

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Campus Innenstadt
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**ANALYSE DER ZYTOTOXISCHEN EIGENSCHAFTEN VON
NATÜRLICH VORKOMMENDEN FLAVONOIDEN
UND DEM ANTIBIOTIKUM BORRELIDIN
AUF MAMMAKARZINOM-ZELLEN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Diana Gabriela Gafiuc

aus

Rottweil

2016

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christian Schindlbeck
Prof. Dr. Eva-Maria Grischke
Prof. Dr. Stefan Endres
Prof. Dr. Kirsten Lauber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ansgar Brüning

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2016

Meinen geliebten Wegbegleitern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	10
1.1	EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK.....	10
1.2	FLAVONOIDE	13
1.2.1	<i>Herkunft und Systematik der Einteilung</i>	13
1.2.2	<i>Quercetin</i>	16
1.2.3	<i>Myricetin</i>	19
1.2.4	<i>Taxifolin</i>	21
1.2.5	<i>Apigenin</i>	23
1.2.6	<i>Luteolin</i>	25
1.2.7	<i>Chrysin</i>	27
1.2.8	<i>Baicalein</i>	29
1.3	BORRELIDIN	32
1.4	ZELLBIOLOGIE UND SIGNALWEGE	35
1.4.1	<i>Apoptose und die Bedeutung von Mcl-1</i>	35
1.4.2	<i>Ubiquitin-Proteasom-Signalweg</i>	38
1.4.3	<i>NFκB zwischen Inflammation und Onkogenese</i>	41
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	43
2.1	MATERIALIEN	43
2.1.1	<i>Allgemein verwendete Materialien</i>	43
2.1.2	<i>Untersuchte Substanzen</i>	44
2.1.3	<i>Für die Zellkultur verwendete Materialien</i>	45
2.1.4	<i>Für die zellbasierten Assays verwendete Materialien</i>	46
2.1.5	<i>Für die Proteinbiochemie verwendete Materialien</i>	47
2.1.6	<i>Für die Molekularbiologie verwendete Materialien</i>	50
2.2	METHODEN	53
2.2.1	<i>Kultivierung der Tumorzellen</i>	53
2.2.2	<i>Generierung von Spheroiden</i>	54
2.2.3	<i>Phasenkontrastmikroskopie</i>	55
2.2.4	<i>Kernfärbung mit Hämatoxylinlösung nach Gill II</i>	55
2.2.5	<i>Clonal Assay</i>	56
2.2.6	<i>MTT-Assay</i>	56
2.2.7	<i>ATP-Assay</i>	57
2.2.8	<i>Proteasomassay</i>	57
2.2.9	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	58
2.2.10	<i>SDS-PAGE-Gelelektrophorese</i>	58
2.2.11	<i>Western Blot (Immunoblot)</i>	60
2.2.12	<i>RNA-Isolierung aus Zellen</i>	62
2.2.13	<i>cDNA-Synthese</i>	64
2.2.14	<i>PCR</i>	65
2.2.15	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	66
3	ERGEBNISSE	69
3.1	FLAVONOIDE UND IHRE WIRKUNGEN AUF MAMMAKARZINOM-ZELLEN	69
3.1.1	<i>Zellüberlebensstudien</i>	69

3.1.2	<i>Zytomorphologie</i>	74
3.1.3	<i>Aktivität des Proteasoms</i>	77
3.1.4	<i>Zielproteine des Proteasoms</i>	80
3.1.5	<i>Apoptose</i>	82
3.1.6	<i>Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB</i>	86
3.1.7	<i>Wirkungen der Flavonoide in der Übersicht</i>	87
3.2	BORRELIDIN UND SEINE WIRKUNG AUF AUSGEWÄHLTE MALIGNEN SOWIE NICHT-MALIGNEN ZELLEN 89	
3.2.1	<i>Zellüberlebensstudien</i>	89
3.2.2	<i>Apoptose</i>	92
3.2.3	<i>Bcl-2-Expression in Borrelidin-resistenten Zelllinien</i>	95
4	DISKUSSION	97
4.1	FLAVONOIDE	97
4.1.1	<i>Erläuterung der anti-neoplastischen Eigenschaften</i>	97
4.1.2	<i>Relation zwischen Wirkung und Struktur</i>	105
4.1.3	<i>Evaluation der Anwendbarkeit einer Therapie mit Flavonoiden in der Praxis</i> .	108
4.2	BORRELIDIN	116
4.2.1	<i>Bedeutung der zytotoxischen Wirkungen auf maligne und nicht-maligne Zellen</i>	116
4.2.2	<i>Einfluss der Bcl-2-Expression auf die Wirksamkeit von Borrelidin und ihre Bedeutung für die Praxis</i>	118
5	ZUSAMMENFASSUNG	122
6	LITERATURVERZEICHNIS	126
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	140
8	TABELLENVERZEICHNIS	142
9	PUBLIKATIONEN	143
10	DANKSAGUNG	144

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4E-BP1 = EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
A	Ampere
A431	human squamous carcinoma cell line (origin: vulva, epidermal carcinoma)
A549	human alveolar adenocarcinoma cell line (origin: lung tissue)
ATP	adenosine triphosphate
BAX	BCL2-associated X-protein
BAK	BCL2 antagonist/killer 1
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-x_L	B-cell CLL/lymphoma-extra large
BID	BH3 interacting domain death agonist
C	Carbon
Cdk1	cyclin-dependent kinase 1
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
ciAP2 = BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3
CO₂	Carbon dioxide
CXCL1 = GROα	chemokine (C-X-C-motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
CXCL10	chemokine (C-X-C-motif) ligand 10
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EA.hy926	endothelial cell line (somatic cell hybrid: fusion of primarily human umbilical vein cells with a thioguanine-resistant clone of A549)
ED₅₀	Effektivdosis
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetal calf serum
GAPDH	glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase
H	Hydrogen
H₂O	Hydrogen oxide

HeLa	human epithelial adenocarcinoma cell line (origin: cervix, Henrietta Lacks)
HepG2	human liver hepatocellular carcinoma cell line
HL-60	human promyelocytic cell line (disease: acute promyelocytic leukemia)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IκBα = NFKIBα	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IE	Internationale Einheit
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
IL1 = IL1A	interleukin 1, alpha
IL7	interleukin 7
IL8 = CXCL8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8
IM-9	human lymphoblastoid cell line (disease: multiple myeloma)
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	low density lipoprotein
M	Molar
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 human breast adenocarcinoma cell line (estrogen receptor positive)
MCF-10A	Michigan Cancer Foundation-10A human non-tumorigenic epithelial cell line (origin: mammary gland)
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
MDA-MB-231	human highly metastatic adenocarcinoma cell line (origin: mammary gland, pleural effusion)
MDA-MB-435	human cancer cell line, cell type: melanocyte/Melanoma (previously described as ductal carcinoma, mammary gland derived from pleural effusion)
MDA-MB-453	human metastatic carcinoma cell line (origin: mammary gland, pericardial effusion)
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTOR	mechanistic target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NaCl	Natriumchlorid

NBT	nitro blue tetrazolium
NFκB = NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
O	Oxygen
O₂	molekularer Sauerstoff
p53 = TP53	tumor protein p53
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PARP = PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
pH	pondus/potentia Hydrogenii
PVDF	polyvinylidene fluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
SDS	sodium dodecyl sulfate
TNF-α = TNF	tumor necrosis factor
tRNA	transfer ribonucleic acid
UV	ultraviolet

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Eine ausgewogene Ernährung mit einem hohen Anteil an Obst und Gemüse wird im Allgemeinen in Verbindung mit einem positiven Effekt auf die Gesundheit und dem Schutz vor Krankheitsentstehung gebracht. Ein beachtlicher Teil der Forschung beschäftigt sich daher seit langer Zeit damit, eben diesen als allgemeingültig angenommenen Sachverhalt experimentell zu bestätigen, durch wissenschaftliches Arbeiten einzelne, dafür verantwortliche Pflanzeninhaltsstoffe zu identifizieren und ihre Wirkungsweisen so gut wie möglich aufzuklären. Bereits in den 1930er Jahren wurde durch Albert von Szent-Györgyi das Augenmerk auf Flavonoide gerichtet. Einige der durch sie hervorgerufenen Effekte, die er beobachten konnte, waren denen der Ascorbinsäure – auch unter dem Namen *Vitamin C* bekannt – ähnlich oder vermochten diese zu ergänzen. An der Isolation und Beschreibung des Vitamins C war er maßgeblich beteiligt gewesen, so dass die neu entdeckten, sekundären Pflanzenstoffe in Anlehnung daran zunächst die Bezeichnung *Vitamin P* erhielten (Scarborough, 1939; Szent-Gyorgyi, 1939). Flavonoide stellen die größte Untergruppe der Polyphenole, einer Gruppe von Substanzen, welche in zahlreichen bekannten Nahrungspflanzen enthalten sind, dar. Ihr ubiquitäres Vorkommen weckte das Interesse der Wissenschaft an ihrer genaueren Erforschung. Bis heute konnten mannigfaltige Wirkungen beschrieben werden, darunter anti-oxidative, entzündungshemmende sowie verschiedene, direkt gegen Krebszellen gerichtete Effekte.

Der Teilbereich der Onkologie besitzt einen hohen Stellenwert in der Frauenheilkunde. Obwohl die weiblichen Geschlechtsorgane eine Vielzahl an möglichen Ursprungsgeweben für maligne Neoplasien darbieten, kommt dem Mammakarzinom nicht nur aus sozialmedizinischen und wissenschaftlichen, sondern vor allem auch aus epidemiologischen Gründen eine besondere Rolle zu. Weltweit erkrankten im Jahr 2012 circa 1,67 Millionen Frauen an Brustkrebs, was ihn zur häufigsten Krebserkrankung bei Frauen macht (J. Ferlay et al., 2013; J. Ferlay et al., 2015). In einer Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts wurden für das Jahr 2014 rund 75.200 Neuerkrankungen allein in Deutschland prognostiziert (Caspritz et al., 2013). Neuesten Schätzungen der American Cancer Society zufolge werden in den Vereinigten Staaten im Jahr 2015 knapp 232.000 Frauen an einem

invasiven Mammakarzinom erkranken (Society, 2015). Dank erkennbarer Fortschritte in den Bereichen Aufklärung, Früherkennung und nicht zuletzt der Therapie stieg nach Statistiken des Tumorregisters München die tumorspezifische 5-Jahres-Überlebensrate zwar von ehemals 84,6% im Zeitraum 1988-1997 auf 88,9% bei Patientinnen mit erhaltener Erstdiagnose in den Jahren 2002-2010 an. Ein gesteigertes 5-Jahres-Überleben verliert allerdings an Bedeutung, berücksichtigt man, dass jede zehnte Frau bei der Diagnosestellung jünger als 45 Jahre ist (*Manual Mammakarzinome*, 2013). Darüber hinaus bleibt das Mammakarzinom trotz dieser erfreulichen Entwicklung weiterhin die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen (J. Ferlay et al., 2013; Society, 2015). Mit dem Hintergrund wachsender Erkenntnisse über die molekularbiologischen Mechanismen der zellulären Entartung und die Tumorbio­logie im Allgemeinen nimmt auch die Anspruchshaltung an die Wissenschaft zu, den Sprung hin zu einer optimalen Krebstherapie möglichst ohne intolerable Nebenwirkungen zu schaffen. Pflanzliche Substanzen scheinen von vielen Menschen als Synonym für „alternative“ Heilmethoden ohne Nebenwirkungen verstanden zu werden. Nicht nur am Beispiel des Chemotherapeutikums Taxol lässt sich diese Sichtweise widerlegen (Schwab, English, Roque, & Santin, 2014). Um diesen Denkansatz allerdings weiter zu verfolgen und den Ansprüchen der Patienten gerecht zu werden, wird die Entwicklung neuer, aus der Natur stammender und zugleich nebenwirkungsärmerer Medikamente angestrebt. So begann rund ein halbes Jahrhundert nach der Erstbeschreibung der Bioflavonoide die intensive Suche nach einer Möglichkeit, diese in moderne Krebstherapien einzubinden. Ihre Verwendung soll dabei nicht als Alternative zur Schulmedizin verstanden werden, sondern vielmehr Evidenz-basiert in Ergänzung dazu Eingang in die präventions- und therapiebezogene Beratung betroffener Patientinnen finden. Hierfür wird die genaue Kenntnis ihrer Wirkungsweise nötig, was jahrelange wissenschaftliche Arbeit auf verschiedenen Ebenen voraussetzt. Die Mehrzahl der veröffentlichten Ergebnisse zu den Flavonoiden spielt sich zurzeit noch im vorklinischen Bereich der Forschungs­labore ab. Einige Versuche an Tiermodellen liefern allerdings bereits positive und damit vielversprechende Resultate für eine zukünftige klinische Anwendung.

Im Hinblick auf die genannten epidemiologischen Hintergründe zum Mammakarzinom und die sich wandelnden Anforderungen an seine Therapie wurde mit dieser Arbeit das Ziel gesetzt, den Einfluss von unterschiedlichen Flavonoiden auf Brustkrebszellen in Zellkultur zu beobachten und ihn auf molekularbiologischer Ebene genauer zu untersuchen. Letztlich gilt es, einen Vergleich zwischen sieben ausgewählten Vertretern anzustellen, um zu differenzieren, von welchen man sich größere Erfolge darin versprechen kann, auch in

niedriger Dosierung noch genügend Wirkung zu zeigen und zugleich unspezifische Toxizität zu vermeiden. Daraus soll zudem abgeleitet werden, welches Flavonoid am ehesten für zukünftige *in vivo*-Studien zur Wirksamkeit bei Patientinnen mit Mammakarzinom in Frage kommt.

Parallel dazu wurden die Wirkungen des natürlich vorkommenden Antibiotikums Borrelidin auf verschiedene, unter anderem der Brustdrüse entstammende Zellarten untersucht. Es handelt sich dabei um ein von bestimmten Bakterienarten gebildetes Stoffwechselprodukt. Seit seiner Entdeckung im Jahr 1949 (Berger, Jampolsky, & Goldberg, 1949) stieg insbesondere im Laufe der letzten Jahrzehnte das Interesse an seiner weiteren Erforschung, als neben seinen zu vermutenden anti-mikrobiellen Eigenschaften sowie seiner starken Potenz gegen bestimmte Erreger der Malaria auch eine Hemmung der Gefäßproliferation beobachtet werden konnte (Bhikshapathi, Shravan Kumar, Madhusudan Rao, & Kishar, 2010). Da diese Eigenschaft in enger Verbindung zu einer potenziellen Wirkung der Substanz gegen maligne Zellproliferation steht, war es ein weiteres Ziel dieser Studie, zu eruieren, ob Borrelidin einen solchen Effekt auf Mammakarzinom-Zellen hat und ob sich Analogien zur Wirkungsweise der Flavonoide finden lassen.

Fragestellungen:

- 1. Welches der untersuchten Flavonoide zeigt die beste Wirkung auf Brustkrebszellen?**
- 2. Auf welche Art und Weise wird Einfluss auf das Zellzyklusgeschehen genommen, und ergeben sich daraus Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien des Mammakarzinoms?**
- 3. Kann man die gewonnenen Erkenntnisse in Zusammenhang mit der chemischen Struktur der Substanzen bringen?**
- 4. Ist eine Zufuhr von Flavonoiden zum Zwecke der Prävention oder der Therapie in die Praxis umzusetzen?**
- 5. Zeigt das Antibiotikum Borrelidin eine spezifische Wirkung gegen Mammakarzinom-Zellen?**

1.2 Flavonoide

1.2.1 Herkunft und Systematik der Einteilung

Pflanzen besitzen die herausragende Eigenschaft, über verschiedene Stoffwechselwege sekundäre Metabolite zu synthetisieren. Es handelt sich dabei um Substanzen, die aus Produkten des Energiestoffwechsels sowie des anabolen oder katabolen Stoffwechsels hervorgehen und per definitionem nicht lebensnotwendig für die Pflanzen sind. Viele dieser sekundären Pflanzenstoffe geben den Blüten und Früchten der Pflanzen ihre charakteristische Farbe, ihren Duft oder Geschmack. Vor allem jedoch besitzen sie bestimmte Eigenschaften, die den Pflanzen selbst erhebliche Überlebensvorteile in Bezug auf schädliche Umwelteinflüsse verschaffen, was sie trotz der prinzipiellen Entbehrlichkeit zu äußerst wertvollen Stoffwechselprodukten macht und ihren hohen Syntheseaufwand rechtfertigt (D. H. Williams, Stone, Hauck, & Rahman, 1989). Unter anderem entstehen auf diesem Wege phenolische Verbindungen, denen das Strukturmerkmal des aromatischen Rings, an den mindestens eine Hydroxygruppe bindet, gemein ist. Einen Großteil dieser Verbindungen stellen die sogenannten Polyphenole. Besonders hervorzuheben ist ihre Fähigkeit, ähnlich wie beispielsweise Vitamin C, freie Radikale abzufangen und somit die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen. Diese und weitere protektive Eigenschaften, auf die im Folgenden noch eingegangen werden wird, machten die Polyphenole zu einem beliebten Forschungsobjekt und, mit Blick auf ihr im Vergleich zu anderen bekannten Antioxidantien größeres Vorkommen in gewöhnlichen Nahrungsmitteln, zu interessanten Kandidaten für vielerlei medizinische Anwendungen (Scalbert, Manach, Morand, Remesy, & Jimenez, 2005). Unter der enormen Anzahl an Polyphenolen bilden die Flavonoide die größte Untergruppe (Croft, 1998). Die Herkunft dieses Namens leitet sich aus früheren Zeiten ab, als zum Färben von Stoffen noch Extrakte bestimmter Pflanzen verwendet wurden. Aus der Rinde der Färbereiche (*Quercus tinctoria*) oder dem Holz des Färbemaulbeerbaumes (*Morus tinctoria*) stellte man so beispielsweise ein Gemisch zum Gelbfärben von Wolle her. Nachdem die verantwortlichen Substanzen identifiziert worden waren, subsummierte man sie unter dem Gruppennamen „Flavone“, abgeleitet vom lateinischen Wort *flavus*, -a, -um für gelb. Später fasste man mit ihnen alle weiteren Pflanzenstoffe, die zwar zum Teil andersfarbig oder gänzlich farblos sind, jedoch eine gleichartige chemische Struktur wie die Ursprungssubstanzen aufweisen, zur Klasse der „Flavonoide“ zusammen (Sticher, 2010). Ihr Grundgerüst besteht aus zwei aromatischen Ringen, die durch eine Brücke aus drei

Kohlenstoff-Atomen (bei den meisten Flavonoiden in einem heterozyklischen Pyranring) verbunden sind (C₆-C₃-C₆), dem Flavan. Der Phenylrest (B-Ring) der Flavonoide sowie einiger weiterer Polyphenole, die gemeinsam unter dem Oberbegriff „Phenylpropanoide“ stehen, findet seinen Ursprung in der Aminosäure Phenylalanin (seltener in Tyrosin) aus dem Shikimisäureweg (Ververidis et al., 2007), während der A-Ring aus dem Acetat-Malonat-Weg der Pflanzen resultiert (Ross & Kasum, 2002). Diese komplexe Struktur der Flavonoide (wodurch sich sekundäre Metaboliten im Allgemeinen auszeichnen) bietet eine Reihe von Ansatzpunkten für zahlreiche Veränderungen, wie zum Beispiel Glykosylierungen, Hydroxylierungen, Methylierungen usw. (Ververidis et al., 2007). Zudem gilt es zu erwähnen, dass die in Pflanzen vorkommenden Flavonoide meist über das C-Atom an Position 3 an Zuckerreste gebunden sind, also in glykosylierter Form, vorliegen. Dies verschafft den sonst in Wasser schlecht bis nicht löslichen Polyphenolen eine bessere Löslichkeit. Die im Folgenden vorgestellten Flavonoide sind definitionsgemäß Aglykone und wurden als solche auch für die Experimente verwendet.

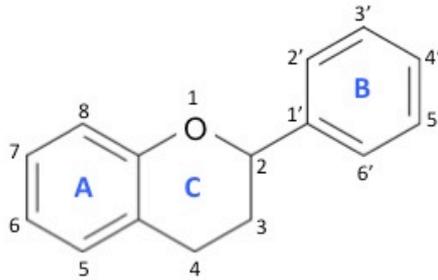


ABBILDUNG 1: DAS FLAVAN-GRUNDGERÜST DER FLAVONOIDE

Zwei aromatische Ringe (A und B) sind durch 3 Kohlenstoffatome in einem heterozyklischen Pyranring (C) miteinander verbunden.

Als Grundlage zur Erstellung dieser Abbildung diente die unter der folgenden Literaturangabe zu findende Grafik: (Becker, 2013). Unter der Veröffentlichung bei Wikimedia Commons gilt diese als gemeinfrei, weswegen ihre Verwendung keine gesonderte Erlaubnis des Urhebers erforderlich macht. Die entsprechenden Modifikationen wurden von der Autorin dieser Arbeit selbst durchgeführt.

Um Ordnung in die Vielfalt der Flavonoide zu bringen (bereits 1990 waren mehr als 5000 Untergruppen bekannt) (Ross & Kasum, 2002), erscheint es sinnvoll, sie nach weiteren Strukturmerkmalen einzuteilen. Die mannigfaltigen Möglichkeiten der Variation des Ringsystems und seiner Substituenten bringen vielerlei Gruppierungssysteme zutage. Die gängige Einteilung nach Veränderungen am C-Ring in die sechs Hauptgruppen Flavone, Flavonole, Flavanone, Flavanole (oder Catechine), Anthocyanidine und Isoflavone (Kelly, 2011; Manach, Scalbert, Morand, Remesy, & Jimenez, 2004; Ross & Kasum, 2002) bietet sich hier aus praktischen Gründen nicht an. Daher wird im Folgenden zunächst eine grobe Einteilung gemäß Ververidis vorgenommen, welche sich an der Art der Verknüpfung der Phenylgruppe an das Benzopyranringsystem orientiert (Ververidis et al., 2007). Daraus ergibt sich eine Hauptgruppe unter den Flavonoiden (2-Phenylbenzopyrane) sowie die Gruppen der Isoflavonoide (3-Benzopyrane), Neoflavonoide (4-Benzopyrane) und schließlich eine Nebengruppe. Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen lassen sich gänzlich der Hauptgruppe zuordnen, deren weitere Unterteilung sich aus dem Fehlen oder Vorhandensein einer Hydroxygruppe an Position 3 des Flavangerüsts ergibt (Brown, 1980). Tabelle 1 veranschaulicht die Systematik der Nomenklatur in Verbindung mit der chemischen Struktur. Es wird darauf hingewiesen, dass nur die für die Studie relevanten und zum besseren Verständnis notwendigen Untergruppen aufgezeigt werden und aus Gründen der Übersicht an dieser Stelle auf Vollständigkeit verzichtet werden muss.

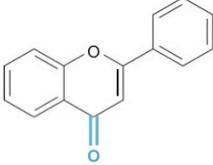
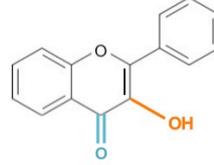
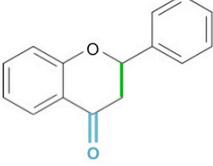
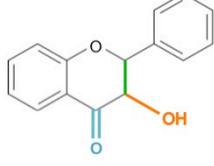
3-Desoxyflavonoide	3-Hydroxyflavonoide
<p>Flavone</p>  <p>Beispiele:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Apigenin - Luteolin - Chrysin - Baicalein 	<p>Flavonole</p>  <p>Beispiele:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Quercetin - Myricetin - Kaempferol
<p>Flavanone</p>  <p>Beispiele:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hesperitin - Naringenin - Eriodictyol 	<p>Flavanonole</p>  <p>Beispiele:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dihydroquercetin (= Taxifolin) - Dihydromyricetin - Dihydrokaempferol

TABELLE 1: HAUPTGRUPPE DER FLAVONOIDE

Unterteilung in 3-Desoxyflavonoide und 3-Hydroxyflavonoide je nach Fehlen oder Vorhandensein einer Hydroxygruppe am C-Atom an Position 3 des C-Rings. Weitere Subgruppierung in Flavone, Flavanone, Flavonole und Flavanonole nach Vorkommen einer Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 am C-Ring. Flavanole (auch Catechine genannt) und Anthocyanidine bezeichnen weitere Untergruppen, die für diese Arbeit jedoch nicht von Bedeutung sind. Die verwendeten Substanzen sind hervorgehoben.

Als Grundlage zur Erstellung dieser Abbildung diente die unter der folgenden Literaturangabe zu findende Grafik: (Becker, 2013). Unter der Veröffentlichung bei Wikimedia Commons gilt diese als gemeinfrei, weswegen ihre Verwendung keine gesonderte Erlaubnis des Urhebers erforderlich macht. Die entsprechenden Modifikationen wurden von der Autorin dieser Arbeit selbst durchgeführt.

1.2.2 Quercetin

Das Flavonol Quercetin ist das bekannteste und am umfassendsten erforschte Flavonoid. Die Hauptursache dafür liegt darin, dass es verglichen mit den anderen Flavonoiden in unserer Ernährung am weitesten verbreitet ist (Cao, Zhang, Chen, & Zhao, 2010) und dabei vor allem auch in gewöhnlichen, häufig konsumierten Nahrungsmitteln vorkommt. So enthalten heimische Obstsorten wie Äpfel, Trauben und Beeren, zahlreiche Gemüsesorten (zum Beispiel Zwiebeln, Tomaten und Kapern) aber auch Teeblätter und die Heilpflanzen *Ginkgo biloba* und *Hypericum perforatum* (Echtes Johanniskraut) einen erwähnenswerten Anteil an Quercetin (Kelly, 2011). Bei Äpfeln der Sorte „Golden Delicious“ beträgt dieser beispielsweise 3,69mg/100g, bei roten Zwiebeln sogar 39,21mg/100g (U.S. Department of Agriculture, 2013). Die durchschnittliche Aufnahme von Quercetin wurde in einer großen Studie bereits vor etwa 20 Jahren mit 16mg pro Tag beziffert. Dabei soll der Großteil aus

Tee, Zwiebeln und Äpfeln stammen (M. G. Hertog, Hollman, Katan, & Kromhout, 1993). Unter anderem in einer Arbeit von Cao et al. wird jedoch deutlich, dass interindividuelle Schwankungen der Quercetin-Aufnahme keinesfalls zu vernachlässigen sind. Im Mittel zeigte sie hier ein Spektrum von 0-50,74mg/Tag auf, was insbesondere auf Unterschiede in der Präferenz der durch die Probanden konsumierten Nahrungsmittel zurückzuführen war (Cao et al., 2010). Man kann festhalten, dass Quercetin zwar das am häufigsten vorkommende Flavonoid ist, dass es allerdings in den meisten Nahrungsmitteln in so geringer Konzentration enthalten ist (im Unterschied zu einigen bestimmten Nahrungsmitteln, die sehr große Mengen an Quercetin enthalten), dass daraus kaum allgemeingültige Rückschlüsse auf die Gesamtaufnahme gezogen werden können. Abgesehen von der Tatsache, dass diese stark von der individuellen Auswahl an konsumierten Nahrungsmitteln sowie deren Quantität abhängt, haben unter anderem auch der Reifegrad, die Lagerung und Verarbeitung bzw. die Zubereitung der jeweiligen Obst- und Gemüsesorten einen enormen Einfluss auf die Menge an enthaltenen und bioverfügbaren Flavonoiden (Manach et al., 2004). Schließlich scheinen auch individuelle Faktoren des Stoffwechsels die Resorption zu begünstigen oder zu behindern (Manach, Williamson, Morand, Scalbert, & Remesy, 2005). Ein weiterer Grund für die Popularität des Flavonols Quercetin ist, dass ihm eine Vielzahl an gesundheitsfördernden Eigenschaften nachgesagt wird. Seit Langem propagiert ist seine anti-oxidative Wirkung, welche die potenteste unter allen Flavonoiden sein soll und die sich gut mit der chemischen Struktur des Moleküls korrelieren lässt (Boots, Haenen, & Bast, 2008). Dabei spielen vor allem die beiden in ortho-Position stehenden Hydroxygruppen am B-Ring und die konjugierte Doppelbindung in Zusammenhang mit der Ketogruppe des C-Rings eine Rolle bei der Stabilisierung des konjugierten Ringsystems und dem Abfangen freier Radikale. Deren Fähigkeit, über multiple Reaktionen oxidativen Stress in der Zelle auszulösen, wird dadurch behindert (Croft, 1998). Betrachtet man die Rolle der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Entzündungsgeschehen (zum Beispiel über die Aktivierung von NFκB oder die Bildung von IL8 sowie weiterer Entzündungsmediatoren), wird deutlich, dass diese Wirkweise der Flavonoide auch ein wichtiger Mechanismus bei der Protektion gegen inflammatorische Prozesse ist (Boots et al., 2008). Die anti-entzündlichen Eigenschaften werden außerdem mit der *in vitro* und *in vivo* im Tierexperiment gezeigten Drosselung von TNF-α begründet (Kelly, 2011). Es besteht jedoch ein deutlicher Mangel an *in vivo*-Studien über den gesundheitlichen Nutzen von Quercetin für den Menschen. In den wenigen durchgeführten Studien ließen sich zum Teil keine Effekte des Flavonols verzeichnen, wobei aber nur gesunde Probanden einbezogen waren oder keine adäquaten Parameter erhoben wurden,

um solche überhaupt evaluieren zu können. Ergebnisse aus Studien, die auch erkrankte Personen miteinbezogen, lassen vermuten, dass ein vorgeschädigter Organismus eher von einer Quercetin-Zufuhr profitiert als ein gesunder (Boots et al., 2008). Dies wird auch durch die Studie von Edwards et al. bestätigt, in welcher ein signifikanter, anti-hypertensiver Effekt von Quercetin bei Grad-1-Hypertonikern, nicht aber bei normotensiven Probanden zu beobachten war (Edwards et al., 2007). Doch trotz des mangelnden Nachweises der zu erwartenden Wirkungen am Menschen scheint ein protektiver Effekt im Rahmen eines Entzündungsgeschehens unumstritten. Daher findet Quercetin sogar klinische Anwendung in der Therapie der chronischen Prostatitis (Shoskes & Nickel, 2011). Weitere, immer wieder im Zusammenhang mit Quercetin (und mitunter auch anderen Polyphenolen) genannte, positive Gesundheitseffekte sind der Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen (insbesondere Hypertonie) und deren Therapie, anti-fibrotische, anti-bakterielle/-virale, neuro-protektive und anti-proliferative Eigenschaften der Substanz. Immer häufiger stellt sich auch die Frage nach einer anti-neoplastischen Wirkung, welche gerade die Flavonoide in den letzten Jahren immer stärker in das Interesse der Öffentlichkeit gerückt und zu einem beliebten Objekt der Krebsforschung gemacht hat (Boots et al., 2008; Brown, 1980; Brüning, 2012; Kelly, 2011; Ross & Kasum, 2002). Auf einzelne Mechanismen, über welche durch Flavonoide ein inhibierender Einfluss auf Tumorentstehung, -wachstum und -ausbreitung genommen werden kann, wird im Verlauf der Arbeit intensiver eingegangen werden. Nicht zuletzt dient die hier vorliegende Studie auch der genaueren Erforschung der Interaktion zwischen Flavonoiden und Transduktoren in bekannten Signalwegen des Zellwachstums. Abschließend soll noch darauf hingewiesen werden, dass viele Studien auch unerwünschte oder sogar schädliche Effekte von Quercetin zutage gebracht haben. So scheint es unter Umständen als Pro-Oxidans und zytotoxisch wirken zu können. An mancher Stelle wird auch eine Fähigkeit zur DNA-Schädigung beschrieben (Boots et al., 2008; Brüning, 2012; Croft, 1998). In der Evaluation der Ergebnisse dieser Arbeit werden diese Erkenntnisse in Hinblick auf eine mögliche Anwendung beim Mammakarzinom berücksichtigt werden.

Die nachfolgende Darstellung von Quercetin soll zum besseren Verständnis gereichen. Die anti-oxidativ wirksamen Strukturbestandteile sind jeweils hervorgehoben. Durch diese wird die Fähigkeit des Moleküls verstärkt, Elektronen zu delokalisieren (Croft, 1998). Sie können sich somit über mehrere Kohlenstoffatome verteilen und verlieren im Zuge dessen an – potenziell schädlicher – Energie.

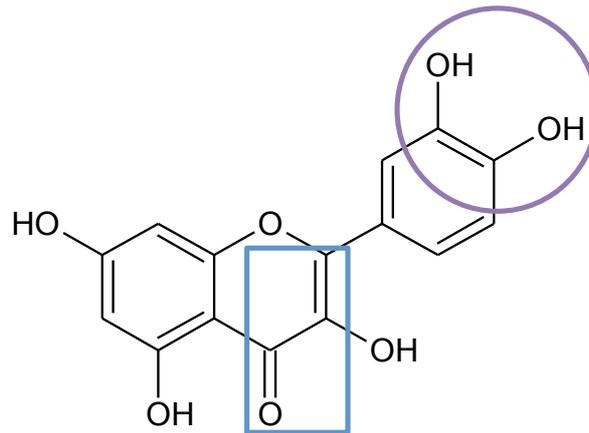


ABBILDUNG 2: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONOLS QUERCETIN (= 3,3',4',5,7-PENTAHYDROXYFLAVON)

Charakteristisch zur Unterscheidung von anderen Flavonolen sind die Hydroxygruppen an den Positionen 3', 4', 5 und 7. Die Katecholgruppe (an Stelle 3' und 4' des B-Rings in ortho-Position stehende Hydroxygruppen) (violetter Kreis) sowie die konjugierte Doppelbindung mit Bezug zur Ketogruppe am C-Ring (blaues Rechteck) stellen die anti-oxidativ wirksamen Gruppen des Moleküls dar.

1.2.3 Myricetin

Myricetin gehört, wie auch Quercetin, zur Untergruppe der Flavonole. Im Unterschied zu diesem besitzt es eine zusätzliche Hydroxygruppe an Position 5' des B-Rings. Verschiedene Beerenarten (vor allem schwarze Johannisbeeren), Persimone, Petersilie, Favabohnen und Steckrüben stellen wichtige Quellen für Myricetin dar, wobei es insgesamt deutlich weniger verbreitet ist als Quercetin und sein Anteil in den meisten Fällen geringer ist. Zum Beispiel beläuft sich der Gehalt an Myricetin in Cranberries auf 6,63mg/100g im Vergleich zu 14,84mg/100g Quercetin (U.S. Department of Agriculture, 2013). Eine besondere Rolle kommt diesem Flavonol jedoch als Inhaltsstoff des Rotweins zu, der seit Langem für seinen Reichtum an Polyphenolen bekannt ist (Morales & Haza, 2012; U.S. Department of Agriculture, 2013). Unter günstigen Bedingungen, das heißt bei der Verwendung von Trauben mit einem hohen Verhältnis von Schalendicke zu Volumen, die möglichst lange und unter viel Sonneneinstrahlung reifen konnten und die mit modernen Methoden der Weinherstellung verarbeitet wurden, kann so der Gehalt an Flavonoiden wie zum Beispiel bei einem chilenischen Cabernet Sauvignon bis zu über 40mg pro Liter erreichen. Diese Bedingungen erklären sich dadurch, dass Flavonoide vor allem in den Schalen der Früchte vorkommen und als wichtige UV-B-Protektoren von den Pflanzen bei hoher Sonnenbelastung vermehrt gebildet werden.

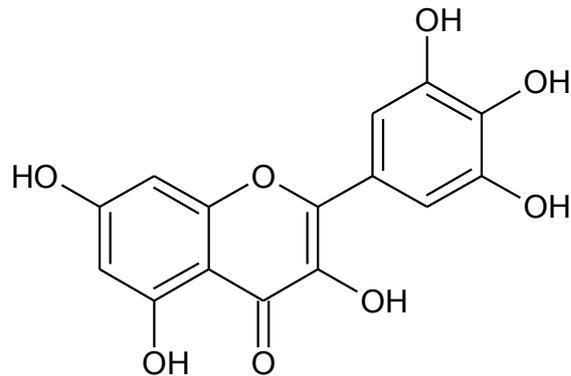


ABBILDUNG 3: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONOLS MYRICETIN (=3,3',4',5,5',7-HEXAHYDROXYFLAVON)

Charakteristisch zur Unterscheidung von anderen Flavonolen sind die Hydroxygruppen an den Positionen 3', 4', 5, 5' und 7.

Zu erwähnen gilt es außerdem, dass allein Quercetin und Myricetin einen Prozentsatz von 20-50% aller im Rotwein vorkommenden Flavonole einnehmen, weshalb sie erheblich zu dessen reichlich propagierten protektiven Effekten beitragen, was durch die zunehmend auf Resveratrol (ebenfalls ein im Rotwein vorhandenes Polyphenol) gelenkte Aufmerksamkeit maskiert werden könnte (McDonald et al., 1998). Überraschenderweise findet man in Rotwein einen besonders hohen Anteil an freien, ungebundenen Flavonoiden, während diese in Obst und Gemüse, wie bereits erwähnt, meist in glykosylierter Form vorliegen. Die Tatsache, dass die freien Moleküle ein stärkeres antioxidatives und Plättchenaggregations-hemmendes Verhalten zeigen als gebundene, lässt sich gut damit vereinbaren, dass insbesondere für Rotwein – unter der Voraussetzung eines gemäßigten Konsums – schon vielfach ein protektiver Einfluss auf das Auftreten einer Koronaren Herzerkrankung (KHK) oder auf die daraus resultierenden kardiovaskulären Ereignisse, beispielsweise auf einen ischämischen Schlaganfall, gezeigt werden konnte (St Leger, Cochrane, & Moore, 1979; Stampfer, Colditz, Willett, Speizer, & Hennekens, 1988). Besonders deutlich wird dies am Beispiel des sogenannten *French paradox*, wodurch der Umstand bezeichnet wird, dass epidemiologische Studien in der französischen Bevölkerung eine signifikant geringere Mortalitätsrate infolge einer KHK zutage brachten, obwohl die Aufnahme von gesättigten Fettsäuren vergleichbar ist mit jener in anderen industrialisierten Staaten, wie zum Beispiel den USA, Großbritannien und Deutschland (Renaud & de Lorgeril, 1992). Es existieren vielfältige Erklärungsansätze für dieses Phänomen. Renaud und de Lorgeril gelang es zu zeigen, dass sich unter allen untersuchten Nahrungsmitteln allein bei den Fetten aus Milchprodukten sowie bei Wein eine signifikante

Korrelation zur KHK-Mortalität ergab. Dabei ging ein höherer Konsum an Milchprodukten mit einer gesteigerten Mortalitätsrate einher, während Wein zu dieser negativ korreliert war, also einen protektiven Effekt aufwies (Renaud & de Lorgeril, 1992). Der höhere Weinkonsum in Frankreich könnte demnach eine mögliche Erklärung für das vermeintliche Paradoxon darstellen. Zusammengefasst konnte für Myricetin experimentell eine antioxidative, anti-neoplastische, anti-virale sowie die bereits erwähnte Plättchenaggregationshemmende und damit anti-thrombotische Wirkung präsentiert werden (Ong & Khoo, 1997). Ein direkter Zellschaden durch Apoptose-Induktion ließ sich in einer Studie auf verschiedenen Wegen an den Leukämiezellen HL-60, nicht aber an den parallel untersuchten Leberzellkarzinom-Zellen HepG2 zeigen (Morales & Haza, 2012). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Myricetin zwar eine wertvolle Rolle in der Tumorthherapie spielen könnte, dass sein Effekt jedoch stark von der betreffenden Zellart abhängt. Darüber hinaus gilt es zu beachten, dass sich – ebenso wie bei Quercetin – auch bei Myricetin konträre Effekte, im Sinne von pro-oxidativen, mutagenen und unter bestimmten Voraussetzungen auch DNA-schädigenden Eigenschaften beobachten ließen (Ong & Khoo, 1997). Aller Vermutung nach handelt es sich dabei sowohl im Fall von Myricetin als auch bei den anderen Flavonoiden um eine Frage der richtigen Dosierung. Welche wichtigen Folgen sich daraus für eine therapeutische Verwendung oder eine nutritive Supplementierung ergeben, wird im Folgenden noch diskutiert werden.

1.2.4 Taxifolin

Für die Untergruppe der Flavanonole findet man in der Literatur auch den Namen 2,3-Dihydroflavonole. Darin wird zum Ausdruck gebracht, dass es zu jedem Flavonol ein entsprechendes Flavanonol gibt, bei welchem sich die Hydroxygruppen an denselben Stellen des Ringsystems befinden, dem allerdings die 2,3-Doppelbindung im C-Ring fehlt. Das Analogon zu Quercetin heißt somit 2,3-Dihydroquercetin und ist ebenfalls bekannt unter dem Namen Taxifolin. Es kommt natürlicherweise, wie auch sein Oxidationsprodukt Quercetin, in Zwiebeln vor. Aus ihnen lassen sich sowohl das reine Flavanonol als auch einige seiner Glykoside isolieren. Obwohl Quercetin und mindestens 24 weitere Flavonole den Hauptanteil der Flavonoide in Zwiebeln bilden, kann der Anteil an Taxifolin je nach Sorte dennoch beträchtlich sein. Pro kg Frischgewicht enthalten rote Zwiebeln generell circa 415-1917mg Flavonoide. Bei der Sorte „Tropea“ beispielsweise nimmt der Gehalt an Taxifolin nahezu 100mg davon ein (Slimestad, Fossen, & Vagen, 2007).

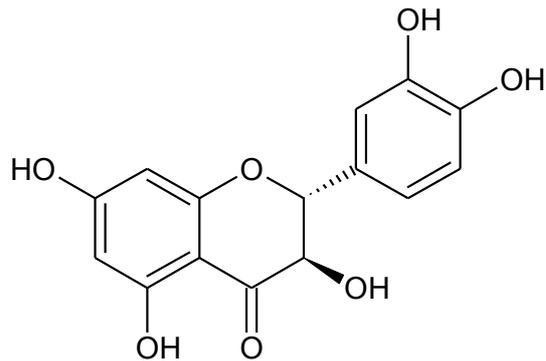


ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVANONOLS TAXIFOLIN (=3,3',4',5,7-PENTAHYDROXYFLAVANON)

Bei gleichem Hydroxylierungsmuster wie jenes von Quercetin erklärt die fehlende Doppelbindung zwischen den C-Atomen der Positionen 2 und 3 und damit das Vorkommen zweier zusätzlicher H-Atome die gängige Bezeichnung Dihydroquercetin.

Außerdem findet man Taxifolin als Bestandteil mehrerer bekannter Pflanzenextrakte. Exemplarisch sei an dieser Stelle die Mariendistel (*Silybum marianum*) genannt. Sie gilt seit vielen Jahren als bewährtes Phytotherapeutikum mit leberprotektiven Eigenschaften. Das Extrakt aus ihren Früchten und Samen namens Silymarin enthält eine Reihe an Flavonolignanen, ebenfalls zu den Pflanzenphenolen gehörende Substanzen (Ververidis et al., 2007), und ein einziges Flavonoid, nämlich Taxifolin. Obwohl Silibinin als vorherrschender Teil des Extraktes betrachtet wird, gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass Taxifolin dessen Wirkung, insbesondere durch seine anti-oxidativen Eigenschaften, maßgeblich unterstützt (Weidmann, 2012). Silymarin findet Anwendung als Antidot bei einer Knollenblätterpilzvergiftung sowie in der supportiven Therapie chronischer Lebererkrankungen, wie zum Beispiel der alkoholischen aber auch der nicht-alkoholischen Fettleber, der Leberzirrhose und sogar der chronischen viralen Hepatitiden (Hackett, Twedt, & Gustafson, 2013). Auch im Pycnogenol, einem Extrakt aus der Rinde der französischen Seekiefer, stellt Taxifolin einen Wirkstoff dar. Wegen seiner vielfältigen Wirkungsweisen, wie dem Schutz gegen (vor allem UV-induzierten) oxidativen Stress, leichten anti-hypertensiven Eigenschaften durch eine Hemmung des Angiotensin-converting Enzyms, einer Erweiterung der kleinen Gefäße durch vermehrte Stickoxid-Bildung in Endothelzellen und spasmolytischen Effekten (Rohdewald, 2002), wird es als Nahrungsergänzungsmittel zur Behandlung einer Reihe von Beschwerden propagiert. Dazu zählen verschiedene Herzerkrankungen, die chronische venöse Insuffizienz, der Diabetes mellitus und seine Folgeerkrankungen, prämenstruelle Beschwerden, sexuelle Dysfunktionen sowie altersbedingte Hautveränderungen, um nur einige wenige zu nennen (Maimoona, Naeem, Saddiqe, & Jameel, 2011). Taxifolin entfaltet seine Wirkung dabei vermutlich insbesondere

durch die Fähigkeit, freie Radikale abzufangen. Die für die Stabilisierung der reaktionsfreudigen Moleküle notwendigen Struktureigenschaften wurden bereits bei Quercetin erklärt. Sie lassen sich bis auf die erwähnte Doppelbindung im C-Ring auch bei Taxifolin finden. Deren Nichtvorhandensein scheint jedoch nahezu unumstritten der Grund dafür zu sein, dass die anti-oxidativen Eigenschaften von Quercetin, aber auch der anderen Flavonole, die von Taxifolin reproduzierbar um ein Vielfaches übersteigen (Weidmann, 2012). Auch weitere, spezifischere Wirkungsweisen des Flavanonols wurden bereits untersucht und experimentell bestätigt. So gibt es Hinweise darauf, dass Taxifolin die LDL-Konzentration im Körper zu senken vermag und somit auch kardioprotektiv wirken könnte. Im Hinblick auf anti-tumorale Effekte werden beispielsweise eine Induktion von entgiftenden Phase-II-Enzymen auf transkriptioneller Ebene sowie eine Hemmung der Gefäßproliferation beschrieben (Weidmann, 2012). Auch im Folgenden wird sich das Augenmerk auf derartige Interaktionen von Dihydroquercetin im Metabolismus von Brustkrebszellen richten, wobei diese mit jenen sechs weiterer Flavonoide verglichen werden wird, um festzustellen, ob sich die untergeordnete Position der Substanz beim Abfangen freier Radikale auch auf andere Wirkmechanismen übertragen lässt.

1.2.5 Apigenin

Als Hauptvertreter der Untergruppe der Flavone ist der Pflanzenstoff Apigenin zu nennen. Er ist in Nahrungspflanzen zwar weitaus weniger ubiquitär vorhanden als beispielsweise Quercetin, allerdings ist seine Konzentration dort, wo er zu finden ist, fast immer sehr hoch. Die raren essbaren Quellen von Apigenin umfassen Gemüse- und Gewürzpflanzen wie roten Paprika, Sellerie und Thymian (Manach et al., 2004; Ross & Kasum, 2002). Der mit Abstand höchste Gehalt verbirgt sich jedoch in Petersilie mit über 200mg pro kg Frischgewicht (U.S. Department of Agriculture, 2013). Darüber hinaus lässt sich Apigenin auch aus dem Echten Johanniskraut und der Kamillenblüte isolieren (Shukla & Gupta, 2010), welche beide bekannte Beispiele dafür darstellen, dass Apigenin seit vielen Jahrzehnten bereits Anwendung in der Phytotherapie findet. Kamillentee kann bis zu 1,2% Apigenin enthalten (Shukla & Gupta, 2010) und generell als wichtigste Quelle für die Zufuhr des Flavons im Rahmen einer üblichen Ernährung betrachtet werden. Die Erkenntnisse der *Zutphen Elderly Study* stehen im Einklang dazu. In ihr wird beschrieben, dass der Hauptteil (circa 60%) aller untersuchten Flavonoide durch Tee aufgenommen wurde (M. G. L. Hertog, Feskens, Hollman, Katan, & Kromhout, 1993).

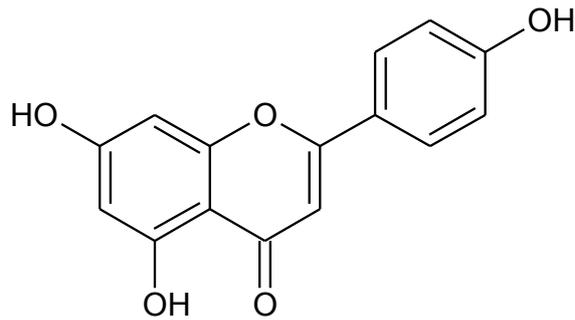


ABBILDUNG 5: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONS APIGENIN (= 4',5,7-TRIHYDROXYFLAVON)

Das Hauptmerkmal dieser Untergruppe bildet die 2,3-Doppelbindung im C-Ring bei fehlender Hydroxylierung des Kohlenstoffatoms an Position 3. Charakteristisch zur Unterscheidung von anderen Flavonen sind die Hydroxygruppen an den Kohlenstoffatomen der Positionen 4', 5 und 7.

Bereits 1986 beschrieb eine Arbeitsgruppe anti-mutagene Eigenschaften des Flavons Apigenin (Birt, Walker, Tibbels, & Bresnick, 1986). Unter der Vielzahl an Flavonoiden gewann es allerdings erst dann besonders an Bedeutung, als beobachtet worden war, dass es in relevantem Maße die Zellproliferation von Prostatakrebszellen inhibieren konnte, ohne jedoch vergleichbare Effekte in normalen Prostataepithelzellen hervorzurufen (S. Gupta, Afaq, & Mukhtar, 2001). Der Vergleich der Zellarten ergab, dass die entarteten Zellen sensitiver, das heißt bei geringeren Konzentrationen und mit geringerem Überleben, auf eine Behandlung mit Apigenin reagierten, während nur ein Teil der nicht-malignen Zellen und dieser erst bei höheren Konzentrationen abzustarben begann. Diese Erkenntnisse ließen sich auch auf ein weiteres Experiment übertragen, in dem normale Keratinozyten im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomzellen der Haut mit Apigenin behandelt wurden. Hierbei zeigte das Flavon keinerlei (negativen) Einfluss auf das Zellwachstum der Epidermiszellen, während die malignen Zellen bereits bei den geringsten getesteten Konzentrationen apoptotisch wurden (S. Gupta et al., 2001). Daneben scheint Apigenin sogar explizit gesunde Zellen zu schützen. Plaumann et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Wirkungen von Apigenin, Luteolin und Quercetin auf das Tumorsuppressor-Gen p53 und stellten fest, dass Apigenin den „Wächter des Genoms“ in nicht-malignen Zellen zu stabilisieren vermochte (Plaumann, Fritsche, Rimpler, Brandner, & Hess, 1996). Des Weiteren werden an vielen Stellen anti-oxidative, anti-inflammatorische, proliferationshemmende, Plättchenaggregations-hemmende und viele weitere Eigenschaften beschrieben, die Apigenin mit anderen Flavonoiden gemeinsam hat. Hervorzuheben ist jedoch, dass einige davon, wie zum Beispiel die Fähigkeiten, freie Radikale abzufangen, die Bildung von Phase-II-Enzymen zu induzieren und sogar die Lungenmetastasierung beim malignen Melanom zu verhindern, bereits auch an *in vivo*-

Tumormodellen gezeigt wurden (Patel, Shukla, & Gupta, 2007; Shukla & Gupta, 2010). Aus diesen Beobachtungen wächst die Hoffnung, in Apigenin einen natürlichen Wirkstoff gefunden zu haben, der im Gegensatz zu anderen verwandten Substanzen bei einer nur geringen Toxizität eine erstaunliche Selektivität für entartete Zellen aufweist, was die weitere Forschung an ihm im Bereich der Chemoprävention vielversprechend erscheinen lässt (Patel et al., 2007). Ob dies auch bei Mammakarzinom-Zellen der Fall ist, wurde in dieser Arbeit untersucht.

1.2.6 Luteolin

Das Flavon Luteolin gehört unter den Flavonoiden zu denjenigen, die nur zu einem relativ geringen Teil durch die tägliche Ernährung aufgenommen werden. Bei einer geschätzten Tagesaufnahme von bis zu mehreren hundert mg an Flavonoiden insgesamt beläuft sich der Anteil der Flavone auf nur circa 1mg pro Tag. Davon wiederum nimmt Apigenin etwa 90% ein, so dass die Luteolin-Fraktion kaum mehr als 0,1mg betragen kann (Seelinger, Merfort, Wolfle, & Schempp, 2008). Die wichtigsten Nahrungsquellen stellen dabei (ähnlich wie für Apigenin) Sellerie, Paprikaschoten, Thymian, Oregano und Salbei dar (U.S. Department of Agriculture, 2013). Darüber hinaus erlangte Luteolin als wirksamer Inhaltsstoff im Extrakt des Artischockenblattes, eines bekannten Phytotherapeutikums, an Bedeutung. Dieses findet in der Behandlung verschiedener gastrointestinaler Beschwerden, wie zum Beispiel der funktionellen Dyspepsie, Anwendung, wobei es seine Effekte insbesondere durch die Unterstützung der Leber- und Gallenblasenfunktion mittels Förderung der Gallenexkretion entfaltet (Gebhardt, 2001). Des Weiteren zeigte sich *in vitro* eine Senkung der endogenen Cholesterinproduktion (Gebhardt, 1998), die in ihrer Tendenz auch im Rahmen randomisierter klinischer Studien nachvollzogen werden konnte (Wider, Pittler, Thompson-Coon, & Ernst, 2013) und somit Luteolin in das Licht eines Wirkstoffes zur Senkung einer Hypercholesterinämie und zur Vermeidung der damit verbundenen Komplikationen rückt. Neben diesen besonderen Eigenschaften des Flavons werden ihm an unzähligen Stellen viele mit den anderen bisher genannten Flavonoiden gemeinsame Effekte zugeordnet. Wie diese schützt es die Zelle vor schädlichen freien Radikalen, greift protektiv in verschiedene Signalwege des Entzündungsgeschehens ein (Seelinger, Merfort, & Schempp, 2008) und hemmt (*in vitro* und *in vivo*) eine unkontrollierte Zellproliferation unterschiedlicher Tumorentitäten (Lin, Shi, Wang, & Shen, 2008).

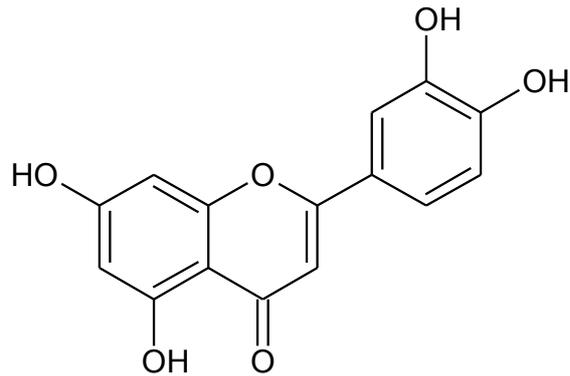


ABBILDUNG 6: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONS LUTEOLIN (= 3',4',5,7-TETRAHYDROXYFLAVON)

Charakteristisch zur Unterscheidung von anderen Flavonoiden ist das Hydroxylierungsmuster an den Positionen 3',4',5 und 7.

Das Bemerkenswerte daran ist, dass Luteolin in vielen komparativen Experimenten in seiner Potenz den strukturverwandten Flavonoiden überlegen ist, was angesichts der quantitativen Inferiorität zunächst verwunderlich erscheint (Seelinger, Merfort, Wolfle, et al., 2008). In einer Studie von Huang et al. konnte Luteolin das Wachstum der epidermoiden Karzinom-Zelllinie A431 mit der im Vergleich zu sieben weiteren Flavonoiden geringsten Konzentration hemmen, dicht gefolgt von Quercetin (Huang et al., 1999). Diese Beobachtungen wurden daraufhin unter anderem an einer Leberzellkarzinom- (HepG2) und einer Mammakarzinom-Zelllinie (MCF-7) bestätigt (Huang et al., 1999). Unter 27 miteinander verglichenen Flavonoiden aus Zitrusfrüchten, darunter auch Quercetin, Apigenin und Taxifolin, beschreibt die Arbeitsgruppe um Kawaii et al. in ihrer Arbeit für Luteolin die stärkste inhibitorische Wirkung auf das Wachstum nahezu aller untersuchten Krebszelllinien, ohne jedoch einen vergleichbaren Einfluss auf normale Zellen festzustellen (Kawai, Tomono, Katase, Ogawa, & Yano, 1999). Passend zu dieser scheinbar selektiven Wirkung auf Tumorzellen soll noch erwähnt werden, dass *in vivo*-Experimente an Ratten keine offenkundige Toxizität nach einer Langzeitbehandlung mit Luteolin zutage gebracht haben (Lin et al., 2008). Diese Beobachtungen fördern das Verständnis für die vielversprechenden Hoffnungen, die in eine Behandlung mit Luteolin gesetzt werden könnten. Ob das Flavon mit seinen anti-tumoralen Wirkungen auf Mammakarzinom-Zellen gegen die hier untersuchten Flavonoide Stand hält, ist Teil der vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden ermittelt werden.

1.2.7 Chrysin

Einen natürlicherweise in ähnlich geringer Menge vorhandenen Vertreter der Flavone stellt der Pflanzenstoff Chrysin dar. Sein Vorkommen beschränkt sich in nennenswerter Weise lediglich auf die Passionsblume *Passiflora coerulea* (Wolfman, Viola, Paladini, Dajas, & Medina, 1994), den Bienenhonig und Propolis, auch bekannt als Bienenwachs (Walle, Galijatovic, & Walle, 1999). Beim Letztgenannten handelt es sich um eine von Bienen erzeugte, harzartige Substanz, die von diesen zum Abdichten des Bienenstocks verwendet wird. Dabei machen sie sich zugleich die anti-oxidativen, anti-inflammatorischen und einige weitere protektive Eigenschaften der komplex zusammengesetzten Substanz zunutze, beispielsweise zur Abwehr der Bienenpopulation vor Bakterien, Viren und Pilzen. Aufgrund dieser gesundheitsfördernder Effekte spielt Propolis seit Hunderten von Jahren eine Rolle in der naturheilkundlichen Medizin. Heutzutage findet man entsprechende Präparate in diversen Formen zur Anwendung bei Erkältungskrankheiten, dermatologischen Erkrankungen, aber auch als Adjuvantien in Kosmetika (Wagh, 2013). Polyphenole wie zum Beispiel Flavonoide wurden bereits früh als wirksame Komponenten von Propolis identifiziert. Eine im Jahr 2012 veröffentlichte Studie legte den Fokus auf die proklamierten anti-tumoralen Eigenschaften des Bienenwachses, wobei unter anderem Chrysin als derjenige Inhaltsstoff mit der stärksten Potenz gegen Krebszellen (am Beispiel der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231) identifiziert wurde (Sun et al., 2012). Als dazu führender Mechanismus wurde hier erstmals eine Hemmung der Histondeacetylase 8 genannt, eines Enzyms, das in vielen Krebszellen überexprimiert wird, um deren Wachstum zu fördern. Am bekanntesten und in Bezug auf das Mammakarzinom von besonderer Bedeutung ist jedoch die Eigenschaft des Flavons Chrysin, das Enzym Aromatase zu hemmen. Eine Vielzahl an Studien fand heraus, dass Chrysin verglichen mit verwandten Flavonoiden in dieser Hinsicht sogar die größte inhibitorische Potenz aufweist (Campbell & Kurzer, 1993; Kao, Zhou, Sherman, Laughton, & Chen, 1998; Kellis & Vickery, 1984; van Meeuwen, Korthagen, de Jong, Piersma, & van den Berg, 2007). Das Protein Aromatase ist Teil der Familie der Cytochrom-P-450-Enzyme. Seine Funktion besteht darin, die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen zu katalysieren. Diese Reaktion findet bei Männern in den Leydig-Zellen der Hoden, bei prämenopausalen Frauen in den Ovarien sowie bei beiden Geschlechtern (bei Frauen vor allem postmenopausal) im Muskel- und Fettgewebe statt (Gambelunghe et al., 2003). Dadurch lässt sich erklären, weshalb adipöse Männer vermehrt Östrogene bilden und weshalb sich der Konsum von Chrysin unter Sportlern zur Steigerung der intrinsischen Testosteronspiegel beziehungsweise als Maßnahme gegen unerwünschte Effekte (zum

Beispiel der Gynäkomastie) bei externer Zufuhr von Androgenen zu Dopingzwecken großer Beliebtheit erfreut (Gambelunghe et al., 2003). Eben jene lokal gebildeten Östrogene sind für die Entstehung des Östrogen-abhängigen Brustkrebs wichtig, da sie die Bildung von Wachstumsfaktoren induzieren und damit die Entwicklung eines solchen Tumors fördern können (van Meeuwen et al., 2007). Eine Therapie mit Aromatasehemmern bei postmenopausalen Frauen mit Östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom ist daher nach höchstem Evidenzgrad indiziert (*Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*, 2012). Der potenzielle Nutzen einer Therapie mit Chrysin zur Prävention oder zur Therapie des Brustkrebs scheint offensichtlich. Zahlreiche Aspekte dämpfen diese Hoffnung allerdings. So ist bekannt, dass Polyphenole nach der Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auch selbst einen Östrogen-ähnlichen Effekt vermitteln können (Miksicek, 1993). Als solche fördern sie konsequenterweise das Wachstum Östrogen-abhängiger Brustkrebszellen, wie zum Beispiel von van Meeuwen et al. an der Zelllinie MCF-7 gezeigt wurde. Zwar identifizierte die Gruppe Chrysin als die im Vergleich am schwächsten Östrogen-simulierende Substanz, jedoch macht dieser Sachverhalt deutlich, dass nicht unbedacht mit einer Chrysin-Substitution verfahren werden darf. Darüber hinaus gibt es begründete Zweifel für eine Wirksamkeit dieses Flavons beim Menschen. Die Arbeitsgruppe um Saarinen et al. konnte keine Hemmung der Aromatase *in vivo* feststellen (Saarinen et al., 2001), und in einer weiteren Studie zeigte eine Behandlung mit Chrysin für 21 Tage keinen Einfluss auf die Testosteronkonzentration im Urin der Probanden (Gambelunghe et al., 2003). Die Erklärung könnte in der verminderten Bioverfügbarkeit des Flavons liegen. Trotz günstiger Bedingungen für einen Transport durch die Darmmukosa werden die rasch gebildeten Metabolite von Chrysin wieder ins Lumen zurücktransportiert, weshalb letztendlich nur wenig in den Kreislauf gelangt (Walle et al., 1999). Ein vielversprechendes Ergebnis lieferte allerdings eine chinesische Forschergruppe, die beobachtet hatte, dass die Tumorgroße einer Geschwulst aus MDA-MB-231-Zellen im Mausmodell durch eine Behandlung mit Chrysin zurückgegangen war (Sun et al., 2012). Dies zeigt, dass Chrysin trotz immer wieder geäußerter Skepsis ein geeigneter Kandidat für neue Therapieansätze sein könnte und macht auch die Notwendigkeit weiterer *in vivo*-Studien deutlich.

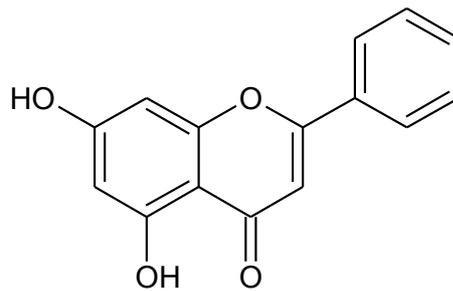


ABBILDUNG 7: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONS CHRYSIN (= 5,7-DIHYDROXYFLAVON)

Charakteristisch zur Unterscheidung von anderen Flavonen sind die Hydroxygruppen an den Kohlenstoffatomen der Positionen 5 und 7 im A-Ring.

1.2.8 Baicalein

Als letzter der hier untersuchten Vertreter der Flavonoide soll der Pflanzenstoff Baicalein vorgestellt werden. Er gehört ebenfalls zur Untergruppe der Flavone, und man begegnet ihm fast ausschließlich in Zusammenhang mit der Traditionellen Chinesischen Medizin. Diese kennt seit Langem die Heilkräfte des Extraktes aus der Wurzel des Lippenblütlers *Scutellaria baicalensis* Georgi, des Baikal-Helmkrauts. Dieses Extrakt macht sie sich in der Behandlung entzündlicher Erkrankungen, bakterieller und viraler Infektionen, Erkältungskrankheiten, kardiovaskulärer sowie gastrointestinaler Erkrankungen wie Bluthochdruck, Durchfall oder Hepatitis zu Nutze. Des Weiteren findet die Heilpflanze Anwendung in der Therapie von Tumorleiden, was sie umso mehr zu einem beliebten Themengebiet wissenschaftlicher Arbeiten macht (Li-Weber, 2009; D. Y. Zhang et al., 2003). Strukturanalysen haben ergeben, dass vor allem Flavonoide die wirksamen Inhaltsstoffe des Helmkrauts darstellen. Darunter nehmen Baicalein und seine glykosylierte Form Baicalin mit zusammen rund 15,5% den bedeutendsten Anteil an der nicht verarbeiteten Wurzel ein (H. Z. Wang, Yu, Gao, & Zhao, 2007). Die zytostatischen und Apoptose-induzierenden Effekte des Pflanzenextrakts konnten bislang nicht nur *in vitro* an verschiedenen Tumorzelllinien, zum Beispiel abstammend von Brust-, Prostata- oder Pankreaskrebszellen (Donald, Hertzler, & Eibl, 2012; Li-Weber, 2009), sondern bereits mehrfach auch an Mausmodellen, unter anderem bei Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses (D. Y. Zhang et al., 2003), gezeigt werden. In einem Experiment mit 3D-Modellen aus MCF-7 Mammakarzinom-Zellen wird sogar auf eine Fähigkeit der Substanz hingewiesen, lymphogene Streuung zu unterbinden (Viola et al., 2013).

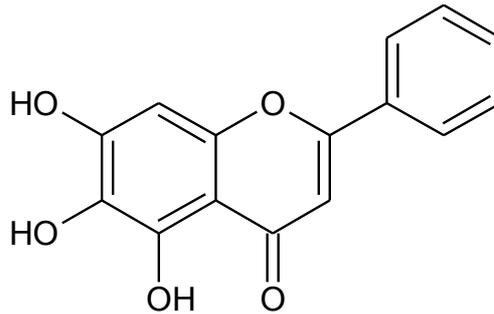


ABBILDUNG 8: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONS BAICALEIN (= 5,6,7-TRIHYDROXYFLAVON)

Charakteristisch zur Unterscheidung von anderen Flavonen sind die drei Hydroxygruppen an den Positionen 5,6, und 7 des A-Rings.

Sofern eine Behandlung von Tumorzellen mit *Scutellaria baicalensis* oder Baicalein allein mit den Wirkungen auf die entsprechenden nicht-malignen Zellen verglichen wurde, lassen sich immer wieder Daten dazu finden, dass eine Wachstumsinhibierung oder eine Toxizität bei letzteren ausblieb. Erklärungen für diese scheinbare Fähigkeit zur Selektion stehen allerdings noch aus (Li-Weber, 2013; D. Y. Zhang et al., 2003). Als limitierender Faktor bei der Interpretation vieler Studien sollte bedacht werden, dass häufig das Gesamtextrakt aus der Helmkroutwurzel verwendet wurde und nicht die einzelnen wirksamen Substanzen. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Effekten der Einzelstoffe, wie es zum Beispiel Zhang et al. getan haben, so stößt man nicht immer auf gleiche Beobachtungen (D. Y. Zhang et al., 2003). Dies legt die Vermutung nahe, dass sich manch eine Wirkung erst durch das Zusammenspiel der Inhaltsstoffe erzielen lässt. Nichtsdestoweniger gibt es zahlreiche anti-entzündliche und anti-tumorale Wirkmechanismen, die sich eindeutig dem Flavon Baicalein zuordnen lassen. Als Reinsubstanz wurde es für den Vergleich mit den anderen Flavonoiden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Mit der folgenden Grafik wird abschließend eine Synopsis der vorgestellten Flavonoide präsentiert:

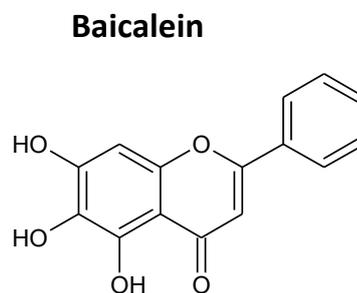
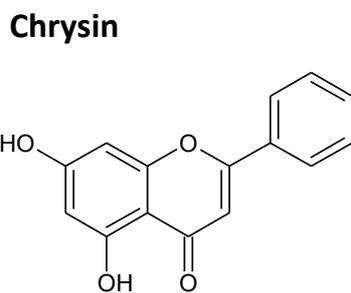
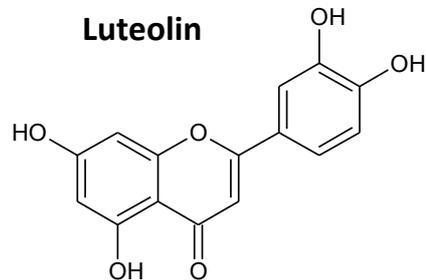
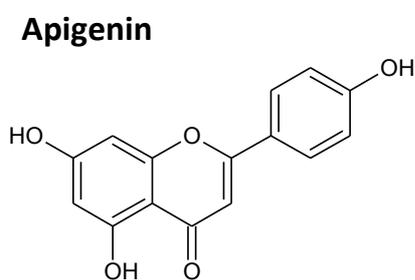
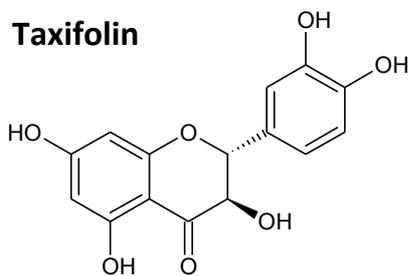
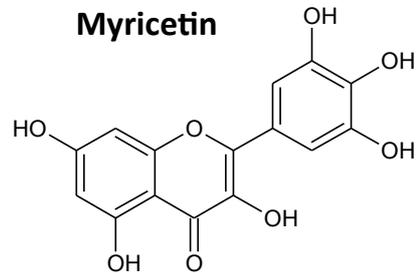
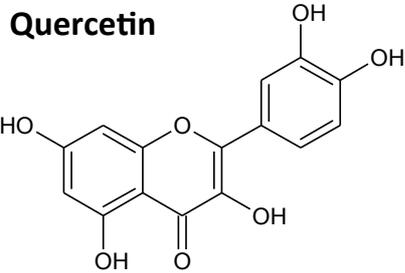


ABBILDUNG 9: ÜBERSICHT ÜBER DIE CHEMISCHEN STRUKTURFORMELN ALLER SIEBEN FLAVONOIDE

1.3 Borrelidin

In einem Nebenprojekt zur Vergleichsstudie der Flavonoide wurden für diese Arbeit die Effekte des Antibiotikums Borrelidin auf verschiedene maligne und nicht-maligne Zelllinien untersucht. Im Jahre 1949 wurde Borrelidin erstmals als Sekundärmetabolit der Bakterienart *Streptomyces rochei* isoliert (Berger et al., 1949). Die Aufklärung seiner Struktur, welche die Eingruppierung zu den Makrolidantibiotika bedingt, erfolgte jedoch erst nahezu zwanzig Jahre später (Keller-Schierlein, 1966).

Die Wirksamkeit des Antibiotikums richtet sich gegen zahlreiche Formen von Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien (Berger et al., 1949), Viren (Dickinson, Griffiths, Mason, & Mills, 1965), Pilze (Gao et al., 2012) und verschiedene Plasmodien-Stämme, jene humanpathogene Parasiten, die für die Übertragung der Malaria verantwortlich sind (Otoguro et al., 2003). Seine Aktivität gegen die Bakterien-Gattung *Borrelia* aus der Klasse der Spirochäten war letztlich für die Namensgebung verantwortlich (Poralla, 1975). Borrelidin ist eine äußerst potente Substanz mit mittleren inhibitorischen Konzentrationen im niedrigen nanomolekularen Bereich für einige der oben genannten Wirkungen (Gao et al., 2012; Otoguro et al., 2003). Im Falle der Plasmodien übertraf Borrelidin im Experiment sogar die Wirksamkeit bewährter Substanzen wie Chloroquin um ein Vielfaches. Darüber hinaus zeigte es auch bei Medikamenten-resistenten Stämmen einen hemmenden Effekt und reduzierte eine Parasitämie im Mausmodell (Otoguro et al., 2003). Damit ging allerdings auch eine erhebliche Toxizität des Antibiotikums einher. Diese war nicht nur bei einer humanen embryonalen Zelllinie im Vergleich zu bekannten anti-Malaria-Mitteln signifikant erhöht (Sugawara et al., 2013), sondern konnte auch bei den mit Borrelidin behandelten Tieren beobachtet werden. Sie zeigte sich hierbei unter anderem durch eine gesteigerte Mortalität (Otoguro et al., 2003) oder eine direkte Schädigung der Leberzellen, welche bereits nach einer fünftägigen Behandlung mit 100µg Borrelidin pro Tag zu erkennen war (Bhikshapathi et al., 2010).

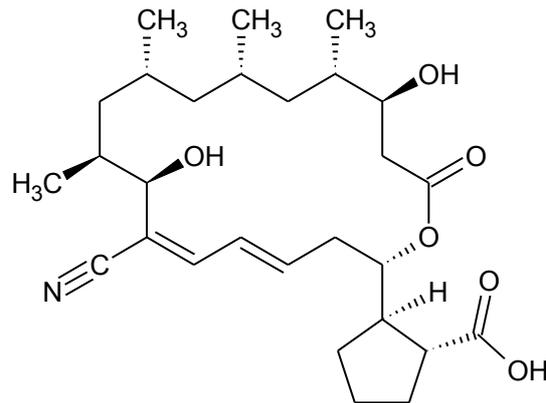


ABBILDUNG 10: CHEMISCHE STRUKTUR DES ANTIBIOTIKUMS BORRELIDIN

Wie andere Makrolidantibiotika auch erkennt man es an der charakteristischen Lacton-Ringstruktur, in diesem Fall aus 18 Gliedern bestehend. Bei Borrelidin fehlt jedoch der meist vorhandene, glykosidisch gebundene Zuckerrest.

Um dieses Problem zu umgehen, bemühten sich Forscher, Derivate des Antibiotikums zu synthetisieren, die bei gleicher oder besserer Wirksamkeit eine geringere Toxizität hervorrufen (Sugawara et al., 2013). Eine neuere Studie verglich die Wirkungen mehrerer Borrelidin-Analoga auf Plasmodien in der Zellkultur sowie im Tiermodell. Sie identifizierte darunter einige, deren Wirksamkeit zum Teil um ein Vielfaches höher war als die der reinen Substanz. Zugleich ergaben sich allerdings auch Hinweise auf eine erhöhte Spezifität der Derivate für infizierte Erythrozyten und damit für eine geringere Toxizität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Novoa et al., 2014). Die Ursache für die schädigenden Wirkungen von Borrelidin auf humane Zellen und in Versuchen mit Ratten und Mäusen liegt vermutlich in seinem Wirkmechanismus. In der Praxis bedeutsame Makrolidantibiotika (Erythromycin, Clarithromycin, Roxithromycin, Azithromycin) wirken bakteriostatisch über eine Hemmung der Proteinbiosynthese in der Elongationsphase, indem sie an die 50S-Untereinheit des (prokaryontischen) Ribosoms binden und dort das Weiterrücken der Peptidyl-tRNA verhindern (Freissmuth, 2012). Im Gegensatz dazu fand man heraus, dass Borrelidin spezifisch jenes Enzym hemmt, das für die Beladung der tRNA mit der Aminosäure Threonin verantwortlich ist, die Threonyl-tRNA-Synthetase. Dazu bindet es an eine bestimmte hydrophobe Region des Enzyms, was die Bildung der korrekten Polypeptidkette unmöglich macht. Da dieser Mechanismus sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Zellen funktioniert (Ruan et al., 2005), wird verständlich, weshalb Borrelidin im klinischen Alltag keine Rolle zu spielen vermag. Eine Eigenschaft, die diese Substanz dennoch seit einigen Jahren immer weiter ins Interesse der Wissenschaft rückt, ist die Fähigkeit, Angiogenese zu hemmen. 1997 wurde an einem *in vitro*-Angiogenese-Modell aus

thorakalem Aortagewebe von Ratten gezeigt, dass Borrelidin schon bei einer Konzentration von 0,4ng/ml die Bildung neuer Kapillaren um die Hälfte reduzieren kann. Des Weiteren führte eine Konzentration von etwa 1ng/ml zur Zerstörung von 50% der bis dahin neu geschaffenen Kapillaren, indem in den verantwortlichen Zellen der Zelltod ausgelöst wurde (Wakabayashi et al., 1997). Eine Interaktion mit den Caspasen 3 und 8 scheint hierbei für die Apoptose-Induktion von Bedeutung zu sein (Kawamura et al., 2003). Die Angiogenese-inhibierende Wirkung konnte kurze Zeit später auch im Tiermodell demonstriert werden (Funahashi et al., 1999; Kawamura et al., 2003). Bedenkt man nun, dass die Neovaskularisation insbesondere bei soliden Tumoren ab einem Durchmesser von 1-2mm für das weitere Wachstum essentiell ist (Wakabayashi et al., 1997), so steigt das Interesse an Borrelidin als potentiell Chemotherapeutikum. Zusammen mit der Fähigkeit der Hemmung der Proteinbiosynthese, für die zwar um ein Vielfaches höhere Dosen nötig sind, die jedoch selbst noch im nanomolekularen Bereich liegen, wirkt die Substanz somit auch anti-proliferativ, wie sich zum Beispiel an endothelialen und einer Reihe maligner Zellen, darunter diverse Leukämie-Zelllinien, experimentell bestätigen ließ (Habibi et al., 2012; Wakabayashi et al., 1997). Über eine Inhibierung der Gefäßneubildung das Wachstum von Tumoren zu unterbinden, ist ein viel frequentierter Ansatz, der sich unter anderem als Nebeneffekt des Taxans Paclitaxel sowie auch bewusst im Rahmen neuerer, sogenannter *targeted therapies* mit synthetisch erzeugten Antikörpern, wie beim VEGF-Inhibitor Bevacizumab, finden lässt (Wilkinson et al., 2006). Beide der genannten Beispiele spielen eine herausragende Rolle bei der Behandlung gynäkologischer Tumoren, insbesondere des Mammakarzinoms. Dabei sind sie in der Chemotherapie des metastasierten Karzinoms, einer Situation mit infauster Prognose, von großer Bedeutung (Linderholm et al., 2013), was die Wirksamkeit der anti-Angiogenese zur Wachstumskontrolle unterstreicht.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften des Antibiotikums Borrelidin, der erläuterten Analogieschlüsse zu bewährten Medikamenten in der Therapie des Mammakarzinoms und einer beschränkten Verfügbarkeit an Daten zu diesem Zusammenhang wurde es in dieser Arbeit direkt an Brustkrebs-Zelllinien getestet. Wie oben erwähnt, existieren bereits vielversprechende Hinweise auf eine proliferationshemmende Wirkung von Borrelidin auf maligne Zellen des blutbildenden Systems (Habibi et al., 2012). Für einige der hier durchgeführten Experimente wurden daher außer Mammakarzinom-Zellen auch verschiedene Leukämie-Zelllinien verwendet. Durch einen Vergleich der Auswirkungen von Borrelidin auf die Zellen sollen neue Erkenntnisse bezüglich der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Therapie von Krebserkrankungen mit dem Antibiotikum gewonnen werden.

1.4 Zellbiologie und Signalwege

1.4.1 Apoptose und die Bedeutung von Mcl-1

Der Mechanismus der Apoptose ist für einen Organismus zur Aufrechterhaltung seiner physiologischen Eigenschaften unentbehrlich. Durch den kontrolliert ausgelösten und ablaufenden sowie rasch eintretenden Zelltod auf die entsprechenden Signale hin wird der Schutz vor schädigenden Einflüssen gewährleistet. Infizierte oder autoreaktiv agierende Zellen können durch einen programmierten Zelltod ausgeschaltet werden, um dadurch größere Defekte am Gesamtorganismus zu verhindern. Dies ist insbesondere für dessen korrekt ablaufende Entwicklung und Differenzierung, die Bildung des Immunsystems und im weiteren Leben für die Homöostase der Zellzahl wichtig (Netzker, 2012b). Kerr et al. beschrieben 1972 die elektronenmikroskopisch zu beobachtenden Prozesse während des programmierten Zelltodes, die sich durch eine Kondensation des Zellkerns und des Zytoplasmas, eine Fragmentierung des Apoptosekörpers sowie die anschließende Phagozytose und Autolyse auszeichnen. Sie stellten durch die Betonung dieses kontrolliert und ohne Entzündungsreaktion vollziehbaren Mechanismus auch den Unterschied zur Nekrose heraus. Durch die Beobachtung ablaufender Apoptosen in diversen Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Leben einer Zelle erschlossen sich dem Autor bereits viele ihrer Funktionen. Erstmals schlug er deshalb den Namen „Apoptose“ in Anlehnung an den griechischen Begriff für das Herabfallen welcher Blätter vor (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972). Über die genauen Signalwege, die zur Auslösung der Apoptose führen, war zu diesem Zeitpunkt jedoch kaum etwas bekannt. Inzwischen weiß man, dass eine Vielzahl von Stimuli Abläufe in Gang setzen, die sich in der gemeinsamen Endstrecke der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 treffen. Es handelt sich bei den Caspasen um Enzyme, welche lebenswichtige Proteine der Zelle zerstören, so dass diese den Zelltod durchlaufen muss. Vereinfacht dargestellt können sie auf dreierlei Weisen aktiviert werden: erstens durch bestimmte, unter anderem aus zytotoxischen T-Zellen freigesetzte Enzyme; zweitens über den „extrinsischen Weg“ durch die Bindung geeigneter Liganden an sogenannte „Todesrezeptoren“ der Zelle; oder drittens über den „intrinsischen Weg“ unter Beteiligung der Mitochondrien. Bei letztgenanntem Weg sorgen Signale aus dem Inneren der Zelle, wie zum Beispiel schädliche DNA-Defekte oder oxidativer Stress, für die Freisetzung von Mediatoren aus den Mitochondrien, die im Zytoplasma wiederum die Aktivierung der Effektor-Caspasen vermitteln. Soll keine Apoptose ablaufen, so verhindert die Balance

zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen in der Zelle die Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran und damit das Ausströmen der Mediatoren. Zu diesen Proteinen zählen vor allem die Proteine der Bcl-2-Familie, deren Funktion nachfolgend näher erläutert wird (Netzker, 2012b). In seiner Arbeit beobachtete John F. R. Kerr bereits Apoptosekörper in malignem, neoplastischem Gewebe und äußerte daraufhin die Vermutung, die Apoptose könnte als Folge gewisser Tumortherapien abgelaufen sein, die schließlich zum Rückgang des Tumors führten (Kerr et al., 1972). Damit wurde schon damals eine grundlegende Feststellung gemacht, die auch heute einen wichtigen Ausgangspunkt für die Forschung darstellt: nämlich das Interesse daran, die Apoptose auszunutzen, um Tumorzellen gezielt in den Tod zu schicken. Es ist bekannt, dass maligne Zellen ihre Fähigkeit zur ungehemmten Proliferation unter anderem dadurch erwerben, dass sie die Auslösung der Apoptose unterbinden, so dass sie auch bei Schädigung der genomischen Integrität oder anderen Defekten weiterleben können. Dies geschieht entweder durch die Hochregulation anti-apoptotischer Proteine oder durch die Herunterregulation pro-apoptotisch agierender Mediatoren. Das resultierende Ungleichgewicht lässt den Tumor unkontrolliert wachsen (Placzek et al., 2010).

„Both apoptotic bodies and mitotic figures are sometimes numerous in rapidly growing tumours; it is the balance between the two processes that determines the rate of enlargement.“ (Kerr et al., 1972)

Ein Ziel in der Entwicklung neuer Therapien ist die pharmakologische Beeinflussung dieser Prozesse, um die Apoptose wieder stattfinden zu lassen. Es ist naheliegend, hierbei zum Beispiel den Weg über die regulatorischen Bcl-2-Proteine zu wählen. Da unter allen Subklassen dieser Familie das Protein Mcl-1 in soliden Tumoren, insbesondere der Brustdrüse, verhältnismäßig am stärksten hochreguliert wird (Placzek et al., 2010), wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk darauf gelegt.

Das Mcl-1-Gen (Myeloid cell leukaemia 1-Gen) wurde im Jahr 1993 erstmals aus zur Differenzierung angeregten Zellen der humanen Leukämie-Zelllinie ML1 isoliert. Aufgrund der Ähnlichkeit zur Gensequenz des Bcl-2-Gens (B-cell CLL/lymphoma 2-Gen) erfolgte die Zusammenfassung zu einer eigenen Genfamilie (Kozopas, Yang, Buchan, Zhou, & Craig, 1993). Im Laufe der Zeit entdeckte man weitere Gene, die ähnliche Sequenzen beinhalten, und wies sie ebenfalls dieser Familie zu. Die Funktionen der durch sie codierten Proteine im Zellinneren sind allerdings verschieden, weshalb die Nomenklatur bisweilen irreführend sein kann. So gibt es unter den Proteinen der „Bcl-2-Familie“ solche, die anti-apoptotisch

wirken, wie zum Beispiel Mcl-1, Bcl-x_L und das namensgebende Bcl-2 selbst, aber auch solche, die pro-apoptotische Effekte vermitteln. Dazu gehören BID, BAX und BAK. Das Ausmaß, in welchem sie sich die Waage halten beziehungsweise die eine oder andere Gruppe überwiegt, bestimmt somit über die Inhibierung oder Auslösung des programmierten Zelltodes (Craig, 1995; Gross, McDonnell, & Korsmeyer, 1999; Nijhawan et al., 2003). Mit der Entdeckung der Bcl-2-Proteinfamilie wurde demnach eine neue Gruppe von Onkogenen beschrieben, die – im Unterschied zu den bis dahin bekannten – ihren Effekt nicht durch die direkte Wachstumsförderung, sondern durch das Verhindern des programmierten Zelltodes erreicht (Thomas, Lam, & Edwards, 2010). Mcl-1 stellt, wie bereits erwähnt, einen anti-apoptotischen Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie dar, dessen Expression nach seiner Entdeckung in Leukämiezellen vor allem in malignen Zellen der B-Linie beobachtet wurde. Darüber hinaus findet man das Protein verstärkt in den oberflächlicheren Schichten differenzierter Epithelien, wie zum Beispiel im Darm, in der Prostata oder in der Brustdrüse. Das Mcl-1-Gen unterliegt einer äußerst strengen und im Zellzyklusgeschehen sehr früh eintretenden Regulation (Zhong, Gao, Du, & Wang, 2005). Das Genprodukt selbst besitzt im Gegensatz zu den anderen bekannten Bcl-2-Proteinen eine bemerkenswert kurze Halbwertszeit von nur maximal wenigen Stunden. Daraus lässt sich ableiten, dass seine Rolle in Bezug auf das Zellüberleben von außerordentlicher Wichtigkeit sein muss (Michels, Johnson, & Packham, 2005). Die anti-apoptotische Wirkung wird aller Wahrscheinlichkeit nach über die Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom C, eines der bereits erwähnten Mediatoren in den Mitochondrien, vermittelt (Michels et al., 2005; Michels et al., 2004). In einer Übersichtsarbeit von Thomas et al. wird dieser Mechanismus durch die Eigenschaft von Mcl-1 erklärt, die pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK zu binden und sie auf diese Weise daran zu hindern, jene Poren durch die äußere Mitochondrienmembran zu bilden, durch welche Cytochrom C ins Zytoplasma gelangt und dort die Caspase-Kaskade der Apoptose in Gang setzt (Thomas et al., 2010). An HeLa-Zellen konnte im Experiment demonstriert werden, dass der Abbau von Mcl-1 und Bcl-x_L als Reaktion auf UV-Strahlung die Freisetzung von Cytochrom C bedingte und somit eine Ursache für den konsekutiven Zelluntergang darstellte (Nijhawan et al., 2003). Dem Proteasom wird in diesem Zusammenhang ein Großteil der Verantwortlichkeit für den schnellen Abbau von Mcl-1 zugeteilt (Michels et al., 2005; Nijhawan et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Zhong et al. identifizierte sowohl die Lysinreste, die hierbei als Andockstelle für die Polyubiquitinkette dienen, als auch eine eigene E3-Ubiquitin-Ligase, die für die konstitutive Ubiquitylierung des Proteins zuständig ist (Zhong et al., 2005). Die Ubiquitinkette ist für die Degradation von Proteinen durch das Proteasom erforderlich. Die

Erläuterung dessen genauer Funktionsweise folgt im nächsten Kapitel. In einer weiteren Studie wurde allerdings gezeigt, dass der Abbau von Mcl-1 in annähernd gleichem Maße auch gänzlich ohne die Beteiligung des Proteasoms ablaufen kann (Stewart et al., 2010). Seine Regulation geschieht demnach auf viel komplexerem Wege und unter Beteiligung zahlreicher, unterschiedlicher Mechanismen, darunter dem direkten Abbau durch die Caspasen selbst (Thomas et al., 2010). Während der Apoptose wird Mcl-1 beispielsweise durch die Effektor-Caspase 3 gespalten, was zum einen eben die Freisetzung von Cytochrom C und damit den intrinsischen Weg der Apoptose ermöglicht und zum anderen die Apoptose über einen positiven Feedbackmechanismus durch ein auf diese Weise entstandenes Spaltprodukt von Mcl-1 selbst verstärkt (Michels et al., 2004). Damit geht einher, dass sich das Protein neben der bereits erwähnten Lokalisation in den Mitochondrien auch im Zytosol finden lässt. Des Weiteren soll es auch im Zellkern vorhanden sein. Das Vorkommen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle bietet Hinweise auf seine mutmaßlichen verschiedenen Funktionen (Thomas et al., 2010). In Zusammenschau mit seinen mannigfaltigen Regulationsmechanismen (Spagnuolo et al., 2011) eröffnet sich somit das Verständnis für die überragende Rolle des Mcl-1-Proteins im Zellzyklusgeschehen und damit einhergehend das große Interesse an ihm als Ansatzpunkt für Krebstherapien. Wie bereits an Leukämiezellen, bei denen eine erhöhte Expression von Mcl-1 mit einer erhöhten Progredienz der Erkrankung sowie einer Resistenz gegenüber Chemotherapien assoziiert ist, gezeigt wurde, besitzt Quercetin die Fähigkeit, durch eine Herunterregulation von Mcl-1 die Anfälligkeit der Zellen für apoptotische Stimuli zu steigern (Placzek et al., 2010; Spagnuolo et al., 2011). Welchen Effekt es allerdings auf Brustkrebszellen hat und wie im Vergleich dazu die anderen Flavonoide wirken, ist Teil der vorliegenden Arbeit.

1.4.2 Ubiquitin-Proteasom-Signalweg

So wie ein Organismus beziehungsweise ein Gewebeverband mittels Apoptose für die „saubere Entsorgung“ schädlicher Zellen sorgen kann, muss es auch auf zellulärer Ebene Mechanismen geben, nicht-funktionsfähige Bestandteile abzubauen. Bezogen auf Proteine wird in diesem Zusammenhang dem Proteasom eine entscheidende Rolle zugesprochen. Dieses ist selbst ein zusammengesetzter Proteinkomplex, der frei im Zytosol vorkommt, aber auch im Zellkern zu finden ist. Durch seine enzymatischen Aktivitäten ist es in der Lage, eigens markierte Proteine abzubauen. Für eukaryontische Zellen ist das 26S-Proteasom charakteristisch. Es setzt sich folgendermaßen zusammen: Zentral befindet sich

ein hohlzylindrischer 20S-Komplex, der die katalytischen Eigenschaften besitzt und somit für den eigentlichen Proteinabbau verantwortlich ist. An den beiden Enden des Zylinders sitzt jeweils eine 19S-Einheit als „Kappe“ auf, welche die abzubauenen Proteine erkennt und an das Proteasom bindet. Für die vorausgehende, zytosolische Markierung der betreffenden Proteine sorgt ein Enzymsystem, bestehend aus drei Hauptgruppen (E1, E2 und E3), dessen Funktion darin besteht, eine sogenannte Ubiquitinkette als Erkennungsmerkmal anzuhängen. Ubiquitin ist ein in Eukaryonten überall (ubiquitär) vorkommendes, kleines Protein aus 76 Aminosäuren. Es wird durch die genannten Enzyme unter ATP-Verbrauch aktiviert, gebunden und schließlich auf das Substrat übertragen. Durch die Wiederholung dieses Vorgangs mit mehreren Ubiquitin-Molekülen entsteht so eine Kette, die von der 19S-Einheit des Proteasoms erkannt wird. Anschließend folgt die Entfaltung des Proteins, so dass es im Inneren des 20S-Komplexes prozessiert werden kann. Von dessen 14 verschiedenen Untereinheiten zeigen lediglich drei eine proteolytische Aktivität: Je nach bevorzugter Schnittstelle in der Aminosäuresequenz werden sie Chymotrypsin-, Trypsin- oder Caspase-ähnliche Aktivität genannt. Nach der Proteindegradation werden die Ubiquitin-Moleküle freigelassen und stehen somit zur Wiederverwertung bereit (Hershko & Ciechanover, 1992; Netzker, 2012a; Rivett, 1989; Shen, Chan, & Dou, 2012). Der Abbau durch das Proteasom ist allerdings nicht nur fehlgefalteten, defekten oder schädlichen (zum Beispiel viralen) Proteinen vorbehalten. Vielmehr dient der Vorgang auch dazu, zahlreiche Funktionen der Zelle zu steuern, indem der Umsatz regulatorischer Proteine kontrolliert wird. Als Beispiel können hier Cycline, die für den Ablauf des Zellzyklus wichtig sind (Hershko & Ciechanover, 1992; Netzker, 2012a), oder aber das bereits beschriebene Mcl-1-Protein dienen. Hier eröffnet sich der Übergang zur Bedeutung des Proteasoms im Tumorgeschehen. Durch einen schnellen Umsatz von Zellzyklus-regulatorischen Proteinen kann die Proliferationsrate gesteigert werden, so wie es bei vielen malignen Erkrankungen der Fall ist. Eine erhöhte proteasomale Aktivität in Tumorzellen führt außerdem über eine vermehrte Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Zellkern zur Anschaltung gewisser Überlebenssignale und dadurch zum Tumorwachstum. Zu den Zielgenen von NFκB gehören zum Beispiel das anti-apoptotische Protein der Bcl-2-Familie Bcl-x_L sowie weitere Inhibitoren der Apoptose (IAPs) (Pahl, 1999). Hinzu kommt, dass pro-apoptotische Proteine wie BAX vermehrt abgebaut werden, wodurch die Apoptose verhindert wird. Diese Mechanismen führen nicht nur zu einer vermehrten Proliferation, sondern sie können auch ein Grund für die Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika sein. Wird das Proteasom hingegen gehemmt, ist es nun verständlich, auf welchen Wegen dies unter Umständen in einem Zellzyklus-Arrest und

damit einem Wachstumsstopp resultieren kann. Dass die Inhibierung des Proteasoms ein wirkungsvolles Mittel zur Tumorbekämpfung ist, lässt sich am Beispiel des synthetischen Proteasom-Inhibitors Bortezomib zeigen, einem seit 2003 zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassenen Medikament (Fennell, Chacko, & Mutti, 2008; Shen et al., 2012). Es ist das erste etablierte Chemotherapeutikum seiner Klasse. Im Experiment konnte an malignen Zellen der Zervix gezeigt werden, dass es aufgrund seiner Wirkung am Proteasom auch auf solche Zellen wirkt, die sich als resistent gegenüber einer Chemotherapie erwiesen haben (Brüning, Vogel, Mylonas, Friese, & Burges, 2011). Auch für pflanzliche Polyphenole wurden in der Literatur mehrfach Proteasom-hemmende Eigenschaften beschrieben. Mit einigen von ihnen, wie zum Beispiel Curcumin, wurden sogar klinische Studien durchgeführt, die zum Teil vielversprechende Ergebnisse brachten. Auch für einen Teil der in dieser Arbeit untersuchten Flavonoide gibt es entsprechende Hinweise auf eine Inhibierung des Proteasoms (Chang, 2009; Shen et al., 2012). In einer Arbeit von Chen et al. wurden beispielsweise die Flavonoide Quercetin, Myricetin und Apigenin auf ihre Wirkung am Proteasom in Jurkat-T-Zellen hin untersucht. Es zeigte sich nicht nur eine Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität, sondern auch eine Akkumulation proteasomaler Zielproteine wie BAX, wodurch der konsekutive Zelluntergang erklärt werden konnte. Apigenin zeigte hierbei die stärkste inhibitorische Wirkung. Erstaunlicherweise hatte es jedoch einen deutlich geringeren Effekt auf nicht-transformierte natürliche Killerzellen, was auf eine Spezifität für Tumorzellen hinweisen könnte (Chen et al., 2005). Im Hinblick auf Brustkrebszellen konnte für Quercetin gezeigt werden, dass es alle drei katalytischen Aktivitäten des Proteasoms in MCF-7-Zellen inhibiert. Im Gegensatz dazu besitzt Bortezomib eine erhöhte Affinität für die Chymotrypsin- und die Caspase-ähnliche Aktivität. Mittels Immunfärbung wurde außerdem eine Anhäufung poly-ubiquitylierter Proteine nach einer Behandlung mit Quercetin nachgewiesen. Dies stellt einen Teil der Wirkung dar, durch welche Quercetin zum Untergang der Zellen führt (Klappan, Hones, Mylonas, & Brüning, 2012). In der vorliegenden Arbeit soll die Fähigkeit der Flavonoide zur Inhibierung des Proteasoms weiter verfolgt werden, wobei ein Vergleich der untersuchten Substanzen weiteren Aufschluss über den Einfluss der chemischen Struktur auf diese Eigenschaft geben soll.

1.4.3 NFκB zwischen Inflammation und Onkogenese

Der Transkriptionsfaktor NFκB ist seit knapp dreißig Jahren für seine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen und für seine Beteiligung an immunologischen Prozessen bekannt. Eine Reihe an extrazellulären Signalen kann zu seiner Aktivierung führen. Dazu gehören zum Beispiel die Lipopolysaccharide, die sich in der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien befinden und nach der Erkennung durch humane Zellmembranrezeptoren über NFκB unter anderem Entzündungsreaktionen in Gang setzen, die letztendlich der Bekämpfung der Bakterien und der Abwehr eines Zellschadens dienen. Lipopolysaccharide sorgen außerdem für eine Freisetzung des Tumornekrosefaktors TNF-α sowie bestimmter Interleukine aus Makrophagen, die ihrerseits selbst NFκB aktivieren können. NFκB wird auf diese Weise befähigt, in den Zellkern zu wandern und die Transkription seiner Zielgene anzuschalten. Zu den daraufhin exprimierten Genen gehören unter anderem jene, die für TNF-α und Interleukin-1 (IL-1) codieren, wodurch eine sich selbst positiv verstärkende Feedback-Schleife entsteht (Lin et al., 2008; Palombella, Rando, Goldberg, & Maniatis, 1994). Weshalb NFκB eine entscheidende Rolle zugesprochen wird, ist nun ersichtlich.

Der Schlüssel zur Aktivierung von NFκB liegt in der Regulation des Proteins IκBα. Dieses fungiert als Inhibitor des Transkriptionsfaktors, indem es an ihn bindet und ihn im Zytoplasma zurückhält, so dass die Translokation in den Zellkern nicht stattfinden kann (Lin et al., 2008). Mechanismen, die zur Aktivierung von NFκB beitragen sollen, bewirken eine Phosphorylierung von IκBα. Das Protein wird anschließend poly-ubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut, was in der Freisetzung von NFκB resultiert (Palombella et al., 1994). NFκB ist jedoch mehr als nur ein Mittelsmann bei inflammatorischen Prozessen. Zu seinen Zielgenen gehören auch solche, deren Genprodukte beispielsweise Proliferation fördern, Zelladhäsion bewirken oder Apoptose verhindern. Daraus lässt sich leicht die Verbindung zwischen einer fehlregulierten NFκB-Aktivität und unkontrolliertem Wachstum, wie zum Beispiel in Tumoren, ableiten (Ben-Neriah & Karin, 2011). Konkreter ausgedrückt, wird NFκB unter anderem dadurch eine Rolle bei der Tumorentstehung nachgesagt, indem es die Apoptose von Zellen verhindert, in denen aktivierte Onkogene ein ungehemmtes Wachstum übermitteln (Bubici, Papa, Pham, Zazzeroni, & Franzoso, 2004). Beachtet man weiterhin, dass viele bösartige Erkrankungen in gewisser Weise Zuständen chronischer Entzündung sehr ähnlich sind und mit diesen in kausalem oder konsekutivem Zusammenhang stehen können, so erschließt sich die Verwendung von NFκB als Ansatzpunkt in der Krebstherapie. Als prominenter Vertreter im klinischen Alltag dient das bereits erwähnte Beispiel des Proteasom-Inhibitors Bortezomib. Die Blockierung von NFκB

wird als einer der Hauptmechanismen angenommen, über den er seine Wirkung entfaltet und somit als Therapeutikum gegen das Multiple Myelom Anwendung findet. Auch Glukokortikoide bewirken eine Hemmung von NFκB und bilden bekanntermaßen eine Hauptsäule in der Therapie des Hodgkin Lymphoms (Ben-Neriah & Karin, 2011; Bubici et al., 2004). Eine NFκB-Inhibierung wurde schließlich ebenfalls als Mechanismus diverser Flavonoide beschrieben, durch den sie ihre entzündungshemmenden und Apoptose-induzierenden Effekte vermitteln (Kim et al., 2007; Lin et al., 2008; Shi, Ong, & Shen, 2004). Ein Vergleich dieses Effektes unter den sieben Flavonoiden in Mammakarzinom-Zellen wurde in dieser Studie angestellt. Insbesondere durch die Zusammenschau mit weiteren, durch sie vermittelten, Wegen der Tumorbekämpfung soll sich daraufhin zeigen, welche der untersuchten Pflanzenstoffe sich in besonderem Maße für eine Brustkrebs-Therapie eignen könnten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemein verwendete Materialien

Geräte	Hersteller
Mikroskop mit Phasenkontrasteinsatz	Leitz DIAVERT Inverted Microscope Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Mikroskop mit Phasenkontrast- und Fluoreszenzeinsatz und Fotografier-Option	Zeiss Axiophot Carl Zeiss Microscopy GmbH, München, Germany
Kühlzentrifuge (für Reaktionsgefäße aller Größen)	Thermo Scientific HERAEUS BIOFUGE STRATOS Centrifuge Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge (für 1,5ml fassende Reaktionsgefäße)	Abbott 3531 Zentrifuge Gemini B.V., Apeldoorn, Netherlands
Pipetten (2,5µl-1000µl)	Eppendorf Research® Pipetten Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipettierhelfer (für serologische Pipetten)	Brand accu-jet® Pipettierhelfer BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Germany
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr Premium Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Germany
Verbrauchsgegenstände	
Einmalhandschuhe	Sempercare premium Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Austria
Pipettenspitzen (für Eppendorf-Pipetten)	Biozym Premium Tips Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Serologische Pipetten (5ml)	Sarstedt Serologische Pipette 5ml SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Germany
Serologische Pipetten (10ml)	ExtraCruz™ Serological Pipet, 10ml Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
1,5ml Tubes	Sarstedt Reagiergefäß 1,5ml SafeSeal SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Germany

15ml Cups	VWR 15ml Centrifuge Tubes VWR International GmbH, Darmstadt, Germany
50ml Cups	BD Falcon 50ml Polypropylene Conical Tube Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
Medien und Puffer	
PBS	PAA Dulbecco's PBS PAA, Pasching, Austria
Ethanol (100%)	Roth Ethanol ROTIPURAN® ≥99,8%, p.a. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ethanol (80%)	Ethanol 80% (mit Methylethylketon vergällt) Apotheke Innenstadt Klinikum Uni München, München, Germany
DMSO	Roth Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® ≥99,8%, p.a. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

2.1.2 Untersuchte Substanzen

Substanzen	Hersteller/Lieferant
Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavone)	Santa Cruz Apigenin Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
Baicalein (5,6,7-Trihydroxyflavone)	Sigma-Aldrich Baicalein Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany
Borrelidin	AXXORA.com Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany
Chrysin (5,7-Dihydroxyflavone)	AXXORA.com Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany
Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone)	AXXORA.com Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany
Myricetin (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavone)	AXXORA.com Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany
Quercetin	MP Bio Quercetin Dihydrate (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone dihydrate) MP Biomedicals, Strasbourg, France
Taxifolin	AXORRA.com Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany
TNF-α	Jena Bioscience TNF-α Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany

2.1.3 Für die Zellkultur verwendete Materialien

Zelllinien	Vertreiber
MCF7	ATCC® HTB-22™ LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
MDA-MB-231	ATCC® HTB-26™ LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
MDA-MB-453	ATCC® HTB-131™ LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
MCF 10A	ATCC® CRL-10317™ LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
Jurkat	ATCC® TIB-152™ LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
IM-9	ATCC® CCL-159™ LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
HL-60	ATCC® CCL-240™ LGC Standards GmbH, Wesel, Germany
HUVEC	Provitro HUVEC Provitro GmbH, Berlin, Germany
EA.hy926	G. Multhoff University Hospital TU Munich, Germany
Geräte	
Flüssigstickstofftank (-196°C)	Taylor-Wharton LS 750 Taylor-Wharton Germany GmbH, Mildstedt, Germany
Zellkulturinkubator	Thermo Scientific Heracell 150i CO2 Incubator Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany
Zellkultursterilwerkbank	Heraeus® HERAsafe® Sicherheitswerkbank Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany
Verbrauchsgegenstände	
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson 50ml Tissue Culture Flask Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
Petrischalen (10cm Durchmesser)	TPP Zellkulturschale 100 TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland
Multiwellplatten (4well)	NUNC 4well Dish Nunclon Delta Treated Nalge Nunc international, NY, USA
Multiwellplatten (6well)	Becton Dickinson Companion Plate, 6-well Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
Multiwellplatten (24well)	Becton Dickinson Companion Plate, 24-well Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
Objektträger (8well)	Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide™ System

	Nalge Nunc international, NY, USA
Puffer und Medien	
Einfriermedium	Biochrom Biofreeze freezing medium Biochrom AG, Berlin, Germany
Einfriermedium	ibidi Freezing medium ibidi GmbH, Martinsried, Germany
Zellkulturmedium für Tumorzellen	PAA Quantum 263 with L-Glutamine PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Zellkulturmedium für Endothelzellen	Provitro Endothelial growth cell medium Provitro GmbH, Berlin, Germany
Zellkulturmedium	Biochrom Dulbecco's MEM (DMEM) Biochrom AG, Berlin, Germany
Fötales Bovines Serum	Biochrom FBS superior Biochrom AG, Berlin, Germany
Antibiotika für Tumorzellmedium	PAA Penicillin/Streptomycin (100x) PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Trypsin	PAA Trypsin-EDTA PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Matrigel	Gibco® Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
Hämatoxylinlösung	Roth Hämatoxylinlösung nach Gill II Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Coomassie Blaulösung	Coomassie Brilliant Blue G 250 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany

2.1.4 Für die zellbasierten Assays verwendete Materialien

Geräte	Hersteller
Bioluminometer	Berthold MicroLumat LB 96P bioluminometer EG&G Berthold, Bad Wildbad, Germany
Verbrauchsgegenstände	
Mikroplatten für das Bioluminometer	Berthold Microplate, 96-well, white EG&G Berthold, Bad Wildbad, Germany
Puffer und Medien	
MTT-Substanz (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)	Sigma Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany
ATP-Assay	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany

Proteasomassay-Kit aus <ul style="list-style-type: none"> - Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-like Assay (mit Suc-LLVY-Glo™ Substrate) - Proteasome-Glo™ Trypsin-like Assay (mit Z-LRR-Glo™ Substrate) - Proteasome-Glo™ Caspase-like Assay (mit Z-nLPnLD-Glo™ Substrate) und jeweils pro Assay 1x <ul style="list-style-type: none"> - Proteasome-Glo™ Buffer - Luciferin Detection Reagent 	Promega Proteasome-Glo™ 3-Substrate Cell-Based Assay System (G1180) Promega GmbH, Mannheim, Germany
--	--

2.1.5 Für die Proteinbiochemie verwendete Materialien

Geräte	Hersteller
Spannungsquelle	Consort 1200V-500mA E815 Electrophoresis Power Supply Consort bvba, Turnhout, Belgium
SDS-PAGE Elektrophoresekammer	Bio-Rad Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Schüttler	Serono Vibrax Shaker Serono Diagnostics, Rockland, USA
Verbrauchsgegenstände	
(SDS-)PAGE Gele	NuSep Tris-Glycine NB 4-20% NuSep Ltd, Lane Cove NSW 2066, Australia
	Roti-PAGE Gradient 4-20% Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
	Mini-PROTEAN TGX Precast Gels 4-20% Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Schwämme	Bio-Rad Fiber Pads Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Filterpapiere	Bio-Rad Mini Trans-Blot® Filter Paper Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
PVDF-Membran	Bio-Rad Trans-Blot® Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Kanüle	BD Microlance™ 3 Kanülen Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany

Spritze (20ml)	BD Discardit™ II Spritzen Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
Puffer und Medien	
RIPA Puffer	Sigma RIPA Buffer Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany
Probenpuffer für Zelllysate	Roth Roti-Load1 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Laufpuffer	Bio Rad 10xTris/Glycine/SDS Buffer Bio Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Blotpuffer	Bio Rad 10xTris/Glycine Buffer Bio Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Milchpulver	Roth Milchpulver Blotting grade Milk powder Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Acid 20%	Sigma Natriumazid Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany
Tween®20	Roth Tween®20 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
NaCl	Roth Natriumchlorid ≥ 99,5%, p.a., ACS, ISO Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	MERCK di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse EMSURE® MERCK KGaA, Darmstadt, Germany
KCl	MERCK Kaliumchlorid zur Analyse EMSURE® MERCK KGaA, Darmstadt, Germany
KH ₂ PO ₄	MERCK Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse EMSURE® ISO MERCK KGaA, Darmstadt, Germany
Farbstoff: Bromchlorindolylphosphat	Promega BCIP Promega GmbH, Mannheim, Germany
Farbstoff: Nitroblautetrazoliumchlorid	Promega NBT Promega GmbH, Mannheim, Germany
Proteinmarker	peqGOLD Protein Marker IV PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany
Antikörper	
Rabbit Sekundärantikörper	Cell Signaling Anti-rabbit IgG, AP-linked Antibody New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
Mouse Sekundärantikörper	Jackson Immuno Research INC. Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat Anti- Mouse IgG Dianova GmbH, Hamburg, Germany

4E-BP1	Cell Signaling 4E-BP1 Antibody New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
β -Actin	Sigma-Aldrich Anti- β -Actin antibody Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology Bcl-2 (100) Antibody Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
Bcl-x _L	Santa Cruz Biotechnology Bcl-x _L (H-5) Antibody Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
BID	Sigma-Aldrich Anti-BID antibody Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany
Caspase-8	Cell Signaling Caspase-8 Antibody New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
Cyclin B	Cell Signaling Cyclin B1 Antibody New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology GAPDH (0411) Antibody Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
I κ B- α	Santa Cruz Biotechnology I κ B- α (C-15) Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
Mcl-1	Cell Signaling Mcl-1 Antibody New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
p4E-BP1	Cell Signaling Phospho-4E-BP1 (Ser65) Antibody #9451 New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
p53	Santa Cruz Biotechnology p53 Antibody (DO-1) Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany
p70 S6 Kinase (+ p85 S6 Kinase)	Cell Signaling p70 S6 Kinase Antibody #9202 New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
pp70 S6 Kinase	Cell Signaling Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb #9234 New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany

pS6	Cell Signaling Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Antibody New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
PARP	Cell Signaling PARP Antibody New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
S6	Cell Signaling S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb #2217 New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
Ubiquitin	Cell Signaling Ubiquitin Antibody #3933 New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany

2.1.6 Für die Molekularbiologie verwendete Materialien

Geräte	Hersteller
Zentrifuge (für 1,5ml fassende Reaktionsgefäße)	Eppendorf Centrifuge 5415D Eppendorf AG, Hamburg, Germany
PCR-Cycler	Eppendorf Mastercycler® gradient Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Spannungsquelle für Agarosegele	Invitrogen E-Gel® Base Bio Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Geldokumentationsgerät für Agarosegele	Bio-Rad Molecular Imager® Gel-Doc™ XR+ with Image Lab™ Software Bio Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Verbrauchsgegenstände	
RNA-Extraktions-Kit mit <ul style="list-style-type: none"> - NucleoSpin® RNA Binding Columns - Collection Tube (2ml) - Collection Tube (1,5ml) 	NucleoSpin® RNA Clean-up MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany
Reaktionsgefäße (0,2ml für PCR)	Biozym PCR Soft Tubes, 0,2ml, farblos Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Austria
DNA-Elektrophoresegel	Invitrogen E-Gel® Agarose 2% with SYBR Safe Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany
Puffer und Medien	

<p>RNA-Extraktions-Kit mit</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lysis Buffer RA1 - Wash Buffer RA2 - Wash Buffer RA3 (concentrate) - RNase-free H₂O 	<p>NucleoSpin® RNA Clean-up MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany</p>
<p>Nuklease-freies H₂O</p>	<p>Promega Nuclease-free Water Promega GmbH, Mannheim, Germany</p>
<p>Oligo(dT)</p>	<p>Stratagene Oligo(dT) Primer Statagene GmbH, Heidelberg, Germany</p>
<p>Nukleotid-Mix mit</p> <ul style="list-style-type: none"> - dATP 10mM - dCTP 10mM - dGTP 10mM - dTTP 10mM 	<p>peqGOLD dNTP-Mix PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, Germany</p>
<p>Reverse Transkriptase</p>	<p>Promega M-MLV Reverse Transcriptase Promega GmbH, Mannheim, Germany</p>
<p>Puffer für die Reverse Transkriptase mit</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 250mM (pH 8,3 bei 25°C) - KCl 375mM - MgCl₂ 15mM - DTT 50mM 	<p>Promega M-MLV Reverse Transcriptase 5x Buffer Promega GmbH, Mannheim, Germany</p>
<p>RNase Inhibitor</p>	<p>Applied Biosystems® Rnase Inhibitor Life Technonogies GmbH, Darmstadt, Germany</p>
<p>PCR Master Mix für Standard-PCR mit</p> <ul style="list-style-type: none"> - Taq DNA Polymerase (50 Einheiten/ml) in Reaktionspuffer (pH 8,5) - dATP 400µM - dCTP 400µM - dGTP 400µM - dTTP 400µM - MgCl₂ 3µM 	<p>Promega PCR Master Mix (2x) Promega GmbH, Mannheim, Germany</p>
<p>Gelladepuffer für DNA-Elektrophorese mit</p> <ul style="list-style-type: none"> - TRIS/HCl pH 7,5 10mM - Na-acetat 5mM - EDTA 2mM - Glycerin 10% (w/v) - Bromphenolblau 0,02% (w/v) - Xylencyanolblau 0,015% (w/v) 	<p>Roth Roti®-Load DNA (mit Glycerin) Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany</p>
<p>DNA-Marker</p>	<p>Roth pBR328 Mix DNA-Marker Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany</p>
<p>Primer</p>	<p>Sequenz (gänzlich hergestellt durch</p>

	biomers.net GmbH, Ulm, Germany)
clAP2	F: 5'-ACA AGC AAG AGA ACT GAT TG-3' R: 5'-TGA AAG AAA TGT ACG AAC TG-3'
CXCL1 (GRO)	F: 5'-CTG AGC CCC ATG GCC CGC GC-3' R: 5'-GTT GGT GCT CCC CTT GTT C-3'
CXCL10	F: 5'-GCA CCA TGA ATC AAA CTG CCA TTC-3' R: 5'-GGA GAT CTT TTA GAC CTT TTC-3'
GAPDH	F: 5'-TGG TAT CGT GGA AGG ACT CA-3' R: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCT T-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Tumorzellen

Für die durchgeführten Experimente wurden ausschließlich Zelllinien (siehe Tabelle unter 2.1.3.) verwendet, die seit ihrem Erwerb in einem Einfriermedium mit 20% FCS und 10% DMSO bei -196°C im Flüssigstickstofftank kryokonserviert worden waren. Nach dem Auftauen wurden sie in eine Zellkulturflasche mit 10ml eines auf RPMI-1640 basierenden Tumorzellmediums (*Quantum 263*) aufgenommen, das zusätzlich mit Antibiotika (Penicillin 10000 IE und Streptomycin $10\mu\text{g/ml}$ in 100-facher Konzentration) versetzt worden war, und im CO_2 -Wärmeschrank (in feuchter Atmosphäre mit 5% CO_2) bei 37°C inkubiert. Das im Medium als pH-Indikator enthaltene Phenolrot zeigte durch einen Farbumschlag auf Gelb an, wann das alte Medium zu entfernen und durch ein neues zu ersetzen war. Wurden die Zellen in der Kulturflasche zu dicht, so mussten sie trypsinisiert werden, um eine zu starke Konfluenz und damit Konkurrenz um Nährstoffe und Sauerstoff zu vermeiden. Nach dem Abgießen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurde 1ml Trypsin-EDTA zu den Zellen pipettiert. Die Peptidase Trypsin führt durch Spaltung der extrazellulären Proteine zur Vereinzelung der Zellen und deren Ablösung vom Boden der Kulturflasche, was unter dem Mikroskop als Abrundung der Zellen beobachtet werden konnte. Um die Aktivität des Trypsins im Hinblick auf dessen Temperaturoptimum zu unterstützen, wurden die Zellen für circa fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Die Fähigkeit des beigefügten EDTAs, zweiwertige Ionen (insbesondere Calcium) zu komplexieren, führt ebenfalls zum Abbruch der Zell-Zell-Verbindungen. Letzte noch adhärenente Zellen wurden schließlich mechanisch durch kurze, kräftige Stöße der Zellkulturflasche gegen den Boden der Sterilwerkbank (sogenanntes *Shake off*-Verfahren) abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde daraufhin für weitere Experimente in dafür geeignete Schalen oder Multiwell-Platten passagiert. Sowohl zu den subkultivierten Zellen als auch zur Mutterkultur wurde frisches Medium hinzugegeben. Durch die im Medium enthaltenen Serumkomponenten wurde dadurch gleichzeitig die Aktivität des Trypsins gehemmt, und die Zellen konnten sich daraufhin erneut am Gefäßboden festsetzen.

2.2.2 Generierung von Spheroïden

Die Kultivierung von Tumorzellen am Boden diverser ZellkulturgefäÙe, wie zum Beispiel Petrischalen, Multiwellplatten oder Chamberslides, eignet sich gut zur Untersuchung der Zellmorphologie einzelner Zellen oder als Ausgangspunkt zahlreicher labortechnischer Verfahren, wie im Weiteren noch beschrieben wird. Sie entspricht allerdings nicht den Verhältnissen *in vivo*, wo für die Zellen vielmehr die Möglichkeit besteht, sich in einem dreidimensionalen Raum auszubreiten. Um dieses Wachstumsverhalten annäherungsweise nachzuahmen, bedienen wir uns der Technik der Zellkultivierung auf Matrigel. Matrigel ist eine bei Raumtemperatur gelartige Substanz, die in ihrer Zusammensetzung der einer Basalmembran entspricht. Es wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkom extrahiert und ist wie dieses reich an Proteinen der Extrazellulärmatrix, vor allem Laminin, Kollagen IV und Entactin. Außerdem enthält es eine Reihe an Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Epidermal growth factor (EGF), Insulin-like growth factor (IGF-1) und Platelet-derived growth factor (PDGF). In der Praxis muss Matrigel gekühlt bei circa 4°C auf die ZellkulturgefäÙe verteilt werden, da es bei dieser Temperatur in flüssiger Form vorliegt und bereits ab 10°C seine gelartige Konsistenz annimmt.

Nach Präparation der Kammern eines Chamberslides mit Matrigel wurden die trypsinisierten Tumorzellen auf diesem ausgesät und mit 200µl Medium bedeckt. Im CO₂-Inkubator wurden sie über einen Zeitraum von 14 Tagen bebrütet und regelmäßig unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Wenn notwendig, wurde das Medium erneuert. Es zeigte sich eine dreidimensionale Ausbreitung der Zellen auf und in dem Matrigel, wobei sie kugelförmige Konglomerate bildeten – sogenannte Tumorzell-Spheroïde. Als die Spheroïde in den Kammern eine angemessene Größe erreicht hatten, wurden sie mit jeweils einem der sieben untersuchten Flavonoïde in einer Konzentration von 50µM behandelt und zwei weitere Tage lang inkubiert, wobei nach circa 5 Stunden ein Wechsel des Mediums (erneut mit 50µM des jeweiligen Flavonoids versetzt) vorgenommen wurde. Daraufhin erfolgte die Bildgebung unter dem Phasenkontrastmikroskop (zur Technik siehe 2.2.3).

2.2.3 Phasenkontrastmikroskopie

Die Betrachtung der Tumorzellen und der Spheroiden durch das Phasenkontrastmikroskop erlaubte es, einen Eindruck über deren Zustand nach Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen zu gewinnen und anhand spezieller zellmorphologischer Veränderungen (z.B. Vakuolisierung) abzuschätzen, durch welchen Mechanismus (z.B. Autophagie) eine eventuelle Zellschädigung erfolgt war. Für dieses Verfahren wurden die Zellen nach Trypsinisierung auf 8well-Chamberslides passagiert und, die konventionellen 2D-Kulturen betreffend, in 200µl Medium unter Zellkulturbedingungen inkubiert, bis sie am Boden des Objektträgers angewachsen waren und eine ausreichende Konfluenz von 70% für die Zugabe der Flavonoide bzw. des Borrelidins erreicht hatten. Für das entsprechende Vorgehen bei den 3D-Kulturen (Spheroiden) siehe Unterpunkt 2.2.2. Nach circa 24-stündiger Behandlung konnte das Medium entfernt, und die noch vitalen Zellen konnten unter dem Mikroskop bei 40-facher (2D-Kulturen) beziehungsweise 10-facher (3D-Kulturen) Vergrößerung betrachtet und photographiert werden. Das Phasenkontrastprinzip erlaubte die Darstellung der Zellen ohne die Notwendigkeit einer Färbung, durch welche ihre Vitalität hätte beeinträchtigt werden können.

2.2.4 Kernfärbung mit Hämatoxylinlösung nach Gill II

Die Wirkung der Flavonoide bzw. des Borrelidins auf die Gesamtzahl der behandelten Zellen konnte als erste quantitative Abschätzung durch eine simple, makroskopisch sichtbare Zellfärbung dargestellt werden. Die Zellen wurden dazu trypsinisiert und auf 24well-Platten in einem Zellkulturmedium angesetzt. Nachdem sie angewachsen und zu circa 70% konfluent waren, wurden sie für 48 Stunden mit den entsprechenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Daraufhin wurde das Medium entfernt und mit PBS nachgewaschen. Die Zellen wurden im Anschluss umgehend in Ethanol fixiert, welcher 5 Minuten lang auf ihnen belassen wurde. Nach Abgießen des Ethanols konnte die Hämatoxylinlösung in die Vertiefungen pipettiert werden. Für die Färbereaktion wurden die Zellen mit dem Hämatoxylin für 15 Minuten stehen gelassen. Schließlich wurde die Lösung mit Wasser abgewaschen, und die Zellen wurden trocknen gelassen. Die Kerne erschienen nun unter dem Mikroskop blau-violett, während das Zytoplasma und weitere Zellbestandteile ungefärbt blieben. Die makroskopische Gesamtfärbung der Zellen konnte

somit orientierend zur Einschätzung des wirksamen Konzentrationsbereichs der Flavonoide und des Antibiotikums Borrelidin herangenommen werden.

2.2.5 Clonal Assay

Zur Bestimmung der längerfristigen Wirkung der ausgewählten Flavonoide auf Mammakarzinom-Zellen wurde die Proliferationsaktivität der Zellen mittels Clonal Assay untersucht. In Grundzügen ist dieser der unter 2.3.4 beschriebenen Zellfärbung ähnlich. Die Zellen wurden trypsinisiert und auf 4well-Platten in einem Zellkulturmedium angesetzt. Nachdem sie unter Standardzellkulturbedingungen einen Tag lang angewachsen waren, wurden sie für zehn Tage mit den angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Substanzen inkubiert. Daraufhin wurde das Medium entfernt und mit PBS nachgewaschen. Die Zellen wurden im Anschluss umgehend in Ethanol fixiert und mit Coomassie Blaulösung gefärbt. Nach dem Abwaschen der Lösung mit Wasser und dem Trocknen der Zellen konnten die Platten photographiert werden. Durch die Blaufärbung wurden somit jene Zellkolonien sichtbar gemacht, die aus Zellen entstanden waren, welche auch nach einer längeren Behandlung mit den Flavonoiden ihre Teilungsfähigkeit erhalten konnten.

2.2.6 MTT-Assay

Um die Vitalität der Tumorzellen nach der Behandlung mit den entsprechenden Substanzen quantitativ zu erfassen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Auf einer 96well-Platte wurden dafür 5×10^3 Zellen pro Vertiefung angesetzt und nach Zugabe der jeweiligen Substanzen 72 Stunden lang bebrütet. Am dritten Tag wurden 20 μ l des MTT-Mediums (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide in PBS gelöst zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml) zu den noch lebenden Zellen in 200 μ l Tumorzellmedium hinzugefügt und für eine weitere Stunde inkubiert. MTT wird intrazellulär zu unlöslichem, violetterm Formazan reduziert, welches nach Abnahme des Überstandes in 100 μ l DMSO resuspendiert wurde. Die Detektion der Färbung der Lösung erfolgte durch einen ELISA reader bei 595nm Wellenlänge. Eine stärkere Blaufärbung ist hierbei gleichzusetzen mit einer höheren Anzahl an vitalen Zellen und damit weniger Medikamenten-induziertem Absterben.

2.2.7 ATP-Assay

Im Falle der Leukämiezellen erfolgte die Bestimmung ihrer Sensitivität auf Borrelidin mittels eines ATP-Assays. Im Vergleich zum MTT-Assay ist dieses für nicht-adhärenente Zellen besser geeignet. Eine Gesamtzahl von 5000 Zellen wurde in 200µl Medium auf 96well-Platten angesetzt. Es folgte die Inkubation mit den entsprechenden Konzentrationen an Borrelidin bei 37°C für 72 Stunden. Zur Zellextraktion wurden anschließend jeweils 50µl einer Pufferlösung zu jeder Vertiefung hinzugefügt, mit deren Inhalt vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur wirken gelassen. Die Zugabe des Luciferin-Luciferase-Reagenz zu jeder Probe erfolgte automatisch im Bioluminometer, woraufhin eine Reaktion mit dem aus den Tumorzellen freigesetzten ATP ablief, bei welcher unter anderem Licht entsteht. Dieses wurde mithilfe des Bioluminometers registriert und gemessen. Da ATP als wichtige Energiequelle für alle lebenden Zellen dient, lässt sich sein Nachweis als Vitalitätszeichen interpretieren. Die Menge an vorhandenem ATP, das heißt die Intensität des Lichtsignals, kann hierbei als proportional zur Anzahl überlebender Leukämiezellen betrachtet werden.

2.2.8 Proteasomassay

Proteasomassays wurden durchgeführt, um den Einfluss der untersuchten Substanzen auf die Aktivität der proteasomalen Enzymkomplexe der Tumorzellen zu untersuchen. Die Zellen, welche über Nacht auf 96well-Platten mit 5×10^3 Zellen pro well angewachsen waren, wurden für fünf Stunden mit den entsprechenden Substanzen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Unter Verwendung des *Proteasome-GloTM 3-Substrate Systems* konnten daraufhin die drei enzymatischen Aktivitäten des Proteasoms bestimmt werden, indem 100µl des Proteasom-GloTM Puffers mit Luciferin Detektions-Reagens hinzugefügt wurden, wobei entweder Suc-LLVY-aminoluciferin (für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität), Z-LRR-aminoluciferin (für die Trypsin-ähnliche Aktivität) oder Z-nLPnLD-aminoluciferin (für die Caspase-ähnliche Aktivität) enthalten waren. Die Enzymkomplexe des Proteasoms erkennen bei dieser Methode ihre entsprechenden künstlichen Substrate, schneiden sie und setzen dabei Aminoluciferin frei, das wiederum als Substrat für das Enzym Luciferase dient. Es folgte eine 10-minütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur, um die Luciferase-Reaktion zu ermöglichen. Bei dieser wird aus dem abgespalteten Aminoluciferin unter ATP- und O₂-Verbrauch Energie in Form von Licht frei. 200µl der Proben wurden auf

Mikroplatten übertragen, und das emittierte Licht konnte durch das MicroLumat LB 96P Bioluminometer detektiert und als relative Lichteinheiten quantifiziert werden. Dabei ist ein starkes Lichtsignal als hohe Proteasomaktivität zu interpretieren, da nur hierdurch ausreichend viel Aminoluciferin abgespalten und Luciferase erzeugt werden kann.

2.2.9 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden nach Trypsinisierung in ihrer Kulturflasche auf Petrischalen in 10ml Tumorzellmedium angesetzt und so lange im CO₂-Inkubator bebrütet, bis eine Konfluenz von maximal 70% erreicht war. Nach Zugabe der entsprechenden Substanzen und definierten Inkubationszeiten (siehe jeweilige Legende der Abbildungen) wurde das Medium entfernt und durch 300µl RIPA-Puffer ersetzt, bevor die Schalen für 10 Minuten eingefroren wurden. Sowohl der RIPA-Puffer als auch der Einfriervorgang sorgen bei dieser Methode für das Aufbrechen der Zellwände und das Freiwerden der intrazellulären Proteine, während durch den Puffer gleichzeitig deren Degradation verhindert wird. Die wiederaufgetauten und nun lysierten Zellen wurden samt RIPA-Puffer in Eppendorf-Cups überführt und 5 Minuten lang bei 19.000 Umdrehungen pro Minute unter ständiger Kühlung bei 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde in 100µl eines Probenpuffers (durch den die Peptidbindungen stabilisiert werden und der die Probe durch das enthaltene Glycerin beschwert) aufgenommen, das Pellet wurde verworfen. Die Aufbewahrung der Proben bis zur weiteren Verwendung geschah tiefgekühlt bei -20°C.

2.2.10 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Bevor ein Nachweis der Expression bzw. Regulation bestimmter Proteine mittels Western Blot-Analyse möglich war, mussten diese den generierten Zelllysaten entnommen und aufgetrennt werden. Dies erfolgte nach der 1970 durch Laemmli etablierten Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gelelektrophorese, wobei die verwendeten Gele kein Natriumdodecylsulfat (SDS) mehr enthalten, da dessen Vorhandensein im Laufpuffer (aus Tris/Glycine/SDS und Millipore-H₂O im Verhältnis 1:10) zum Ladungsausgleich genügt. Das Gel wurde in eine mit Puffer gefüllte Elektrophorese-Zelle eingespannt. Anschließend wurden seine Kammern gespült und mit 10-30µl (je nach Kammeranzahl des Polyacrylamid-Gels und nach Gesamtproteinmenge in den Zelllysaten) der einzelnen Proben gefüllt, um anschließend die Auftrennung der Proteine nach Größe und Gewicht im Elektrophorese-Gel

bei circa 200V Spannung und 70mA Stromstärke zu ermöglichen. Die negative Eigenladung der Proteine und die zusätzliche Neutralisierung positiver Ladungen durch das SDS im Laufpuffer sowie durch den basischen pH des Gels bewirken hierbei die Wanderung der Proteine von der Kathode zur Anode. Dabei müssen die Proteine das Maschenwerk des Polyacrylamid-Gels durchqueren, woraus deren Auftrennung nach der Molekülgröße erfolgt, da kleinere Proteine in derselben Zeit weiter (d.h. näher zur Anode) wandern können als größere. Nach 30 bis 45 Minuten wurde die Elektrophorese unter Berücksichtigung des Vergleichs mit der Auftrennung eines gefärbten Proteinmarkers beendet, und die Moleküle konnten so im Gel festgehalten werden.

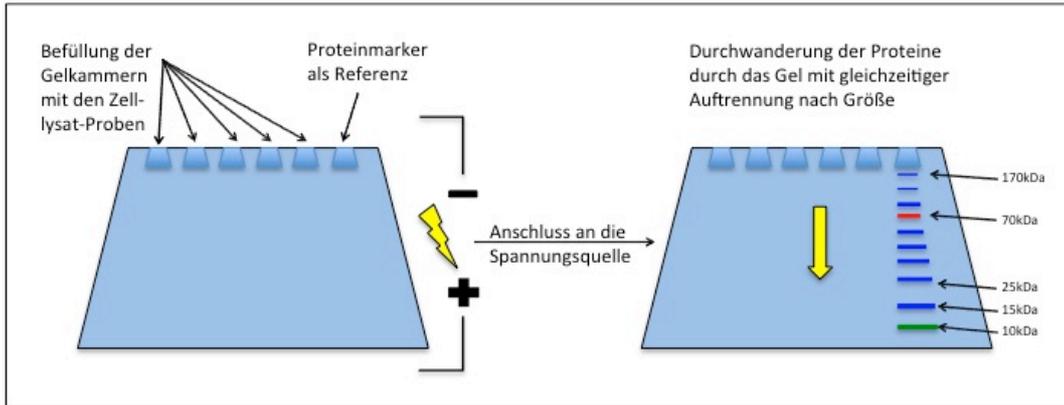


ABBILDUNG 11: FUNKTIONSWEISE DER GELELEKTROPHORESE

Nach der Befüllung der Gelkammern mit 10-30 μ l der Zelllysate und dem Anschluss an die Stromquelle laufen die Proteine in die Richtung der Anode (Pluspol) und trennen sich nach ihrer Größe im Polyacrylamid-Gel auf. Ein zusätzlich zu den Proben aufgetragener Größenmarker erlaubt die Ermittlung der Laufzeit während der Elektrophorese und letztendlich die Größenbestimmung der detektierten Proben-Proteine.

2.2.11 Western Blot (Immunoblot)

Um die Proteine für weitere Analysen zugänglich zu machen, müssen diese nach der Auftrennung im Gel auf die Oberfläche einer PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) übertragen („geblottet“) werden. Gel und Membran wurden dafür nach der Aktivierung der Membran mit vergälltem Ethanol und Voräquilibrierung in Tris/Glycine-Puffer zwischen Filterpapieren und Schwämmen (siehe Abbildung 2) in der Transferkammer positioniert und unter Kühlung mittels Eisakku im Blotpuffer (aus Tris/Glycine und Millipore-H₂O im Verhältnis 1:10) für 60 Minuten an eine Stromquelle bei circa 60V Spannung und 200mA Stromstärke angeschlossen. Der Strom verlief hierbei in einem 90°-Winkel zur Gel- und Membranoberfläche, wobei das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode gerichtet sein musste, da die negativ geladenen Proteine wiederum von der Kathode (also aus dem Gel hinaus) zur Anode (auf die Membranoberfläche) wandern sollten.

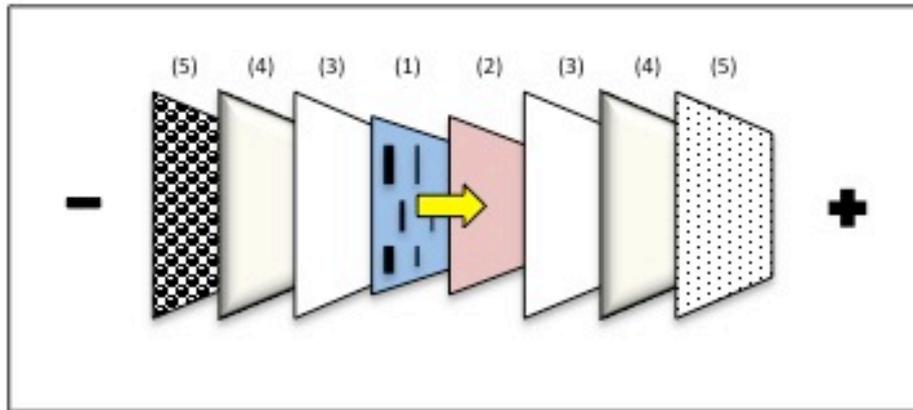
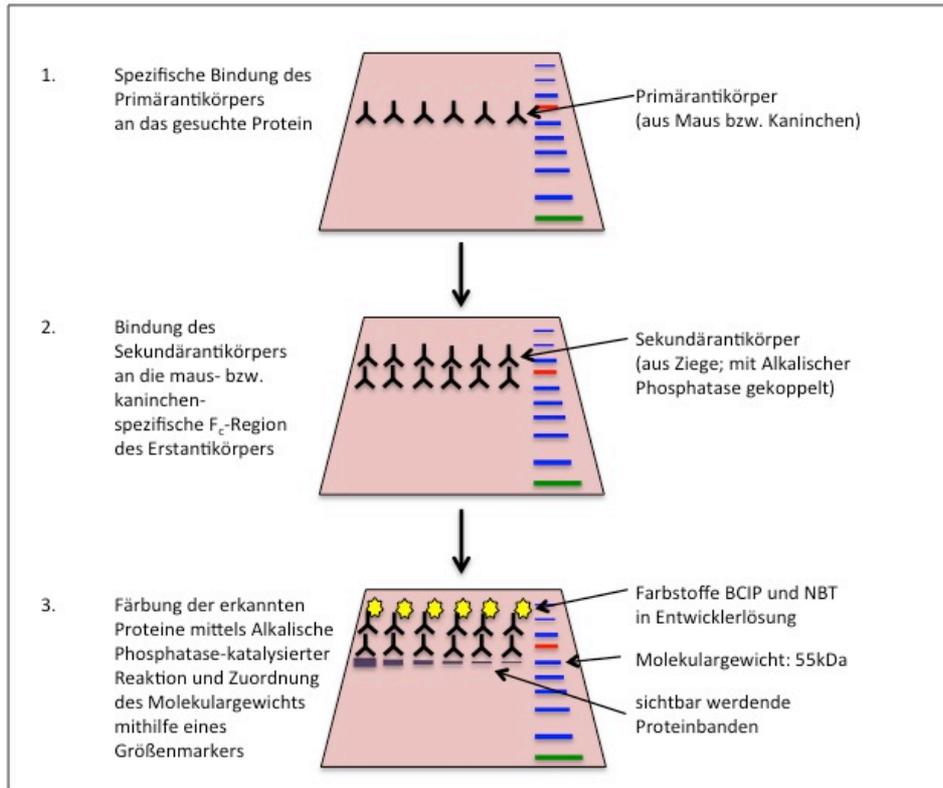


ABBILDUNG 12: SCHEMA ZUM PRINZIP DES WESTERN BLOT VERFAHRENS

(1) Elektrophorese-Gel, (2) PVDF-Membran, (3) Filter-Papiere, (4) Schwämme, (5) Haltevorrichtung. Der Strom läuft in einem 90°-Winkel zur Blotting-Vorrichtung, die Proteine wandern von der Kathode (Minuspol), das heißt aus dem Gel hinaus, zur Anode (Pluspol) und bleiben so auf der Membran haften.

Vor dem eigentlichen Proteinnachweis wurden die Membranen nach erfolgtem Blotten für zwei Stunden auf dem Schüttler mit einem Blockierungsreagenz, bestehend aus 4%-igem Trockenmilchpulver in PBS, 0,02%-igem Natriumazid und 0,01%-igem Tween®20, behandelt, um dadurch unspezifische Bindungsstellen zu maskieren. Anschließend konnte dieses gegen den Primärantikörper ausgetauscht werden. Der Erstantikörper wird aus Mäusen bzw. Kaninchen gewonnen und richtet sich gegen das gesuchte Protein. Er wurde in 140-facher Verdünnung in Blockierungsreagenz auf die Membran aufgebracht und für die spezifische Bindung über Nacht unter permanentem Schütteln bei Raumtemperatur auf dieser belassen. Am nächsten Tag wurde er gegen einen Sekundärantikörper (gewonnen aus Ziegen; 750-fach verdünnt in Blockierungsreagenz) ausgetauscht, der an die für die betreffende Spezies spezifische F_c-Region des primären Antikörpers bindet. Nach weiterer Inkubation auf dem Schüttler für zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde der Sekundärantikörper entfernt und die Membran dreimal für etwa 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die immunologische Bindung an die gesuchten Proteine wurde letztendlich mittels einer Entwicklerlösung, zusammengesetzt aus den Farbstoffen BCIP (Bromchlorindolyphosphat) und NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), gelöst in einem Puffer aus Tris (1M bei pH 9,5), NaCl (1M), MgCl (1M) und Millipore-H₂O im Verhältnis 20:20:1:200, sichtbar gemacht. Dabei wird die Farbreaktion von BCIP und NBT durch das Enzym Alkalische Phosphatase katalysiert, welches zu diesem Zweck mit dem Sekundärantikörper gekoppelt ist. Die Zuordnung der detektierten Proteine zu ihrem Molekulargewicht gelang durch den Vergleich mit dem zusätzlich auf das Gel aufgetragenen und auf die Membran transferierten Größenmarker.



ABBLIDUNG 13: PRINZIP DER IMMUNOFÄRBUNG

Die geblotteten Proteine werden durch sukzessive Bindung zweier Antikörper und anschließender Färbereaktion mit BCIP/NBT sichtbar gemacht. Der Erstantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Protein. Der Zweitantikörper erkennt die F_c -Region des Erstantikörpers und bindet daran. Die an ihn gekoppelte Alkalische Phosphatase katalysiert die Farbreaktion, welche die Proteinbanden erscheinen lässt. Durch den Vergleich mit einem Größenmarker lässt sich das Molekulargewicht der Proteine bestimmen.

2.2.12 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Extraktion der zellulären RNA erfolgte unter Verwendung des *NucleoSpin[®] RNA Cleanup-Kits* von MACHEREY-NAGEL. Zunächst wurde das Tumorzellmedium aus den 6well-Platten, auf welchen die Zellen angesetzt und mit den entsprechenden Substanzen inkubiert worden waren, entfernt. Um die Zellen zu lysieren, wurden jeweils 300µl des im Kit enthaltenen Lyse-Puffers in die Vertiefungen pipettiert. Zur Optimierung der gewünschten RNA-Bindung an die Silica-Membranen wurden jeweils 300µl 100%-igen Ethanols hinzugefügt und die gesamte Suspension mehrmals auf- und abpipettiert. Anschließend wurde das Lysat in die beigefügten Sammel-Behälter mit einer Scheibe aus Silica-Membran überführt und für 30 Sekunden bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die RNA sollte nun an die Membran gebunden haben, so dass der Durchfluss

samt Auffangbehälter entfernt und der Sammel-Behälter in einen neuen Auffangbehälter platziert werden konnten. Daraufhin folgten drei Waschvorgänge, durch welche die RNA von Kontaminationen gereinigt werden sollte. Zunächst wurde mit 250µl RA2-Puffer gewaschen, daraufhin mit 700µl RA3-Puffer (gelöst in 100%-igem Ethanol) und schließlich mit 350µl RA3-Puffer (gelöst in 100%-igem Ethanol). Auf jeden Waschvorgang folgte eine Zentrifugation bei 8000 Umdrehungen pro Minute, zweimal für jeweils 30 Sekunden und beim letzten Mal für 2 Minuten. Der Durchfluss wurde dabei stets vor dem nächsten Waschen verworfen. Nach Reinigung der RNA konnte diese von der Membran eluiert werden. Hierfür wurde der Sammelbehälter in ein 1,5ml fassendes Reaktionsgefäß gesetzt und die Membran bei geöffnetem Deckel für 3 Minuten trocknen gelassen. Daraufhin wurden 33µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und die RNA während der abschließenden Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 Umdrehungen pro Minute eluiert. Der Sammelbehälter mit der Silica-Membran konnte nun verworfen werden, die RNA, inzwischen zusammen mit dem Wasser im unteren Tube befindlich, wurde für das weitere Procedere auf Eis gelagert.

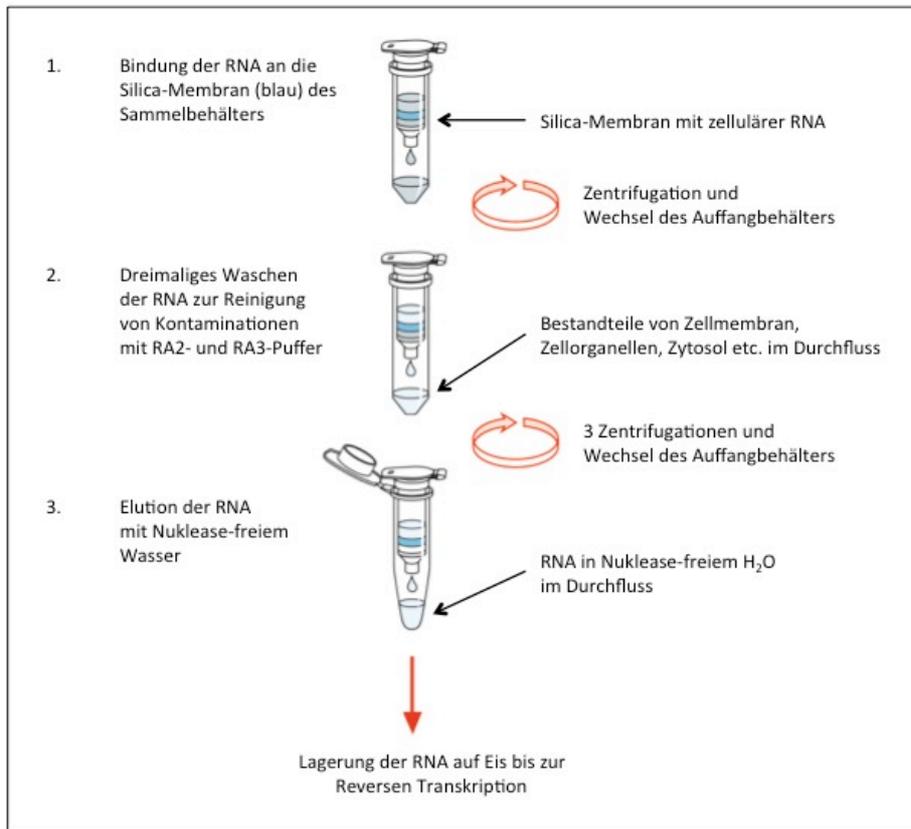


ABBILDUNG 14: PRINZIP DER RNA-EXTRAKTION AUS ZELLEN

Nach Lyse der Zellen mit einem geeigneten Puffer und unter Zugabe von Ethanol kann die RNA an die Silica-Membran des Sammelbehälters binden. Mehrere Waschvorgänge mit geeigneten Puffern und anschließende Zentrifugationen reinigen die gebundene RNA. Durch Zugabe von Nuklease-freiem Wasser wird die RNA in einer weiteren Zentrifugation in den Auffangbehälter eluiert und steht für die RT-PCR zur Verfügung.

Die Verwendung des Schaubildes erfolgte mit freundlicher Genehmigung der Firma MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG.

2.2.13 cDNA-Synthese

Um die Proben aus eluierter RNA weiter für die Polymerasekettenreaktion vorzubereiten, musste als nächstes die aus den Zellen extrahierte RNA in komplementäre DNA umgeschrieben werden. Zu 33µl RNA wurden im ersten Schritt 1,5µl Oligo(dT)-Primer hinzugegeben und anschließend für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Dies erlaubte die Bindung der Thymidin-Nukleotide an den poly(A)-Schwanz der mRNA. Unter Eiskühlung wurden daraufhin 2,5µl Nukleotid-Mix, 0,5µl RNasin® Ribonuklease Inhibitor, 1µl des Enzyms M-MLV Reverse Transkriptase und 10µl M-MLV Reverse Transkriptase 5x Reaktionspuffer zu den Proben pipettiert. Die reverse Transkription durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase lief bei 42°C ab. Das Enzym verwendete hierbei die Oligo(dT)-Kette als Primer. Nach 60 Minuten wurde die nun generierte cDNA zur Verwahrung bei -20°C tiefgekühlt.

2.2.14 PCR

Für die Amplifikation der zu untersuchenden Gensequenzen wurde eine klassische Polymerasekettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) durchgeführt. Zu 1 µl der synthetisierten cDNA wurden auf Eis 10,5 µl Nuklease-freies Wasser, 1 µl 2x PCR Master Mix und 1 µl Primer-Mix (vorwärts- und rückwärts-gerichteter Primer verdünnt mit Nuklease-freiem Wasser im Verhältnis von 1:1:19) gegeben. Die Reaktion selbst lief über circa 180 Minuten (je nach Anzahl der Zyklen) im *Mastercycler gradient* von Eppendorf ab. Bei einer PCR besteht jeder Zyklus aus drei Schritten, die in der richtigen Reihenfolge hintereinander ablaufen können, indem die für den jeweiligen Schritt erforderliche Temperatur zu einem definierten Zeitpunkt ein- bzw. umgestellt wird, was in diesem Fall automatisch vom PCR-Gerät übernommen wurde. Zunächst ist es erforderlich, den generierten cDNA-Doppelstrang, der als Matrize dienen soll, in zwei Einzelstränge aufzutrennen. Dieser Schritt der Denaturierung erfolgt bei 94°C und stellt die Basis für das Annealing der Primer dar, das heißt deren Anlagerung an die komplementäre Sequenz ihres jeweiligen DNA-Einzelstrangs. Die Primer sind so konstruiert, dass sie durch die Hybridisierung mit der DNA die gesuchte Nukleotidsequenz zwischen sich einschließen. Um die Fehlerrate beim Annealing (zum Beispiel Fehlpriming oder Primerdimer-Bildung) und damit bei der nachfolgenden Amplifikation so gering wie möglich zu halten, sollte das Primerdesign für jede Sequenz möglichst spezifisch erfolgen. Daraus ergibt sich, dass jeder Primer in Bezug auf Basenpaarlänge und -abfolge anders ist, was erklärt, warum auch die optimale Temperatur für das Annealing zwischen circa 40°C und 70°C variieren kann. Bei den durchgeführten Experimenten wurde die Annealingtemperatur stets auf 57°C eingestellt. Erst wenn die Primer als Startpunkt für die DNA-Polymerase gebunden haben, kann diese, ausgehend vom freien 3'-OH-Ende der Primer, den jeweiligen komplementären DNA-Strang synthetisieren. Die benötigten Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) befanden sich, zusammen mit dem Enzym selbst sowie mit MgCl₂, das es ebenfalls für die Reaktion benötigt, im zugegebenen PCR Master Mix. Die Taq-DNA-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*), welche hier verwendet wurde, weist bei ihrer außerordentlichen Hitzestabilität ein Aktivitätsmaximum bei 74°C auf. Nach Beendigung ihrer Arbeit, das heißt der Primerverlängerung bis zum Ende des Strangs, kann auf diese Weise im Laufe eines Zyklus die gesuchte DNA-Sequenz verdoppelt werden.

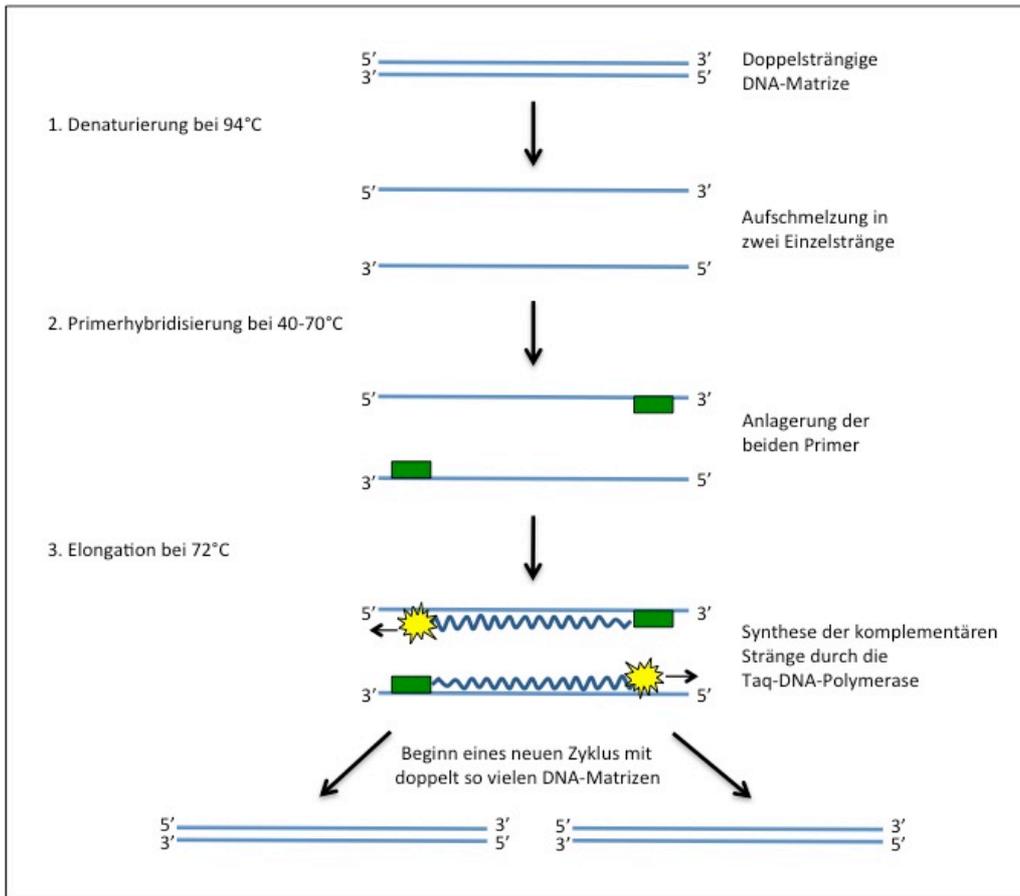


ABBILDUNG 15: SCHEMA ZUM PRINZIP DES PCR VERFAHRENS

Je nach Anzahl der abgelaufenen Zyklen beträgt die Amplifikationsrate demnach optimalerweise 2^x (mit x = Anzahl der Zyklen), also zum Beispiel 2^{32} bei einer PCR mit 32 Zyklen. Dies ermöglicht den Nachweis einer Gensequenz selbst bei einer sehr geringen Probenmenge. Die hier durchgeführten Polymerasekettenreaktionen liefen stets mit 28 bis 36 Zyklen ab.

2.2.15 Agarosegelelektrophorese

Nach abgelaufener PCR wurden die amplifizierten Sequenzen mittels DNA-Elektrophorese in ein Agarose-Gel laufen gelassen und darin sichtbar gemacht. Hierfür wurden jeweils $16\mu\text{l}$ der Proben mit einem Gelladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Dabei sorgte das im Puffer enthaltene Glycerin für die gleichmäßige Verteilung der Probe am Boden der Geltasche, während Tris und EDTA die Stabilität der DNA erhöhten. Die Laufzeit wurde anhand der durch die integrierten Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanolblau markierten Lauffront bestimmt.

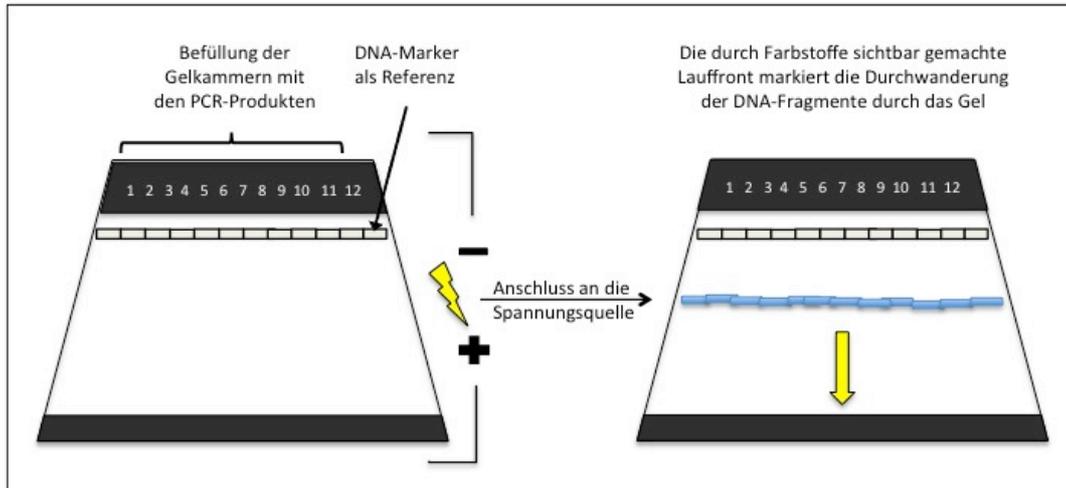


ABBILDUNG 16: FUNKTIONSWEISE DER AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarose-Gel durch den *Molecular Imager® Gel Doc™ XR+* analysiert. Die zugehörige *Image Lab™ Software* erlaubte die Bearbeitung der Ergebnisse. Dabei erfolgte die Visualisierung des PCR-Produkts, indem die Bindung des im Gel enthaltenen *SYBR®Safe* DNA-Farbstoffs an die amplifizierten Sequenzen diese unter UV-Licht zum Leuchten brachte. Zur Zuordnung der Basenpaarlängen diente ein zusätzlich auf das Gel aufgetragener DNA-Größenmarker als Referenz.

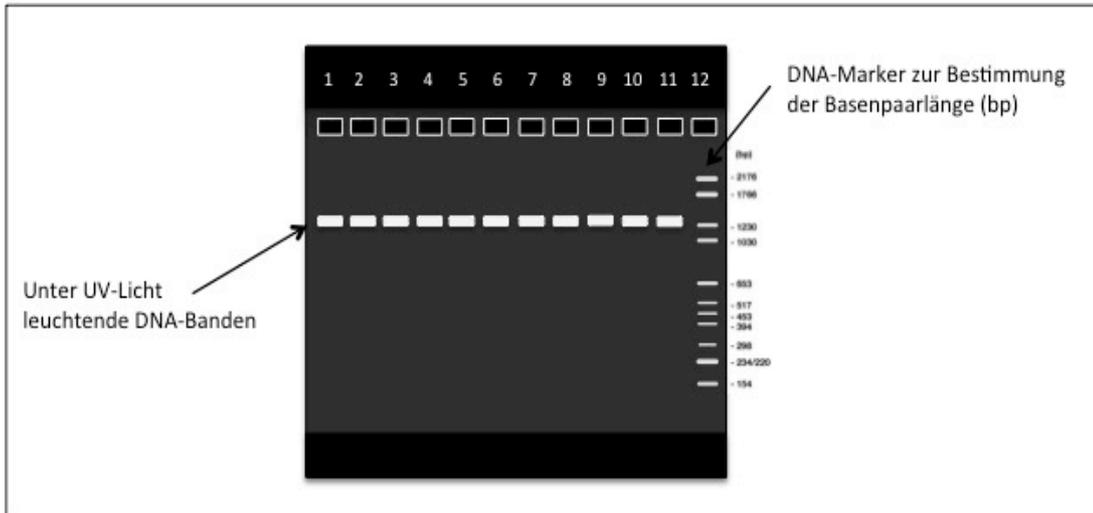


ABBILDUNG 17: ERGEBNIS UND INTERPRETATION DER AGAROSEGELELEKTROPHORESE

3 Ergebnisse

3.1. Flavonoide und ihre Wirkungen auf Mammakarzinom-Zellen

3.1.1 Zellüberlebensstudien

Um einen ersten Eindruck über die Auswirkungen der Behandlung mit steigenden Konzentrationen an ausgewählten Flavonoiden auf die Vitalität der Tumorzellen zu gewinnen, wurden diese nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen mit einer Hämatoxylinlösung angefärbt. In Abbildung 18 wird veranschaulicht, wie der Grad der Färbung unter ansteigenden Konzentrationen von Quercetin und Apigenin sukzessive abnimmt. Ein Verlust von anfärbbaren Zellen kann hierbei nach diesem kurzen Intervall auf einen vonstatten gegangenen Zelltod oder aber auf eine verminderte Proliferation hinweisen. Dieser Zusammenhang ist unter der Behandlung mit Quercetin deutlich erkennbar und bei den Zelllinien MDA-MB-231, -435 und -453 am stärksten ausgeprägt. Im Falle der Zelllinie MCF-7 erzielte jedoch Apigenin mit den vergleichsweise geringsten Konzentrationen einen sichtbaren Effekt.

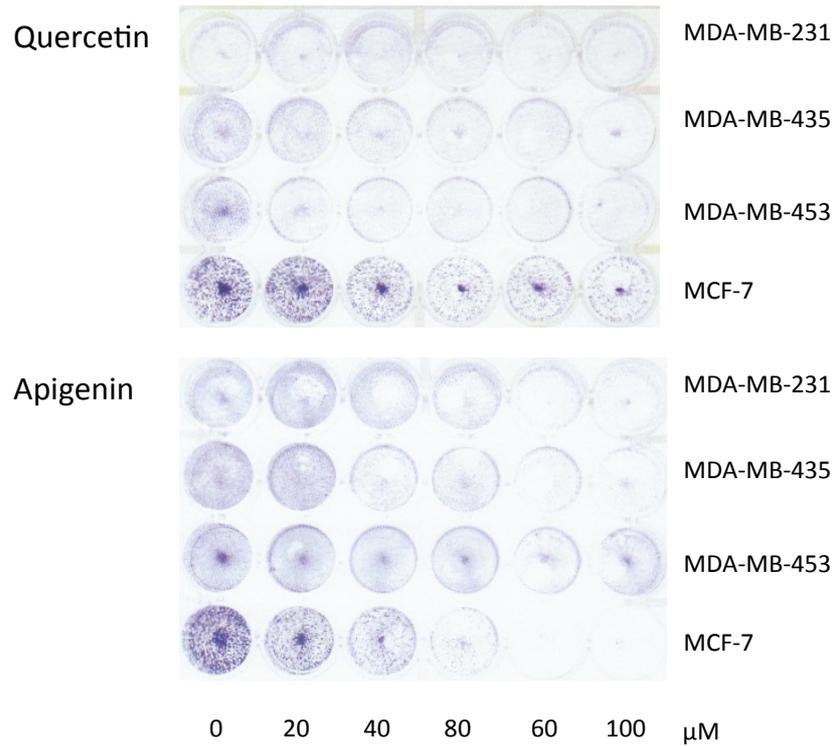


ABBILDUNG 18: EINFLUSS AUSGEWÄHLTER FLAVONOIDE AUF DAS ÜBERLEBEN VON MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Zellen der Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB-231/-435/-453 und MCF-7 wurden auf 24well-Platten angesetzt und mit den angegebenen Konzentrationen Quercetin und Apigenin inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte die Fixierung der Zellen in Ethanol und anschließend die Färbung mit Hämatoxylinlösung nach Gill II. Die blau-violette Färbung markiert die Gesamtmasse an überlebenden Zellen.

Nach diesem ersten Überblick wurden MTT-Assays an mehreren Zelllinien durchgeführt, mit deren Hilfe die gewonnenen Erkenntnisse bestätigt, ergänzt und genauer quantifiziert werden sollten. In Abbildung 19 wird durch eine negative Steigung der Kurven eine geringere Farbdetektion im Assay und damit ein geringeres Vorhandensein vitaler Zellen demonstriert. Es bestätigt sich also die Beobachtung, dass mit zunehmender Konzentration der Flavonoide Quercetin und Apigenin der Anteil überlebender Tumorzellen abnimmt. Das Flavanonol Taxifolin (Dihydroquercetin) zeigt im Gegensatz zu seiner Muttersubstanz Quercetin einen nur sehr geringen negativen Einfluss auf das Überleben der Mammakarzinom-Zellen (MDA-MB-231, -435, -453 und MCF-7). Mittels MTT-Assay wurde zudem die Wirkung der Flavonoide Quercetin, Apigenin und Taxifolin auf die nicht-malignen Zelllinien MCF-10A (Brustdrüsen-Epithel) und HUVEC (Nabelschnurvenen-Endothel) untersucht. Es ließ sich feststellen, dass auch diese unter steigenden Konzentrationen der Substanzen abstarben, wobei Apigenin die scheinbar stärkste unter den drei genannten Flavonoiden, Taxifolin dagegen kaum eine Wirkung besaß. Allerdings liegt die niedrigste Überlebensrate der nicht entarteten Zellen (also bei der jeweils höchsten Konzentration der Flavonoide) über dem Gesamtüberleben der malignen Zelllinien. Insbesondere Quercetin und Apigenin zeigten somit insgesamt eine schwächere Wirkung auf gutartige Zellen als auf bösartige, wobei der Unterschied bei Apigenin geringer ausgeprägt war.

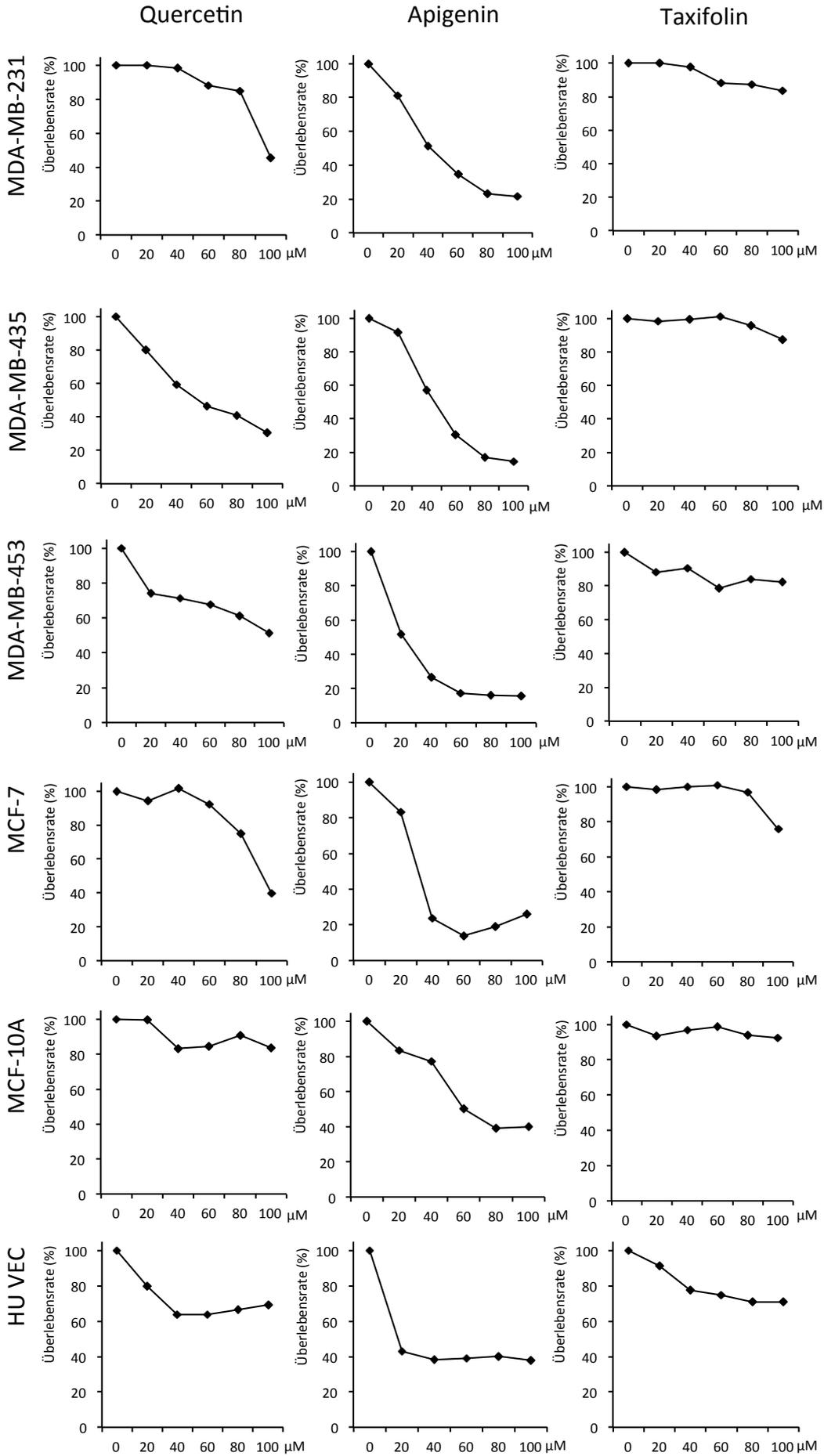


ABBILDUNG 19: ÜBERLEBEN DER ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT AUSGEWÄHLTEN FLAVONOIDEN IM MTT-ASSAY

Zellen der Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB-231/-435/-453, MCF-7 sowie der nicht-malignen Brustdrüsen-Zelllinie MCF-10A und Zellen der humanen endothelialen Zelllinie HUVEC wurden auf 96well-Platten angesetzt und mit den angegebenen Konzentrationen Quercetin, Apigenin und Taxifolin inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte nach Zugabe des MTT-Reagenz die Detektion noch vitaler Zellen mittels ELISA reader bei 595nm Wellenlänge.

In den obigen Experimenten wurde die kurzfristige Wirkung der Flavonoide auf eine größere Zellzahl untersucht. Dabei lässt sich nicht immer feststellen, ob es sich bei den beobachteten Unterschieden in der Zellaktivität um ein Absterben der Zellen oder um eine verminderte Proliferation handelt. Um den Einfluss der Flavonoide auf die Proliferationsaktivität von Mammakarzinom-Zellen zu ermitteln, wurden sogenannte Clonal Assays durchgeführt. Abbildung 20 gibt einen Überblick über das Wachstumsverhalten von MCF-7-Mammakarzinom-Zellen nach einer zehntägigen Inkubation mit 5µM eines der sieben untersuchten Flavonoide: Quercetin, Baicalein, Apigenin, Luteolin, Taxifolin, Myricetin und Chrysin. Bereits bei dieser niedrigen Konzentration ist erkennbar, dass Apigenin und Luteolin sehr stark wirksam sind. Es war nahezu keine Blaufärbung zu sehen. Auch unter Quercetin und Chrysin ließen sich im Vergleich zur Kontrolle deutlich weniger Zellen anfärben. Dieser Effekt war bei Baicalein, Myricetin und Taxifolin allerdings nur sehr geringgradig ausgeprägt.

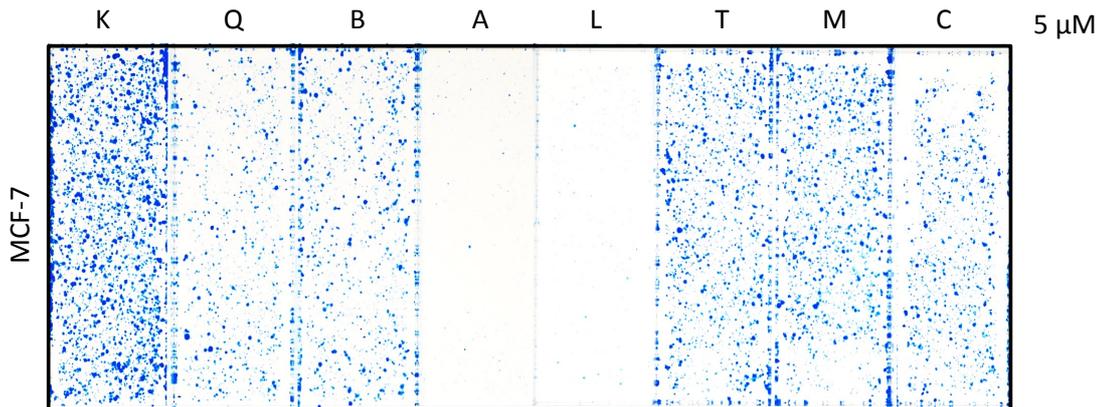


ABBILDUNG 20: ÜBERSICHT ÜBER DAS GESAMTÜBERLEBEN VON MAMMAKARZINOM-ZELLEN

1000 Zellen der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 wurden auf 4-well-Platten angesetzt und bis auf eine unbehandelte Kontrollprobe (K) mit jeweils 5µM Quercetin, Baicalein, Apigenin, Luteolin, Taxifolin, Myricetin oder Chrysin inkubiert. Nach zehn Tagen wurden die Zellen in Ethanol fixiert und mit Coomassie Blaulösung gefärbt. Vitale Zellen färbten sich blau an.

3.1.2 Zytomorphologie

Zur Beobachtung des Verhaltens einzelner Tumorzellen nach einer Inkubation mit den untersuchten Flavonoiden bedienten wir uns der Phasenkontrastmikroskopie. In Studien derselben Arbeitsgruppe konnte bereits eine Vakuolenbildung in MCF-7-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit Quercetin dargestellt werden. Weitergehende Untersuchungen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Markern der Autophagie identifizierten diese Vakuolen als Phagolysosomen (Klappan et al., 2012). Für die vorliegende Arbeit sollte ermittelt werden, ob sich ähnliche oder andere morphologische Veränderungen auch nach einer Inkubation mit weiteren Flavonoiden außer mit Quercetin finden lassen und ob diese auch bei einem Wachstum der Zellen als Tumorspheroid vorzutreffen sind. Dazu wurden Zellen der Linie MCF-7 – parallel zur herkömmlichen, zweidimensionalen Kultur auf einem Objektträger – auch in Matrigel kultiviert. Dies ermöglichte es, die dreidimensionalen Verhältnisse einer *in vivo*-Situation nachzuahmen. Die 2D- bzw. 3D-Kulturen wurden mit jeweils 50µM der Flavonoide für 48 Stunden inkubiert und anschließend unter dem Phasenkontrastmikroskop photographiert. In Abbildung 21 werden jeweils exemplarische Ausschnitte der behandelten Kulturen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle dargestellt.

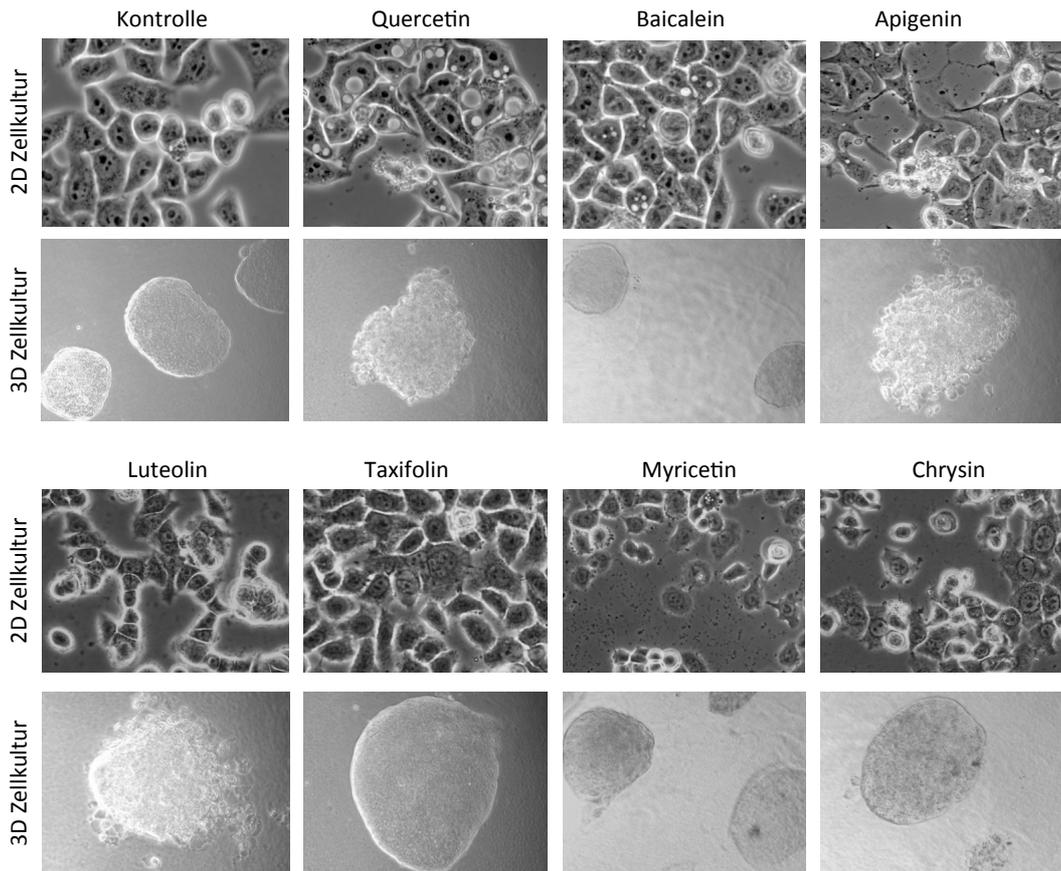


ABBILDUNG 21: VERÄNDERUNG DER ZYTOMORPHOLOGIE VON MAMMAKARZINOM-ZELLEN DURCH EINE BEHANDLUNG MIT AUSGEWÄHLTEN FLAVONOIDEN

Zellen der Linie MCF-7 wurden auf dem Boden eines Objektträgers (2D-Kultur) beziehungsweise in Matrigel (3D-Kultur) kultiviert. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit jeweils 50 μ M Quercetin, Baicalein, Apigenin, Luteolin, Taxifolin, Myricetin oder Chrysin erfolgte die Betrachtung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop in 40-facher (2D-Kultur) beziehungsweise in 10-facher (3D-Kultur) Vergrößerung.

Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen zeigten sich bei den mit Quercetin, Apigenin, Luteolin, Myricetin und Chrysin behandelten Zellen in 2D-Kultur deutliche morphologische Veränderungen. Im Falle von Apigenin und in geringerem Maße bei Myricetin ließ sich die bereits bei Quercetin beschriebene Vakuolisierung feststellen. Ebenfalls war eine intrazelluläre Vakuolenbildung bei den mit Baicalein behandelten Zellen zu beobachten, wobei sich die eigentliche Form der Zellen nicht verändert hatte. Den gravierendsten Formverlust hatten die Zellen nach der Inkubation mit Apigenin erlitten. Abbildung 22 zeigt analog zur Vorläuferarbeit repräsentative Vergrößerungen der beobachteten Vakuolisierung (Klappan et al., 2012).

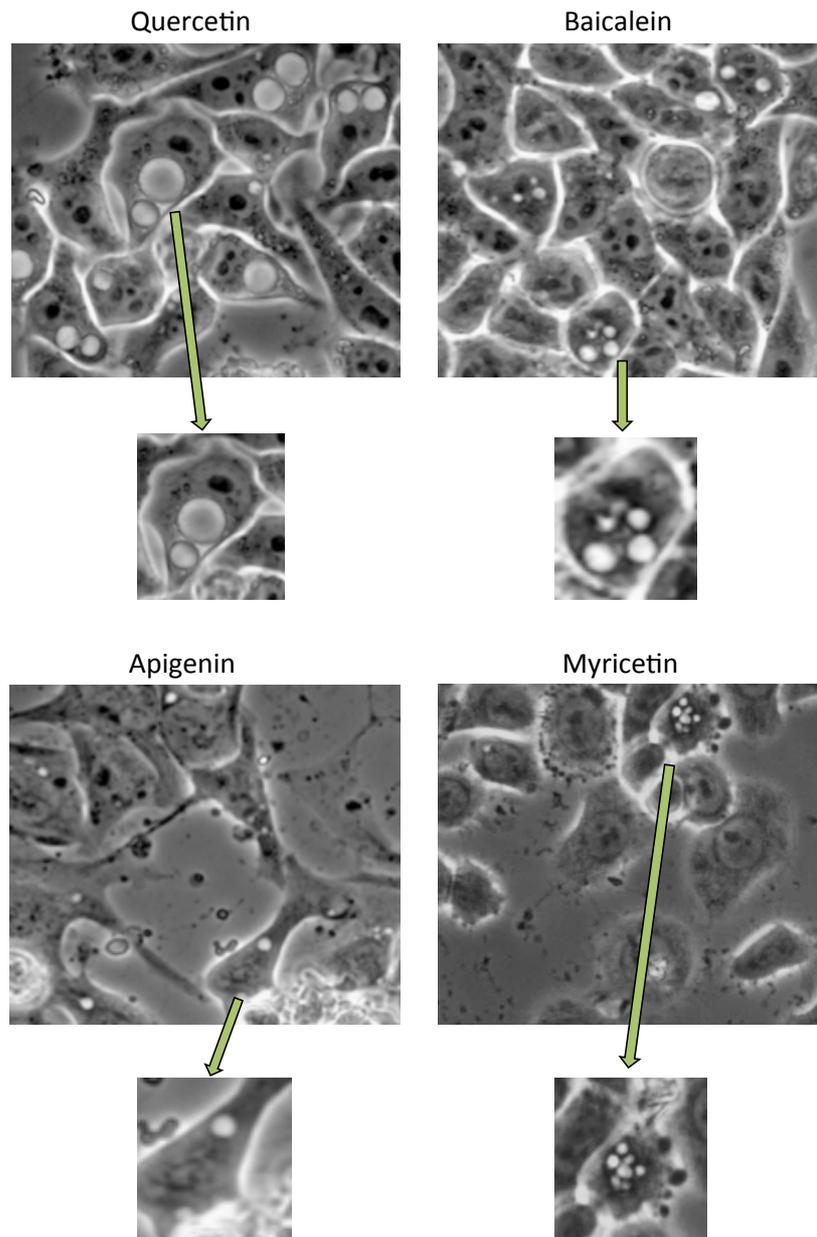


ABBILDUNG 22: INTRAZELLULÄRE VAKUOLENBILDUNG DURCH BESTIMMTE FLAVONOIDE BEI MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Zellen der Linie MCF-7 wurden für 48 Stunden mit 50 μ M Quercetin, Baicalein, Apigenin oder Myricetin inkubiert. Exemplarische Vergrößerung einzelner Abschnitte zeigen die aufgetretenen Vakuolen.

Während die Behandlung mit Taxifolin keinen Einfluss auf die Zellmorphologie hatte, veränderte sich diese nach einer Inkubation mit Luteolin dahingehend, dass sich auffallende, tubuläre Strukturen ausbildeten, wie sie in Abbildung 23 vergrößert dargestellt werden. Inwieweit es sich dabei tatsächlich um physiologische Differenzierungsprozesse handelte, konnte im Rahmen der Arbeit jedoch nicht weiter untersucht werden.

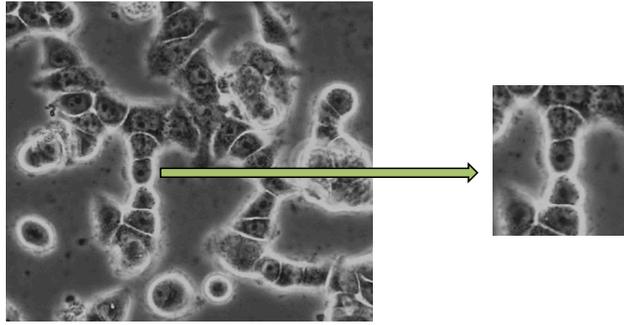


ABBILDUNG 23: AUSBILDUNG TUBULÄRER STRUKTUREN DURCH LUTEOLIN BEI MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Zellen der Linie MCF-7 wurden für 48 Stunden mit $50\mu\text{M}$ Luteolin inkubiert. Die Vergrößerung eines exemplarischen Ausschnitts dient zur Veranschaulichung der Beobachtung.

Bei den Tumorspheroiden erwirkten lediglich Quercetin, Apigenin und Luteolin eine eindruckliche Formveränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Struktur der Spheroide erschien von außen nach innen zunehmend zerstörter. Baicalein, Taxifolin, Myricetin und Chrysin hingegen richteten nach zweitägiger Inkubation keinen sichtbaren Schaden an den 3D-Kulturen an (siehe Abbildung 21).

3.1.3 Aktivität des Proteasoms

Mit Hilfe eines Proteasomassays wurde der Einfluss der Flavonoide auf die Aktivität des Proteasoms in Mammakarzinom-Zellen untersucht. Durch einen Teil unserer Arbeitsgruppe konnte bereits eine inhibitorische Wirkung des Flavonoids Quercetin auf die drei enzymatischen Aktivitäten des Proteasoms (Chymotrypsin-, Trypsin- und Caspase-ähnliche Aktivität) in MCF-7-Zellen beschrieben werden (Klappan et al., 2012). Zum Vergleich der hier untersuchten Flavonoide untereinander wurden zunächst die Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB-231, -435, -453 und MCF-7 für fünf Stunden mit jeweils $50\mu\text{M}$ Quercetin, Baicalein, Taxifolin oder Apigenin behandelt. Die Zellen wurden anschließend einem enzymatischen Assay unterzogen, der die Restaktivität der drei katalytischen Untereinheiten des Proteasoms nach der beschriebenen Inkubation erfasste. Abbildung 24 stellt die Ergebnisse der Untersuchung dar. Bei allen verwendeten Zellreihen bestätigte sich die bekannte inhibitorische Wirkung von Quercetin auf sämtliche enzymatische Aktivitäten des Proteasoms. Es fiel zudem auf, dass in allen Fällen Apigenin einen stärkeren hemmenden Einfluss zeigte, während Baicalein und Taxifolin nur eine geringe beziehungsweise keine entsprechende Wirkung hatten.

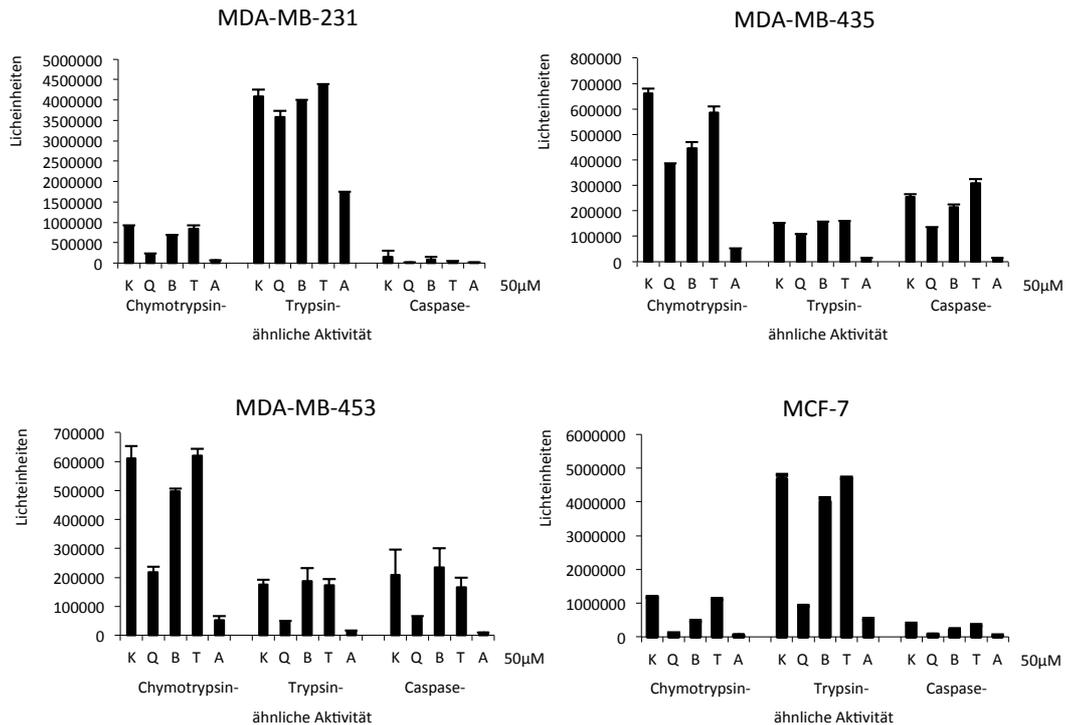


ABBILDUNG 24: PROTEASOMINHIBITION IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN NACH EINER BEHANDLUNG MIT AUSGEWÄHLTEN FLAVONOIDEN

Zellen der Linien MDA-MB-231, -435, -453 und MCF-7 wurden auf 96well-Platten angesetzt und für fünf Stunden mit jeweils 50µM Quercetin (Q), Baicalein (B), Taxifolin (T) oder Apigenin (A) inkubiert. Unter Verwendung des *Proteasome-Glo™ 3-Substrate Systems* erfolgte die Messung der Aktivität aller drei katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in Form einer Detektion emittierten Lichtes. Die Stärke des Lichtsignals korreliert mit der proteasomalen Restaktivität und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrolle (K) angegeben.

In weiteren Proteasomassays erfolgte daraufhin die genauere Differenzierung der Wirkungen von Quercetin und Apigenin. Es wurde hierfür nur die Zellreihe MDA-MB-453 verwendet, da sich an ihr der Einfluss der Flavonoide auf alle drei enzymatischen Aktivitäten besonders deutlich darstellen ließ. Gleichzeitig wurde mit diesen ergänzenden Assays auch eine Konzentrationsabhängigkeit des zu erwartenden Effektes untersucht. Nachdem mehrere Zellkulturen angesetzt und entsprechend mit 10µM, 20µM, 30µM, 40µM oder 50µM Quercetin beziehungsweise Apigenin behandelt worden waren, wurden die Zellen dem Assay unterzogen. Für sämtliche verwendeten Konzentrationen ließ sich bei Apigenin eine stärkere Hemmung der Chymotrypsin-, Trypsin- und Caspase-ähnlichen Aktivität des Proteasoms in den Mammakarzinom-Zellen beobachten als bei Quercetin.

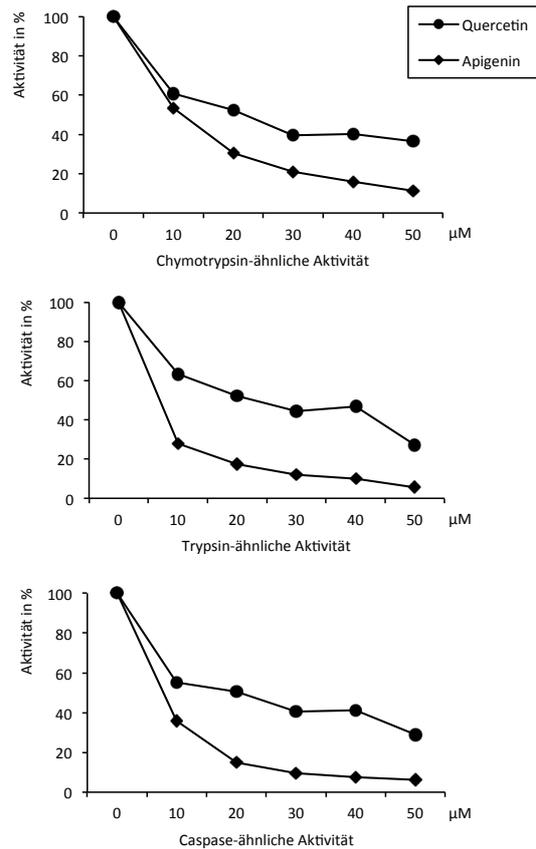


ABBILDUNG 25: VERGLEICH DER KONZENTRATIONSBABHÄNGIGEN HEMMUNG DES PROTEASOMS IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN ZWISCHEN QUERCETIN UND APIGENIN

Zellen der Linie MDA-MB-453 wurden auf 96well-Platten angesetzt und für fünf Stunden mit den angegebenen Konzentrationen Quercetin beziehungsweise Apigenin inkubiert. Unter Verwendung des *Proteasome-Glo™ 3-Substrate Systems* erfolgte die Messung der Aktivität aller drei katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in Form einer Detektion emittierten Lichtes. Die Stärke des Lichtsignals korreliert mit der proteasomalen Restaktivität und ist zur besseren Vergleichbarkeit in einer relativen Skalierung dargestellt.

Schließlich ergänzten exemplarische Untersuchungen des Einflusses von Chrysin, Luteolin und Myricetin auf das Proteasom in Brustkrebszellen der Reihen MDA-MB-453 und MCF-7 die Vergleichsstudie. Die genannten Zellen wurden mit jeweils 50 µM des entsprechenden Flavonoids für fünf Stunden inkubiert und einem Proteasomassay unterzogen, wobei lediglich die Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität erfolgte. Chrysin und Luteolin vermittelten eine starke Inhibition dieser Untereinheit, während ein entsprechender Effekt bei Myricetin nur schwach ausgeprägt war.

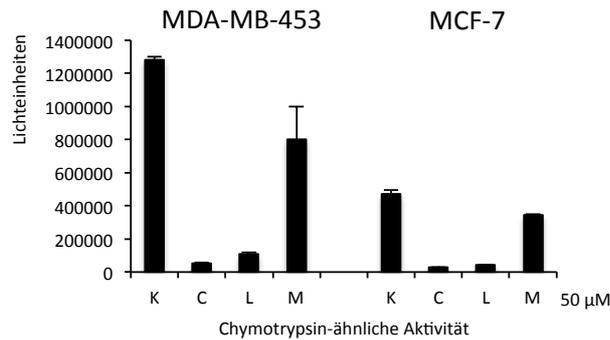


ABBILDUNG 26: PROTEASOMINHIBITION IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN NACH EINER BEHANDLUNG MIT AUSGEWÄHLTEN FLAVONOIDEN

Zellen der Linien MDA-MB-453 und MCF-7 wurden auf 96well-Platten angesetzt und für fünf Stunden mit jeweils 50µM Chrysin (C), Luteolin (L) oder Myricetin (M) inkubiert. Unter Verwendung des *Proteasome-GloTM 3-Substrate Systems* erfolgte die Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms in Form einer Detektion emittierten Lichtes. Die Stärke des Lichtsignals korreliert mit der proteasomalen Restaktivität und ist in Relation zu einer unbehandelten Kontrolle (K) angegeben.

3.1.4 Zielproteine des Proteasoms

Bislang konnte in dieser Studie eine Hemmung der Proteasom-Aktivität durch einige Flavonoide im zellbasierten Assay nachgewiesen werden. Da das Proteasom die Aufgabe hat, bestimmte Proteine nach deren Markierung mit einer Ubiquitinkette abzubauen, liegt die Vermutung nahe, dass sich eben jene Proteine bei einer Inaktivität des Proteasoms anhäufen müssten. Um dieser Annahme nachzugehen, wurde der Effekt der sieben ausgewählten Flavonoide auf spezielle Zielproteine des Proteasoms untersucht. Der Nachweis dieser Proteine erfolgte mittels Western Blot-Analyse nach einer entsprechenden Behandlung und Lyse der Mammakarzinom-Zellen MCF-7. Es stellte sich heraus, dass ein erhöhtes Vorkommen lediglich im Falle des Proteins p53 zu beobachten war. Insbesondere geschah dies nach einer Inkubation mit Apigenin. Diese Feststellung korreliert mit der oben beschriebenen Theorie. Bei allen weiteren Proteinen, die als Beispiele für die Ziele des Proteasoms untersucht worden waren, nämlich mit Ubiquitin markierte Proteine allgemein sowie speziell Mcl-1, IκBα und Cyclin B, zeigten sich unter Quercetin und Apigenin überraschenderweise deutlich schwächere Proteinbanden als bei der unbehandelten Kontrollprobe und als unter Baicalein. Eine Hemmung des Proteasoms durch die Flavonoide führte also nicht zu einer Ansammlung der genannten Zielproteine. Sie wurden im Gegensatz dazu sogar schwächer exprimiert.

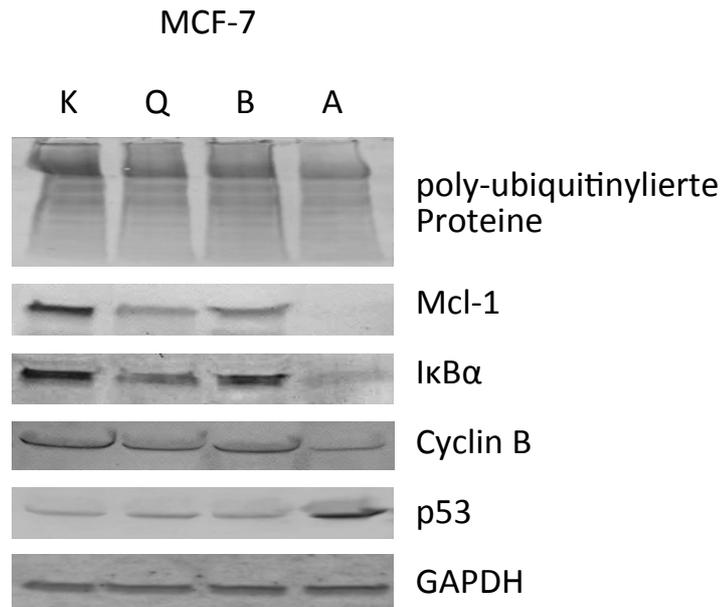


ABBILDUNG 27: WIRKUNG AUSGEWÄHLTER FLAVONOIDE AUF ZIELPROTEINE DES PROTEASOMS IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Zellen der Linie MCF-7 wurden für 24 Stunden mit jeweils 50µM Quercetin (Q), Baicalein (B) oder Apigenin (A) inkubiert. Ihre Lysate wurden zusammen mit einer unbehandelten Kontrollprobe (K) einer Western Blot-Analyse unterzogen. Es erfolgte die Kopplung mit Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine, welche in der Regel vom Proteasom abgebaut werden, und eine anschließende Färbung. Die Markierung von GAPDH dient zum Nachweis der Verwendung äquivalenter Proteinmengen aus den Zelllysaten.

3.1.5 Apoptose

Trotz einer Inhibierung des Proteasoms durch ausgewählte Flavonoide konnte im Western Blot keine Akkumulation seines Zielproteins Mcl-1 nachgewiesen werden. Vielmehr erfolgte eine verminderte Expression in MCF-7-Zellen nach einer entsprechenden Inkubation. Wie eingangs bereits erwähnt, gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Herunterregulation von Mcl-1 durch Quercetin in Leukämiezellen. Da Mcl-1 zu den anti-apoptotischen Vertretern der Bcl-2-Proteinfamilie gehört, geht seine Herunterregulation mit einer erhöhten Anfälligkeit der Zellen auf apoptotische Stimuli einher. Im Falle entarteter Zellen, wie hier der Mammakarzinom-Zellen MCF-7, ist dieser Effekt mit einer Anti-Tumor-Wirkung gleichzusetzen. Um die Annahme einer erleichterten Auslösung der Apoptose in Tumorzellen durch Flavonoide zu untermauern, wurde als weiterer Marker des programmierten Zelltodes die poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) mittels Western Blot untersucht. Geht in einer Zelle ein programmierter Zelltod vonstatten, so wird PARP im Zuge dessen gespalten. Die Spaltprodukte können im Western Blot nachgewiesen werden und dienen als Hinweis auf ein Apoptosegeschehen (Oliver et al., 1998). In der hier vorliegenden Studie konnte eine PARP-Spaltung nach einer Inkubation der Zellen mit Quercetin, Baicalein und Apigenin beobachtet werden. Weiterhin wurde der Einfluss der Flavonoide auf das zellwachstums- und proliferationsfördernde Protein mTOR getestet. Es handelt sich dabei um eine Regulationseinheit in Signalwegen der Zellbiologie, die an der Ausführung von Entscheidungen über den Energiehaushalt der betreffenden Zelle beteiligt ist. Von einem Teil der hieran beteiligten Forschungsgruppe wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Quercetin den mTOR-Signalweg hemmt und dadurch die Zellabbauwege über Autophagie und Apoptose auslöst (Brüning, 2012; Klappan et al., 2012). Die Wirkung der sieben ausgewählten Flavonoide auf diesen Mechanismus, der schließlich zum Zelluntergang der Tumorzellen führen kann, wurde hier in vergleichender Weise untersucht. Die Inhibition des mTOR-Signalwegs durch Quercetin konnte über eine verminderte Phosphorylierung seiner nachgeschalteten Substrate 4E-BP1, S6 und p70S6-Kinase im Western Blot dargestellt werden. Derselbe Effekt ließ sich nach der Behandlung mit Baicalein und Apigenin beobachten, wobei Apigenin von den drei genannten Flavonoiden die stärkste Wirkung erzielte.

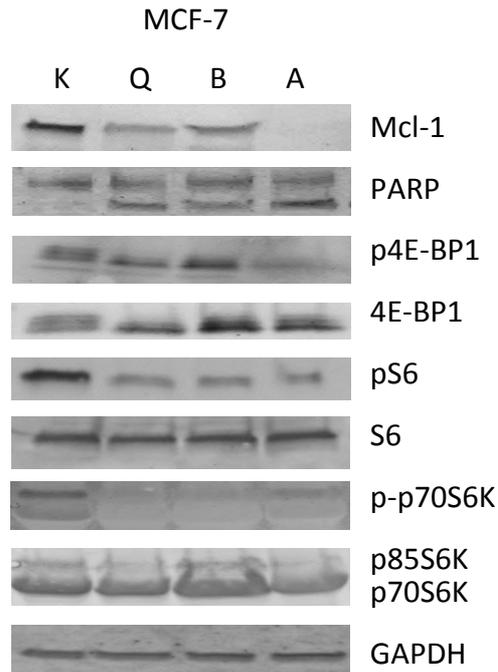


ABBILDUNG 28: WIRKUNG AUSGEWÄHLTER FLAVONOIDE AUF MARKERPROTEINE DES ZELLUNTERGANGS IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Zellen der Linie MCF-7 wurden für 24 Stunden mit jeweils 50µM Quercetin (Q), Baicalein (B) oder Apigenin (A) inkubiert. Ihre Lysate wurden zusammen mit einer unbehandelten Kontrollprobe (K) einer Western Blot-Analyse unterzogen. Es erfolgte die Kopplung mit Antikörpern gegen die dargestellten Proteine und eine anschließende Färbung. Die verminderte Expression von Mcl-1 und die Spaltung von PARP sind als Hinweise auf eine Steigerung der Apoptoserate zu sehen. Die Dephosphorylierung von 4E-BP1, S6 und p70S6K sind Folgen einer Hemmung des mTOR-Signalwegs. Die Markierung von GAPDH dient zum Nachweis der Verwendung äquivalenter Proteinmengen aus den Zelllysaten.

Schließlich wurden Western Blots aller sieben zu untersuchenden Flavonoide angefertigt, um den Vergleich ihrer Wirkungen auf die wichtigsten, oben genannten Signalwege des Zellzyklusgeschehens zu erbringen. In Bezug auf die Auslösung des programmierten Zelltodes zeigte sich auch im Übersichts-Blot eine Herunterregulation von Mcl-1 und eine konkordante Spaltung der poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Wie oben war der Effekt bei Apigenin deutlicher als bei Quercetin und Baicalein. Das Flavon Luteolin erzielte eine ähnlich starke Wirkung wie Apigenin. Bei Myricetin und Chrysin war diese nur schwach ausgebildet, bei Taxifolin hingegen kaum nachweisbar. Im Hinblick auf die Expression des Proteins p53 war, dem vorherigen Experiment entsprechend, auch hier eine deutliche Hochregulation durch Apigenin im Western Blot zu sehen. Von den übrigen Substanzen bewirkte allein Luteolin eine solch gesteigerte Proteinexpression. Die mTOR-Aktivität betreffend, ließ sich ebenfalls für Apigenin eine sehr ausgeprägte Inhibition erkennen. Dargestellt wurde diese durch eine verminderte Phosphorylierung der mTOR-Substrate 4E-BP1 und Protein S6. Quercetin, Luteolin, Myricetin und Chrysin vermittelten ebenfalls eine Hemmung der mTOR-Aktivität, allerdings war diese schwächer nachzuweisen. Durch eine Behandlung mit Baicalein und Taxifolin ließ sich kein derartiges Ergebnis erzielen.

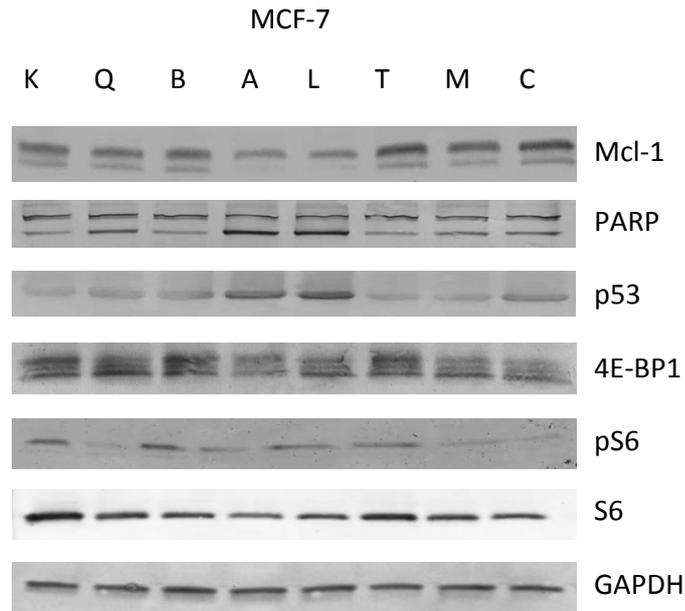


ABBILDUNG 29: VERGLEICH DER WIRKUNGEN DER SIEBEN FLAVONOIDE AUF VERSCHIEDENE SIGNALWEGE IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Zellen der Linie MCF-7 wurden für 24 Stunden mit jeweils 50µM Quercetin (Q), Baicalein (B), Apigenin (A), Luteolin (L), Taxifolin (T), Myricetin (M) oder Chrysin (C) inkubiert. Ihre Lysate wurden zusammen mit einer unbehandelten Kontrollprobe (K) einer Western Blot-Analyse unterzogen. Es erfolgte die Kopplung mit Antikörpern gegen die dargestellten Proteine und eine anschließende Färbung. Die Markierung von GAPDH dient zum Nachweis der Verwendung äquivalenter Proteinmengen aus den Zelllysaten.

3.1.6 Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B

Bei der Untersuchung der Wirkung der Flavonoide auf einige Zielproteine des Proteasoms stellte sich heraus, dass I κ B α insbesondere durch Quercetin und Apigenin vermindert exprimiert wurde (siehe Kapitel 3.1.4). Da I κ B α im unphosphorylierten Zustand als Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF κ B fungiert, könnte man annehmen, dass eine verstärkte Aktivität von NF κ B die Folge einer Flavonoid-Behandlung ist. Dennoch gibt es zahlreiche Hinweise auf die Hemmung von NF κ B durch bestimmte Flavonoide (Kim et al., 2007; Lin et al., 2008; Shi et al., 2004). Wie sich die Inkubation mit Flavonoiden auf die Aktivität von NF κ B in Mammakarzinom-Zellen auswirkt, wurde in dieser Arbeit am Beispiel von Apigenin ermittelt. MCF-7-Zellen wurden hierfür mit TNF- α stimuliert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen Apigenin inkubiert. TNF- α führt als Induktor von NF κ B zur vermehrten Transkription seiner Zielgene (Lin et al., 2008). Die Expression einiger dieser Zielgene wurde anschließend mittels Polymerasekettenreaktion untersucht. Abbildung 30 zeigt, dass nach der Stimulation mit TNF- α die Gene für CXCL1 und cIAP2 vermehrt und jenes für CXCL10 überhaupt erst exprimiert wurden. Im Falle von CXCL10 führte bereits die geringste Konzentration von Apigenin zur Inhibierung seiner Transkription. Bei CXCL1 und cIAP2 ließ sich sowohl bei konstitutiver als auch bei induzierter Transkription eine konzentrationsabhängige Suppression durch Apigenin erkennen. Es bestätigte sich also eine Hemmung von NF κ B durch eine Behandlung der Zellen mit einem Flavonoid, hier am Beispiel des Flavons Apigenin. Diese Inhibition betraf sowohl die konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors als auch die durch TNF- α induzierte Aktivität.

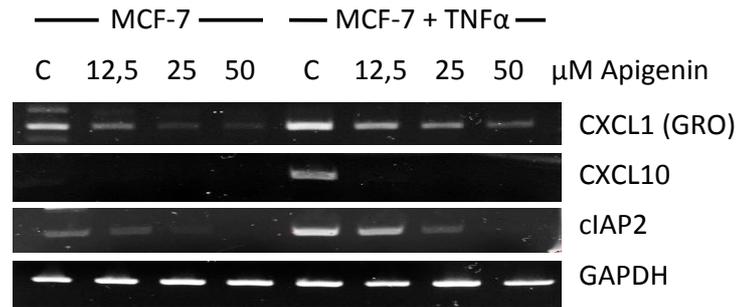


ABBILDUNG 30: EINFLUSS VON APIGENIN AUF DIE AKTIVITÄT DES TRANSKRIPTIIONSFAKTORS NF κ B IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Unstimulierte beziehungsweise durch TNF- α stimulierte Zellen der Linie MCF-7 wurden für neun Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen des Flavons Apigenin inkubiert. Nach Lyse der Zellen, Extraktion der RNA und deren Umschreibung in komplementäre DNA wurden die gesuchten Gensequenzen mittels PCR-Verfahren amplifiziert. Durch die Agarosegelelektrophorese konnte der Einfluss von Apigenin auf die Expression der dargestellten Zielgene von NF κ B veranschaulicht werden. Der Nachweis der Gensequenzen von GAPDH dient zum Nachweis der Verwendung äquivalenter RNA-Mengen aus den Zelllysaten.

3.1.7 Wirkungen der Flavonoide in der Übersicht

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl an möglichen, zytotoxischen Effekten durch Flavonoide auf Mammakarzinom-Zellen durch unterschiedliche Methoden experimentell ermittelt. Um den Vergleich der sieben ausgewählten Substanzen untereinander zu erleichtern, soll nun eine Tabelle den Überblick über die erzielten Ergebnisse liefern. Es lässt sich schnell erkennen, dass Taxifolin so gut wie keinen Einfluss auf die aufgelisteten Mechanismen im Zellzyklusgeschehen hatte. Baicalein kann durch den vorliegenden Vergleich allenfalls als sehr gering wirksam eingestuft werden. Myricetin und Chrysin führten zu einer deutlichen Zellschädigung der Brustkrebszellen. In der Zusammenschau nehmen diese beiden Flavonoide gemeinsam mit Quercetin eine Mittelstellung ein. Wie aus früheren, in der Literatur zu findenden Studien bereits zu eruieren war, erwies sich insbesondere Quercetin auch in dieser Arbeit als eine sehr wirksame Substanz zur Bekämpfung von Tumorzellen. Im direkten Vergleich stechen die Flavone Luteolin und Apigenin jedoch besonders hervor, was in der Übersicht durch die häufige Verwendung doppelter Symbole im Sinne einer sehr starken Wirkung verdeutlicht wird. Vor allem Apigenin zeichnete sich durch eine außerordentliche Zytotoxizität aus und steht somit in der hier durchgeführten Vergleichsstudie an der Spitze der sieben ausgewählten Flavonoide mit dem größten Anti-Tumor-Effekt auf Mammakarzinom-Zellen.

Tabelle 2 fasst die Ergebnisse in einer übersichtlichen, vereinfachten Darstellung zusammen:

	Quercetin	Taxifolin	Myricetin	Apigenin	Luteolin	Chrysin	Baicalein
Zellproliferation	↓	-/↓	-/↓	↓↓	↓↓	↓	↓
Vakuolenbildung	+++	-	+	+	-	-	+
Spheroidbildung	↓	-	-	↓	↓	-	-
Proteasomaktivität	↓	-	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓
Apoptoseinduktion	+	-	+	+++	+++	+	+
mTOR-Aktivität	↓	-	↓	↓↓	↓	↓	-/↓
p53-Expression	-	-	-	↑	↑	-	-
NFκB-Aktivität	n.g.	n.g.	n.g.	↓	n.g.	n.g.	n.g.

TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER DIE WIRKUNGEN DER FLAVONOIDE AUF MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Vereinfachte Darstellung der Wirkungen der sieben untersuchten Flavonoide auf das Gesamtüberleben, die Zytomorphologie und wichtige Signalwege der Mammakarzinom-Zellen. Die Ergebnisse wurden in den vorhergehenden Kapiteln im Einzelnen beschrieben. Zur Bedeutung der Symbole: ↓ = inhibiert; ↑ = steigert; + = ruft hervor; - = beeinflusst nicht; unausgemaltes Symbol = (sehr) schwache Wirkung, n.g. = nicht getestet.

3.2 Borrelidin und seine Wirkung auf ausgewählte maligne sowie nicht-maligne Zellen

3.2.1 Zellüberlebensstudien

Analog zur Studie der Flavonoide wurde auch bei Borrelidin eine erste Annäherung an seine Wirkung auf Mammakarzinom-Zellen mittels Färbung der Zellmasse durchgeführt. Mit steigenden Konzentrationen von Borrelidin kam es zur graduellen Abnahme der Blaufärbung und damit zum Verlust von vitalen Zellen bei den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-453. Dass bereits ab der geringsten Konzentration Borrelidin bei den Linien MDA-MB-231 und -435 keine Färbung mehr zu erkennen war, kann einerseits einen Hinweis auf die anfangs erwähnte, starke Wirkung des Antibiotikums im nanomolaren Bereich geben. Andererseits konnte allein durch diesen Versuch eine unspezifische Toxizität bereits ab dieser Konzentration nicht ausgeschlossen werden, weshalb weitere Experimente erforderlich waren.

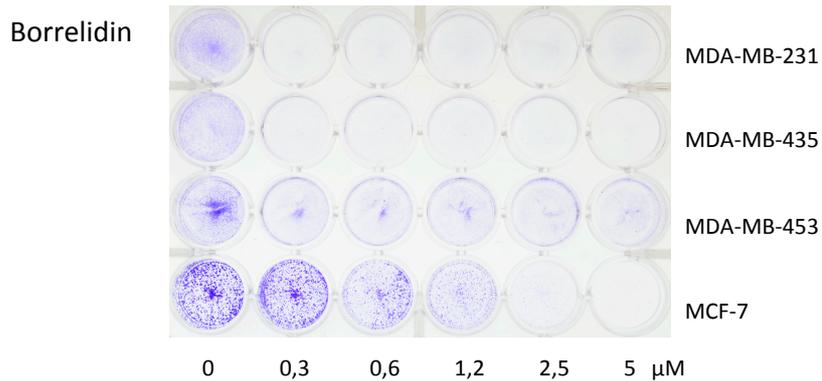


ABBILDUNG 31: EINFLUSS VON BORRELIDIN AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN VON MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Zellen der Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB-231/-435/-453 und MCF-7 wurden auf 24well-Platten angesetzt und mit den angegebenen Konzentrationen Borrelidin inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte die Fixierung der Zellen in Ethanol und anschließend die Färbung mit Hämatoxylinlösung nach Gill II. Intakte Zellkerne, die wie sie nur in überlebenden Zellen vorkommen, färbten sich blau-violett.

Die zellbasierten Assays wurden im Anschluss daran durchgeführt, um die Quantität der überlebenden Zellen nach einer 72-stündigen Behandlung mit Borrelidin genauer zu erfassen und seine Wirkung auf verschiedene Zellarten im Vergleich darzustellen. Auf den ersten Blick fällt bereits auf, dass Borrelidin zwar bei allen verwendeten Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der Zellpopulation führte, dass sich jedoch die Effektivdosis, die zur halbmaximalen Wachstumshemmung führte, zwischen den Zellarten um nennenswerte Faktoren unterschied. Betrachtet man isoliert die Wirkung von Borrelidin auf Zellen der Brustdrüse (siehe Abbildung 32 A), so lässt sich bei den hoch aggressiven Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-435 und MDA-MB-453 ein sehr gutes Ansprechen auf bereits geringe Konzentrationen des Antibiotikums erkennen. Insbesondere bei MDA-MB-231-Zellen, die keine Hormonrezeptoren exprimieren und bei denen keine Amplifikation des HER2/neu-Gens zu finden ist, zeigt es mit einer Effektivdosis von nur 84nM die stärkste Wirkung (siehe Abbildung 32 A, Zeile 1). Mammakarzinom-Zellen der Linie MCF-7 reagierten hingegen erst bei höheren Konzentrationen Borrelidin mit einem entsprechenden Absterben der Kolonie. Eine halbmaximale Wachstumsinhibition wurde erst bei 245nM erreicht. Diese Zellen gehören zum weniger aggressiven Subtypen Luminal A, sind sehr hormonsensibel und besitzen eine niedrige Teilungsaktivität. Annähernd genauso stellt sich die Überlebenskurve der Zellen MCF-10A dar. Borrelidin führte auch hier zu einer starken Reduktion der Zellpopulation, die in diesem Falle jedoch aus nicht-malignem Brustdrüsengewebe stammte (siehe Abbildung 32 A, Zeile 2).

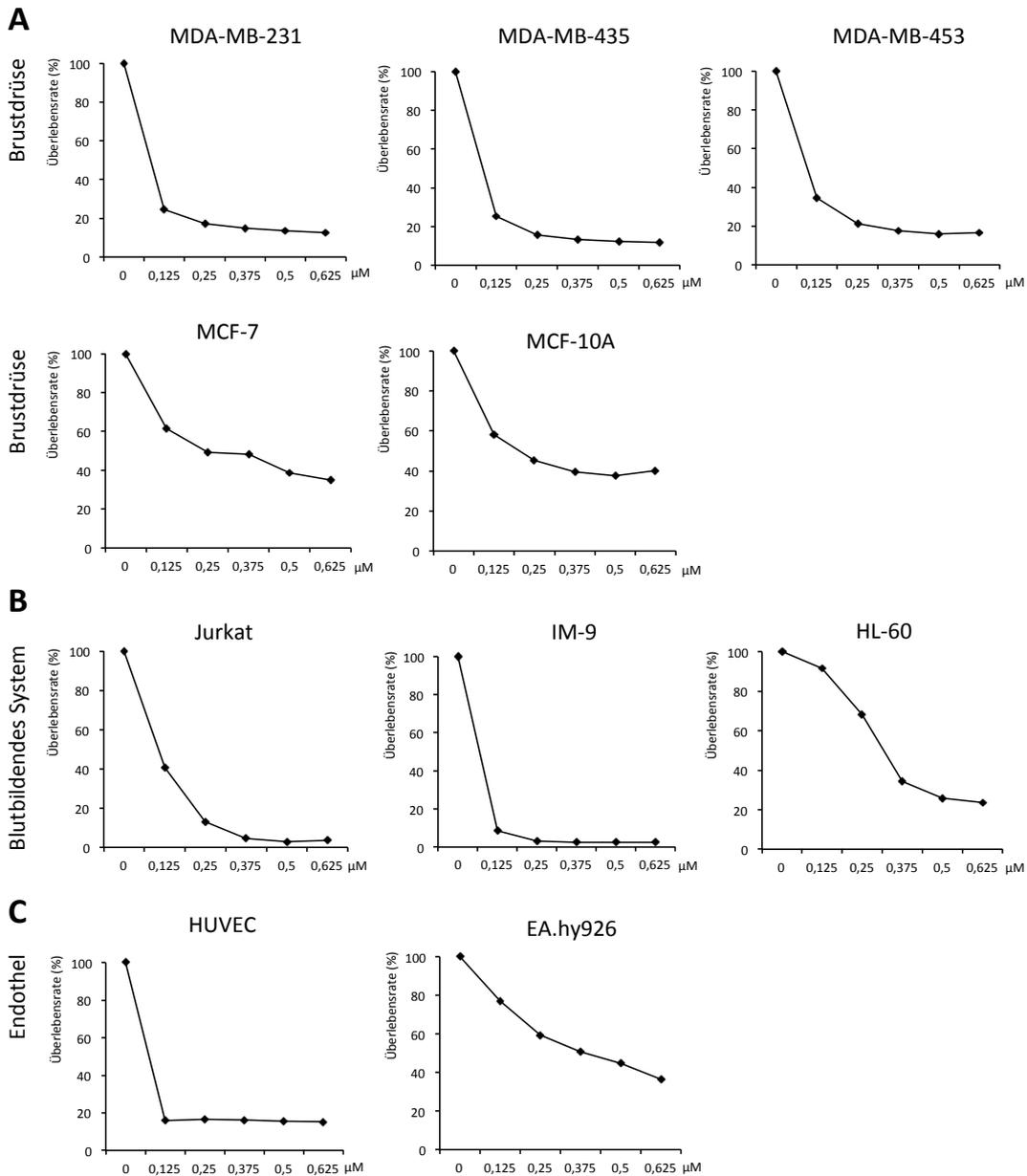


ABBILDUNG 32: ÜBERLEBEN DER ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT BORRELIDIN IM MTT- BZW. ATP-ASSAY

(A) Zellen der Brustdrüse. (B) Zellen des blutbildenden Systems. (C) Endotheliale Zellen. Alle verwendeten Zellen wurden auf 96well-Platten angesetzt und mit den angegebenen, aufsteigenden Konzentrationen Borrelidin für 72 Stunden inkubiert. Im Fall von (A) und (C) erfolgte nach Zugabe des MTT-Reagenz die Detektion noch vitaler Zellen mittels ELISA reader bei 595nm Wellenlänge, während die Überlebensrate bei (B) im ATP-Assay ermittelt wurde.

Bei den untersuchten, malignen Zellen des blutbildenden Systems (siehe Abbildung 32 B) reagierten die Zelllinien Jurkat (T-Zell-Leukämie) und IM-9 (lymphoblastoide Zelllinie) am empfindlichsten auf eine Behandlung mit Borrelidin. Besonders ausgeprägt war der Effekt bei IM9-Zellen mit einer Effektivdosis von nur 68nM. Eine viel höhere Konzentration

Borrelidin war hingegen nötig, um die Zellpopulation von HL-60-Zellen (Promyelozyten-Leukämie) zu halbieren ($ED_{50} = 316\text{nM}$).

Die in der Abbildung demonstrierte, inhibitorische Wirkung von Borrelidin auf die prä-neoplastischen MCF-10A-Zellen spiegelt die eingangs erwähnten, toxischen Effekte des Antibiotikums auf nicht-malignes Gewebe wider. Um diese Beobachtung zu erhärten, wurden auch humane Endothelzellen der Linie HUVEC nach einer Behandlung mit Borrelidin einem MTT-Assay unterzogen. Mit einem ED_{50} -Wert von nur 74nM erzielte die Substanz auch bei diesen Zellen somit durch geringste Konzentrationen eine halbmaximale Wachstumshemmung. Die Zellen der Hybrid-Linie EA.hy926 scheinen dagegen resistenter gegen eine Behandlung mit Borrelidin zu sein (siehe Abbildung 32 C). Es handelt sich bei EA.hy926 um die Fusion der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 mit HUVEC-Zellen, was zur Immortalisierung dieser an sich benignen Zellart führte (Edgell, McDonald, & Graham, 1983). Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigen, dass HUVEC-Zellen in dieser Form ihre Sensitivität gegenüber Borrelidin zu einem gewissen Grad verlieren, so dass um ein Vielfaches höhere Konzentrationen nötig sind, um eine vergleichbare Reduktion der Zellpopulation herbeizuführen ($ED_{50} = 390\text{nM}$).

3.2.2 Apoptose

Um die zytotoxische Wirkungsweise von Borrelidin genauer zu erforschen und dadurch einen Hinweis auf das unterschiedliche Ansprechen der Zellen auf die Substanz zu erhalten, wurden sie in weiteren Experimenten nach der Inkubation mit Borrelidin Western Blot-Analysen unterzogen. Wir konzentrierten uns dabei auf Proteine, deren Regulation für die Apoptose maßgeblich ist. Sowohl bei MCF-7-Zellen als auch bei den untersuchten Leukämie-Zelllinien ließ sich eine Spaltung der poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) sowie eine verminderte Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 darstellen. Die beschriebenen Effekte erwiesen sich als konzentrationsabhängig und waren im Vergleich bei der Zelllinie HL-60 am geringsten ausgeprägt. Die Ergebnisse der Western Blots sprechen somit für eine Borrelidin-induzierte Auslösung des programmierten Zelltodes in den behandelten Zellen.

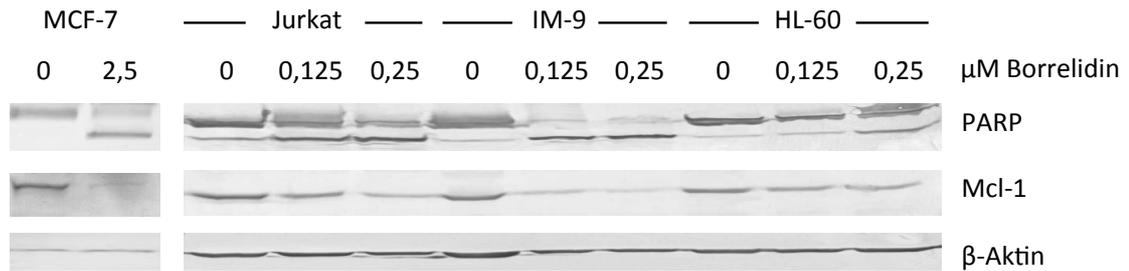


ABBILDUNG 33: WIRKUNG VON BORRELIDIN AUF MARKERPROTEINE DER APOPTOSE IN MAMMAKARZINOM- UND LEUKÄMIEZELLEN

Zellen der Linien MCF-7, Jurkat, IM-9 und HL-60 wurden für 24 Stunden jeweils mit den dargestellten Konzentrationen Borrelidin inkubiert. Ihre Lysate wurden zusammen mit unbehandelten Kontrollproben (0μM Borrelidin) Western Blot-Analysen unterzogen. Es erfolgte die Kopplung mit Antikörpern gegen die dargestellten Proteine und eine anschließende Färbung. Die Markierung von β-Aktin dient zum Nachweis der Verwendung äquivalenter Proteinmengen aus den Zelllysaten.

Betrachtet man das Protein Mcl-1, so kann eine Verminderung der Gesamt-Proteinmenge allerdings auf mehrere Arten erklärt werden. Wie eingangs erwähnt wurde, kann die Einleitung der Apoptose – neben einer Reihe anderer Mechanismen – zum Beispiel auch primär durch die verminderte Expression oder den post-translationalen Abbau von Mcl-1 erleichtert werden. Allerdings wird Mcl-1 auch selbst im Zuge des Apoptose-Geschehens durch Caspasen gespalten. Ein dadurch entstehendes Spaltprodukt trägt infolgedessen selbst verstärkend zum Zelltod bei. Es wirkt somit im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus. Die verminderte Expression von Mcl-1 kann daher ein primärer Effekt sein, durch den der programmierte Zelltod in den untersuchten Zellen eingeleitet wird, allerdings auch als sekundärer Effekt aus einer andersartigen Apoptose-Auslösung resultieren. Daher untersuchten wir im Anschluss den Einfluss von Borrelidin auf weitere Proteine der Bcl-2-Familie, nämlich auf die ebenfalls anti-apoptotischen Vertreter Bcl-2 und Bcl-x_L sowie auf das pro-apoptotische Protein BID.

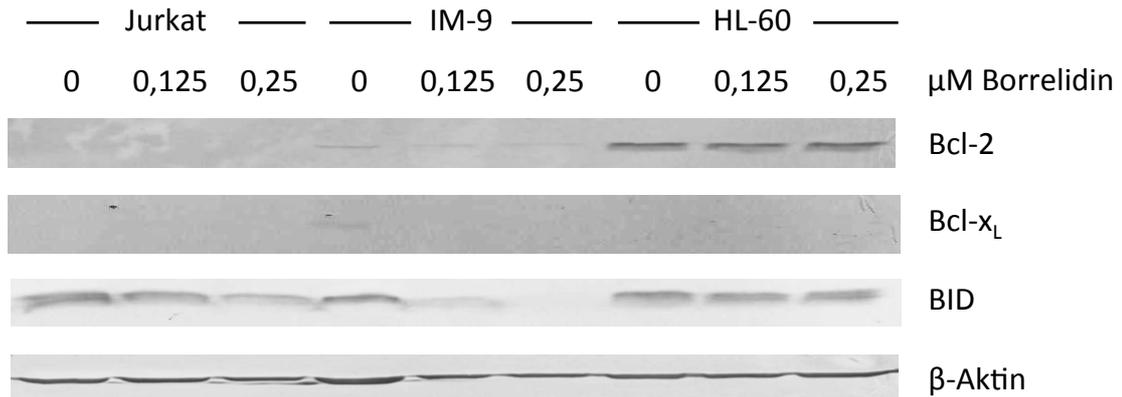


ABBILDUNG 34: EINFLUSS VON BORRELIDIN AUF PROTEINE DER BCL-2-FAMILIE IN LEUKÄMIEZELLEN

Zellen der Linien Jurkat, IM-9 und HL-60 wurden für 24 Stunden jeweils mit den dargestellten Konzentrationen Borrelidin inkubiert. Ihre Lysate wurden zusammen mit unbehandelten Kontrollproben (0µM Borrelidin) Western Blot-Analysen unterzogen. Es erfolgte die Kopplung mit Antikörpern gegen die dargestellten Proteine und eine anschließende Färbung. Die Markierung von β-Aktin dient zum Nachweis der Verwendung äquivalenter Proteinmengen aus den Zelllysaten.

Man kann anhand des Western Blots erkennen, dass die Banden des pro-apoptischen Proteins BID ein nahezu identisches Muster wie die des anti-apoptischen Proteins Mcl-1 (siehe Abbildung 33) aufweisen. Da BID ebenso wie Mcl-1 dem Abbau durch gewisse Caspasen unterliegt (Brüning, Rahmeh, Gingelmaier, & Friese, 2010), kam die Vermutung auf, dass der Abbau dieser beiden Proteine der Bcl-2-Familie durch die Behandlung mit Borrelidin eher als sekundärer Effekt zu werten ist. Um diese Annahme weiter zu erhärten, wurde eine Zeitkinetik mit den Zelllinien Jurkat und IM-9 durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 8 (und bei IM-9 auch 12) Stunden nach Borrelidin-Zugabe zu den Zellen wurden die Proteinmengen von gespaltener PARP, Caspase 8 und Mcl-1 mittels Western Blot untersucht. Es zeigte sich, dass die PARP-Spaltung bereits zu einem früheren Zeitpunkt geschieht als der Abbau von Mcl-1. Synchron zu dessen Abbau stieg außerdem die Menge an Caspase 8. Die zuvor geäußerte Vermutung, dass Borrelidin zwar früh die Apoptose in den Leukämiezellen induziert und damit deren Untergang herbeiführt (frühe PARP-Spaltung), dass allerdings der Abbau von Mcl-1 nicht ursächlich dafür ist, sondern vielmehr im Rahmen des Zelltodes vonstatten geht (spätere Induktion von Caspase 8 und späterer Abbau von Mcl-1), wurde somit untermauert.

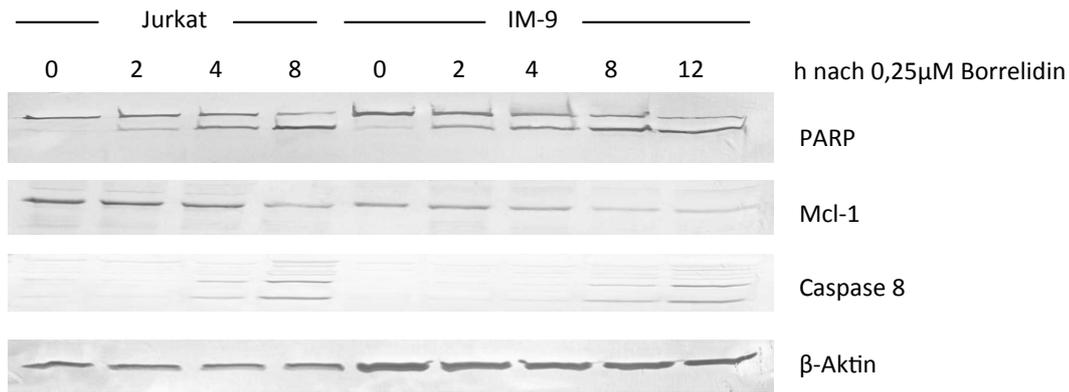


ABBILDUNG 35: ABBAU VON MCL-1 ALS SEKUNDÄRER EFFEKT DER APOPTOSE-INDUKTION DURCH BORRELIDIN IN LEUKÄMIEZELLEN

Zellen der Linien Jurkat und IM-9 wurden für die angegebenen Zeitintervalle jeweils mit den dargestellten Konzentrationen Borrelidin inkubiert. Ihre Lysate wurden zusammen mit unbehandelten Kontrollproben (0h nach 0,25µM Borrelidin) Western Blot-Analysen unterzogen. Es erfolgte die Kopplung mit Antikörpern gegen die dargestellten Proteine und eine anschließende Färbung. Während sich bereits früh eine PARP-Spaltung erkennen lässt, erfolgen die vermehrte Expression von Caspase 8 und die Abnahme der Mcl-1-Proteinmenge erst zu einem späteren Zeitpunkt. Die Markierung von β-Aktin dient zum Nachweis der Verwendung äquivalenter Proteinmengen aus den Zelllysaten.

In Abbildung 34 ist zudem der Einfluss von Borrelidin auf die anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L dargestellt. Während das zuletzt genannte in keiner der untersuchten Zelllinien durch Western Blotting in nennenswerter Quantität nachzuweisen ist, findet sich in den Zellen der Linie HL-60 eine deutliche Überexpression von Bcl-2. Diese bleibt auch nach der Inkubation mit Borrelidin unbeeinflusst. Interessant wird diese Beobachtung, wenn man die Ergebnisse der ATP-Assays mit in Betracht zieht (siehe Abbildung 32). Hier war die Zelllinie HL-60 von allen untersuchten Leukämie-Zelllinien diejenige, die am wenigsten sensibel auf Borrelidin reagierte (ED₅₀ = 316nM im Gegensatz zu 105nM bei Jurkat und 68nM bei IM-9). Eine gesteigerte Expression von Bcl-2 könnte demnach einen Mechanismus darstellen, der den Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber Borrelidin verleiht.

3.2.3 Bcl-2-Expression in Borrelidin-resistenten Zelllinien

Zur weitergehenden Untersuchung dieser Hypothese wurden auch die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 sowie endothelialen Zelllinien HUVEC und EA.hy926 analogen Western Blot-Analysen unterzogen.

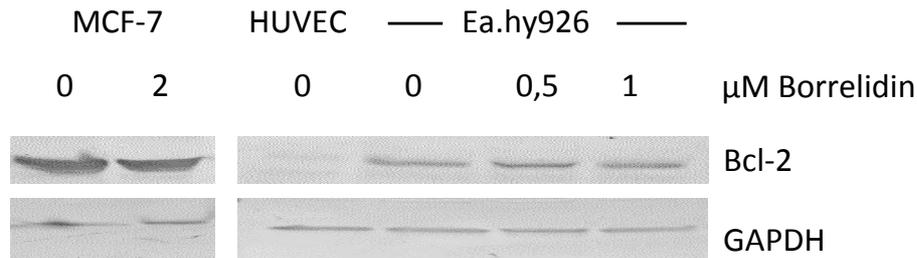


ABBILDUNG 36: EINFLUSS VON BORRELIDIN AUF PROTEINE DER BCL-2-FAMILIE IN MAMMAKARZINOM-UND ENDOTHELZELLEN

Zellen der Linien MCF-7, HUVEC und EA.hy926 wurden für 24 Stunden jeweils mit den dargestellten Konzentrationen Borrelidin inkubiert. Ihre Lysate wurden zusammen mit unbehandelten Kontrollproben (0μM Borrelidin) Western Blot-Analysen unterzogen. Es erfolgte die Kopplung mit Antikörpern gegen die dargestellten Proteine und eine anschließende Färbung. Die Markierung von GAPDH dient zum Nachweis der Verwendung äquivalenter Proteinmengen aus den Zelllysaten.

Während bei HUVEC-Zellen nur eine sehr schwache Proteinbande von Bcl-2 zu sehen war, wurde durch die Färbung des an Bcl-2 gekoppelten Antikörpers bei Zelllysaten der Linie EA.hy926 eine viel deutlichere Expression sichtbar. Die Fusion der HUVEC-Zellen mit der Lungenkrebs-Zelllinie A549, aus welcher die verwendeten EA.hy926-Zellen hervorgegangen waren, führte also zu einer gesteigerten Expression des Proteins Bcl-2. Damit einher ging eine erhöhte Resistenz der EA.hy926-Zellen gegenüber Borrelidin im Vergleich zu den einfachen, benignen HUVEC-Zellen (siehe Abbildung 32). Ebenso exprimierten MCF-7-Zellen, die von allen untersuchten, malignen Brustdrüsenepithel-Zellen am wenigsten sensibel auf Borrelidin reagierten, eine deutlich nachweisbare und selbst durch 2μM Borrelidin nicht abschwächbare Proteinmenge an Bcl-2. Die Bedeutung dieser Beobachtungen und die sich daraus ergebende Relevanz für die praktische Anwendung von Borrelidin werden im nächsten Kapitel diskutiert werden.

4 Diskussion

4.1 Flavonoide

4.1.1 Erläuterung der anti-neoplastischen Eigenschaften

Die sekundären Pflanzenstoffe, die man unter der Gruppenbezeichnung *Flavonoide* zusammenfasst, erfreuen sich größter Beliebtheit als Thema zellbiologischer Forschungsprojekte. Zahlreiche Studien (allein die Suche bei PubMed unter dem Stichwort „flavonoid“ ergibt über 77000 Treffer, die bis Mitte der 1940er Jahre zurückreichen) untersuchten, bestätigten und beschrieben ihre anti-oxidativen, anti-allergischen, kardio- protektiven und anti-neoplastischen Eigenschaften, um nur einige Beispiele zu nennen. Dabei wurden zunehmend die diversen Mechanismen, durch welche Flavonoide das Zellzyklusgeschehen beeinflussen und somit Apoptose induzieren oder Wachstum hemmen, entschlüsselt. Der Gedanke an die Möglichkeit, durch solch potente, natürlicherweise vorkommende Substanzen eine Tumorentstehung oder -progression verhindern zu können, steigert das Interesse an ihnen, sie zur Krebstherapie einzusetzen (Kandaswami et al., 2005). Die Mehrzahl der im Vorfeld erwähnten Studien wurde an Zellkulturen durchgeführt. Nur bei einem geringen Teil wurden die Flavonoide *in vivo* getestet und dann zumeist an Tiermodellen (Kandaswami et al., 2005; Lin et al., 2008; Patel et al., 2007). Noch spärlicher sind Ergebnisse über ihre Wirkungen im Menschen. Immer wieder wird daher in wissenschaftlichen Arbeiten die Notwendigkeit weiterer Forschung betont, die letztendlich ermitteln soll, inwiefern sich die Effekte der Flavonoide auch im komplexen Organismus des Menschen entfalten. Da solche Versuche nicht unerhebliche ethische sowie wirtschaftliche Hürden überwinden müssen, sollte im Voraus wohl überlegt worden sein, welche Substanz(en) für entsprechende Studien herangezogen werden. Wir sahen trotz der Vielzahl an Arbeiten über Flavonoide das Problem, dass häufig nur ein einzelnes oder einige wenige ihrer Vertreter Eingang in die Experimente fanden. Ein systematischer Vergleich unter diesen blieb in den meisten Fällen aus. Daher hielten wir es für sinnvoll, zunächst wichtige, immer wieder in der Literatur genannte und in der Forschung verwendete Flavonoide in ihrer Wirkungsweise gegenüberzustellen. Dadurch soll die Entscheidungsfindung darüber, welche unter ihnen größere Erfolge bei zukünftigen *in*

vivo-Studien versprechen könnten, erleichtert werden. Wir beschränkten uns dabei hauptsächlich auf die Wirkungen der Substanzen Quercetin, Myricetin, Taxifolin, Apigenin, Luteolin, Chrysin und Baicalein auf maligne Zelllinien der Brustdrüse.

Die ersten orientierenden Untersuchungen zum Überleben der Zellen (Zellfärbungen und MTT-Assays) ergaben für alle getesteten Flavonoide außer für Taxifolin eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität und bestätigten damit den häufig zitierten Anti-Tumor-Effekt der Substanzen (Fotsis et al., 1997; Kelly, 2011; Shukla & Gupta, 2010). Bei der genaueren Betrachtung der durch sie beeinflussten Mechanismen des Zellzyklus wurde zunächst das Augenmerk auf die Aktivität des Proteasoms gerichtet. Ein Teil unserer Forschungsgruppe konnte bereits für Quercetin eine Hemmung aller drei enzymatischen Aktivitäten des Proteasoms in MCF-7-Zellen beschreiben (Klappan et al., 2012). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Proteasomassays brachten dieselbe Beobachtung zutage. Darüber hinaus wurde allerdings deutlich, dass Apigenin, Luteolin und Chrysin eine sogar noch stärkere Inhibition vermittelten. In der Vorläuferarbeit über Quercetin wurde in der Immunfluoreszenz die Anhäufung poly-ubiquitylierter Proteinaggregate, sogenannter Aggresomen, als Folge einer Hemmung des Proteasoms beobachtet (Klappan et al., 2012). Wir untersuchten die Auswirkungen der Flavonoide auf Zielproteine des Proteasoms im Western Blot. Da diese bei einer verminderten Aktivität des Proteasoms (die im Assay eindeutig zu sehen war) nicht mehr abgebaut werden können, dürfte eine Anhäufung derselbigen als logische Konsequenz angenommen werden. Im Gegensatz zu dieser Annahme beobachteten wir allerdings keine Akkumulation derartiger Konglomerate im Western Blot. Die Proteinbanden von Mcl-1, I κ B α und Cyclin B erschienen sogar deutlich schwächer, insbesondere nach einer Inkubation mit Quercetin und Apigenin. Diese Beobachtungen lösen zunächst Verwunderung aus und könnten die Vermutung nahe legen, dass die Ergebnisse, die im enzymatischen Assay mit synthetischen Substraten erzielt wurden, nicht auf physiologische Zielproteine übertragbar sind. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass der Zusammenhang komplizierter und diese Schlussfolgerung nicht so einfach zu ziehen ist.

Betrachtet man das anti-apoptotische Protein Mcl-1, so geht seine verminderte Expression mit einem gesteigerten Zelltod einher. Dieser Zusammenhang wurde bereits mehrfach hergestellt und führte dazu, dass Mcl-1 zu einem möglichen Angriffspunkt zielgerichteter Tumortherapien wurde (Brüning et al., 2010; Mitchell et al., 2010). Das Ergebnis des Western Blots passt somit trotz des fehlenden Bezugs zur Proteasomaktivität gut zum erwarteten Anti-Tumor-Effekt der Flavonoide. Sie scheinen diesbezüglich auf einer anderen,

dem Proteasom vorgeschalteten Ebene Einfluss auf Mcl-1 zu nehmen. Eine Studie beschrieb zum Beispiel seine Regulation auf transkriptioneller Ebene im Sinne einer verminderten Expression seiner mRNA durch Quercetin (Spagnuolo et al., 2011). Im Vergleich der von uns ausgewählten Flavonoide bewirkten Apigenin und Luteolin bezogen auf die Proteinmenge eine geringere Mcl-1-Expression als Quercetin. Eine Analyse der transkribierten RNA in einer real-time PCR, wie sie in der erwähnten Studie durchgeführt wurde, könnte Aufschluss darüber geben, ob die beiden Flavone bereits auf dieser Ebene eine stärkere Wirkung haben als Quercetin.

Der experimentell ermittelte Einfluss der Flavonoide auf das Protein I κ B α bietet gleich in zweifacher Hinsicht eine Grundlage zur Diskussion. Anders als man aufgrund der Proteasominhibition annehmen könnte, wurde in dieser Studie keine Akkumulation, sondern ein vermindertes Vorkommen von I κ B α beobachtet. Im unphosphorylierten Zustand hat I κ B α die Aufgabe, an den Transkriptionsfaktor NF κ B im Zytosol zu binden und seine Translokation in den Zellkern zu verhindern. Soll NF κ B aktiviert werden, erfolgt die Phosphorylierung von I κ B α , die Markierung mit einer Ubiquitinkette und die konsekutive Prozessierung durch das Proteasom. Eine Inhibierung des Proteasoms unterbindet dementsprechend den Abbau von phosphoryliertem I κ B α (Palombella et al., 1994). Trotz einer eindeutigen Proteasom-Hemmung durch die Flavonoide im Assay wurde jedoch eine geringere I κ B α -Expression vor allem durch Quercetin und Apigenin beobachtet. Nun liegt wieder die Vermutung nahe, dass, ähnlich wie im Falle von Mcl-1, eine Regulation von I κ B α durch die Flavonoide auf einer anderen Ebene erfolgt. Die folgenden Experimente brachten allerdings eine weitere Unstimmigkeit auf. Es erscheint logisch, dass eine Hemmung von I κ B α zu einer vermehrten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B führen müsste. Wie oben bereits erwähnt, spricht jedoch eine Vielzahl an Publikationen für eine Inhibition von NF κ B durch Flavonoide und proklamiert diese als einen ihrer Hauptmechanismen zur Bekämpfung von Entzündung und ungehemmter Proliferation. Mittels Polymerasekettenreaktion konnten wir zeigen, dass bestimmte Zielgene von NF κ B, nämlich CXCL1, CXCL10 und cIAP2, (mit und ohne Stimulation durch TNF- α) konzentrationsabhängig durch Apigenin weniger stark exprimiert wurden. Dies spricht für eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors. Nun stehen sich allerdings der zu erwartende Effekt (Proteasominhibition \rightarrow I κ B α -Akkumulation \rightarrow NF κ B-Hemmung) und die von uns beobachteten Folgen der Flavonoid-Behandlung (Proteasominhibitor, verminderte I κ B α -Expression und dennoch NF κ B-Hemmung) gegenüber. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein fehlerhaftes Ergebnis im Western Blot. Dafür sprechen zum Beispiel die Beobachtungen von Versuchen mit Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs-Zellen der Linie H460, bei denen durch

Quercetin tatsächlich eine Hochregulation von I κ B α sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene bewirkt wurde (Youn, Jeong, Jeong, Kim, & Um, 2013). In einer anderen Arbeit hingegen wurde ebenfalls festgestellt, dass I κ B α im Beisein eines Proteasom-Inhibitors herunterreguliert werden kann. Es handelt sich um eine Studie zu dem bekannten und klinisch bewährten Hemmer des Proteasoms Bortezomib. Während dieser auf Zellen eines Multiplen Myeloms hervorragende therapeutische Wirkungen erzielt, lässt sich ein solcher Effekt auf solide Tumoren, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, nicht beobachten. In den entsprechenden Versuchen erwiesen sich MCF-7-Zellen als nahezu resistent gegen Bortezomib. Da eine Hemmung von NF κ B (über eine Blockierung des Abbaus von I κ B α) als ein sehr wichtiger Mechanismus für seine Wirkung angenommen wird, wurde dieser Signalweg in der erwähnten Arbeit genauer untersucht. In der Tat fand eine gesteigerte Phosphorylierung und Herunterregulation von I κ B α in MCF-7-Zellen nach einer Behandlung mit Bortezomib statt. In diesem Fall ging damit allerdings auch eine gesteigerte Aktivität von NF κ B einher, wie man sie erwarten würde. Durch die Inhibition von IKK β , einer vorgeschalteten Kinase von I κ B α , gelang es, die durch Bortezomib gesteigerte NF κ B-Aktivität wieder zu hemmen und somit die Zytotoxizität des Proteasom-Inhibitors auch auf Mammakarzinom-Zellen zu übertragen. Die Autoren der Studie folgerten daraus, ihre Ergebnisse könnten eine Grundlage für eine künftige Kombination von Bortezomib mit IKK β -Hemmern beim Mammakarzinom bilden (Hideshima et al., 2014). Letztlich bleibt für die vorliegende Arbeit der Schluss zu ziehen, dass Flavonoide weder reine Hemmer des Proteasoms sind noch dass sie ihre Wirkung auf den Transkriptionsfaktor NF κ B durch eine reine Regulation seines Inhibitors I κ B α vermitteln. Festzuhalten bleibt allerdings, dass sie sehr wahrscheinlich die Aktivität von NF κ B unterbinden, wie wir – zumindest am Beispiel von Apigenin – aus der verminderten Expression seiner Zielgene CXCL1, CXCL10 und cIAP2 ableiten können. Die Rolle von I κ B α bleibt in diesem Geschehen leider unklar.

Da NF κ B ein wichtiger Vermittler inflammatorischer Prozesse ist, kommt seiner Inhibition durch Flavonoide im Rahmen derer Wirkungen gegen maligne Zellen eine große Bedeutung zu. Die Entstehung von Neoplasien weist viele Ähnlichkeiten zu Zuständen der Entzündung auf. Chemokine, das heißt chemotaktische Zytokine, interagieren mit Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten, den Hauptbeteiligten jeglicher Entzündungsreaktion. Sie können daher auch in Zusammenhang mit Tumorentstehung und -progression gebracht werden (Mukaida & Baba, 2012). Eine Aktivierung von NF κ B ist für die Zytokin-Expression in vielen Fällen eine wichtige Voraussetzung. Dies bezieht sich sowohl auf Zustände der Inflammation als auch auf Fälle malignen Wachstums, sofern diese voneinander getrennt

betrachtet werden (Mantovani, Allavena, Sica, & Balkwill, 2008). Wir untersuchten die NFκB-Aktivität in MCF-7-Zellen nach einer Behandlung mit Apigenin, indem wir den Einfluss auf die Expression der Gene für die Chemokine CXCL1 und CXCL10 in einer Polymerasekettenreaktion bestimmten. Wir wählten dazu exemplarisch zwei Vertreter der CXC-Familie aus, da diese eine besondere, teilweise konträre Rolle im Zusammenhang mit Tumorentwicklung und Angiogenese spielen (Strieter et al., 2006). CXCL1 oder GROα gehört zu dem Teil der CXC-Chemokine, der über den CXCR2-Rezeptor Angiogenese und Proliferation fördert (Rainczuk, Rao, Gathercole, & Stephens, 2012). Die Expression dieses „growth-regulated ocogene“ (GRO) wird dabei sowohl durch wachstumsfördernde als auch durch immunmodulierende Signale (über IL-1 und TNF) induziert. Für Letztere ist die Bindung des Transkriptionsfaktors NFκB an seine Bindungssequenz im GRO-Promoter nötig (Haskill et al., 1990). Es wurde gezeigt, dass GRO Endothelzellen zur Migration und Proliferation anregt, was eine Neovaskularisation des betreffenden Gewebes zur Folge hat (Addison et al., 2000; Mukaida & Baba, 2012). Besonders für solide Tumoren ist dieser Weg wichtig, um zu überleben, so dass eine Inhibition von GRO, wie wir sie nach der Inkubation mit Apigenin beobachten konnten, maßgeblich von Nutzen für eine Behandlung des Mammakarzinoms sein kann. Des Weiteren weckt eine Studie Hoffnungen, die eine Überexpression von CXCL1 (neben einigen anderen Zytokinen) vor allem in Hormon- und HER2/neu-Rezeptor-negativen Brustkrebszellen beschreibt, da hier durch die Hemmung von CXCL1 ein Verankerungs-unabhängiges Wachstum der Zellen stark unterbunden werden konnte (Hartman et al., 2013). Dreifach Rezeptor-negative Formen des Mammakarzinoms weisen große Lücken in ihrer Therapierbarkeit auf (aufgrund der fehlenden Rezeptoren haben die gängigen zielgerichteten Therapien keine Angriffspunkte) und gehen deshalb mit einer schlechteren Prognose einher. Die Überexpression von Zytokinen stellt daher einen interessanten, neuen Ansatzpunkt für ihre Behandlung dar, und ihre Inhibierung durch Flavonoide ist vielversprechend.

Anders als GRO bindet das Zytokin CXCL10 an die Rezeptor-Familie CXCR3 und ist ein wichtiger Mediator der Entzündung, indem es mit ihr assoziierte Zellen, insbesondere T-Zellen, an den Ort der Inflammation lockt. Erstaunlicherweise wird in der Literatur sowohl ein Zusammenhang zwischen CXCL10 und der Hemmung von Proliferation und Vaskularisation auf der einen Seite hergestellt als auch eine Förderung von Zellwachstum und Tumorprogression durch das Zytokin auf der anderen Seite beobachtet. Welche Rolle CXCL10 ausübt, hängt dabei von der Unterform des Rezeptors ab, an den es bindet. Während über die Isoform CXCR3-A (die hauptsächlich zu finden ist) Proliferation angeregt wird, vermittelt der CXCR3-B-Rezeptor gegensätzliche Signalwege (Liu, Guo, & Stiles, 2011).

Um die Bedeutung einer verminderten Expression von CXCL10 durch Apigenin interpretieren zu können, stellt sich nun die Frage, wie die Rezeptor-Unterformen in Mammakarzinom-Zellen verteilt sind. Eine Studie fand hierzu heraus, dass die Aktivierung des Proto-Onkogens Ras in Zellen der Linie MDA-MB-435 zu einer Überexpression von CXCL10 führte. Da gleichzeitig der CXCR3-B-Rezeptor in ihnen herunterreguliert wurde, vermittelte das Zytokin insgesamt eine Proliferation der malignen Zellen (vermutlich über CXCR3-A) und trug somit zum Wachstum des Tumors bei. Untersuchungen an menschlichem Brustdrüsen-Gewebe von Patientinnen mit einem Mammakarzinom ergaben auch bei den Zellen *in situ* eine gesteigerte Expression von CXCL10. Die Autoren beschreiben zudem eine Erhöhung der CXCR3-Rezeptoren, allerdings ohne weitere Unterteilung in ihre Isoformen. Sie folgern aus diesen Ergebnissen dennoch eine gewisse Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo* (Datta et al., 2006). Wenn CXCL10 über den beschriebenen Mechanismus in Brustkrebszellen also eine Tumorprogression begünstigt, so könnte Apigenin durch seine Inhibition von CXCL10 auf diesem Weg dem malignen Wachstum entgegenwirken. Dieser Annahme müsste allerdings in weiteren Untersuchungen, beispielsweise an der Zelllinie MDA-MB-435, nachgegangen werden, um an die beschriebene Studie anzuknüpfen und die Wirkung von Apigenin oder anderer Flavonoide weiter zu erforschen.

Schließlich wurde im Zusammenhang mit der Aktivität von NFκB auch die Expression des Gens für cIAP2 nach einer Behandlung mit Apigenin in der PCR ermittelt. cIAP2 gehört zu einer Familie von Proteinen, die als Inhibitoren der Apoptose identifiziert wurden (Crook, Clem, & Miller, 1993). Eine Fehlregulation anti-apoptotischer Proteine kann ein ungehemmtes Wachstum, zum Beispiel in Tumoren, begünstigen. Daher ist die Untersuchung dieser Proteine in der Krebsforschung von Interesse. Die Expression von cIAP2 scheint zwar, anders als die der verwandten Proteine XIAP und cIAP1, in einer geringeren Anzahl an Tumorentitäten eine Rolle zu spielen. In einer Studie, die 60 verschiedene Tumorzelllinien miteinbezog, konnte jedoch in Mammakarzinom-Zellen der Linie MCF-7 eine Überexpression nachgewiesen werden (Tamm et al., 2000). Für die vorliegende Arbeit ist der Effekt von Flavonoiden auf cIAP2 aus diesem Grund von Bedeutung. In der PCR zeigte sich eine konzentrationsabhängige Herunterregulation von cIAP2 durch Apigenin in MCF-7-Zellen. Davon waren sowohl die basale als auch die durch TNF-α stimulierte Expression des Gens betroffen. Auf diese Weise wird die Inhibition der Apoptose in den Zellen aufgehoben, und sie unterliegen dem programmierten Zelltod. Diese Beobachtungen gehen mit der in vorherigen Kapiteln beschriebenen Wirkung der Flavonoide einher, die Apoptose in malignen Zellen der Brustdrüse zu begünstigen, wie dort

am Beispiel der Mcl-1-Suppression und der PARP-Spaltung gezeigt werden konnte. Da sich Apigenin in sämtlichen Versuchen als die effektivste Substanz herausstellte, wurden die PCRs nur mit diesem Flavon durchgeführt. Für eine vollständige Gegenüberstellung der sieben Flavonoide sollten analoge Untersuchungen mit den übrigen Vertretern erfolgen. Zur Interpretation der Bedeutung für NFκB ist schließlich noch wichtig, dass cIAP2 einerseits zu seinen Zielgenen zählt und infolge seiner Aktivierung exprimiert wird und dass andererseits das Vorkommen von cIAP2 selbst zur Aktivierung von NFκB beiträgt. Ähnlich wie bei TNF-α und Interleukin-1 (siehe Kapitel 1.4.3) bildet sich dadurch eine positive Feedbackschleife (S. Wang et al., 2012). Die Frage, ob Apigenin nun NFκB inhibiert und deshalb cIAP2 vermindert exprimiert wird oder ob es cIAP2 direkt herunterreguliert und darüber eine negative Wirkung auf NFκB hat, bleibt also offen. Fest steht allerdings, dass die IAP-Proteine ein erwähnenswertes Ziel für sogenannte *targeted therapies* darstellen. Einige Annäherungen daran, diesen Sachverhalt mit IAP-Antagonisten praktisch zu nutzen, ergaben gerade für Rezeptor-negative Mammakarzinom-Zellen Hinweise auf ein besonders gutes Ansprechen, und einige unter ihnen fanden sogar schon den Einstieg in klinische Studien (S. Wang et al., 2012).

Eine weitere, wichtige Erkenntnis aus der vorliegenden Arbeit ist die gesteigerte Expression des Proteins p53 in MCF-7-Zellen, die sich durch die Inkubation mit Apigenin und Luteolin im Western Blot zeigte. Nach der Entdeckung des zugehörigen Gens war man sich der Rolle von p53 im Tumorgeschehen nicht ganz sicher. Weiterführende Studien an malignen Zellen wiesen eine Mutation des p53-Gens in einer Vielzahl an Fällen nach, was die Forscher zu dem Ergebnis brachte, dass sich die Wildtyp-Variante des Proteins hemmend auf eine Tumorentwicklung auswirkt, während eine Mutation im Gen zur Entstehung von Neoplasien beitragen kann (Eliyahu, Michalovitz, Eliyahu, Pinhasi-Kimhi, & Oren, 1989). Basierend auf den Beobachtungen, dass zellulärer Stress, zum Beispiel UV-Strahlung, eine Akkumulation von (Wildtyp-) p53 bewirkt, wurde man sich seiner Funktionen allmählich bewusst. Beispielsweise sorgt es dafür, dass bei einer Schädigung der Zelle deren Teilungsfähigkeit abgeschaltet wird (Lane, 1992). Dafür greift es an mehreren Stellen des Zellzyklus an (Levine, 1997). Der Einfluss auf die Cycline, wichtige Regulatoren des Zellzyklus, soll kurz erläutert werden. Man fand heraus, dass es sich bei den Cyclinen um Proteine handelt, die abhängig vom Zellzyklusgeschehen synthetisiert oder abgebaut werden. Je nach ihrer Funktion auf die jeweiligen Phasen des Zellzyklus erfolgte die Einteilung in mehrere Gruppen. Cycline der Gruppe B befähigen die Zelle beispielsweise zum Übergang von der G2- in die M-Phase. Am korrekten Umsatz der Cycline ist unter

anderem das Proteasom beteiligt (Hershko, 1999; Pines, 1991). Daneben ist der Transkriptionsfaktor p53 in der Lage, unter anderem mit dem Promoter im Gen für Cyclin B zu interagieren, um dessen Transkription zu verhindern. Dies stellt einen möglichen Mechanismus dar, durch den p53 einen Zellzyklusarrest bewirken kann (Innocente, Abrahamson, Cogswell, & Lee, 1999). Ein solcher Teilungsstopp durch p53 soll den Reparaturmechanismen der Zelle genügend Zeit geben, einen Schaden zu beheben. Falls die Reparatur nicht gelingt, führt p53 die Zelle zum Schutz des Organismus in die Selbstzerstörung, indem es die Apoptose einleitet. Da bei einer Mutation, wie sie in vielen Tumorzellen vorkommt, „normales“ p53 inaktiviert wird, fehlt solchen Zellen die protektive Kontrollfunktion des Proteins. D. P. Lane gab ihm daher den treffenden Namen *guardian of the genome* (Lane, 1992). Unter normalen Umständen, das heißt, wenn kein genomischer Schaden droht oder andersartiger Stress in der Zelle vorherrscht, ist nur sehr wenig p53 nachweisbar. Dieser Umstand ist auf eine hohe Instabilität des Proteins zurückzuführen und es wurde mehrfach ein Zusammenhang mit dem Abbau durch das Proteasom hergestellt (Haupt, Maya, Kazaz, & Oren, 1997; Maki, Huibregtse, & Howley, 1996). Die gesteigerte Expression von p53 durch Apigenin und Luteolin könnte somit einerseits auf die Hemmung des Proteasoms zurückzuführen sein. Allerdings wäre dann ein ähnlicher – wenn auch schwächerer – Effekt beispielsweise durch Quercetin zu erwarten. Da sich jedoch auch nach Wiederholung des Experiments keine stärkere p53-Bande bei Quercetin-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe zeigte, wurden wir zur Annahme gebracht, dass Apigenin und Luteolin auf anderem Wege den Abbau von p53 hemmen oder dessen Expression erhöhen. Eine weitere, interessante Beobachtung war die verminderte Expression von Cyclin B, die mit einem gesteigerten Level an p53 einherging. Diese war im Western Blot deutlich an den mit Apigenin inkubierten MCF-7-Zellen zu sehen. Wie oben bereits erklärt, kann p53 durch die Herunterregulation der Cycline verhindern, dass eine Zelle sich weiter teilt. Im Fall von Brustkrebszellen ist dies jedoch von besonderer Bedeutung. Immunhistochemische Untersuchungen an Gewebe aus malignen und nicht-malignen Läsionen der Brustdrüse ergaben einen Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von Cyclin B und einem zunehmendem Grad der Malignität (Kawamoto, Koizumi, & Uchikoshi, 1997). Eine ausgedehnte, statistische Analyse brachte Cyclin B weiterhin in Verbindung mit anderen, etablierten Prognosefaktoren (zum Beispiel dem Lymphknotenstatus, der Tumorgöße oder dem Proliferationsindex Ki67) und stellte eine starke Korrelation zwischen ihm und einem geringeren Gesamt- beziehungsweise tumorfreien Überleben fest (Aaltonen et al., 2009). Die Herunterregulation von Cyclin B durch eine Behandlung mit Apigenin kann somit maßgeblich zu seiner anti-tumoralen

Wirkung beitragen, sei es über die Expression von p53 oder auf einem anderen Weg. Die fehlende Akkumulation von Cyclin B trotz einer Hemmung des Proteasoms durch Apigenin spricht auch hier für einen vorgeschalteten Angriffspunkt des Flavons. Bewährte Medikamente in der Chemotherapie des Mammakarzinoms, wie Adriamycin und Platin-Derivate, wirken ebenfalls zu einem gewissen Grad über die Erhöhung des Proteinlevels von p53. Ihr Effekt wird allerdings von einem hohen Maß an Zytotoxizität überschattet. Eine direkte Regulation von p53 zählt daher ebenfalls zu den Ansatzpunkten zielgerichteter Tumorthérapien, in der Hoffnung, derartige Nebenwirkungen umgehen zu können (Hao & Cho, 2014). Weitere Studien, die den genauen Mechanismus der Interaktion zwischen den beiden genannten Flavonoiden (Apigenin und Luteolin) und dem „Wächter des Genoms“ untersuchen, sind aus diesem Grund von besonderem Interesse.

4.1.2 Relation zwischen Wirkung und Struktur

Die Experimente in dieser Arbeit wurden, neben dem Ziel des reinen Erkenntnisgewinns über die Wirkmechanismen der untersuchten Flavonoide, in komparativer Art und Weise durchgeführt, um damit die effektivsten Substanzen unter ihnen zu identifizieren. In Kapitel 3.1.7 wurde anhand einer zusammenfassenden Tabelle gezeigt, dass durch Taxifolin nahezu keine zytotoxische Wirkung auf Mammakarzinom-Zellen zu erzielen war, während sich Apigenin und Luteolin als besonders zellschädigend und proliferationshemmend herausstellten. In Abbildung 37 ist nochmals eine Übersicht der verwendeten Flavonoide mit ihren Strukturformeln zu sehen.

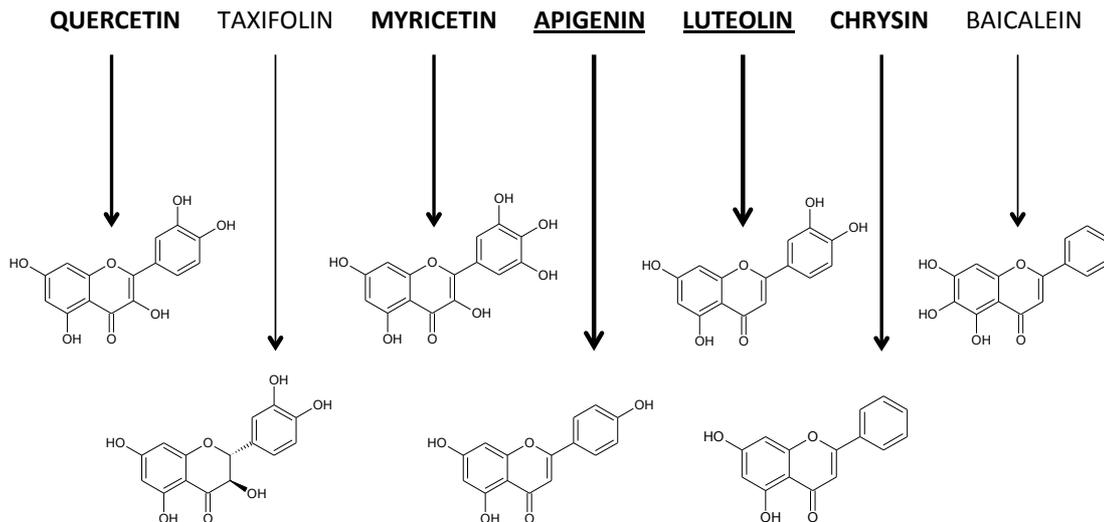


ABBILDUNG 37: ZUSAMMENSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN FLAVONOIDE MIT DARSTELLUNG IHRER STRUKTURFORMELN

Apigenin und Luteolin sind als wirksamste Substanzen besonders hervorgehoben. Quercetin, Myricetin und Chrysin zeigten eine mittelstarke Effektivität. Baicalein und Taxifolin waren größtenteils schwach beziehungsweise nicht wirksam gegen Mammarkarzinom-Zellen. Die Abstufung der zytotoxischen Eigenschaften wird durch die Beschriftung widerspiegelt.

Bei der Betrachtung fällt auf, dass dem Flavanonol Taxifolin als einzigem unter ihnen, das so gut wie keinerlei Wirkung zeigte, die konjugierte Doppelbindung im C-Ring fehlt. Daraus resultiert eine Abkippung des B-Rings und der 3-OH-Gruppe zum Rest des Moleküls, so dass es insgesamt nicht mehr in einer Ebene liegt. Wie bereits erwähnt, wird der 2,3-Doppelbindung eine große Bedeutung bei der Entfaltung der anti-oxidativen Eigenschaften der Flavonoide zugesprochen (Bors & Michel, 2002; Croft, 1998; Ratty & Das, 1988). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen stark darauf hin, dass dieses Strukturmerkmal ebenso für ihre anti-neoplastischen Wirkungen notwendig ist. Dies deckt sich auch mit ähnlichen Beobachtungen, die in der Literatur zu finden sind und die einen entsprechenden Zusammenhang beschreiben (Brusselmans, Vrolix, Verhoeven, & Swinnen, 2005; Kawaii et al., 1999). Es sollte daraus allerdings nicht auf das völlige Fehlen einer gesundheitsfördernden Wirkung von Taxifolin geschlossen werden. Untersuchungen ergaben, dass seine anti-oxidativen Eigenschaften mit denen von α -Tocopherol (Vitamin E) zu vergleichen sind (Teselkin Iu, Zhambalova, Babenkova, & Tiukavkina, 1996), und eine Studie an Ratten berechnete für Taxifolin sogar einen ähnlichen therapeutischen Index in Bezug auf seine anti-inflammatorische Aktivität wie für Hydrocortison (M. B. Gupta, Bhalla, Gupta, Mitra, & Bhargava, 1971). Damit wird deutlich, dass das Interesse an Taxifolin als Mittel zur Therapie diverser Erkrankungen nicht vollständig verlorengehen sollte. Beispielsweise wurde seine Bedeutung für (unter anderem virale) Läsionen der Leber

bereits eingangs erklärt (Weidmann, 2012). Für die Therapie des Mammakarzinoms ist Taxifolin dieser komparativen Analyse zufolge jedoch zu vernachlässigen.

Des Weiteren unterscheiden sich die untersuchten Flavonoide anhand der Hydroxylierung an Position 3 des C-Rings. Dieser wird (insbesondere in Zusammenhang mit einer OH-Gruppe an Position 5) ebenfalls eine wichtige Rolle beim Abfangen freier Radikale zugesprochen (Croft, 1998). In Abbildung 37 fällt allerdings auf, dass ausgerechnet die beiden Flavone Apigenin und Luteolin, die im Vergleich der Flavonoide die stärksten zytotoxischen Effekte auf Mammakarzinom-Zellen erzielten, keine 3-OH-Gruppe besitzen. Es ist daher anzunehmen, dass eine Hydroxylierung an dieser Stelle für die anti-tumoralen Wirkungen der Flavonoide entbehrlich ist. Sie könnte die Induktion der Apoptose in Tumorzellen sogar behindern. Die Arbeitsgruppe, die diese Vermutung äußerte, konnte ebenfalls eine stärkere Wirkung von Apigenin im Vergleich zu Quercetin und Myricetin gegen Tumorzellen (in diesem Falle Leukämiezellen der Linie HL-60) beobachten (I. K. Wang, Lin-Shiau, & Lin, 1999). Die in der hier vorliegenden Arbeit beschriebene starke Wirkung von Luteolin passt ebenfalls zu dieser Theorie. Von den fünf übrigen Flavonoiden in unserer Studie entbehren außerdem nur Baicalein und Chrysin der 3-Hydroxy-Gruppe. Diese wirkten jedoch nur schwach bis mäßig auf die untersuchten Mammakarzinom-Zellen, weshalb vermutlich weitere, strukturelle Gegebenheiten die Zytotoxizität der Flavonoide beeinflussen.

Als letzter Punkt in Bezug auf die Unterschiede zwischen den chemischen Strukturen der Flavonoide soll das Hydroxylierungsmuster am B-Ring angesprochen werden. Generell ist festzuhalten, dass für eine anti-proliferative und Apoptose-induzierende Wirkung vermutlich OH-Gruppen an sich nötig sind. Eine Forschergruppe zeigte dies am Beispiel von Quercetin, von welchem sie ein Derivat herstellte, bei dem einige seiner Hydroxy-Gruppen (an den Positionen 3, 3', 4' und 7) durch Benzyl-Gruppen ersetzt wurden. An HL-60-Leukämiezellen testete sie die Substanzen und fand heraus, dass reines Quercetin die Proliferation der Zellen hemmte und die Apoptose in ihnen einleitete. Modifiziertes Quercetin hingegen hatte diese Fähigkeit verloren. Sie schloss daraus, dass zumindest die Gesamtheit der ersetzten OH-Gruppen an den genannten Funktionen beteiligt ist. Um die Bedeutung der einzelnen Substituenten zu ergründen, müssten allerdings mehrere verschiedene Derivate hergestellt werden (Sakao, Fujii, & Hou, 2009). Eine andere Studie verglich den Effekt von acht Flavonoiden auf die Aktivität verschiedener Proteinkinasen in mehreren Tumorzelllinien und die daraus resultierende Proliferationshemmung dieser Zellen. Quercetin und Luteolin wurden dabei als wirksamste Substanzen identifiziert. Die strukturabhängigen Beiträge zur ihrer Wirksamkeit wurden der 2,3-Doppelbindung im C-

Ring sowie den 3'- und 4'-OH-Gruppen am B-Ring zugesprochen. Dass Quercetin und Luteolin hier dasselbe Hydroxylierungsmuster besitzen, stützte diese Vermutung. Die Autoren der Studie behaupteten jedoch, dass das Fehlen einer oder beider dieser OH-Gruppen die Wirkung abschwäche. Der Grund dafür ist, dass die anderen, von ihnen untersuchten Flavonoide zum Teil nur eine oder keine OH-Gruppe an diesen Positionen besitzen und im Vergleich schwächer waren als Quercetin beziehungsweise Luteolin (Huang et al., 1999). Hier gilt es allerdings zu beachten, dass Apigenin nicht zu den acht Flavonoiden der Studie gehörte. Apigenin ist am B-Ring nur an Position 4' hydroxyliert und war in der vorliegenden Arbeit dennoch das wirksamste Flavonoid gegen Mammakarzinom-Zellen, so dass aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse von der zitierten Behauptung Abstand genommen werden muss. Die Rolle der OH-Gruppen in Bezug auf die Anti-Tumor-Wirkung ist demnach noch nicht genau aufzuklären. Größere, strukturierte Studien mit mehreren Vertretern der Flavonoide sollten durchgeführt werden, um dazu beizutragen.

4.1.3 Evaluation der Anwendbarkeit einer Therapie mit Flavonoiden in der Praxis

In der vorliegenden Arbeit wurden sieben ausgewählte Flavonoide vorgestellt, ihre Wirkungen auf verschiedene Signalwege in Mammakarzinom-Zellen untersucht, die Ergebnisse untereinander verglichen, ein positiver Nutzen für die Bekämpfung der Erkrankung herausgearbeitet sowie eine Verbindung zur chemischen Struktur der Substanzen hergestellt. Als letzter Punkt soll nun die Praktikabilität einer Behandlung mit Flavonoiden diskutiert werden.

Hierfür gilt es zunächst zu klären, welche Konzentrationen sich in den Versuchen als wirksam erwiesen haben und ob diese im menschlichen Plasma zu erreichen sind. Nach anfänglichen Tests mit aufsteigenden Konzentrationsreihen der sieben Flavonoide wurden für diese Arbeit die jeweiligen ED_{50} -Konzentrationen für verschiedene Zelllinien berechnet. Auf der Basis der Ergebnisse entschieden wir uns zur einheitlichen Verwendung von $50\mu\text{M}$ als Konzentration für die folgenden Experimente, da diese bei allen Substanzen repräsentativ war und sinnvoll zu vergleichende Daten lieferte. Darüber hinaus stößt man auch beim Durchforsten der Literatur an vielen Stellen und in unterschiedlichen Analysen auf diese oder ähnliche Konzentrationen zur Untersuchung der Flavonoide (Huang et al., 1999; Morales & Haza, 2012; I. K. Wang et al., 1999; Youn et al., 2013). Die eigentlich wirksamen Konzentrationen liegen allerdings auf einem weitaus niedrigeren Niveau, wie aus mehreren Arbeiten hervorgeht. Zum Beispiel wurden für Brustkrebszellen der Linie

MDA-MB-231 zytotoxische Effekte durch Quercetin und Luteolin bereits bei Konzentrationen von 6-12 μ M beschrieben (Brusselmans et al., 2005). Eine andere Arbeit identifizierte Luteolin als wirksamste Substanz unter 27 Flavonoiden und berechnete dafür ED₅₀-Konzentrationen zur Proliferationshemmung verschiedener Tumorzelllinien von maximal 3,1 μ M (Kawaii et al., 1999). In einer weiteren Studie wiederum wurden für Quercetin, Apigenin, Luteolin und Chrysin jeweils weniger als 10 μ M als halbmaximale Konzentrationen zur Hemmung von MCF-7-Zellen angegeben (Fotsis et al., 1997). Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Clonal Assays mit einer nur geringen Konzentration der Flavonoide von 5 μ M (siehe Kapitel 3.1.1) stehen dazu im Einklang. Es wird deutlich, dass *in vitro* keine allzu hohen Konzentrationen der Flavonoide nötig sind, um anti-tumorale Effekte zu erzielen. Zu hohe Konzentrationen können hingegen sogar nicht-tolerable, schädliche Effekte vermitteln, wie bereits eingangs erwähnt wurde. Es existieren in diesem Zusammenhang sogar konkretere Angaben bezüglich der Dosierungen, zum Beispiel basierend auf einer Arbeit von Wätjen et al., in der behauptet wird, dass eine protektive Dosis fünf- bis zehnmal niedriger sei als eine zytotoxische. Es wird zudem erwähnt, dass die Zufuhr von 1-2g Quercetin bereits ausreichend sei, um zu Plasmakonzentrationen von 10-50 μ mol/l zu führen (Watjen et al., 2005). Sind wirksame Konzentrationen also auch *in vivo* zu erreichen, und haben sie dort dieselbe Wirkung? Und wenn ja: Auf welchem Weg werden die Flavonoide am besten vom Organismus aufgenommen?

Die Frage nach der Bioverfügbarkeit von Flavonoiden wurde bislang am umfassendsten anhand von Quercetin erforscht. Dieses Flavonol scheint für *in vivo*-Untersuchungen zur Aufnahme der Pflanzenstoffe am geeignetsten, da es in geläufigen und häufig konsumierten Nahrungsmitteln am weitesten verbreitet ist. Eine vielfach zitierte Studie aus den Niederlanden konnte bei einem Patientenkollektiv die Gesamt-Tagesaufnahme der Flavonoide Quercetin, Kaempferol, Apigenin, Luteolin und Myricetin aus der Nahrung mit 23mg bemessen. Davon schrieb sie 16mg pro Tag allein Quercetin zu. Knapp die Hälfte der von den Testpersonen aufgenommenen Menge an Flavonoiden stammte dabei aus Tee, ein knappes Drittel aus Zwiebeln (M. G. Hertog et al., 1993). Im Gegensatz dazu wird an mehreren Stellen auf eine Übersichtsarbeit von J. Kühnau aus dem Jahr 1976 verwiesen, in welcher die tägliche Aufnahme einiger Flavonoid-Untergruppen über die Nahrung in den USA sogar mit bis zu einem Gramm angegeben wurde. Viele Autoren sehen diese Angabe als realistisch bemessene Grundlage an (Kay, 2010; Manach et al., 2004). Gegenstimmen erachten eine solche Berechnung allerdings als überschätzt (Hollman & Katan, 1999). Wiederum an anderer Stelle wird die Menge von einem Gramm pro Tag als Gesamtmasse aller aufgenommenen Polyphenole genannt. Darunter fallen neben den Flavonoiden also

auch andere Substanzen, die zu den Polyphenolen gezählt werden, beispielsweise die Hydroxy-Zimtsäure. Hier beruht die Schätzung auf einem Vergleich mehrerer Arbeiten und steht unter der Prämisse eines täglichen Verzehrs von Obst und Gemüse (Manach et al., 2004). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam ebenfalls eine weitere Studie, bei welcher die Gesamt-Tagesaufnahme von Polyphenolen aus der Nahrung nach 337 verschiedenen Untergruppen aufgeschlüsselt wurde. Es stellte sich heraus, dass die Gesamtmenge an mit der Nahrung zugeführten Flavonoiden zwar deutlich unter der von anderen Polyphenolen (zum Beispiel der Hydroxy-Zimtsäure aus Kaffee) liegt, dass sie aber dennoch einen Großteil der Masse ausmacht und daher keinesfalls zu vernachlässigen ist (Perez-Jimenez et al., 2011). Die beschriebenen Studien verdeutlichen exemplarisch, dass sich in der Literatur keine exakte und einheitliche Menge zur tatsächlichen Aufnahme von Flavonoiden und anderen Polyphenolen über die Nahrung finden lässt. Ein strukturierter Vergleich der hierzu veröffentlichten Arbeiten ist außerdem nicht unproblematisch. Das erklärt sich zum einen dadurch, dass die Berechnung des Polyphenol-Gehaltes einzelner Lebensmittel auf unterschiedlichen Quellenangaben zu ihrer Zusammensetzung beruht. Zum anderen sind die betrachteten Naturstoffe im Organismus multiplen, metabolischen Einflüssen ausgesetzt und während ihres Transportes im Plasma an Proteine gebunden. Möglicherweise akkumulieren sie auch zu einem unbekanntem Anteil in verschiedenen Geweben. Es bleibt daher fraglich, welche Parameter sich zur Bestimmung ihres wahren Gehaltes im Körper eignen. Insbesondere für den Nachweis einer längerfristigen Zufuhr von Flavonoiden mangelt es an entsprechenden Detektionsmethoden (Manach et al., 2004; Perez-Jimenez et al., 2011). Dennoch wird aus den zusammengetragenen Ergebnissen ersichtlich, dass eine Aufnahme von Flavonoiden durch die alltägliche Ernährung eine nicht zu verachtende Rolle spielt und dass sich eine Untersuchung ihrer protektiven Effekte *in vivo* lohnt. Darüber hinaus würde es eine elegante Lösung darstellen, ihre bekannten anti-tumoralen Effekte allein auf nutritivem Weg präventiv oder therapeutisch ausnutzen zu können. Als wichtiger Punkt gilt es jedoch, die Essgewohnheiten des Einzelnen zu beachten, da sie verständlicherweise die Basis für das Angebot und die Resorption von Flavonoiden bilden (Manach et al., 2004). Allgemein gültige Aussagen bezüglich der diätetischen Versorgung mit Flavonoiden lassen sich demnach nicht formulieren.

So wird die Evaluation weiter zur Überlegung geführt, ob eine zusätzliche, exogene Zufuhr von Flavonoiden (zum Beispiel in Form von Kapseln) zuverlässiger zu einem wirksamen Plasmaspiegel beitragen kann als die reine Ernährung mit Flavonoid-reichen Lebensmitteln. Dazu muss man verstehen, in welcher Form die Substanzen vom Organismus resorbiert werden. Hollman et al. gingen dieser Frage nach und kamen, entgegen zuvor geäußerter

Annahmen, zu dem Ergebnis, dass glykosyliertes Quercetin (also an Zucker gebundenes, wie es meistens in der Natur zu finden ist) zum Teil besser resorbiert werden kann als das reine Aglykon. Sie untersuchten auch, welche Rolle die Art des jeweiligen Zuckerrestes, der an Quercetin gebunden ist, spielt. Dieser unterscheidet sich nämlich in den verschiedenen Lebensmitteln. In einer Studie von Hollman et al. zeigte Quercetin die größte Bioverfügbarkeit, wenn es aus Zwiebeln stammte, wo es an Glucose gebunden ist. Das brachte die Arbeitsgruppe zu der Vermutung, dass ein Glucose-Carrier der Darmwand an der Resorption beteiligt sei. Nach einer Applikation von 225µmol Quercetin in glykosylierter Form aus Zwiebeln erzielte sie bei ihren Testpatienten Spitzenkonzentrationen im Plasma von 0,74µM (Hollman, de Vries, van Leeuwen, Mengelers, & Katan, 1995; Hollman & Katan, 1999). Wie bereits erwähnt, behaupten einige Autoren, dass die Aufnahme der reinen Substanzen (in einer geeigneten Darreichungsform) das Erreichen wirksamer Plasmaspiegel gegenüber einer Aufnahme aus Nahrungsmitteln erleichtern soll (Manach et al., 2004). Eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen der diätetischen Zufuhr von Flavonoiden und ihrem Erscheinen im Blutplasma wurde allerdings bereits mehrfach experimentell ermittelt. In einer Studie mit 92 Studenten, die über sieben Tage ein Ernährungstagebuch führten, aus welchem die mittlere Aufnahme ausgewählter Flavonoide berechnet wurde, konnten beispielsweise nach einer Woche mittlere Plasmaspiegel von circa 80nM des reinen Aglykons von Quercetin bei einer durchschnittlichen Aufnahme von 13,6mg pro Tag gemessen werden (Cao et al., 2010). Dies erreicht zwar an sich noch nicht die zuvor erwähnten, wirksamen Konzentrationen, es ist jedoch eine Akkumulation der Substanzen im Organismus zu bedenken. Hierfür sollten die entsprechenden Halbwertszeiten der Substanzen beachtet werden. Zum Teil geht die Elimination der Polyphenole aus dem Körper schnell vonstatten. Für Apigenin wurde beispielsweise beschrieben, dass die Plasmaspiegel bereits nach 28 Stunden unter die Nachweisgrenze gefallen waren (Cao et al., 2010). Andere Polyphenole können jedoch über einen längeren Zeitraum im Plasma nachweisbar sein. Zum Beispiel wird die Halbwertszeit für Quercetin an mehreren Stellen bis circa 30 Stunden angegeben. Das Erreichen und die Aufrechterhaltung einer wirksamen Dosis bei regelmäßiger Zufuhr ist also durchaus denkbar (Manach et al., 2004; Ross & Kasum, 2002). Je nach Substanz sollten bei der exogenen Zufuhr die Applikationsabstände entsprechend der beschriebenen Halbwertszeiten gewählt werden. Trotz eines Mangels an klinischen Studien zur Supplementierung mit Flavonoiden wird bei Betrachtung der wenigen durchgeführten bereits deutlich, auf welche Aspekte der Löslichkeit und der Applikationsart bei der Verwendung synthetisch hergestellter Präparate geachtet werden muss. Eine Arbeitsgruppe entwickelte zum Beispiel eine wasserlösliche

Vorstufe von Quercetin, QC12, und führte sie Tumorpatienten in einer Dosis von 400mg entweder per os oder intravenös zu (Mulholland et al., 2001). Zuvor hatte dieselbe Gruppe eine klinische Studie mit in DMSO gelöstem Quercetin durchgeführt, dessen Wirkungen im Menschen bei höherer Dosierung jedoch nicht unbedenklich sind. Damals hatte sie nach intravenöser Zufuhr von hochdosiertem Quercetin kurzzeitig Plasmakonzentrationen von 200-400µM erreichen können. Diese waren zwar rasch auf 1µM abgefallen, doch es zeigte sich in dieser Studie bei einigen Patienten ein Behandlungserfolg. Zum Beispiel fiel der Tumormarker CA12-5 bei einer Patientin mit metastasiertem Ovarialkarzinom nach der Behandlung mit Quercetin auf ein deutlich niedrigeres Niveau ab (Ferry et al., 1996). Die Versuche mit dem synthetischen Quercetin QC12 sollten daraufhin eine orale mit einer intravenösen Gabe vergleichen. Es stellte sich heraus, dass allein nach intravenöser Applikation ein Quercetin-Spiegel im Plasma nachweisbar war. Die aufgenommene Menge wurde dabei auf 20-25% der gegebenen Dosis geschätzt (Mulholland et al., 2001). Dieses Erkenntnis ist im Einklang mit einer circa vierzig Jahre lang zurückliegenden Untersuchung über die Bioverfügbarkeit von Quercetin, die eine fehlende Aufnahme nach oraler Applikation eines Quercetin-Präparates aufdeckte (Gugler, Leschik, & Dengler, 1975). Eine neuere Studie hingegen untersuchte die Quercetin-Aufnahme bei Probanden, denen eine Woche lang drei mal täglich 500mg des Flavonols in Form von Kapseln zugeführt wurden. Es wurden Spitzen-Plasmakonzentrationen von 463mg/ml gemessen, was zeigte, dass eine Resorption bei oraler Aufnahme erfolgt war. Auch für Luteolin lassen sich Hinweise darauf finden, dass es nach oraler Zufuhr im Plasma nachweisbar ist (Shimoi et al., 1998). Bei einer vor wenigen Jahren veröffentlichten klinischen Studie wurden Kinder mit Autismus-Spektrum-Störungen mit Kapseln behandelt, die unter anderem Luteolin und Quercetin enthielten. Da die Autoren von einer geringen oralen Bioverfügbarkeit der fettlöslichen Substanzen ausgingen, wurden diese entsprechend formuliert, um ihre Resorption zu verbessern. Die Studie ergab eine gesteigerte Anpassungsfähigkeit der Kinder nach der durchgeführten Therapie, was auf eine entsprechende Wirksamkeit der Flavonoide hindeutete (Taliou, Zintzaras, Lykouras, & Francis, 2013). Es war demnach davon auszugehen, dass Quercetin und Luteolin nach oraler Zufuhr aufgenommen wurden.

Was Quercetin betrifft, lassen sich jedoch auch jenseits klinischer Studien zahlreiche Angebote für Nahrungsergänzungsmittel finden. Sie werden in der Regel in einer Dosierung von 250-500mg pro Kapsel angeboten, und ein täglicher Konsum wird empfohlen. Sportler, die sich durch die anti-oxidative Wirkung eine Leistungssteigerung erhoffen, indem die bei der körperlichen Anstrengung anfallenden freien Radikale abgefangen werden, greifen beispielsweise darauf zurück. Ein signifikanter Einfluss auf entsprechende Biomarker konnte

bislang allerdings nur in Verbindung mit einer gleichzeitigen Vitamin-C-Einnahme nachgewiesen werden (Askari, Ghasvand, Feizi, Ghanadian, & Karimian, 2012). Die zusätzliche Aufnahme von Quercetin in Form von Kapseln wird darüber hinaus auch zum Zweck der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen angepriesen. Bei einer randomisierten, kontrollierten, klinischen Studie wurden Probanden mit einem Gemisch aus verschiedenen Proteasom-Inhibitoren (darunter Quercetin und andere Polyphenole sowie Vitamine) behandelt. Es zeigte sich daraufhin ein signifikanter Abfall der Entzündungsmarker NO und CRP im Serum. Des Weiteren ließ sich in derselben Studie eine Verbesserung des Lipoprotein-Profiles im Plasma bei Personen mit erhöhten Cholesterinwerten erzielen. Die Autoren der Arbeit betonten die mögliche Bedeutung einer derartigen Behandlung für die Therapie und die Prävention entsprechender inflammatorischer Erkrankungen (Qureshi, Khan, Mahjabeen, Papasian, & Qureshi, 2013).

Man kann zusammenfassen, dass es schwierig ist, aus der derzeitigen Datenlage eine allgemeingültige Aussage über die geeignete Darreichungsform, Dosis und Dauer einer Therapie mit Flavonoiden zu treffen. Dafür sind die durchgeführten Studien zu unterschiedlich und nicht komparabel genug. Eine Akkumulation der Substanzen im Körper ist jedoch anzunehmen, und das Erreichen einer wirksamen Dosis ist somit vorstellbar. Polyphenole kommen allerdings kaum in unkonjugierter Form im Organismus vor, während die meisten *in vitro*-Studien ihre Wirksamkeit als genau solche untersucht haben. Bei Untersuchungen an Blutplasma von Probanden, denen verschiedene Quercetin-Glykoside zugeführt wurden, war nach deren Aufnahme kein freies Quercetin darin nachweisbar. Es unterlag hingegen einer raschen Verstoffwechslung, so dass vor allem die entsprechenden Stoffwechselprodukte detektiert werden konnten (Graefe et al., 2001; Manach et al., 1998). Die im Blut zirkulierenden Metabolite könnten jedoch ein anderes Wirkprofil aufweisen. Eine Arbeitsgruppe konnte beispielsweise beschreiben, dass die Konjugation von Quercetin seine anti-oxidativen Eigenschaften etwa um die Hälfte abschwächte (Manach et al., 1998). Der Einfluss von Darmbakterien auf die anti-tumoralen Eigenschaften des Flavonols scheint gegensätzlich zu sein (Z. Zhang et al., 2014). Die Auswirkungen auf andere Effekte des Flavonoids sowie die entsprechenden Verhältnisse bei den ihm verwandten Substanzen bleiben dagegen weitestgehend unerforscht (Manach et al., 2004). Dazu kommt, dass einige Flavonoide im Rahmen ihres Metabolismus mit verschiedenen Katalysatoren des Stoffwechsels interagieren, zum Beispiel mit Enzymen der Cytochrom P-Familie. So fungiert unter anderem Quercetin als Inhibitor von Cytochrom P450. Da diesen Enzymen eine besondere Aufgabe bei der Verstoffwechslung von Medikamenten zukommt, ergibt sich daraus ein weiterer Aspekt, der bei der Anwendung von Flavonoiden *in vivo* berücksichtigt

werden muss (Rastogi & Jana, 2014). Dabei kann eine Interaktion der Naturstoffe mit Medikamenten potentiell in zwei Richtungen führen: zu deren Abschwächung durch einen schnelleren Abbau oder im Gegenteil zur Wirkungsverstärkung bei inhibiertem Metabolismus. In Bezug auf Krebstherapien ist es in diesem Zusammenhang von Interesse, die Wirkung etablierter Therapien durch Flavonoide zu verstärken oder ergänzen, um somit an Chemotherapeutika einsparen zu können und dadurch ihre Toxizität zu reduzieren. Auch wenn die genauen Mechanismen zum Teil nicht vollständig geklärt sind, liegen zu diesem Sachverhalt einige Daten vor. Es gibt zum Beispiel Hinweise darauf, dass Quercetin die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin auf Brustkrebszellen zu unterstützen vermag, während zugleich die Nebenwirkungen auf nicht maligne Zellen reduziert werden (Staedler, Idrizi, Kenzaoui, & Juillerat-Jeanneret, 2011). Um auf die anfangs erwähnte duale Rolle des Flavonols (zum Beispiel anti- und zugleich pro-oxidativ) zurückzukommen, seien noch die Untersuchungen einer Arbeitsgruppe erwähnt, die den Einfluss der Dosierung von Quercetin auf das Ansprechen von Ovarialkarzinom-Zellen auf Cisplatin erforschte. Während hoch dosiertes Quercetin ($100\mu\text{M}$) seinerseits zytotoxische Effekte vermittelte, schwächte niedrig dosiertes Quercetin ($5\text{-}30\mu\text{M}$) dagegen die Wirkung von Cisplatin ab (Li et al., 2014). Ungeachtet der – auch hierzu überwiegenden – Datenlage zu Quercetin lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schlussfolgern, dass in Bezug auf das Mammakarzinom das größere Augenmerk auf die Therapie mit Apigenin gelegt werden sollte. Für das Flavon konnte immerhin bereits an mehreren Tumor-Zelllinien (unter anderem an HeLa-Zellen) gezeigt werden, dass es in niedriger Dosierung den anti-neoplastischen Effekt von Paclitaxel verstärkte und dabei eine nur geringe Toxizität auf gutartige Zellen ausübte (Li et al., 2014). Eine ähnliche Wirkung bei Brustkrebszellen ist daher vorstellbar, was letztlich eine Reduktion des für die Erkrankung etablierten Chemotherapeutikums Paclitaxel und damit seiner Nebenwirkungen ermöglichen könnte. Es wurde nun erläutert, dass sich Flavonoide in einer Reihe an Experimenten und Studien als wirksame Therapeutika bei malignen und nicht-malignen Erkrankungen erwiesen haben und dass eine Wirkung auch im Menschen zu erzielen ist. Bedenkt man die eingangs beschriebenen epidemiologischen Hintergründe zum Mammakarzinom sowie den zunehmend erwünschten Einsatz komplementärmedizinischer Methoden in dessen Therapie, so wird eine zukünftige Behandlung dieser speziellen Tumorerkrankung mit Flavonoiden zu einem nachvollziehbaren und erstrebenswerten Ziel. In dieser Arbeit konnte Apigenin als die Substanz der Wahl für eine weitergehende Forschung identifiziert werden. Zahlreiche *in vitro*-Untersuchungen unterstützen diese Behauptung. Auf die Fallstricke und potentiellen Hürden beim Übergang zu *in vivo*-Experimenten wurde insbesondere am

Beispiel von Quercetin eingegangen. Dies soll zum Vorteil für gezielte Versuche mit Apigenin bei Patientinnen mit Brustkrebs reichen. Durch ein besseres Verständnis der Wirkungen des Flavons und seiner Interaktion mit etablierten Therapien könnte in Zukunft eine schonendere Therapie der Erkrankung möglich sein. Darüber hinaus könnte es möglich werden, exaktere Empfehlungen bezüglich einer präventiv wirksamen Ernährung beziehungsweise Nahrungsergänzung zu geben und dadurch die Zahl der Neuerkrankungen zu reduzieren.

4.2 Borrelidin

4.2.1 Bedeutung der zytotoxischen Wirkungen auf maligne und nicht-maligne Zellen

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit dem Antibiotikum Borrelidin konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass geringe Konzentrationen bereits ausreichend sind, um das Wachstum verschiedener maligner Zellen der Brustdrüse zu inhibieren. Seine proliferationshemmende Wirkung auf zahlreiche weitere Zellarten, wie zum Beispiel entartete Zellen des blutbildenden Systems oder auch gewöhnliche Endothelzellen, sind bereits mehrfach beschrieben worden (Habibi et al., 2012; Kawamura et al., 2003). Ebenso wurde experimentell gezeigt, dass solch geringe Dosierungen wie 40nM ausreichend sind, um bei Jurkat-Zellen einen signifikanten Anstieg der Proteinmenge an gespaltener poly(ADP-Ribose)-Polymerase zu verursachen, was für die Auslösung der Apoptose spricht (Habibi et al., 2012). Die hier durchgeführte komparative Anwendung von Borrelidin an unterschiedlichen malignen und nicht-malignen Zelllinien ergab, dass die untersuchten Brustkrebs-Zelllinien vergleichbar sensitiv auf das Antibiotikum reagierten wie die verwendeten Leukämie- und Endothelzellen. Eine besonders gute Wirksamkeit von Borrelidin gegenüber den hoch aggressiven Mammakarzinom-Zellen der Linien MDA-MB-231, -435 und -453 war bereits durch die als Vorversuche ausgewerteten Zellfärbungen zu vermuten gewesen. Mittels MTT-Assays wurde diese Annahme bestätigt. Es ergaben sich für die erwähnten Zelllinien mittlere inhibitorische Konzentrationen von nur 84nM, 85nM beziehungsweise 95nM Borrelidin. Mit einer effektiven Dosis zur halbmaximalen Proliferationshemmung von 204nM erwiesen sich die nicht-malignen Brustgewebszellen der Linie MCF-10A als deutlich resistenter gegenüber Borrelidin. Dennoch war eine markante Reduktion an vitalen Zellen zu verzeichnen, so dass von einer zytotoxischen Wirkung des Antibiotikums auch auf nicht-bösartig verändertes Brustdrüsengewebe ausgegangen werden muss. Aufgrund dieser Eigenschaft muss die Substanz daher an für die Praxis relevantem Potential einbüßen. Der Effekt auf die endotheliale Zelllinie HUVEC war sogar noch ausgeprägter. Die hier ermittelte ED₅₀-Konzentration von 74nM entspricht der zuvor beschriebenen ausgeprägten Wirksamkeit von Borrelidin bei Endothelzellen im nanomolaren Bereich (Kawamura et al., 2003; Wakabayashi et al., 1997). Es ist also zu befürchten, dass bei einer therapeutischen Anwendung der Substanz, zum Beispiel zum Zwecke der Tumorbekämpfung, selbst bei geringen Konzentrationen mit erheblichen,

schädlichen Nebeneffekten im Sinne einer toxischen Wirkung auf gesundes Gewebe zu rechnen ist.

Bei der Auswertung der Assays zum Zellüberleben fiel daneben auf, dass die Zellen der Linie MCF-7 von allen untersuchten Mammakarzinom-Zellen am wenigsten auf die Therapie mit Borrelidin ansprachen. Erst mit einer Dosis von 245nM konnte die Halbierung ihrer Zellpopulation erreicht werden. Im Gegensatz zu den übrigen verwendeten Mammakarzinom-Zellen stellt die Zelllinie MCF-7 aufgrund der Expression von Östrogen-Rezeptoren ein Beispiel für einen differenzierteren Brustkrebs dar (Levenson & Jordan, 1997). Darüber hinaus war bei diesem Experiment zu beobachten, dass es auch bei den untersuchten Leukämie-Zelllinien große Unterschiede bezüglich des Ansprechens auf Borrelidin gab. Während HL-60-Zellen am resistentesten gegen eine entsprechende Therapie waren ($ED_{50} = 316nM$), genügte bei Jurkat-Zellen eine Effektivdosis von 105nM, um ihr Zellwachstum zur Hälfte zu inhibieren, was in etwa der Sensitivität der zuvor erwähnten, hoch aggressiven Mammakarzinom-Zellen entspricht. Den größten Effekt hatte Borrelidin auf die lymphoblastoiden Zellen der Linie IM-9 ($ED_{50} = 68nM$). Alle diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Borrelidin eine potente Substanz zur Bekämpfung bösartiger Erkrankungen sein kann. Seine Wirkung richtet sich nicht nur gegen hämatologische Erkrankungen, wie Leukämien unterschiedlicher Herkunft, sondern auch gegen solide Tumoren der Brustdrüse. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass es biologische Membranen mühelos überwinden kann (Bhikshapathi et al., 2010), was für eine Anwendbarkeit im Organismus von großem Vorteil und für eine anzustrebende orale Applikationsweise essenziell ist. Allerdings wurde sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur bereits mehrfach auf die zytotoxischen Auswirkungen des Antibiotikums hingewiesen, die sich auch bei nicht-neoplastischen Zellen geltend machen. Experimentell ließen sie sich hier anhand der Borrelidin-induzierten Abnahme des Zellüberlebens bei der endothelialen Zelllinie HUVEC und bei den gutartigen Brustdrüsen-Zellen MCF-10A demonstrieren. Dass auch bei diesen Zellen sehr niedrige Konzentrationen Borrelidin für eine entsprechende Wirkung ausreichend waren, spricht für eine Gefahr von nicht-tolerablen Nebenwirkungen bei einer etwaigen Therapie mit Borrelidin zur Tumorbekämpfung.

4.2.2 Einfluss der Bcl-2-Expression auf die Wirksamkeit von Borrelidin und ihre Bedeutung für die Praxis

Durch Proteinanalysen wurde untersucht, auf welche Art und Weise Borrelidin den Zelltod in den betreffenden Zellen einzuleiten vermag. Eine Zeitkinetik mit Jurkat- und IM-9-Leukämiezellen brachte durch eine bereits nach zwei Stunden erfolgte Spaltung der poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) den Hinweis auf eine frühe Auslösung der Apoptose. Eine Abnahme der Proteinmenge von Mcl-1 zeigte sich bei beiden Zelllinien allerdings erst nach einer achtstündigen Inkubation mit Borrelidin. Im Gegensatz zu den Wirkungen der Flavonoide ist hier also nicht davon auszugehen, dass Borrelidin einen direkten Einfluss auf die Proteinbiosynthese von Mcl-1 nimmt oder es post-translational degradiert und dadurch die Apoptose erleichtert. Vielmehr führt in diesem Fall eine andersartig eingeleitete Apoptose zum sekundären Abbau von Mcl-1 in Leukämiezellen. Eine Studie fand zu diesem Thema heraus, dass in HUVEC-Zellen, die für 24 Stunden mit 100nM Borrelidin behandelt worden waren, die Aktivität der Caspasen 3 und 8 signifikant anstieg. Die Autoren begründeten damit – zumindest teilweise – den durch das Antibiotikum vermittelten Zelltod (Kawamura et al., 2003). In unseren Western Blots zeigte sich bei Jurkat-Zellen nach vier Stunden und bei IM-9-Zellen nach acht Stunden eine verstärkte Spaltung und somit Aktivierung der Initiator-Caspase 8. Diese ist mit diversen Todesrezeptoren gekoppelt und bildet somit ein Glied des extrinsischen Signalwegs der Apoptose. Ähnlich wie bei Caspase 3, die durch die Spaltung von Mcl-1 die Apoptose positiv verstärkt (siehe Kapitel 1.4.1), besteht auch über die Caspase 8 eine Feedback-Schleife zum intrinsischen Weg der Apoptose, nämlich über die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins BID (Netzker, 2012b). Die Proteinbanden von BID bildeten in unseren Western Blot-Analysen ein nahezu identisches Muster wie die von Mcl-1 bei allen verwendeten Leukämiezellen. Mit dem Hintergrund, dass Mcl-1 ebenfalls ein Ziel für den Abbau durch die Caspase 8 darstellt (Brüning et al., 2010), lässt sich folgern, dass es sich im Fall von Borrelidin um keine echte Herunterregulation von Mcl-1 handelt, sondern vielmehr um einen sekundären Effekt, der im Zuge des schon im Gang befindlichen Apoptosegeschehens zur Abnahme der Proteinmenge beiträgt. In der Literatur befindliche Angaben dazu, dass Borrelidin seine zytotoxischen Effekte über die Einleitung der Apoptose in HUVEC-Zellen vermittelt (Kawamura et al., 2003), konnten wir auch auf die Leukämie-Zelllinien Jurkat, IM-9 und HL-60 sowie auf die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 übertragen, bei der ebenfalls eine deutliche PARP-Spaltung im Western Blot zu sehen war.

Als letzter Aspekt soll nun auf eine interessante Beobachtung eingegangen werden, die im Zuge der erwähnten Western Blot-Untersuchungen gemacht wurde. Beim Nachweis weiterer Proteine, die für die Apoptose von Bedeutung sind, fiel auf, dass die Zellen der Linie HL-60 eine gesteigerte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 aufweisen. Da es sich unter den ausgewählten Leukämiezellen um jene handelte, die im ATP-Assay am wenigsten auf Borrelidin reagierten, wurde ein Zusammenhang vermutet, und die Untersuchungen wurden um weitere Zelllinien ergänzt. Die Bcl-2-Überexpression zeigte sich daraufhin auch in der immortalisierten HUVEC-Zelllinie EA.hy926, welche im Gegensatz zu herkömmlichen HUVEC-Zellen im Überlebensassay ebenfalls resistenter gegen Borrelidin waren. Schließlich färbte sich auch in den Zelllysaten der MCF-7-Zellen eine kräftige Proteinbande bei Bcl-2 an. Unter allen untersuchten Mammakarzinom-Zellen waren MCF-7-Zellen diejenigen, bei welchen die höchste Effektivdosis von Borrelidin ermittelt wurde. Bei den in dieser Arbeit ausgewählten malignen Zellen, die mit Borrelidin behandelt wurden, ging also eine gesteigerte Expression von Bcl-2 mit einer erhöhten Resistenz gegenüber der Behandlung mit Borrelidin einher. Die Bedeutung der Apoptose-regulierenden Proteine, die der Bcl-2-Familie angehören, in Bezug auf (neuere) Tumorthapien wurde in der Diskussion über die Flavonoide anhand von Mcl-1 herausgearbeitet. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 selbst ist allerdings auch ein bekanntes Beispiel dafür, inwiefern Expressionsanalysen zu therapeutischen und prognostischen Zwecken ausgenutzt werden können. Eine Überexpression des Proteins, wie sie in diversen Tumorentitäten vorkommt, kann durch die Verhinderung der Apoptose zur Tumorentstehung und -progression beitragen. Mit ihr wird außerdem eine gewisse Resistenz gegenüber bestimmten Chemo- oder Strahlentherapien assoziiert (Thomadaki & Scorilas, 2006). Aufgrund der primären Entdeckung des B-Zell CLL/Lymphom 2 (Bcl-2)-Gens in Zusammenhang mit der Translokation t(14;18) beim follikulären B-Zell-Lymphom (Tsujiimoto, Cossman, Jaffe, & Croce, 1985) konzentriert sich ein großer Teil der Forschung auf diese Tumorentität. So konnte an einer malignen B-Zell-Linie gezeigt werden, dass eine Bcl-2-Überexpression einen Zellschaden durch das Zytostatikum Etoposid verhindern kann (Kamesaki et al., 1993). Eine weitere Studie testete eine Vorläufer-B-Zell-Leukämie-Zelllinie und fand heraus, dass ein erhöhtes Proteinlevel an Bcl-2 eine Resistenz der Zellen gegenüber dem Glucocorticoid Dexamethason begünstigte (Miyashita & Reed, 1993). Bezogen auf die Prognoseabschätzung bei hämatologischen Erkrankungen scheint Bcl-2 allein jedoch keine überragende Rolle zu spielen. Die Translokation t(14;18), die zur konstitutiven, fehlregulierten Transkription des Gens Bcl-2 führt, ist – für sich genommen – wohl nicht ursächlich für die Krebsentstehung. Zur Bedeutung von Bcl-2 als reinem Prognosemarker

existieren allerdings kontroverse Meinungen (Adams, Harris, Strasser, Ogilvy, & Cory, 1999; Aukema et al., 2011; Karakas et al., 1998). In Zusammenhang mit weiteren, bestimmten genetischen Veränderungen trägt es jedoch verstärkend zur Tumorgenese bei (Strasser, Harris, Bath, & Cory, 1990). Zum Beispiel wird im Fall der in den letzten Jahren zunehmend in den Focus rückenden Untergruppe der *double-hit lymphomas*, die sich durch die Koexistenz zweier genetischer Aberrationen auszeichnen, Bcl-2 eine größere Bedeutung zugesprochen. Diese Lymphome besitzen zum einen eine Translokation, die das Gen für den Transkriptionsfaktor MYC betrifft, sowie zum anderen eine weitere Translokation, die zumeist im Genlocus von Bcl-2 liegt. Die Kombination der beiden ist ein Grund dafür, weshalb diese Lymphome besonders rasch fortschreiten und auch unter hoch aggressiver Chemotherapie eine schlechte Prognose besitzen. Einige Autoren schlagen deshalb vor, Patienten in ausgewählten Fällen auf derartige Genmutationen zu testen (Aukema et al., 2011). Im Gegensatz zu Lymphomen und Leukämien wird eine Bcl-2-Überexpression beim Mammakarzinom für sich als signifikanter Prognosefaktor angesehen. Mit ihr geht in diesem Fall eine positive Prognose einher und dieser Zusammenhang scheint, wenn auch nicht exklusiv, insbesondere für Hormonrezeptor-positive Tumoren von Bedeutung zu sein (Dawson et al., 2010; Perillo, Sasso, Abbondanza, & Palumbo, 2000; Seong et al., 2015; Thomadaki & Scorilas, 2006). So konnte in den hier durchgeführten Western Blots bei der Östrogen-Rezeptor-positiven Zelllinie MCF-7 eine deutliche Bcl-2-Expression dargestellt werden. Für die Therapie bedeutet das, dass eine Kombination aus anti-hormoneller Therapie und selektiver Bcl-2-Inhibition die Tumorbekämpfung bei diesen Zellen positiv verstärken könnte. Allerdings spielt das Protein Bcl-2 bei Mammakarzinom-Zellen eine weitaus geringere Rolle als das verwandte Protein Mcl-1. Es ist hierbei außerdem – im Gegensatz zur Situation bei Leukämie- und Lymphomzellen – mit einer positiven Prognose assoziiert, während Mcl-1 beim Mammakarzinom einen negativen Prognosefaktor darstellt. Im Gesamtkontext der Brustkrebs-Forschung sollte der selektiven Inhibition von Mcl-1 bei der Therapie der Erkrankung also unter Umständen mehr Aufmerksamkeit zuteil werden (M. M. Williams & Cook, 2015). Die Ergebnisse einer Studie, in welcher die Expression von sechs Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie in insgesamt 68 Zelllinien aus neun Tumorentitäten mittels PCR untersucht wurde, stehen im Einklang zu dieser Behauptung. Es stellte sich heraus, dass sich in der Tat hauptsächlich bei hämatologischen Erkrankungen eine außerordentliche Bcl-2-Überexpression finden lässt. Bei soliden Tumoren hingegen überwiegt die Expression der mRNA, die die Sequenz des Proteins Mcl-1 beinhaltet. Die Autoren ziehen daraus unter anderem den Schluss, dass sich bei solchen Tumoren eine gezielte Therapie gegen Mcl-1 eher anbietet als gegen Bcl-2 (Dawson et al., 2010).

Alternativ beziehungsweise ergänzend dazu schlagen sie die Entwicklung universaler Inhibitoren aller Bcl-2-Proteine vor, um somit noch stärkere therapeutische Effekte zu erzielen (Placzek et al., 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben, dass im Fall von ausgewählten Mammakarzinom-, Leukämie-, und Endothelzellen eine Überexpression des Bcl-2-Proteins mit einem geringeren Ansprechen auf Borrelidin assoziiert ist. Ein Therapieansatz, der die Verwendung von Borrelidin mit selektiven Hemmern von Bcl-2 beziehungsweise sogenannten pan-Bcl-2-Protein-Inhibitoren kombiniert, könnte dazu beitragen, dieses Problem zu umgehen. Da Bcl-2 jedoch ein wichtiger Bestandteil unter anderem der physiologischen Lymphozytenreifung ist (Craig, 1995), geht mit einem solchen Ansatz auch ein erhöhtes Risiko für unerwünschte Nebeneffekte einher.

Es bleibt festzuhalten, dass Borrelidin eine äußerst potente Substanz ist, die in sehr geringen Dosierungen bei verschiedenen malignen und nicht-malignen Zellarten starke zytotoxische Wirkungen erzielt. Neben den bereits bekannten Effekten auf Leukämiezellen konnte in dieser Arbeit auch eine starke Wirksamkeit insbesondere auf hoch aggressive Brustkrebs-Zelllinien beschrieben werden. Da diese Formen des Mammakarzinoms besondere Hindernisse in der Therapie darstellen, sollte die Forschung am Antibiotikum Borrelidin an ihnen fortgeführt werden. Das Ansprechen auf eine Behandlung mit Borrelidin konnte hier mit dem Expressionslevel des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in Verbindung gebracht werden, wobei eine Überexpression mit einem schlechteren Ansprechen einherging. Damit empfehlen wir für weitergehende beziehungsweise eventuelle *in vivo*-Untersuchungen eine vorangehende Testung des Gewebes auf die Expression von Bcl-2, um Patienten mit erhöhtem Level von vornherein auszuschließen und somit nicht-erfolgversprechende Behandlungen und unnötige toxische Nebeneffekte zu vermeiden. Klinische Studien mit der Reinsubstanz Borrelidin scheinen indes noch nicht in Betracht zu kommen, auch wenn das Antibiotikum strukturelle und chemische Voraussetzungen für eine orale Anwendbarkeit und die Wirksamkeit im Organismus erfüllt (Bhikshapathi et al., 2010). Die starken proliferationshemmenden Effekte auf die nicht-maligne Brust-Zelllinie MCF-10A sowie die noch ausgeprägtere Toxizität auf endotheliale Zellen bekräftigen diese Aussage. Erste Versuche, analoge Substanzen von Borrelidin zu synthetisieren, die selektiver auf maligne Zellen wirken, sind bereits in Gang (Sugawara et al., 2013). Sie verdeutlichen somit das wissenschaftliche Interesse an dieser vielversprechenden Substanz.

5 Zusammenfassung

Die Krebsforschung steht vor der Herausforderung, immer potentere und gleichzeitig nebenwirkungsärmere Therapeutika entwickeln zu müssen. Der zunehmende Kenntnisstand über das zelluläre *signaling* erlaubt dabei die Bewegung fort von einer unspezifischen Toxizität der Substanzen hin zur zielgerichteten Therapie. Gleichzeitig wird gefordert, das Suchfeld auf möglichst naturbelassene Stoffe zu beschränken. Flavonoide scheinen diesen wachsenden Anforderungen gerecht zu werden. Längst ist bekannt, dass ihre protektive Wirkung über die reine Fähigkeit, freie Radikale abzufangen, hinausgeht. Seit sie sich einer zunehmenden Beliebtheit als Forschungsobjekte erfreuen, konnte zudem eine Reihe an weiteren Mechanismen identifiziert werden, über die sie ungehemmte Proliferation stoppen und Tumorzellen abtöten können. Dass viele Flavonoide zugleich als Bestandteil der täglichen Ernährung allgegenwärtig sind, weckt außerdem die Hoffnung, durch ihre Anwendung unerwünschte Wirkungen – eines der Hauptprobleme vieler etablierter Chemotherapeutika – vermeiden zu können. Mit Quercetin, Baicalein, Taxifolin, Apigenin, Luteolin, Myricetin und Chrysin wählten wir sieben wichtige Vertreter unter ihnen aus und stellten ihre Wirkungen auf Mammakarzinom-Zellen einander gegenüber. Die genannten Flavonoide sind nicht nur häufig in der Literatur anzutreffen und stellen einen Großteil der in üblichen Obst- und Gemüsesorten enthaltenen Flavonoide dar, sondern sie weisen auch gewisse strukturelle Ähnlichkeiten auf. Neben dem reinen Vergleich ihrer Effekte auf die Zellen konnten wir daher auch einige Zusammenhänge zu ihren chemischen Eigenschaften herstellen und beschreiben. Wir erhofften uns von dem Vergleich, Hinweise darauf zu bekommen, welches Flavonoid für eine Brustkrebs-Therapie (und die dazu führenden klinischen Studien) am ehesten in Frage kommen könnte und inwieweit die jeweiligen Strukturformeln bereits Hinweise auf eine entsprechende Wirksamkeit geben könnten. Ferner sollte die Einordnung in den derzeitigen Kontext der Flavonoid-Forschung eine Abschätzung zur Praktikabilität bei der Therapie des Mammakarzinoms ermöglichen. Zunächst führten wir verschiedene Experimente durch, welche den Einfluss der Flavonoide auf unterschiedlichen Ebenen des Zellzyklusgeschehens aufdecken sollten. Diese umfassten sowohl Zellüberlebensstudien, zytomorphologische Beobachtungen von 2D- und 3D-Kulturen, Messungen der Proteasomaktivität und Proteinnachweise im Western Blot als auch Genexpressionsanalysen mittels Polymerasekettenreaktion. Von den ausgewählten Vertretern der Flavonoide stellte sich Apigenin als die potenteste Substanz in Bezug auf die

hier untersuchte Fragestellung heraus. In sämtlichen Experimenten war es den verwandten Naturstoffen überlegen. Es zeigte beispielsweise starke zytotoxische und proliferationshemmende Wirkungen in Zellfärbungen, Clonal Assays und MTT-Assays. Im Proteasomassay hemmte es alle drei katalytischen Untereinheiten in signifikantem Ausmaß. Durch Western Blotting war unter anderem eine sehr starke Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 darstellbar, wodurch Apigenin und andere Flavonoide die Apoptose-Induktion in Mammakarzinom-Zellen begünstigen können. Auf RNA-Ebene konnte eine Inhibierung des Transkriptionsfaktors NFκB über die verminderte Expression einige seiner Zielgene durch Apigenin ermittelt werden. Auch dadurch wird zur Anti-Tumor-Wirkung des Flavons beigetragen. Viele der in unseren Experimenten betrachteten Proteine gelten unter anderem beim Mammakarzinom bereits als Angriffspunkte von sogenannten *targeted therapies*, darunter Mcl-1, IAP und p53. Dass Apigenin seine Wirksamkeit über alle diese Mechanismen entfaltet, unterstreicht seine Relevanz für die Interpretation dieser Arbeit. Das ihm strukturell sehr ähnliche Flavon Luteolin erwies sich als nahezu genauso potent. Im Mittelfeld des Vergleichs waren Quercetin, Myricetin und Chrysin anzusiedeln, während Baicalein nur sehr schwach und Taxifolin so gut wie nicht wirksam war. Die untersuchten Flavonoide besitzen alle dasselbe Grundgerüst aus drei miteinander verbundenen Ringen. Modifikationen an einzelnen Stellen durch unterschiedliche Bindungs- und Hydroxylierungsmuster ergeben die spezielle Struktur der jeweiligen Substanzen. Die Korrelation mit den chemischen Eigenschaften lässt vermuten, dass Flavonoide ohne konjugierte Doppelbindung im mittleren Ring keine oder nur eine äußerst geringe Wirkung gegen Tumorzellen der Brustdrüse haben. Die Anzahl der OH-Gruppen der Moleküle und deren Positionen können im Einzelnen in Verbindung mit einer Anti-Tumor-Wirkung gebracht werden. So ist zum Beispiel die OH-Gruppe an Position 3 von Vorteil, aber nicht notwendig für die Potenz der Flavonoide. Für detailliertere Aufschlüsselungen sind systematischere Versuche mit Derivaten der Substanzen nötig. Zur Beantwortung der Frage, ob Flavonoide auch im Menschen entsprechende Wirkungen erzielen können, wurden verschiedene Aspekte der Dosierung und Applikation berücksichtigt. Obwohl für die meisten der hier durchgeführten Experimente höhere Dosen der Substanzen verwendet wurden, als sie *in vivo* durch die reine Aufnahme aus Nahrungsmitteln oder durch die exogene Zufuhr von Nahrungsergänzungsmitteln zu erreichen sind, sprechen zahlreich Daten aus der Literatur für das Vorliegen von wirksamen Plasmaspiegeln (welche weit unter dem hier angesiedelten Niveau liegen) infolge einer adäquaten Applikation. Dafür sorgen beispielsweise metabolische Gegebenheiten, die zu einer Akkumulation im menschlichen Körper bei regelmäßiger Zufuhr mit Berücksichtigung

der jeweiligen Eliminationsraten führen. Einer geeigneten Auswahl der Nahrungsmittel zum Zweck der diätetischen Zufuhr von Flavonoiden (zum Beispiel Petersilie als Quelle von Apigenin oder Zwiebeln und Äpfel als Quelle von Quercetin) oder einer supplementiven Aufnahme (zum Beispiel von Quercetin-Kapseln) kann daher beigeplichtet werden.

Bezogen auf den speziellen Fall des Mammakarzinoms sollte das Augenmerk auf zwei Ansätzen liegen: zum einen auf der Aufnahme von Flavonoiden zur Unterstützung einer Prävention der Krankheitsentstehung und zum anderen auf der Ergänzung von bewährten Therapien, um deren Nebenwirkungen zu reduzieren, indem durch die Potenzierung ihrer Wirkungen die Einsparung von Chemotherapeutika erreicht wird. Entsprechende Hinweise für derartige Wechselwirkungen zwischen Apigenin und Paclitaxel sind bereits für verschiedene Tumorzelllinien in der Literatur zu finden. Für weiterführende Studien empfehlen wir generell am ehesten die Verwendung von Apigenin, da es dieser Arbeit zufolge für die komplementäre Brustkrebs-Therapie von größerem Nutzen ist als das bekanntere Flavonoid Quercetin. Ein Vergleich der beiden Substanzen untereinander sollte dennoch insbesondere im Hinblick auf unspezifische Toxizität erfolgen, da Apigenin hier auf nicht-maligne Brustdrüsen-Zellen eine stärkere zytotoxische Wirkung hatte als Quercetin.

In dieser Arbeit wurden des Weiteren die Wirkungen des natürlichen Antibiotikums Borrelidin auf Brustkrebszellen untersucht. Es zählt zur Gruppe der Makrolidantibiotika und wird von verschiedenen Bakterienstämmen erzeugt. Anders als die klinisch relevanten Gruppenvertreter, wie zum Beispiel Erythromycin, wirkt Borrelidin über eine Inhibition der Threonyl-tRNA-Synthetase, die auch in eukaryontischen Zellen für die Proteinbiosynthese nötig ist. Dadurch begründet sich seine immense Zytotoxizität und die fehlende Anwendung in der Praxis trotz seiner guten Wirksamkeit gegen zahlreiche Mikroorganismen. Im Hinblick auf die Krebsforschung wurde es allerdings interessant, als eine Hemmung der Gefäßproliferation durch Borrelidin beschrieben wurde. Durch die bewährten Medikamente Paclitaxel und Bevacizumab wird ein ähnlicher zielgerichteter Therapieansatz beim Mammakarzinom verfolgt, so dass sich daraus eine neue Verwendungsmöglichkeit des potenten Antibiotikums ergeben könnte. Es wurde in unseren Experimenten in analoger Weise zu den Flavonoiden an verschiedenen malignen und nicht-malignen Zellen getestet. Wir konnten eine starke proliferationshemmende und Apoptose-auslösende Wirkung auf einige der verwendeten Zelllinien beobachten. Auf molekularbiologischer Ebene wurde ermittelt, dass Zellen, in denen das anti-apoptotische Protein Bcl-2 überexprimiert ist, weniger sensitiv auf Borrelidin reagierten als jene, in denen keine Überexpression festzustellen war. Im Fall der untersuchten Mammakarzinom-Zellen betraf

dies die Zelllinie MCF-7. Sie zählt zu den besser differenzierten Brustkrebs-Zelllinien, während die hoch aggressiven Zellen der Linien MDA-MB-231, -435, und -453 sehr gut auf Borrelidin ansprechen. Gerade diese Formen des Mammakarzinoms stellen größere Hürden in Bezug auf ihre Therapierbarkeit dar, weshalb die weitere Forschung an Borrelidin hier von besonderem Nutzen ist. Es musste allerdings auch eine starke zellschädigende Wirkung auf nicht-maligne Zellen unterschiedlicher Ursprungsgewebe festgestellt werden. Daher raten wir gemäß den Ergebnissen unserer Studie dringend zur Analyse der Bcl-2-Expression im Vorfeld aller weiteren Untersuchungen mit Borrelidin, um unnötige, wenig zielführende Experimente zu vermeiden und dadurch – im Fall von *in vivo*-Studien – übermäßige Toxizität zu verhindern. Auch durch die Synthese selektiv wirkender Derivate von Borrelidin könnte dieses Problem in Zukunft umgangen werden.

Im Rahmen der in dieser Dissertation erzielten Resultate und in Zusammenschau mit den erläuterten Erkenntnissen aus der Literaturrecherche kann abschließend Folgendes festgehalten werden: Naturstoffe, wie zum Beispiel bestimmte Flavonoide und das Antibiotikum Borrelidin, sind als äußerst effektive Substanzen zur Bekämpfung von Mammakarzinom-Zellen anzusehen. Ihre Verwendung für die Prävention oder die Therapie der Erkrankung ist im Kontext der zeitgemäßen Anforderungen an die Behandlung, welche zielgerichtete Therapien möglichst ohne Nebenwirkungen proklamiert, durchaus erstrebenswert. Die weitere Forschung in Bezug auf diese Fragestellungen ist daher sinnvoll. Beim Übergang zu klinischen Studien müssen Aspekte der Bioverfügbarkeit, der Akkumulation und der Verstoffwechslung im menschlichen Organismus beachtet werden. Ebenso sind schädliche Effekte auf gesundes Gewebe zu berücksichtigen, so dass der Terminus „Naturstoff“ nicht mit einer irreführenden, allumfassenden Therapiesicherheit assoziiert werden darf. Zuguterletzt sei trotz der wissenschaftlich fundierten Empfehlungen zur diätetischen und supplementären Zufuhr der hier untersuchten Substanzen darauf hingewiesen, dass ihre Verwendung im Fall einer manifesten Erkrankung in ihrer derzeitigen Struktur und Applikationsart stets komplementär zu bewährten Methoden der Schulmedizin und nicht alternativ zu diesen erfolgen sollte.

6 Literaturverzeichnis

- Aaltonen, K., Amini, R. M., Heikkilä, P., Aittomäki, K., Tamminen, A., Nevanlinna, H., & Blomqvist, C. (2009). High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. *Br J Cancer*, *100*(7), 1055-1060. doi: 10.1038/sj.bjc.6604874
- Adams, J. M., Harris, A. W., Strasser, A., Ogilvy, S., & Cory, S. (1999). Transgenic models of lymphoid neoplasia and development of a pan-hematopoietic vector. *Oncogene*, *18*(38), 5268-5277. doi: 10.1038/sj.onc.1202997
- Addison, Christina L., Daniel, Thonas O., Burdick, Marie D., Liu, Hua, Ehlert, Jan E., Xue, Ying Ying, . . . Strieter, Robert M. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*, *165*(9), 5269-5277.
- Askari, G., Ghiasvand, R., Feizi, A., Ghanadian, S. M., & Karimian, J. (2012). The effect of quercetin supplementation on selected markers of inflammation and oxidative stress. *J Res Med Sci*, *17*(7), 637-641.
- Aukema, Sietse M., Siebert, Reiner, Schuurin, Ed, van Imhoff, Gustaaf W., Kluin-Nelemans, Hanneke C., Boerma, Evert-Jan, & Kluin, Philip M. (2011). Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*, *117*(8), 2319-2331. doi: 10.1182/blood-2010-09-297879
- Becker, Christian. (2013). Basic structure of flavonoids. In F. basis.svg (Ed.), *BKChem & Inkscape*. Wikimedia Commons.
- Ben-Neriah, Yinon, & Karin, Michael. (2011). Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol*, *12*(8), 715-723. doi: 10.1038/ni.2060
- Berger, J., Jampolsky, L. M., & Goldberg, M. W. (1949). Borrelidin, a new antibiotic with antiborrelia activity and penicillin enhancement properties. *Arch Biochem*, *22*(3), 476-478.
- Bhikshapathi, D. V. R. N., Shravan Kumar, Y., Madhusudan Rao, Y., & Kishar, V. (2010). Borrelidin: A prospective drug. *Indian Journal of Biotechnology*, *9*(January 2012), 18-23.
- Birt, Diane F., Walker, Betty, Tibbels, Michelle G., & Bresnick, Edward. (1986). Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*, *7*(6), 959-963.
- Boots, Agnes W., Haenen, Guido R., & Bast, Aalt. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, *585*(2-3), 325-337. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.008
- Bors, Wolf, & Michel, Christa. (2002). Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci*, *957*, 57-69.

- Brown, J. P. (1980). A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat Res*, 75(3), 243-277.
- Brüning, Ansgar. (2012). Inhibition of mTOR Signaling by Quercetin in Cancer Treatment and Prevention. *Anticancer Agents Med Chem*.
- Brüning, Ansgar, Rahmeh, Martina, Gingelmaier, Aandrea, & Friese, Klaus. (2010). The mitochondria-independent cytotoxic effect of nelfinavir on leukemia cells can be enhanced by sorafenib-mediated mcl-1 downregulation and mitochondrial membrane destabilization. *Mol Cancer*, 9, 19. doi: 10.1186/1476-4598-9-19
- Brüning, Ansgar, Vogel, M., Mylonas, Ioannis, Friese, Klaus, & Burges, A. (2011). Bortezomib targets the caspase-like proteasome activity in cervical cancer cells, triggering apoptosis that can be enhanced by nelfinavir. *Curr Cancer Drug Targets*, 11(7), 799-809.
- Brusselmans, Koen, Vrolix, Ruth, Verhoeven, Guido, & Swinnen, Johannes V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem*, 280(7), 5636-5645. doi: 10.1074/jbc.M408177200
- Bubici, Concetta, Papa, Salvatore, Pham, Can G., Zazzeroni, Francesca, & Franzoso, Guido. (2004). NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle*, 3(12), 1524-1529.
- Campbell, Deborah R., & Kurzer, Mindy S. (1993). Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46(3), 381-388. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0960-0760\(93\)90228-O](http://dx.doi.org/10.1016/0960-0760(93)90228-O)
- Cao, Jie, Zhang, Ying, Chen, Wei, & Zhao, Xiujuan. (2010). The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr*, 103(2), 249-255. doi: 10.1017/s000711450999170x
- Caspritz, Sandra, Cernaj, Josef, Ernst, Anke, Folkerts, Juliane, Hansmann, Jens, Kranzhöfer, Kristine, . . . Wittenberg, Kerstin. (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. In R. K.-I. u. d. G. d. e. K. i. D. e.V. (Ed.), (Vol. 9). Berlin.
- Chang, Tsui-Ling. (2009). Inhibitory effect of flavonoids on 26S proteasome activity. *J Agric Food Chem*, 57(20), 9706-9715. doi: 10.1021/jf9017492
- Chen, Di, Daniel, Kenyon G., Chen, Marina S., Kuhn, Deborah J., Landis-Piwowar, Kristin R., & Dou, Q. Ping. (2005). Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, 69(10), 1421-1432. doi: 10.1016/j.bcp.2005.02.022
- Craig, Ruth W. (1995). The bcl-2 gene family. *Semin Cancer Biol*, 6(1), 35-43. doi: 10.1006/scbi.1995.0005
- Croft, Kevin D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci*, 854, 435-442.
- Crook, Norman E., Clem, Rollie J., & Miller, Lois K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 67(4), 2168-2174.

- Datta, Dipak, Flaxenburg, Jesse A., Laxmanan, Sreenivas, Geehan, C., Grimm, M., Waaga-Gasser, A. M., . . . Pal, S. (2006). Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res*, *66*(19), 9509-9518. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-4345
- Dawson, S. J., Makretsov, N., Blows, F. M., Driver, K. E., Provenzano, E., Le Quesne, J., . . . Pharoah, P. (2010). BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer*, *103*(5), 668-675. doi: 10.1038/sj.bjc.6605736
- Dickinson, L., Griffiths, A. J., Mason, C. G., & Mills, R. F. (1965). Anti-viral activity of two antibiotics isolated from a species of *Streptomyces*. *Nature*, *206*(981), 265-268.
- Donald, Graham, Hertzler, Kathleen, & Eibl, Guido. (2012). Baicalein--an intriguing therapeutic phytochemical in pancreatic cancer. *Curr Drug Targets*, *13*(14), 1772-1776.
- Edgell, Cora-Jean, McDonald, Cary C., & Graham, John B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *80*(12), 3734-3737.
- Edwards, Randi L., Lyon, Tiffany, Litwin, Sheldon E., Rabovsky, Alexander, Symons, J. David, & Jalili, Thunder. (2007). Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr*, *137*(11), 2405-2411.
- Eliyahu, Daniel, Michalovitz, Dan, Eliyahu, Siona, Pinhasi-Kimhi, Orit, & Oren, Moshe. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(22), 8763-8767.
- Fennell, D. A., Chacko, A., & Mutti, L. (2008). BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene*, *27*(9), 1189-1197. doi: 10.1038/sj.onc.1210744
- Ferlay, J. , Soerjomataram, I. , Ervik, M. , Dikshit, R. , Eser, S. , Mathers, C. , . . . Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Retrieved 18.02.2014 13:15, 2014, from <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 18/02/2014 and 17/05/2015. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, *136*(5), E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210
- Ferry, David R., Smith, Anna, Malkhandi, Joy, Fyfe, David W., deTakats, Philippa G., Anderson, David, . . . Kerr, David J. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res*, *2*(4), 659-668.
- Fotsis, Theodore, Pepper, Michael S., Aktas, Erkan, Breit, Stephen, Rasku, Sirpa, Adlercreutz, Herman, . . . Schweigerer, Lothar. (1997). Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res*, *57*(14), 2916-2921.

- Freissmuth, Michael. (2012). *Pharmakologie & Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. (M. Freissmuth, S. Offermanns & S. Böhm Eds.). Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Funahashi, Y., Wakabayashi, T., Semba, T., Sonoda, J., Kitoh, K., & Yoshimatsu, K. (1999). Establishment of a quantitative mouse dorsal air sac model and its application to evaluate a new angiogenesis inhibitor. *Oncol Res*, *11*(7), 319-329.
- Gambelunghe, Cristiana, Rossi, Ruggero, Sommovilla, Marco, Ferranti, Chiara, Rossi, Riccardo, Ciculi, Chiara, . . . Rufini, Stefano. (2003). Effects of chrysin on urinary testosterone levels in human males. *J Med Food*, *6*(4), 387-390. doi: 10.1089/109662003772519967
- Gao, Ya-Mei, Wang, Xiang-Jing, Zhang, Ji, Li, Ming, Liu, Chong-Xi, An, Jing, . . . Xiang, Wen-Sheng. (2012). Borrelidin, a potent antifungal agent: insight into the antifungal mechanism against *Phytophthora sojae*. *J Agric Food Chem*, *60*(39), 9874-9881. doi: 10.1021/jf302857x
- Gebhardt, Rolf. (1998). Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *J Pharmacol Exp Ther*, *286*(3), 1122-1128.
- Gebhardt, Rolf. (2001). Anticholestatic activity of flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) and of their metabolites. *Med Sci Monit*, *7 Suppl 1*, 316-320.
- Graefe, Eva U., Wittig, Joerg, Mueller, Silke, Riethling, Anne-Kathrin, Uehleke, Bernhard, Drewelow, Bernd, . . . Veit, Markus. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, *41*(5), 492-499.
- Gross, Atan, McDonnell, James M., & Korsmeyer, Stanley J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, *13*(15), 1899-1911.
- Gugler, R., Leschik, M., & Dengler, H. J. (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol*, *9*(2-3), 229-234.
- Gupta, M. B., Bhalla, T. N., Gupta, G. P., Mitra, C. R., & Bhargava, K. P. (1971). Anti-inflammatory activity of taxifolin. *Jpn J Pharmacol*, *21*(3), 377-382.
- Gupta, Sanjay, Afaq, Farrukh, & Mukhtar, Hasan. (2001). Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *287*(4), 914-920. doi: 10.1006/bbrc.2001.5672
- Habibi, Darya, Ogloff, Nadya, Jalili, Reza B., Yost, Aria, Weng, Andrew P., Ghahary, Aziz, & Ong, Christopher J. (2012). Borrelidin, a small molecule nitrile-containing macrolide inhibitor of threonyl-tRNA synthetase, is a potent inducer of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia. *Invest New Drugs*, *30*(4), 1361-1370. doi: 10.1007/s10637-011-9700-y
- Hackett, E. S., Twedt, D. C., & Gustafson, D. L. (2013). Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. *J Vet Intern Med*, *27*(1), 10-16. doi: 10.1111/jvim.12002

- Hao, Qian, & Cho, William C. (2014). Battle against cancer: an everlasting saga of p53. *Int J Mol Sci*, 15(12), 22109-22127. doi: 10.3390/ijms151222109
- Hartman, Zachary C., Poage, Graham M., den Hollander, Petra, Tsimelzon, Anna, Hill, Jamal, Panupinthu, Nattapon, . . . Brown, Powel H. (2013). Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res*. doi: 10.1158/0008-5472.can-12-4524-t
- Haskill, Stephen, Peace, Amy, Morris, John, Sporn, Sarah A., Anisowicz, Anthony, Lee, Sam W., . . . Sager, Ruth. (1990). Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(19), 7732-7736.
- Haupt, Ygal, Maya, Ruth, Kazaz, Anat, & Oren, Moshe. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), 296-299. doi: 10.1038/387296a0
- Hershko, Avram. (1999). Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1389), 1571-1575; discussion 1575-1576. doi: 10.1098/rstb.1999.0500
- Hershko, Avram, & Ciechanover, Aaron. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem*, 61, 761-807. doi: 10.1146/annurev.bi.61.070192.003553
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*, 20(1), 21-29. doi: 10.1080/01635589309514267
- Hertog, Michael G. L., Feskens, Edith J. M., Hollman, Peter C. H., Katan, Martijn B., & Kromhout, Daan. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342(8878), 1007-1011.
- Hideshima, Hiromasa, Yoshida, Yasuhiro, Ikeda, Hiroshi, Hide, Maya, Iwasaki, Akinori, Anderson, Kenneth C., & Hideshima, Teru. (2014). IKKbeta inhibitor in combination with bortezomib induces cytotoxicity in breast cancer cells. *Int J Oncol*, 44(4), 1171-1176. doi: 10.3892/ijo.2014.2273
- Hollman, Peter C., de Vries, Jeanne H., van Leeuwen, Sonja D., Mengelers, Marcel J., & Katan, Martijn B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, 62(6), 1276-1282.
- Hollman, Peter C., & Katan, Martijn B. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*, 37(9-10), 937-942.
- Huang, Y. T., Hwang, J. J., Lee, P. P., Ke, F. C., Huang, J. H., Huang, C. J., . . . Lee, M. T. (1999). Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol*, 128(5), 999-1010. doi: 10.1038/sj.bjp.0702879
- Innocente, Steven A., Abrahamson, John L., Cogswell, John P., & Lee, Jonathan M. (1999). p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 2147-2152.

- Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.* (2012).
- Kamesaki, Saori, Kamesaki, Hiroshi, Jorgensen, Timothy J., Tanizawa, Akihiko, Pommier, Yves, & Cossman, Jeffrey. (1993). bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res*, 53(18), 4251-4256.
- Kandaswami, Chithan, Lee, Lung-Ta, Lee, Ping-Ping, Hwang, Jiuan-Jiuan, Ke, Ferng-Chun, Huang, Ying-Tung, & Lee, Ming-Ting. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, 19(5), 895-909.
- Kao, Yeh-Chih, Zhou, Changbao, Sherman, Mark, Laughton, Charles A., & Chen, Shiuan. (1998). Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ Health Perspect*, 106(2), 85-92.
- Karakas, T., Maurer, U., Weidmann, E., Miething, C. C., Hoelzer, D., & Bergmann, L. (1998). High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol*, 9(2), 159-165.
- Kawaii, Satoru, Tomono, Yasuhiko, Katase, Eriko, Ogawa, Kazunori, & Yano, Masamichi. (1999). Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63(5), 896-899.
- Kawamoto, Hisanori, Koizumi, Hirotaka, & Uchikoshi, Toshiyuki. (1997). Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *Am J Pathol*, 150(1), 15-23.
- Kawamura, Takanori, Liu, Diana, Towle, Murray J., Kageyama, Rena, Tsukahara, Naoko, Wakabayashi, Toshiaki, & Littlefield, Bruce A. (2003). Anti-angiogenesis effects of borrelidin are mediated through distinct pathways: threonyl-tRNA synthetase and caspases are independently involved in suppression of proliferation and induction of apoptosis in endothelial cells. *J Antibiot (Tokyo)*, 56(8), 709-715.
- Kay, Colin D. (2010). The future of flavonoid research. *Br J Nutr*, 104 Suppl 3, S91-95. doi: 10.1017/s000711451000396x
- Keller-Schierlein, W. (1966). [The constitution of Borrelidin]. *Experientia*, 22(6), 355-359.
- Kellis, J. T., Jr., & Vickery, L. E. (1984). Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science*, 225(4666), 1032-1034.
- Kelly, Gregory S. (2011). Quercetin. Monograph. *Altern Med Rev*, 16(2), 172-194.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kim, Eun-Kyung, Kwon, Kang-Beom, Song, Mi-Young, Han, Mi-Jeong, Lee, Ji-Hyun, Lee, Young-Rae, . . . Park, Jin-Woo. (2007). Flavonoids protect against cytokine-induced pancreatic beta-cell damage through suppression of nuclear factor kappaB activation. *Pancreas*, 35(4), e1-9. doi: 10.1097/mpa.0b013e31811ed0d2

- Klappan, Anja K., Hones, Stefanie, Mylonas, Ioannis, & Brüning, Ansgar. (2012). Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol*, 137(1), 25-36. doi: 10.1007/s00418-011-0869-0
- Kozopas, Karen M., Yang, Tao, Buchan, Heather L., Zhou, Ping, & Craig, Ruth W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8), 3516-3520.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16. doi: 10.1038/358015a0
- Levenson, Anait S., & Jordan, V. Craig. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res*, 57(15), 3071-3078.
- Levine, Arnold J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323-331.
- Li, Na, Sun, Chaoyang, Zhou, Bo, Xing, Hui, Ma, Ding, Chen, Gang, & Weng, Danhui. (2014). Low concentration of quercetin antagonizes the cytotoxic effects of anti-neoplastic drugs in ovarian cancer. *PLoS One*, 9(7), e100314. doi: 10.1371/journal.pone.0100314
- Li-Weber, Min. (2009). New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat Rev*, 35(1), 57-68. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.09.005
- Li-Weber, Min. (2013). Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett*, 332(2), 304-312. doi: 10.1016/j.canlet.2010.07.015
- Lin, Yong, Shi, Ranxin, Wang, Xia, & Shen, Han-Ming. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 8(7), 634-646.
- Linderholm, B. K., Lidbrink, E., Tallroth, E., Einbeigi, Z., Svensson, H., von Wachenfeldt, A., . . . Hatschek, T. (2013). Angiogenic factors in relation to clinical effect in a phase II trial of weekly paclitaxel. *Breast*, 22(6), 1142-1147. doi: 10.1016/j.breast.2013.07.041
- Liu, Mingli, Guo, Shanchun, & Stiles, Jonathan K. (2011). The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncol Lett*, 2(4), 583-589. doi: 10.3892/ol.2011.300
- Maimoona, Alya, Naeem, Ismat, Saddiqe, Zeb, & Jameel, Khalid. (2011). A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J Ethnopharmacol*, 133(2), 261-277. doi: 10.1016/j.jep.2010.10.041
- Maki, Carl G., Huijbregtse, Jon M., & Howley, Peter M. (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res*, 56(11), 2649-2654.
- Manach, Claudine, Morand, Christine, Crespy, Vanessa, Demigne, Christian, Texier, Odile, Regerat, Françoise, & Remesy, Christian. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett*, 426(3), 331-336.

- Manach, Claudine, Scalbert, Augustin, Morand, Christine, Remesy, Christian, & Jimenez, Liliana. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5), 727-747.
- Manach, Claudine, Williamson, Gary, Morand, Christine, Scalbert, Augustin, & Remesy, Christian. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl), 230S-242S.
- Mantovani, Alberto, Allavena, Paola, Sica, Antonio, & Balkwill, Frances. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444. doi: 10.1038/nature07205
- Manual Mammakarzinome*. (2013). (T. München Ed. 14 ed.). München: W. zuckerschwerdt Verlag.
- McDonald, M. S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M. E., Matthews, D., & Crozier, A. (1998). Survey of the Free and Conjugated Myricetin and Quercetin Content of Red Wines of Different Geographical Origins. *J Agric Food Chem*, 46(2), 368-375.
- Michels, Jorg, Johnson, Peter W. M., & Packham, Graham. (2005). Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(2), 267-271. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.007
- Michels, Jorg, O'Neill, Jason W., Dallman, Claire L., Mouzakiti, Amalia, Habens, Fay, Brimmell, Matthew, . . . Packham, Graham. (2004). Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene*, 23(28), 4818-4827. doi: 10.1038/sj.onc.1207648
- Miksicek, Richard J. (1993). Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol*, 44(1), 37-43.
- Mitchell, Clint, Yacoub, Adly, Hossein, Hossein, Martin, Aditi Panfya, Bareford, M. Danielle, Eulitt, Patrick, . . . Dent, Paul. (2010). Inhibition of MCL-1 in breast cancer cells promotes cell death in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, 10(9), 903-917. doi: 10.4161/cbt.10.9.13273
- Miyashita, Toshiyuki, & Reed, John C. (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*, 81(1), 151-157.
- Morales, Paloma, & Haza, Ana I. (2012). Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells. *J Appl Toxicol*, 32(12), 986-993. doi: 10.1002/jat.1725
- Mukaida, Naofumi, & Baba, Tomohisa. (2012). Chemokines in tumor development and progression. *Exp Cell Res*, 318(2), 95-102. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.10.012
- Mulholland, P. J., Ferry, D. R., Anderson, D., Hussain, S. A., Young, A. M., Cook, J. E., . . . Kerr, D. J. (2001). Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin. *Ann Oncol*, 12(2), 245-248.
- Netzker, Roland. (2012a). Duale Reihe - Biochemie. In J. Rassow, K. Hauser & R. Netzker (Eds.), (3 ed., pp. 373-375). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Netzker, Roland. (2012b). Duale Reihe - Biochemie. In J. Rassow, K. Hauser & R. Netzker (Eds.), (3 ed., pp. 506-524). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

- Nijhawan, Deepak, Fang, Min, Traer, Elie, Zhong, Qing, Gao, Wenhua, Du, Fenghe, & Wang, Xiaodong. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev*, *17*(12), 1475-1486. doi: 10.1101/gad.1093903
- Novoa, Eva Maria, Camacho, Noelia, Tor, Anna, Wilkinson, Barrie, Moss, Steven J., Marin-Garcia, Patricia, . . . Ribas de Pouplana, Lluís. (2014). Analogs of natural aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors clear malaria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(51), E5508-5517. doi: 10.1073/pnas.1405994111
- Oliver, F. Javier, de la Rubia, Guadalupe, Rolli, Véronique, Ruiz-Ruiz, M. Carmen, de Murcia, Gilbert, & Murcia, Josiane M. (1998). Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem*, *273*(50), 33533-33539.
- Ong, Kian C., & Khoo, Hoon-Eng. (1997). Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol*, *29*(2), 121-126.
- Otoguro, K., Ui, H., Ishiyama, A., Kobayashi, M., Togashi, H., Takahashi, Y., . . . Omura, S. (2003). In vitro and in vivo antimalarial activities of a non-glycosidic 18-membered macrolide antibiotic, borrelidin, against drug-resistant strains of Plasmodia. *J Antibiot (Tokyo)*, *56*(8), 727-729.
- Pahl, Heike L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, *18*(49), 6853-6866. doi: 10.1038/sj.onc.1203239
- Palombella, Vito J., Rando, Oliver J., Goldberg, Alfred L., & Maniatis, Tom. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, *78*(5), 773-785.
- Patel, Deendayal, Shukla, Sanjeev, & Gupta, Sanjay. (2007). Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol*, *30*(1), 233-245.
- Perez-Jimenez, Jara, Fezeu, Léopold, Touvier, Mathilde, Arnault, Nathalie, Manach, Claudine, Hercberg, Serge, . . . Scalbert, Augustin. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr*, *93*(6), 1220-1228. doi: 10.3945/ajcn.110.007096
- Perillo, Bruno, Sasso, Annarita, Abbondanza, Ciro, & Palumbo, Giuseppe. (2000). 17beta-estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol Cell Biol*, *20*(8), 2890-2901.
- Pines, Jonathan. (1991). Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ*, *2*(6), 305-310.
- Placzek, W. J., Wei, J., Kitada, S., Zhai, D., Reed, J. C., & Pellecchia, M. (2010). A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis*, *1*, e40. doi: 10.1038/cddis.2010.18
- Plaumann, B., Fritsche, M., Rimpler, H., Brandner, G., & Hess, R. D. (1996). Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene*, *13*(8), 1605-1614.

- Poralla, K. (1975). Borrelidin. In J. Corcoran, F. Hahn, J. F. Snell & K. L. Arora (Eds.), *Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents* (Vol. 3, pp. 365-369): Springer Berlin Heidelberg.
- Qureshi, Asaf A., Khan, Dilshad A., Mahjabeen, Wajiha, Papasian, Christopher J., & Qureshi, Nilofer. (2013). Nutritional Supplement-5 with a Combination of Proteasome Inhibitors (Resveratrol, Quercetin, -Tocotrienol) Modulate Age-Associated Biomarkers and Cardiovascular Lipid Parameters in Human Subjects. *J Clin Exp Cardiol*, 4(3). doi: 10.4172/2155-9880.1000238
- Rainczuk, Adam, Rao, Jyothsna, Gathercole, Jessica, & Stephens, Andrew N. (2012). The emerging role of CXC chemokines in epithelial ovarian cancer. *Reproduction*, 144(3), 303-317. doi: 10.1530/rep-12-0153
- Rastogi, Himanshu, & Jana, Snehasis. (2014). Evaluation of inhibitory effects of caffeic acid and quercetin on human liver cytochrome p450 activities. *Phytother Res*, 28(12), 1873-1878. doi: 10.1002/ptr.5220
- Ratty, A. K., & Das, N. P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol*, 39(1), 69-79.
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Rivett, A. Jennifer. (1989). The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 268(1), 1-8.
- Rohdewald, P. (2002). A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 40(4), 158-168.
- Ross, Julie A., & Kasum, Christine M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*, 22, 19-34. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957
- Ruan, Benfang, Bovee, Michael L., Sacher, Meik, Stathopoulos, Constantinos, Poralla, Karl, Francklyn, Christopher S., & Soll, Dieter. (2005). A unique hydrophobic cluster near the active site contributes to differences in borrelidin inhibition among threonyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*, 280(1), 571-577. doi: 10.1074/jbc.M411039200
- Saarinen, Niina, Joshi, Suresh C., Ahotupa, Markku, Li, Xiangdong, Ammala, Jenni, Makela, Sari, & Santti, Risto. (2001). No evidence for the in vivo activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 78(3), 231-239.
- Sakao, Kozue, Fujii, Makoto, & Hou, De-Xing. (2009). Clarification of the role of quercetin hydroxyl groups in superoxide generation and cell apoptosis by chemical modification. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(9), 2048-2053. doi: 10.1271/bbb.90253
- Scalbert, Augustin, Manach, Claudine, Morand, Christine, Remesy, Christian, & Jimenez, Liliana. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45(4), 287-306. doi: 10.1080/1040869059096
- Scarborough, Harold. (1939). Vitamin P. *Biochem J*, 33(9), 1400-1407.

- Schwab, Carlton L., English, Diana P., Roque, Dana M., & Santin, Alessandro D. (2014). Taxanes: their impact on gynecologic malignancy. *Anticancer Drugs*, 25(5), 522-535. doi: 10.1097/cad.0000000000000057
- Seelinger, Günter, Merfort, Irmgard, & Schempp, Christoph M. (2008). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med*, 74(14), 1667-1677. doi: 10.1055/s-0028-1088314
- Seelinger, Günter, Merfort, Irmgard, Wolfle, Ute, & Schempp, Christoph M. (2008). Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules*, 13(10), 2628-2651.
- Seong, M. K., Lee, J. Y., Byeon, J., Sohn, Y. J., Seol, H., Lee, J. K., . . . Noh, W. C. (2015). Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 150(1), 141-148. doi: 10.1007/s10549-015-3305-7
- Shen, Min, Chan, Tak Hang, & Dou, Q. Ping. (2012). Targeting tumor ubiquitin-proteasome pathway with polyphenols for chemosensitization. *Anticancer Agents Med Chem*, 12(8), 891-901.
- Shi, Ran-Xin, Ong, Choon-Nam, & Shen, Han-Ming. (2004). Luteolin sensitizes tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human tumor cells. *Oncogene*, 23(46), 7712-7721. doi: 10.1038/sj.onc.1208046
- Shimoi, Kayoko, Okada, Hisae, Furugori, Michiyo, Goda, Toshinao, Takase, Sachiko, Suzuki, Masayuki, . . . Kinae, Naohide. (1998). Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett*, 438(3), 220-224.
- Shoskes, D. A., & Nickel, J. C. (2011). Quercetin for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urol Clin North Am*, 38(3), 279-284. doi: 10.1016/j.ucl.2011.05.003
- Shukla, Sanjeev, & Gupta, Sanjay. (2010). Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res*, 27(6), 962-978. doi: 10.1007/s11095-010-0089-7
- Slimestad, Rune, Fossen, Torgils, & Vagen, Ingunn Molund. (2007). Onions: a source of unique dietary flavonoids. *J Agric Food Chem*, 55(25), 10067-10080. doi: 10.1021/jf0712503
- Society, American Cancer. (2015). Cancer Facts & Figures 2015. Retrieved 17/05/2015, from American Cancer Society
http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acs_pc-044552.pdf
- Spagnuolo, C., Cerella, C., Russo, M., Chateauvieux, S., Diederich, M., & Russo, G. L. (2011). Quercetin downregulates Mcl-1 by acting on mRNA stability and protein degradation. *Br J Cancer*, 105(2), 221-230. doi: 10.1038/bjc.2011.229
- St Leger, A. S., Cochrane, A. L., & Moore, F. (1979). Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*, 1(8124), 1017-1020.
- Staedler, Davide, Idrizi, Elita, Kenzaoui, Blanke H., & Juillerat-Jeanneret, Lucienne. (2011). Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast

- cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 68(5), 1161-1172. doi: 10.1007/s00280-011-1596-x
- Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C., Speizer, F. E., & Hennekens, C. H. (1988). A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. *N Engl J Med*, 319(5), 267-273. doi: 10.1056/nejm198808043190503
- Stewart, Daniel P., Koss, Brian, Bathina, Madhavi, Perciavalle, Rhonda M., Bisanz, Kristen, & Opferman, Joseph T. (2010). Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1. *Mol Cell Biol*, 30(12), 3099-3110. doi: 10.1128/mcb.01266-09
- Sticher, Otto. (2010). *Pharmakognosie - Phytopharmazie* (S.-V. B. Heidelberg Ed. 9., überarbeitete und aktualisierte Auflage ed.): Hänsel, Rudolf; Sticher, Otto.
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., & Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, 348(6299), 331-333. doi: 10.1038/348331a0
- Strieter, Robert M., Burdick, Marie D., Mestas, Javier, Gomperts, Brigitte, Keane, Michael P., & Belperio, John A. (2006). Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer*, 42(6), 768-778. doi: 10.1016/j.ejca.2006.01.006
- Sugawara, Akihiro, Tanaka, Toshiaki, Hirose, Tomoyasu, Ishiyama, Aki, Iwatsuki, Masato, Takahashi, Yoko, . . . Sunazuka, Toshiaki. (2013). Borrelidin analogues with antimalarial activity: design, synthesis and biological evaluation against Plasmodium falciparum parasites. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(8), 2302-2305. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.02.075
- Sun, Li-Ping, Chen, Ai-Ling, Hung, Hsiao-Chiao, Chien, Yin-Huan, Huang, Jing-Shi, Huang, Chung-Yang, . . . Chen, Chia-Nan. (2012). Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J Agric Food Chem*, 60(47), 11748-11758. doi: 10.1021/jf303261r
- Szent-Gyorgyi, Albert. (1939). Biological Oxidation and Vitamins: Harvey Lecture, May 18, 1939. *Bull N Y Acad Med*, 15(7), 456-468.
- Taliou, Anilia, Zintzaras, Elias, Lykouras, Lefteris, & Francis, Konstantinos. (2013). An open-label pilot study of a formulation containing the anti-inflammatory flavonoid luteolin and its effects on behavior in children with autism spectrum disorders. *Clin Ther*, 35(5), 592-602. doi: 10.1016/j.clinthera.2013.04.006
- Tamm, Ingo, Kornblau, Steven M., Segall, Harry, Krajewski, Stanislaw, Welsh, Kate, Kitada, Shinichi, . . . Reed, John C. (2000). Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res*, 6(5), 1796-1803.
- Teselkin Iu, O., Zhambalova, B. A., Babenkova, I. V., & Tiukavkina, N. A. (1996). [Antioxidant properties of dihydroquercetin]. *Biofizika*, 41(3), 620-624.
- Thomadaki, Hellinida, & Scorilas, Andreas. (2006). BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 43(1), 1-67. doi: 10.1080/10408360500295626

- Thomas, Luke W., Lam, Connie, & Edwards, Steven W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett*, 584(14), 2981-2989. doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.061
- Tsujimoto, Yishihide, Cossman, Jeffrey, Jaffe, Elaine, & Croce, Carlo M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228(4706), 1440-1443.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2013). USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.1. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/flav>
<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>
- van Meeuwen, J. A., Korthagen, N., de Jong, P. C., Piersma, A. H., & van den Berg, M. (2007). (Anti)estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture. *Toxicol Appl Pharmacol*, 221(3), 372-383. doi: 10.1016/j.taap.2007.03.016
- Ververidis, Filippou, Trantas, Emmanouil, Douglas, Carl, Vollmer, Guenter, Kretschmar, Georg, & Panopoulos, Nickolas. (2007). Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol J*, 2(10), 1214-1234. doi: 10.1002/biot.200700084
- Viola, K., Kopf, S., Huttary, N., Vonach, C., Kretschy, N., Teichmann, M., . . . Grusch, M. (2013). Bay11-7082 inhibits the disintegration of the lymphendothelial barrier triggered by MCF-7 breast cancer spheroids; the role of ICAM-1 and adhesion. *Br J Cancer*, 108(3), 564-569. doi: 10.1038/bjc.2012.485
- Wagh, Vijay D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv Pharmacol Sci*, 2013, 308249. doi: 10.1155/2013/308249
- Wakabayashi, Toshiaki, Kageyama, Rena, Naruse, Nobuaki, Tsukahara, Naoko, Funahashi, Yashuiro, Kitoh, Kyosuke, & Watanabe, Yoshio. (1997). Borrelidin is an angiogenesis inhibitor; disruption of angiogenic capillary vessels in a rat aorta matrix culture model. *J Antibiot (Tokyo)*, 50(8), 671-676.
- Walle, U. Kristina, Galijatovic, Alema, & Walle, Thomas. (1999). Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol*, 58(3), 431-438. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00133-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00133-1)
- Wang, H. Z., Yu, C. H., Gao, J., & Zhao, G. R. (2007). [Effects of processing and extracting methods on active components in Radix Scutellariae by HPLC analysis]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 32(16), 1637-1640.
- Wang, I. K., Lin-Shiau, S. Y., & Lin, J. K. (1999). Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer*, 35(10), 1517-1525.
- Wang, Shaomeng, Bai, Longchuan, Lu, Jianfeng, Liu, Liu, Yang, Chao-Yie, & Sun, H. (2012). Targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for new breast cancer therapeutics. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 17(3-4), 217-228. doi: 10.1007/s10911-012-9265-1

- Watjen, Wim, Michels, Gudrun, Steffan, Bärbel, Niering, Petra, Chovolou, Yvonne, Kampkötter, Andreas, . . . Kahl, Regine. (2005). Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J Nutr*, 135(3), 525-531.
- Weidmann, Anita Elaine. (2012). Dihydroquercetin: More than just an impurity? *Eur J Pharmacol*, 684(1-3), 19-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.03.035
- Wider, B., Pittler, M. H., Thompson-Coon, J., & Ernst, E. (2013). Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia. *Cochrane Database Syst Rev*, 3, CD003335. doi: 10.1002/14651858.CD003335.pub3
- Wilkinson, Barrie, Gregory, Matthew A., Moss, Steven J., Carletti, Isabelle, Sheridan, Rose M., Kaja, Andrew, . . . Zhang, Ming-Qiang. (2006). Separation of anti-angiogenic and cytotoxic activities of borrelidin by modification at the C17 side chain. *Bioorg Med Chem Lett*, 16(22), 5814-5817. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.08.073
- Williams, Dudley H., Stone, Martin J., Hauck, Peter R., & Rahman, Shirley K. (1989). Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod*, 52(6), 1189-1208.
- Williams, Michelle M., & Cook, Rebecca S. (2015). Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? *Oncotarget*, 6(6), 3519-3530.
- Wolfman, Claudia, Viola, Haydeé, Paladini, Alejandro, Dajas, Federico, & Medina, Jorge H. (1994). Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora Coerulea*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 47(1), 1-4. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90103-1](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(94)90103-1)
- Youn, HyeSook, Jeong, Ji-Cheon, Jeong, Young Seok, Kim, Eun-Joo, & Um, Soo-Jong. (2013). Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in H460 lung cancer cells. *Biol Pharm Bull*, 36(6), 944-951.
- Zhang, David Y., Wu, Josephine, Ye, Fei, Xue, Li, Jiang, Shiquan, Yi, Jizu, . . . Li, Xiaoping. (2003). Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res*, 63(14), 4037-4043.
- Zhang, Zhichao, Peng, Xichun, Zhang, Ning, Liu, Liu, Wang, Yong, & Ou, Shiyi. (2014). Cytotoxicity comparison of quercetin and its metabolites from in vitro fermentation of several gut bacteria. *Food Funct*, 5(9), 2152-2156. doi: 10.1039/c4fo00418c
- Zhong, Qing, Gao, Wenhui, Du, Fenghe, & Wang, Xiaodong. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell*, 121(7), 1085-1095. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.009

7 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DAS FLAVAN-GRUNDGERÜST DER FLAVONOIDE	15
ABBILDUNG 2: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONOLS QUERCETIN (= 3,3',4',5,7-PENTAHYDROXYFLAVON)	19
ABBILDUNG 3: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONOLS MYRICETIN (=3,3',4',5,5',7-HEXAHYDROXYFLAVON)	20
ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVANONOLS TAXIFOLIN (=3,3',4',5,7-PENTAHYDROXYFLAVANON)	22
ABBILDUNG 5: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONS APIGENIN (= 4',5,7-TRIHYDROXYFLAVON)	24
ABBILDUNG 6: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONS LUTEOLIN (= 3',4',5,7-TETRAHYDROXYFLAVON)	26
ABBILDUNG 7: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONS CHRYSIN (= 5,7-DIHYDROXYFLAVON)	29
ABBILDUNG 8: CHEMISCHE STRUKTUR DES FLAVONS BAICALEIN (= 5,6,7-TRIHYDROXYFLAVON)	30
ABBILDUNG 9: ÜBERSICHT ÜBER DIE CHEMISCHEN STRUKTURFORMELN ALLER SIEBEN FLAVONOIDE	31
ABBILDUNG 10: CHEMISCHE STRUKTUR DES ANTIBIOTIKUMS BORRELIDIN	33
ABBILDUNG 11: FUNKTIONSWEISE DER GELELEKTROPHORESE	60
ABBILDUNG 12: SCHEMA ZUM PRINZIP DES WESTERN BLOT VERFAHRENS	61
ABBILDUNG 13: PRINZIP DER IMMUNOFÄRBUNG	62
ABBILDUNG 14: PRINZIP DER RNA-EXTRAKTION AUS ZELLEN	64
ABBILDUNG 15: SCHEMA ZUM PRINZIP DES PCR VERFAHRENS	66
ABBILDUNG 16: FUNKTIONSWEISE DER AGAROSEGELELEKTROPHORESE	67
ABBILDUNG 17: ERGEBNIS UND INTERPRETATION DER AGAROSEGELELEKTROPHORESE	68
ABBILDUNG 18: EINFLUSS AUSGEWÄHLTER FLAVONOIDE AUF DAS ÜBERLEBEN VON MAMMAKARZINOM-ZELLEN	70
ABBILDUNG 19: ÜBERLEBEN DER ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT AUSGEWÄHLTEN FLAVONOIDEN IM MTT-ASSAY ..	73
ABBILDUNG 20: ÜBERSICHT ÜBER DAS GESAMTÜBERLEBEN VON MAMMAKARZINOM-ZELLEN	74
ABBILDUNG 21: VERÄNDERUNG DER ZYTMORPHOLOGIE VON MAMMAKARZINOM-ZELLEN DURCH EINE BEHANDLUNG MIT AUSGEWÄHLTEN FLAVONOIDEN	75
ABBILDUNG 22: INTRAZELLULÄRE VAKUOLENBILDUNG DURCH BESTIMMTE FLAVONOIDE BEI MAMMAKARZINOM- ZELLEN	76
ABBILDUNG 23: AUSBILDUNG TUBULÄRER STRUKTUREN DURCH LUTEOLIN BEI MAMMAKARZINOM-ZELLEN.....	77
ABBILDUNG 24: PROTEASOMINHIBITION IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN NACH EINER BEHANDLUNG MIT AUSGEWÄHLTEN FLAVONOIDEN.....	78
ABBILDUNG 25: VERGLEICH DER KONZENTRATIONSABHÄNGIGEN HEMMUNG DES PROTEASOMS IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN ZWISCHEN QUERCETIN UND APIGENIN.....	79
ABBILDUNG 26: PROTEASOMINHIBITION IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN NACH EINER BEHANDLUNG MIT AUSGEWÄHLTEN FLAVONOIDEN.....	80
ABBILDUNG 27: WIRKUNG AUSGEWÄHLTER FLAVONOIDE AUF ZIELPROTEINE DES PROTEASOMS IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN	81
ABBILDUNG 28: WIRKUNG AUSGEWÄHLTER FLAVONOIDE AUF MARKERPROTEINE DES ZELLUNTERGANGS IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN	83
ABBILDUNG 29: VERGLEICH DER WIRKUNGEN DER SIEBEN FLAVONOIDE AUF VERSCHIEDENE SIGNALWEGE IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN	85
ABBILDUNG 30: EINFLUSS VON APIGENIN AUF DIE AKTIVITÄT DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS NFKB IN MAMMAKARZINOM-ZELLEN	87
ABBILDUNG 31: EINFLUSS VON BORRELIDIN AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN VON MAMMAKARZINOM-ZELLEN	90
ABBILDUNG 32: ÜBERLEBEN DER ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT BORRELIDIN IM MTT- BZW. ATP-ASSAY	91
ABBILDUNG 33: WIRKUNG VON BORRELIDIN AUF MARKERPROTEINE DER APOPTOSE IN MAMMAKARZINOM- UND LEUKÄMIEZELLEN	93
ABBILDUNG 34: EINFLUSS VON BORRELIDIN AUF PROTEINE DER BCL-2-FAMILIE IN LEUKÄMIEZELLEN	94

ABBILDUNG 35: ABBAU VON MCL-1 ALS SEKUNDÄRER EFFEKT DER APOPTOSE-INDUKTION DURCH BORRELIDIN IN LEUKÄMIEZELLEN	95
ABBILDUNG 36: EINFLUSS VON BORRELIDIN AUF PROTEINE DER BCL-2-FAMILIE IN MAMMAKARZINOM-UND ENDOTHELZELLEN	96
ABBILDUNG 37: ZUSAMMENSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN FLAVONOIDE MIT DARSTELLUNG IHRER STRUKTURFORMELN	106

8 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: HAUPTGRUPPE DER FLAVONOIDE	16
TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER DIE WIRKUNGEN DER FLAVONOIDE AUF MAMMAKARZINOM-ZELLEN.....	88

9 Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Originalarbeit:

Gafiuc Diana, Weiss Marlene, Mylonas Ioannis & Brüning Ansgar. (2014).

Borrelidin has limited anti-cancer effects in bcl-2 overexpressing breast cancer and leukemia cells and reveals toxicity in non-malignant breast epithelial cells.

J Appl Toxicol, 34(10), 1109-1113. doi: 10.1002/jat.2946

Posterpräsentation:

Diana Gafiuc, Ioannis Mylonas, Ansgar Brüning. (Prag, 2013).

Comparative analysis of natural flavonoids and their antineoplastic effects in breast cancer cells.

Das folgende Manuskript wurde zur Publikation erstellt und soll demnächst eingereicht werden:

Gafiuc Diana, Rahmeh Martina, Mylonas Ioannis & Brüning Ansgar.

A comparative analysis of the anti-cancer properties of flavonoids in breast cancer cells and their influence on proteasome activity and proteasomal target proteins.

10 Danksagung

Dem Direktor der Frauenklinik, Prof. Dr. med. Sven Mahner, sowie dem ehemaligen Direktor, Prof. Dr. med. Klaus Friese, möchte ich aufrichtig dafür danken, dass ich die Arbeit an dieser Dissertation im Forschungslabor ihrer Klinik durchführen durfte.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas, danke ich besonders herzlich für die Bereitstellung des Themas, die stets konstruktive und hilfreiche Beteiligung an dem Projekt sowie seinem unvergleichlichen Engagement für seine Doktoranden über die Grenzen der Promotion hinaus, zum Beispiel durch die Möglichkeit der Teilnahme am *Infektiologie Update* Kongress 2014 und am Seminar *Erfolgreich Publizieren*.

Mein größter und innigster Dank gilt meinem Betreuer, Dr. rer. nat. Ansgar Brüning. Ohne sein enormes fachkundiges Wissen, seine langjährige, wertvolle Erfahrung, seine Begeisterung an der Wissenschaft und seine außerordentlich hingebungsvolle Unterstützung wäre ein Gelingen dieser Dissertation und der Publikationen ausgeschlossen gewesen. Zu jeder Zeit stand er mir mit Rat, Tat und Hilfe zur Seite und ermöglichte mir somit dieses erfolgreiche Debüt in der Forschung.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Petra Burger und Martina Rahmeh möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der zellbasierten Assays danken.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für einen allseits freundschaftlichen, rücksichtsvollen und hilfsbereiten Umgang im Labor. Insbesondere gilt mein Dank meiner Kommilitonin Marlene Weiß für die Mittestung von Borrelidin an einigen der für ihre Arbeit verwendeten Zelllinien.

An dieser Stelle möchte ich auch meinem geliebten Lebensgefährten für sein immerwährendes Verständnis, seine scheinbar endlose Geduld, seine emotionale Unterstützung und seinen ermutigenden Zuspruch nicht nur während der Erstellung dieser Doktorarbeit, sondern auch während des gesamten Studiums danken.

Zum Schluss richte ich ein ganz herzliches Dankeschön an meine lieben Eltern und meinen Bruder. Bedingungslos ermöglichten sie mir sowohl das Medizinstudium als auch das Leben in München und schufen damit jene optimalen Voraussetzungen, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Versicherung

Gafiuc, Diana

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Analyse der zytotoxischen Eigenschaften von natürlich vorkommenden Flavonoiden
und dem Antibiotikum Borrelidin auf Mammakarzinom-Zellen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Augsburg, 24.05.2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand