



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Testung von Flavonoiden im CCID-Assay“

verfasst von / submitted by

Christa Cäcilia Stadlbauer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree
of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Ein besonderer Dank gebührt in erster Linie ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn, die es mir ermöglicht hat, an diesem interessanten Thema zu forschen. Ich bedanke mich für die gute Betreuung während meiner gesamten Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei ao. Univ.-Prof. Dr. Georg Krupitza bedanken, der mich am Institut für Klinische Pathologie des Allgemeinen Krankenhauses Wien betreut hat. Seine Hilfestellungen waren für das Gelingen meiner Forschungsarbeit sehr wichtig. Mein Dank gilt außerdem seinem gesamten Team, das mir stets hilfsbereit zur Seite gestanden ist.

Ich möchte meiner Familie, besonders meinen Eltern, danken. Sie haben mich zu allen Zeiten unterstützt und mir den nötigen Rückhalt gegeben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund, meinen Studienkolleginnen und all den lieben Menschen, die mir während meiner Studienzeit viel Unterstützung und Verständnis entgegenbrachten und mich in schweren Zeiten mit breiten Armen aufgefangen haben, bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Hintergrund und Zielsetzung	3
4	Einleitung	6
4.1	CCID-Assay.....	6
4.2	Krebserkrankungen	7
4.3	Metastasierung.....	8
4.4	Flavonoide	9
5	Material	11
5.1	Testsubstanzen	11
5.2	Zelllinien	13
5.3	Kultivierungsmedien und Substanzen	14
5.4	Technische Ausstattung und Geräte	16
6	Methoden	18
6.1	Zellkultur.....	18
6.1.1	Passagieren/Subkultivierung.....	18
6.1.2	Sphäroidbildung	19
6.1.3	Herstellung eines Monolayers.....	21
6.1.4	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	22
6.2	CCID- Assay.....	23
6.2.1	Durchführung der Versuche	23
6.2.2	Dokumentation	25
6.2.3	Auswertung	26
7	Ergebnisse der CCID-Assays	28
7.1	Wirkung von Oroxylin A.....	28
7.1.1	Wirkung von Oroxylin A auf SW620-Sphäroide auf LECs.....	28
7.1.2	Wirkung von Oroxylin A auf SW620-Sphäroide auf BECs	29
7.2	Wirkung von Wogonin	30
7.2.1	Wirkung von Wogonin auf SW620-Sphäroide auf LECs	30
7.2.2	Wirkung von Wogonin auf SW620-Sphäroide auf BECs.....	32

7.3	Wirkung von Norwogonin	33
7.3.1	Wirkung von Norwogonin auf SW620-Sphäroide auf LECs	33
7.3.2	Wirkung von Norwogonin auf SW620-Sphäroide auf BECs.....	34
7.3.3	Wirkung von Norwogonin auf MCF7-Sphäroide auf LECs	35
7.4	Wirkung von Chrysoeriol	36
7.4.1	Wirkung von Chrysoeriol auf SW620-Sphäroide auf LECs	36
7.4.2	Wirkung von Chrysoeriol auf SW620-Sphäroide auf BECs.....	37
7.5	Wirkung von Diosmetin	38
7.5.1	Wirkung von Diosmetin auf SW620-Sphäroide auf LECs	38
7.5.2	Wirkung von Diosmetin auf SW620-Sphäroide auf BECs	39
7.6	Wirkung von Nepetin	40
7.6.1	Wirkung von Nepetin auf SW620-Sphäroide auf LECs	40
7.6.2	Wirkung von Nepetin auf SW620-Sphäroide auf BECs	41
7.7	Wirkung von Gossypetin	42
7.7.1	Wirkung von Gossypetin auf SW620-Sphäroide auf LECs	42
7.7.2	Wirkung von Gossypetin auf SW620-Sphäroide auf BECs	43
7.8	Wirkung von Homoeriodictyol.....	44
7.8.1	Wirkung von Homoeriodictyol auf SW620-Sphäroide auf LECs	44
7.8.2	Wirkung von Homoeriodictyol auf SW620-Sphäroide auf BECs	45
7.9	Wirkung von Eriodictyol	46
7.9.1	Wirkung von Eriodictyol auf MCF7-Sphäroide auf LECs.....	46
8	Diskussion	47
8.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	48
8.1.1	Wirkung der Flavonoide auf SW620-Sphäroide auf LECs	48
8.1.2	Wirkung der Flavonoide auf SW620-Sphäroide auf BECs.....	49
8.1.3	Wirkung der Flavonoide auf MCF7-Sphäroide auf LECs	50
8.1.4	Zusammenfassende Analyse aller Ergebnisse	50
9	Abbildungsverzeichnis	53
10	Tabellenverzeichnis	55
11	Literaturverzeichnis	56

Abkürzungsverzeichnis

ALOX-15	Arachidonat 15-Lipoxygenase
ATCC	American Type Culture Collection
BAY 11-7082	(E)-3-(4-Methylphenylsulfonyl)-2-propenenitril
BEC	Blood Endothelial Cells
CCID	Circular Chemorepellent Induced Defects
CREL	V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EBM	Endothelial Basal Medium
EGM-2MV	Endothelial Cell Growth Medium
FBS	Fetales Bovines Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoroisothiocyanate
GA-1000	Gentamicin and Amphotericin 1:1000
hEGF	human Epidermal Growth Factor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hFGF-b	human Fibroblastic Growth Factor-basic
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IC ₅₀	half maximal Inhibitory Concentration
LEC	Lymphatic Endothelial Cells
MCF7	Brustkrebszelllinie
MDA-MB231	Brustkrebszelllinie
MEM	Minimal Essential Medium
MMP1	Matrix Metalloproteinase-1
NEAA	Non Essential Amino Acids
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NIK	NF-kappa-B-inducing kinase
NF-κB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

PAR1	Protease-aktivierter Rezeptor-1
P/S	Penicillin/Streptomycin
RELA	Transcription factor p65
RELB	Transcription factor RelB
R3-IGF-1	Recombinant analog of human Insulin-like Growth Factor-1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
12-(S)-HETE	12-Hydroxyeicosatetraenoic acid
SW620	Kolonkrebszelllinie
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Zusammenfassung

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen in westlichen Industrieländern. Die Mehrzahl der Krebspatienten verstirbt an den Folgen der Metastasierung. Daher spielen Therapien, die eine Metastasierung unterbinden, in der onkologischen Forschung eine große Rolle.

Die Heilpflanze *Scrophularia lucida* L. wird in der türkischen Volksmedizin wegen ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften angewendet. Bei einem Screening methanolischer Pflanzenextrakte zeigte *Scrophularia lucida* L. eine deutliche Hemmung der Gap-Bildung durch Krebszellsphäroide in Endothelzellschichten. Das Flavonoid Hispidulin war die Hauptkomponente einer sehr gut wirkenden Fraktion dieses Extraktes. Das Ziel dieser Diplomarbeit war, Struktur-Wirkungs-Beziehungen mehrerer Flavonoide zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden weitere Flavonoide mit struktureller Ähnlichkeit in drei Testsystemen (SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen, SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen und MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen) untersucht. Das Testverfahren basierte auf dem circular chemorepellent induced defects-Assay, einem dreidimensionalen Zellkultursystem, bei dem die Intravasation *in vitro* beobachtet werden kann.

Die Flavonoide Wogonin und Oroxylin A zeigten eine gute bis moderate Wirkung in allen Testsystemen. Bei Diosmetin und Nepetin, die eine zusätzliche Hydroxylgruppe aufweisen, war die Wirkung weniger stark ausgeprägt. Die Flavanone Homoeriodictyol und Eriodictyol konnten die Gap-Bildung nur ungenügend verhindern. Für Norwogonin konnte ebenfalls kein Effekt festgestellt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Flavonoide mit höherer Lipophilie eine stärkere Hemmwirkung auf die Gap-Bildung im CCID-Assay hatten. Eine Ausnahme war Gossypetin, da es trotz seiner vergleichsweise geringen Lipophilie die CCID-Bildung im Testsystem mit SW620-Sphäroiden auf BECs am stärksten hemmte.

2 Summary

Cancer is the second leading cause of death after cardiovascular diseases in Western industrialized countries. The majority of cancer patients die from the consequences of metastasis. Due to this fact, therapies which prevent metastasis play a major role in oncology research.

Scrophularia lucida L. is a medicinal plant which has been used in Turkish folk medicine especially for its anti-inflammatory properties. A screening of methanolic plant extracts showed the ability of *Scrophularia lucida* L. to inhibit the gap formation by cancer cell spheroids in endothelial cell layers. The flavonoid hispidulin was the main component of a very active fraction of this extract. The aim of this diploma thesis was to investigate the structure-activity relationship of several flavonoids. For this reason, flavonoids with structural similarity were examined in three test systems (SW620-spheroids on lymphatic endothelial cells, SW620-spheroids on blood endothelial cells and MCF7-spheroids on lymphatic endothelial cells). The investigation was based on the circular chemorepellent induced defects-assay which is a three-dimensional cell culture system in which intravasation can be studied *in vitro*.

The flavonoids wogonin and oroxylin A showed good to moderate effects in all test systems. For diosmetin and nepetin with an additional hydroxyl group, the effect was less compared to wogonin and oroxylin A. Homoeriodictyol, eriodictyol and norwogonin could not sufficiently prevent the formation of gaps.

This study showed that flavonoids with higher lipophilicity resulted in stronger inhibitory effect on the gap formation in CCID-assay except for gossypetin. This flavonoid despite a relatively low lipophilicity inhibited the CCID-formation in the test system with SW620-spheroids on BECs most efficiently.

3 Hintergrund und Zielsetzung

Verschiedene *Scrophularia*-Arten wurden in der Volksmedizin besonders wegen ihrer antiinflammatorischen Wirkungen seit Jahrhunderten angewendet (Galindez et al., 2002).

Um mehr über die antineoplastischen Effekte dieser Pflanzenarten zu erfahren, wurden methanolische Extrakte verschiedener *Scrophularia*-Arten im CCID-Assay mit MCF7-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen untersucht (Giessrigl et al., 2012). Das Extrakt von *Scrophularia lucida* L. (*Scrophulariaceae*) zeigte eine besonders gute Hemmwirkung im CCID-Assay. Im Zuge weiterer Untersuchungen wurde festgestellt, dass die vielversprechenden antineoplastischen Eigenschaften von *Scrophularia lucida* L. unter anderem auf eine Down-Regulation verschiedener Zellzyklus-Regulatoren, Protoonkogene, NF- κ B sowie der Aktivierung von Caspase 3 zurückzuführen sind (Giessrigl et al., 2012).

Um die Inhaltsstoffe, die für die Wirkungen verantwortlich sind, zu identifizieren, wurde das methanolische Extrakt von *Scrophularia lucida* L. fraktioniert (Lewenhofer, 2014). Die einzelnen Fraktionen wurden im CCID-Assay mit MCF7-Sphäroiden auf LECs untersucht. Am wirksamsten erwies sich eine Fraktion, in der das Flavonoid Hispidulin in hoher Konzentration nachgewiesen wurde.

Daher wurden weitere Flavonoide mit struktureller Ähnlichkeit zu Hispidulin im CCID-Assay auf anti-intravasative Wirkungen getestet. Neben dem Testsystem mit MCF7-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen erfolgte auch die Testung an einer Kolonkrebszelllinie (SW620), da Kolonkrebs sowohl über Lymph- als auch über Blutendothelzellen metastasiert.

Ziel war es, Daten zur Erstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu sammeln. In vorangegangenen Diplomarbeiten wurden bereits einige Flavonoide in drei Testsystemen (SW620-Sphäroide auf LECs, SW620-Sphäroide auf BECs und MCF7-Sphäroide auf LECs) untersucht (Eichsteininger, 2015; Smöch, 2015).

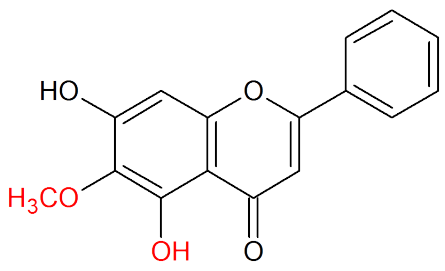
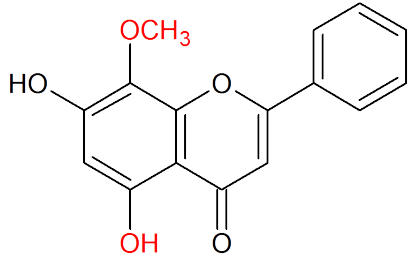
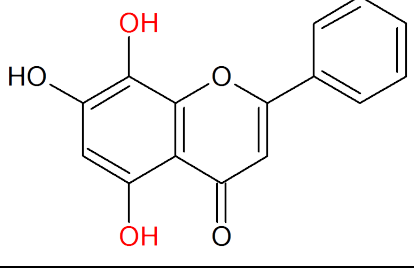
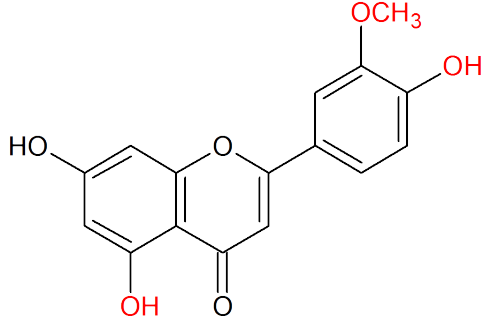
Das Ziel vorliegender Diplomarbeit war es, weitere Flavonoide im CCID-Assay zu testen und deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu analysieren.

In der Versuchsanordnung SW620-Sphäroide auf LECs und BECs wurden die Flavonoide Oroxylin A, Wogonin, Norwogonin, Chrysoeriol, Diosmetin, Nepetin,

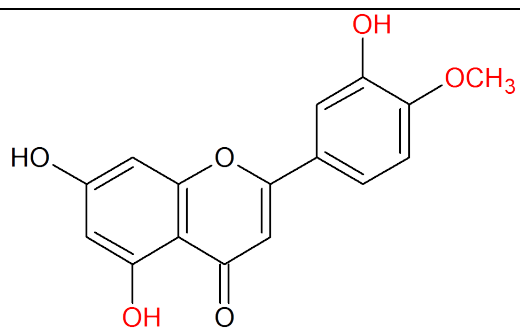
Gossypetin und Homoeriodictyol getestet. Im Testsystem mit MCF7-Sphäroiden auf LECs wurde die Hemmwirkung von Norwogonin und Eriodictyol untersucht.

Die Flavonoide in der Testreihe dieser Arbeit unterschieden sich durch unterschiedliche Hydroxy- bzw. Methoxylierung in Position 3, 5, 6, 8, 3', 4' oder 5' (In Tabelle 1 in rot dargestellt). Bei Homoeriodictyol und Eriodictyol fehlt zusätzlich die Doppelbindung in Position 2 bis 3.

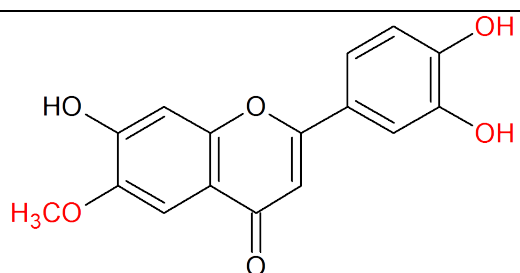
Tabelle 1: Flavonoide in der Testreihe dieser Arbeit

1. Oroxylin A	
2. Wogonin	
3. Norwogonin	
4. Chrysoeriol	

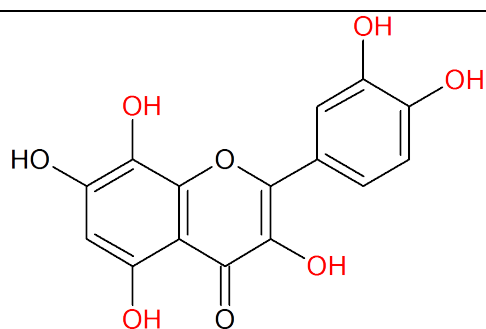
5. Diosmetin



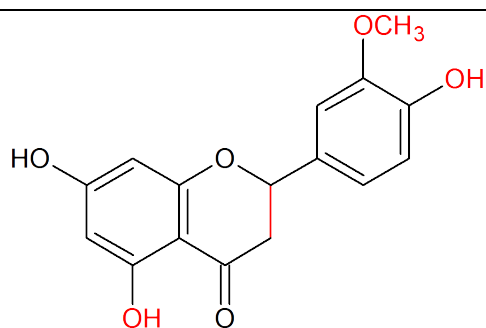
6. Nepetin



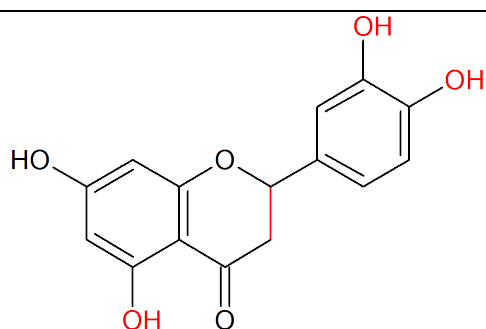
7. Gossypetin



8. Homoeriodictyol



9. Eriodictyol



4 Einleitung

4.1 CCID-Assay

Das CCID-Assay ist ein dreidimensionales Zellkultursystem, mit dem es möglich ist, molekulare Mechanismen früher Metastasierungsschritte (Intravasation) *in vitro* zu beobachten.

CCID steht für „circular chemorepellent induced defects“ und bezeichnet die Größe der zellfreien Bereiche, die in einem Monolayer von Endothelzellen unter dem Einfluss von Tumorzellsphäroiden entstehen.

Blut- und Lymphendothelzellen weichen unter dem Einfluss von Tumorzellsphäroiden auseinander und ermöglichen so das Einwandern des Tumors in die Gefäßbahnen. Dafür verantwortlich ist unter anderem der vom Tumor abgesonderte Arachidonsäure-Metabolit 12(S)-HETE, der mit Hilfe von ALOX15 synthetisiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch einen Knockdown von ALOX15 die Bildung der CCIDs deutlich verkleinert (Kerjaschki et al., 2011; Vonach et al., 2010).

Des Weiteren spielt die Adhäsion der Krebszellen an das Epithel im Gefäßsystem eine wichtige Rolle für die nachfolgende Intravasation des Tumors. Das von NF-κB gesteuerte ICAM-1 erhöht diese Haftung und fördert damit die CCID-Bildung. Durch die Behandlung von LECs mit Bay11-7082, einem synthetischen Inhibitor von NF-κB, konnte die Anhaftung der Sphäroide am Monolayer verhindert werden (Viola et al., 2013).

NF-κB trägt außerdem zur Aktivierung von MMP1 in Brustkrebs-sphäroiden bei und verursacht eine parakrine PAR1-Aktivierung. Die intrazelluläre NF-κB-abhängige MMP1/PAR1- Signalkaskade stimuliert die Intravasation epidermoider Krebszellen in angiogene Blutgefäße (Juncker-Jensen et al., 2013). Diese Signalachse funktioniert auch in die Gegenrichtung, also mit dem Ursprung im Stroma und dem Ziel im Tumor, was die Mobilität und Invasivität der Krebszelle verbessert (Boire et al., 2005).

Um herauszufinden, welche Transkriptionsfaktoren der NF-κB Familie für die CCID-Bildung verantwortlich sind, wurden RELA, RELB, CREL, NF-κB1, NF-κB2,

NEMO und NIK genauer untersucht. Im CCID-Assay mit MDA-MB231 Brustkrebs-sphäroiden auf LECs wurde gezeigt, dass vor allem die Unterdrückung von RELA, NF-kB1 und NEMO die CCIDs deutlich verkleinert (Nguyen et al., 2015).

Diese Forschungsergebnisse zeigen den großen Einfluss von NF-kB bei der Metastasierung von Tumorerkrankungen.

Starke NF-kB-Inhibitoren findet man als Bestandteil einiger Pflanzen. Curcumin aus dem Rhizom der Gelbwurzel (*Curcuma longa* L.) zeigte im Tierversuch eine starke Hemmung auf die Bildung und Ausbreitung von Metastasen bei Brustkrebs (Bachmeier et al., 2007). Auch eine Vielzahl an Flavonoiden, die in Obst und Gemüse vorkommen, inhibieren die NF-kB-Aktivität (Teuscher et al., 2012). Die Konzentration der über die Nahrung aufgenommenen Flavonoide ist wahrscheinlich zu gering, um Krebsmetastasen zu bekämpfen. Eine präventive Wirkung ist aber durchaus vorstellbar.

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Flavonoide zeigen das präventive Potential dieser Stoffgruppe hinsichtlich anti-intravasativer Wirkungen bei Kolon- und Brustkrebs.

4.2 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen in westlichen Industrieländern. Besonders durch die steigende Lebenserwartung nimmt das Risiko, an einer Tumorerkrankung zu erkranken, zu (Wagener & Müller, 2010).

Obwohl in den letzten Jahrzehnten massive Fortschritte in der Diagnose und Therapie von Krebs erreicht werden konnten, sind viele Krebsarten auch heute nur sehr beschränkt behandelbar, vor allem bei Vorhandensein von Metastasen.

Die Ursachen einer Krebserkrankung sind bis heute nicht vollständig geklärt. Neben erblich bedingten Gründen können verschiedene Faktoren wie Zigarettenkonsum, falsche Ernährung, mangelnde Bewegung oder Virusinfektionen eine Tumorerkrankung begünstigen. Zu den eindeutig identifizierten exogenen Krebsursachen gehören chemische Karzinogene (Chemikalien) und physikalische Noxen (UV-B und ionisierende Strahlung). Dabei können zwischen dem initialen

Auslöser und dem Ausbruch der Tumorerkrankung Jahrzehnte vergehen (Mutschler et al., 2007).

Meistens entstehen Tumore aus ursprünglich gesunden Zellen, die durch zufällige Mutation oder gerichtete Selektion einen Wachstums- und Überlebensvorteil erlangen. Durch Angiogenesefaktoren wie VEGF induziert der Tumor die Neubildung von Blutgefäßen, die ihn mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen und ihm ungehemmtes Wachstum ermöglichen. Weitere Merkmale von bösartigen Tumoren sind Apoptose-Resistenz, die Umgehung der immunologischen Überwachung sowie Intravasation und Metastasierung (Mutschler et al., 2007; Wagener & Müller, 2010).

4.3 Metastasierung

Die Metastasierung stellt die bedrohlichste Form maligner Tumore dar. Mehr als 90 % der Tumorpatienten sterben an den Folgen der Metastasierung (Wagener & Müller, 2010).

Metastasen entstehen, wenn sich der maligne Tumor in umgebenden oder entfernten Geweben oder Organen ansiedelt.

Die Intravasation beschreibt das Eindringen der vom Primärtumor abgelösten Tumorzellen in die Metastasierungswege. Die wichtigsten Metastasierungswege sind Blut- und Lymphgefäße. Bei einer lymphogenen Metastasierung gelangen die Krebszellen über Lymphbahnen in Lymphknoten. Die Überlebensrate von Tumorpatienten sinkt deutlich, wenn die Lymphknoten befallen sind (Wagener & Müller, 2010). Eine hämatogene Metastasierung liegt vor, wenn Tumorzellen eines Primärtumors über den Blutstrom in entfernte Organe verschleppt werden. Dabei ist der Ort der Fernmetastasierung in den meisten Fällen durch die anatomischen Verhältnisse des Blutflusses vorgegeben. Zum Beispiel wird das venöse Blut im Gastrointestinaltrakt über die Pfortader in die Leber transportiert. Das ist auch der Grund, weshalb Darm- oder Pankreastumore bevorzugt in die Leber metastasieren (Wagener & Müller, 2010). Die „seed and soil“ Theorie des englischen Chirurgen Paget beschreibt das Phänomen, dass Tumorzellen nur dort Metastasen bilden, wo sie besonders gute Bedingungen vorfinden (Fidler, 2003).

Tumorzellen können auch direkt vom Primärtumor in Körperhöhlen ausgestreut werden. Die Extravasation bezeichnet den Prozess des Austritts der Tumorzellen

aus den Metastasierungswegen. Durch Anheften an Organe können sich Sekundärtumore ausbilden. Aber nicht alle Tumorzellen, die in andere Organe auswandern, bilden Metastasen. Sie können auch lange im Gewebe überleben, ohne Metastasen auszubilden (Wagener & Müller, 2010).

4.4 Flavonoide

Als sekundäre Pflanzenstoffe kommen Flavonoide in vielen höheren Pflanzen vor. Chemisch gesehen handelt es sich bei Flavonoiden um Derivate des Flavans (2-Phenylchroman), die aus einem Polyketid und einen Phenylpropankörper bestehen. Aufgrund ihrer Oxidationsstufe lassen sich die Derivate in verschiedene Gruppen einteilen: Flavanone, Flavone, Flavanonole, Flavonole, Flavanole, Flavandiole, Flavyliumsalze und Oxoniumsalze der Enolform von Flavanonolen.

Flavonoiden werden antiinflammatorische, antioxidative, virustatische, antimikrobielle und auch antitumorale Eigenschaften zugeschrieben. Die Wirkungen sind von Strukturelementen abhängig und nicht für alle Flavonoide im gleichen Ausmaß zutreffend. *In vitro* Untersuchungen belegen die Hemmwirkung einer Vielzahl an Enzymen durch Flavonoide. Der Eingriff in die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges unterbindet die Bildung inflammatorisch wirkender Zytokine. Des Weiteren führen Flavonoide zur Erniedrigung der Ca^{2+} Konzentration im Zytoplasma, was eine Relaxation der glatten Muskulatur der Hohlorgane bewirkt. Die Folge sind eine Erweiterung der peripheren Blutgefäße und der Koronarien, wodurch eine bessere Durchblutung des Herzens und eine Blutdrucksenkung erreicht wird. Daher werden Flavonoide häufig als Venotonika und Kardiotonika eingesetzt. Flavonoide haben Radikalfängereigenschaften und können zweiwertige Metallionen komplex binden. Die aquarettische Wirkung einiger Flavonoide (z.B. Birkenblätter) ist unter anderem auf eine verstärkte Nierendurchblutung zurückzuführen. Flavonoide finden des Weiteren Anwendung als Sedativa (z.B. Passionsblumenkraut), Nootropika (z.B. Ginkoblätter), Hepatika (z.B. Mariendistel Früchte) und als Antisepatika (z.B. Bienenkittharz).

Aufgrund der vielseitigen Wirkungen werden zahlreiche flavonoidhaltige Drogen medizinisch genutzt. Auch die Aufnahme von Flavonoiden über die Nahrung,

insbesondere durch den Verzehr von Gemüse und Obst, kann zur Vorbeugung bestimmter Erkrankungen beitragen.

Meist liegen Flavonoide als Glykoside vor und werden rasch durch die Darmflora abgebaut. Die Aglyka werden gut resorbiert und nach der Konjugation als Glucuronide ausgeschieden. Auch eine perkutane Resorption der Aglyka ist möglich.

Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit von Flavonoiden ist jedoch zu beachten, dass *in vitro* erhobene Daten nicht direkt auf die therapeutischen Wirkungen im menschlichen Körper übertragen werden können (Teuscher et al., 2012).

5 Material

5.1 Testsubstanzen

Folgende Testsubstanzen wurden zur Herstellung der Stammlösungen verwendet:

Tabelle 2: Testsubstanzen

• Oroxylin A	the nature network – PhytoLab Vestenbergsreuth, Deutschland Nr.: 82615
• Wogonin	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland Nr.: 043M4707V
• Norwogonin	Extrasynthese Genay Cedex, Frankreich Nr.: 4443-09-8
• Chrysoeriol	Extrasynthese Genay Cedex, Frankreich Nr.: 491-71-4
• Diosmetin	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland Nr.: BCBM1051V
• Nepetin	the nature network – PhytoLab Vestenbergsreuth, Deutschland Nr.: 83327
• Gossypetin	INDOFINE Chemical Company Hillsborough, USA Nr.: 489-35-0
• Homoeriodictyol	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland Nr.: 9382
• Eriodictyol	Extrasynthese Genay Cedex, Frankreich Nr.: 4049-38-1

Bereitung von 50 mM Stammlösungen:

Aus den Testsubstanzen wurden 50 mM Stammlösungen in einer Menge von etwa 100 µl hergestellt. Als Lösungsmittel diente DMSO. Mit Hilfe des Molekulargewichtes konnten die Substanzeinwaagen berechnet werden:

$$m[\text{mg}] = 50 * 0,0001 * MW$$

$m[\text{mg}]$ = Substanzeinwaage, MW = Molekulargewicht

Tabelle 3: Substanzeinwaagen zur Herstellung von 50 mM Stammlösungen

Substanz	Molekulargewicht [mg/mmol]	berechnete Substanzeinwaage [mg]
Oroxylin A	284,26	1,42
Wogonin	284,26	1,42
Norwogonin	270,23	1,35
Chrysoeriol	300,26	1,50
Diosmetin	300,26	1,50
Nepetin	316,26	1,58
Gossypetin	318,24	1,59
Homoeriodictyol	302,27	1,51
Eriodictyol	288,25	1,44

Zwischen 0,45 und 1,80 mg der Flavonoide wurden genau eingewogen in DMSO zu 50 mM Stammlösungen gelöst.

Anschließend wurden die Substanzen im Gefrierschrank bei -20 °C für die einzelnen Experimente (siehe Kapitel 6.2.1, S. 23) gelagert.

5.2 Zelllinien

Kolonkrebiszellen: SW620 (CCL-227TM)

Die Kolonkrebzelllinie SW620 (CCL-227TM) wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen. Diese Zelllinie zeichnete sich durch eine gute Haftfähigkeit aus, wodurch sie gut zur Sphäroidherstellung geeignet war.

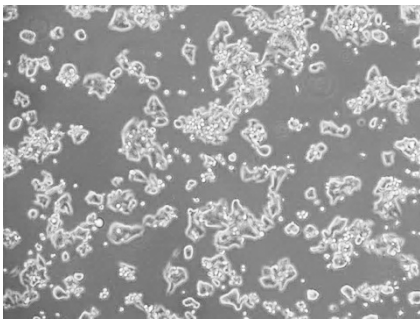


Abbildung 1: SW620 bei Konfluenz

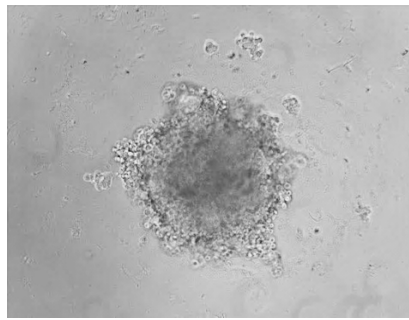


Abbildung 2: SW620-Sphäroid nach 4 Tagen

Brustkrebiszellen: MCF7

Die Brustkrebiszellen MCF7 stammten ebenfalls von der Firma ATCC. Mit dieser Zelllinie war es möglich, perfekte kugelförmige Sphäroide herzustellen.

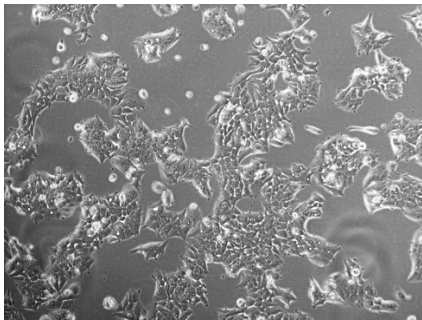


Abbildung 3: MCF7 bei Konfluenz

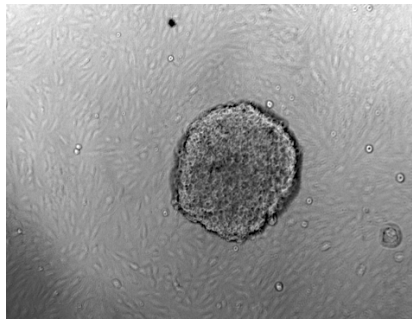


Abbildung 4: MCF7-Sphäroid nach 3 Tagen

Lymph- und Blutendothelzellen: LECs/ BECs

Lymph- und Blutendothelzellen von der Firma PromoCell (Heidelberg, Deutschland) wurden humanen Spendern von verschiedenen Stellen der Dermis entnommen. Nach der Isolierung wurden sie mit Antikörpern und Telomerase

Reverse Transkriptase (TERT) immortalisiert.



Abbildung 5: Nicht konfluente LECs

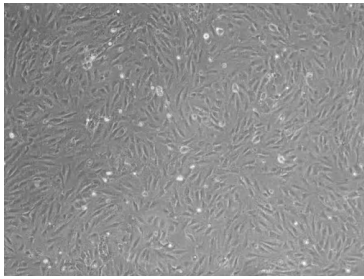


Abbildung 6: Konfluente LECs

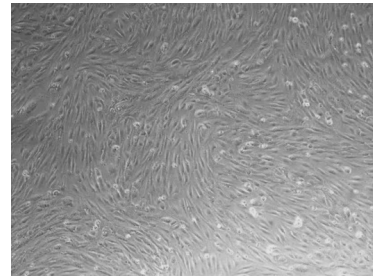


Abbildung 7: Konfluente BECs

5.3 Kultivierungsmedien und Substanzen

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium

RPMI wurde von der Firma Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) bezogen und zur Kultivierung der Kolonkrebiszellen verwendet. L-Glutamin und 25 mM des Puffers HEPES waren im Medium bereits enthalten. Zusätzlich wurden dem Medium 10 % FBS (Fetal Calf Serum, Firma Life Technologies) und 1 % P/S (Penicillin/Streptomycin, Firma Gibco (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)) beigefügt.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM wurde ebenfalls von der Firma Life Technologies angekauft. Dieses Medium diente zur Sphäroidbildung der SW620-Zellen. Das Medium beinhaltet 4,5 g/L D-Glucose und 0,11 g/L Pyruvat. Zugefügt wurden 5 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % P/S.

Minimal essential Medium (MEM)

Dieses Medium wurde freundlicherweise von Frau Nicole Huttary vom Department für klinische Pathologie des Allgemeinen Krankenhauses Wien zur Verfügung gestellt. MEM wurde zur Kultivierung und Sphäroidherstellung der MCF7-Brustkrebiszellen verwendet. Das Medium enthielt 10 % FCS, 1 % P/S, 1 % NEAA (Non Essential Amino Acids) und 150 µg/ml Hygromycin B.

Endothelial Cell Growth Medium (EGM-2MV)

EGM-2MV wurde von der Firma Lonza (Allendale, NJ, USA) bezogen. Als Basalmedium wurde EBM mit dem CC4147-Kit der Firma Lonza supplementiert. Dieser Kit enthielt: 25 ml FBS; 0,2 ml Hydrocortison; 0,2 ml hFGF-b; 0,5 ml VEGF; 0,5 ml R3-IGF-1; 0,5 ml Ascorbinsäure; 0,5 ml hEGF und 0,5 ml GA-1000. Dieses Medium diente als Kultivierungsmedium für die Endothelzellen (BECs und LECs). Es wurde außerdem im Zuge der Assays zur Herstellung der Flavonoidtestlösungen aus den Stammlösungen und als Trägermedium für den CellTracker verwendet.

Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)

DPBS wurde von der Firma Life Technologies angekauft. Die gepufferte Salzlösung diente als Waschreagenz zum Waschen der Zellen und zum Reinigen von Kulturflaschen.

Trypsin (TrypLE™ Express)

Trypsin wurde ebenfalls von der Firma Life Technologies bezogen und zum Ablösen der adhärennten Zellen vom Boden der Kultivierungsflaschen verwendet.

CellTracker™ Green CMFDA Dye

Der CellTracker von der Firma Life Technologies kam als Fluoreszenzmarker zur Färbung der Endothelzellen zum Einsatz.

Dimethylsulfoxid (DMSO)

DMSO von der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) diente als Lösungsmittel für die getesteten Flavonoide und wurde den Zellen bei der Kryokonservierung als Frostschutzmittel hinzugefügt.

Carboxymethylcellulose

Methylcellulose zur Sphäroidherstellung (cat#: m-0512, 4000 cP) wurde von der Firma Sigma-Aldrich erworben. Dazu wurde eine 1,6 %ige Lösung in DMEM hergestellt und für die Sphäroidbildung mit Kultivierungsmedium verdünnt.

5.4 Technische Ausstattung und Geräte

Cytoperm™ 2 CO₂ Inkubator

Ein CO₂-Inkubator der Firma Thermo scientific (Waltham, MA, USA) diente als Brutschrank für die Zellen und zur Inkubation der Assays. Für das optimale Wachstum der Zelllinien betrug die Temperatur im Inkubator 37 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂-Gehalt.

Laminar Air Flow-Werkbank, NordicSafe®

Zur Verhinderung von Kontaminationen wurde eine Laminar-Air Flow Werkbank der Firma ESCO (Changi South Street, Singapur) mit Sicherheitsstufe für Klasse II verwendet.

Mikroskop Axiovert 35

Ein inverses Fluoreszenzmikroskop mit integrierter Kamera der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) diente zum Fotografieren der Assay-Platten. Mit der dazugehörigen ZEN Pro Imaging Software von Zeiss konnten die Fotos in zwei Bildebenen angefertigt werden. Die Auswertung der Fotos und Vermessung der Sphäroide und Gaps erfolgte mit der ZEN lite Software der Firma Zeiss.

Mikroskop Labovert

Ein Durchlichtmikroskop Labovert (Type 090-122.012) von der Firma Ernst Leitz (Wetzlar, Deutschland) wurde zur routinemäßigen Kontrolle der Zellen auf Zellwachstums und Vitalität verwendet.

Untertischzentrifuge, Rotanta/TRC

Eine Zentrifuge der Firma Hettich (Tuttlingen, Deutschland) wurde zum Zentrifugieren der Zellen im Rahmen der Passagierung und bei der Methylcellulose-Herstellung verwendet. Außerdem wurden die 96-Well-Plates für die Sphäroidbildung zentrifugiert, um die Tumorzellen besser in Kontakt zu bringen.

Vortexmischer: Vortex-Genie™

Zur gründlichen Durchmischung von Stammlösungen und Flavonoidverdünnungen wurde ein Vortex-Genie™ (Type K-550-GE) der Firma Scientific industries, Inc. (Bohemia, NY, USA) benutzt.

Wasserbad

Die Kultivierungsmedien wurden vor der Verwendung auf 37 °C im Wasserbad der Firma GFL (Burgwedel, Deutschland) vorgewärmt.

96-Well-Plates

96-Well-Plates Cellstar® (Nr.: 650185) der Firma Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich) wurden für die Anzucht der Späroide verwendet.

24-Well-Plates

Für die Aussaat der Monolayer und die Durchführung der Experimente dienten 24-Well-Plates Costar® (Nr.: 3524) der Firma Corning Incorporated (Corning, NY, USA).

Kryotubes

Die Kryotubes zum Einfrieren der Zellen wurden ebenfalls von Corning Incorporated bezogen.

Kulturflaschen

Für die Kultivierung der Zellen dienten Kulturflaschen in der Größe von 25 und 75 cm² der Firma nunc™ (Roskilde, Dänemark).

Pipetten

5 und 10 ml Einwegpipetten stammten von der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland).

Pipettierhilfe

Ein Accu-jet® pro der Firma Brand® (Wertheim, Deutschland) wurde als Pipettierhilfe verwendet.

6 Methoden

6.1 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte wurden in einem Zellkulturlabor unter Einhaltung aseptischer Arbeitstechniken durchgeführt.

6.1.1 Passagieren/Subkultivierung

Nach Erreichen der Maximaldichte der Kulturen mussten die Zellen passagiert werden. Blut- und Lymphendothelzellen wurden passagiert, wenn der Zellrasen den Boden der Kulturflasche vollständig bedeckte. Bei den Tumorzellen, die nie die gesamte Wachstumsfläche beanspruchten, war die Konfluenz erst mit ausreichender Erfahrung zu erkennen.

Die Zellen wurden in 25 und 75 cm² Kulturflaschen passagiert, wobei die Flaschen mit jeweils 5 bzw. 10 ml Kulturmedium befüllt wurden. Der erste Schritt umfasste das Abpipettieren des nährstoffarmen Kulturmediums. Nach einem Waschschrift mit DPBS wurde 1 ml Trypsin zugesetzt und das Kulturgefäß für 3-5 min in den Inkubator gestellt. Trypsin fungierte durch seine Eigenschaft als Peptidase zellverbandaufrechterhaltender Proteine als Anti-Adhäsionsmittel. Somit konnten die adhärenen Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst und vereinzelt werden. Die Enzymreaktion wurde nach maximal 5 min mit FBS-haltigem Medium gestoppt. Für SW620-Zellen sowie für LECs und BECs wurde RPMI Medium und für MCF7-Zellen MEM als Stoppreagens verwendet. Um Trypsin wieder vollständig zu entfernen, wurde die erhaltene Zellsuspension 3 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet in 5 ml des jeweiligen Kulturmediums resuspendiert. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde wieder in die Kulturflasche überführt, in welcher zuvor das jeweilige Kulturmedium vorgelegt worden war.

Verdünnungsfaktor:

- Blut- und Lymphendothelzellen konnten maximal in einem Verhältnis von 1:5 passagiert werden, da diese Zellen für ein hinreichendes Wachstum Zell-Zell-Kontakte benötigten. In vorliegender Arbeit wurden BECs und LECs dreimal wöchentlich subkultiviert. Bei einem Verhältnis von 1:3 war nach 2 Tagen wieder ein konfluenten Zellverband gegeben, bei 1:4 nach 3 Tagen.

Nach maximal 15 Passagen wurden neue Zellen eingesetzt.

- SW620-Kolonkrebszellen wurden in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt und waren dann nach 5 Tagen wieder konfluent. Für eine optimale Nährstoffversorgung wurde nach 2 Tagen ein partieller Medienwechsel durchgeführt.
- MCF7-Brustkrebszellen wurden ebenfalls in einem Verhältnis von 1:10 (7 Tage bis zur Konfluenz) oder 1:5 (4 Tage bis zur Konfluenz) passagiert.

6.1.2 Sphäroidbildung

Sphäroide simulieren im CCID-Assay maligne Kleinstumore, welche sich vom Primärtumor ablösen, um über Blut- bzw. Lymphbahnen in andere Körperregionen zu wandern und sich dort anzusiedeln und zu vermehren.

Um kugelförmige Sphäroide zu erhalten, wurde eine Mischung von 20 % Methylcellulose und 80 % Kultivierungsmedium verwendet. SW620-Sphäroide wurden mit DMEM + 5 % FCS kultiviert, MCF7-Sphäroide mit MEM + 10 % FCS. Für eine 96-Well-Platte wurden 150 µl pro Well benötigt. Für eine Platte wurden 15 ml einer Mischung von Methylcellulose und Medium vorbereitet.

Herstellung einer 1,6 %igen Lösung von Methylcellulose in DMEM:

8 g Methylcellulose wurden in ein 500 ml Glasgefäß mit Magnetrührstäbchen eingewogen und anschließend autoklaviert. Danach wurden 250 ml 60 °C heißes DMEM (ohne FCS) hinzugefügt und eine Stunde am Magnetrührer gerührt. Nachdem die Methylcellulose gelöst war, wurden weitere 250 ml kaltes DMEM hinzugefügt und 48 Stunden bei 4 °C gerührt. Die Lösung wurde in 50 ml Vials aliquotiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur und 5000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Methylcellulose für die einzelnen Versuche bei -20 °C aufbewahrt, wobei pro Vial nur die oberen klaren 90-95% der viskosen Lösung verwendet werden konnten, da sich im unteren Teil Methylcellulose Stückchen absetzten.

Für die Herstellung der Sphäroide mussten die Tumorzellen passagiert werden. Dazu wurde wie in 6.1.1 (S. 18) beschrieben, das Kulturmedium entfernt, mit DPBS gewaschen und die adhärenen Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Nach Zugabe des Stoppreagens und Zentrifugation wurde das Zellpellet in 5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert. Für Sphäroide definierter Größe musste die Zellzahl ermittelt werden. Es wurde eine 1:10 Verdünnung erstellt, um das Auszählen zu erleichtern. 10 µl dieser Verdünnung wurden mit Hilfe einer Bürker-Türk-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden die Zellen der 4 Großquadrate, in denen jeweils 4 Kleinquadrate mit 16 Kammern liegen, ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Danach musste mit 1000 multipliziert und wegen der vorangegangenen Verdünnung von 1:10, durch 10 dividiert werden. Der erhaltene Wert stellt die Anzahl der Zellen pro 10 µl dar. Die benötigte Zellzahl pro Sphäroid betrug 2000 bei SW620- und 3000 bei MCF7-Sphäroiden. Für eine 96-Wellplatte wurde zur Vereinfachung die Berechnung mit 100 statt 96 Wells durchgeführt. Zur Berechnung der notwendigen Menge an Zellsuspension in µl musste 2 bzw. $3 \cdot 10^5$ durch die oben errechnete Zellzahl pro 10 µl dividiert werden. Diese Menge an Zellsuspension wurde aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und zur Medium-Methylcellulose-Mischung hinzugefügt.

Diese Mischung wurde in eine V-Wanne überführt, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert und mit einer 12er-Multipipette in die 96-Well-Platte pipettiert.

Um die Zellen in Kontakt zu bringen, wurden die Platten anschließend zentrifugiert. SW620-Sphäroide mussten 30 min bei 1000 U/min zentrifugiert werden, MCF-7-Sphäroide hingegen nur 15 min, da sie leichter adhärirten.

Die Inkubationszeit betrug 3-5 Tage, anschließend konnten die Sphäroide für die Versuche verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kolonkrebs-sphäroide immer nach 4 Tagen verwendet, da sich nach 5 Tagen schon ein großer nekrotischer Kern bildete. MCF-7-Brustkrebssphäroide zeigten weitaus bessere kugelförmige Gestalt als SW620-Sphäroide und konnten nach 3 Tagen optimal verwendet werden.

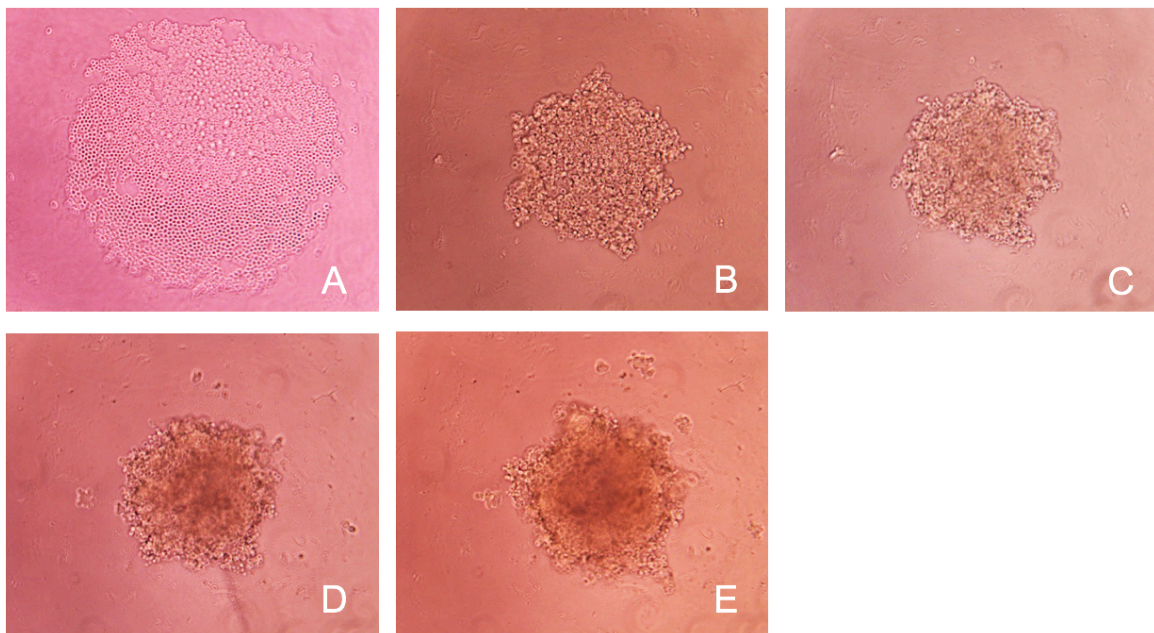


Abbildung 8: Verlauf des Sphäroidwachstums von SW620-Zellen

A: Sphäroid nach 30 Minuten Zentrifugation, B: Sphäroid nach 1 Tag, C: Sphäroid nach 2 Tagen, D: Sphäroid nach 3 Tagen, E: Sphäroid nach 4 Tagen

6.1.3 Herstellung eines Monolayers

Für die CCID-Versuche war ein konfluenten Monolayer aus Endothelzellen erforderlich. Da die Experimente in 4 Konzentrationen mit jeweils 3 Wells für Kontrolle sowie 10, 25, 75/50 μM Flavonoidlösungen durchgeführt wurden,

mussten die Endothelzellen in 12 Wells einer 24-Well-Platte ausgesät werden. Die Monolayer wurden 1 bis 2 Tage vor dem Experiment in einer Verdünnung von 1:3 beziehungsweise 1:5 hergestellt.

Die Herstellung eines Monolayers erfolgte jeweils im Rahmen der Subkultivierung der Endothelzellen (siehe 6.1.1, S. 18).

Nach der Resuspension des Zellpellets im Kultivierungsmedium wurde die dem Verdünnungsgrad entsprechende Zellsuspensionsmenge entnommen und mit EGM-2MV-Medium auf 12 ml aufgefüllt. Davon wurde 1 ml in jedes der 12 markierten Wells pipettiert. Anschließend wurde der Monolayer für 24 Stunden (bei einer Verdünnung von 1:3) beziehungsweise für 48 Stunden (bei einer Verdünnung von 1:5) inkubiert.



Abbildung 9: Monolayer

6.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zellen niedriger Passagen wurden in regelmäßigen Abständen eingefroren, um bei Bedarf rasch Zellen hoher Vitalität zur Verfügung zu haben.

Für das Einfrieren der Zellen wurden Kryotubes verwendet. Zellen einer 75 cm² großen Kulturflasche konnten auf 3 Kryotubes verteilt werden. In jedes Kryotube wurden 100 µl 99 %iges DMSO vorgelegt. DMSO diente als Frostschutzmittel, da die Zellen durch Bildung von Eiskristallen ansonsten zerstört worden wären.

Die konfluenten Zellen mussten zuerst mit DPBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und zentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde dann in 2,70 ml FCS resuspendiert und davon jeweils 0,90 ml zum vorgelegten DMSO pipettiert. Das Kryotube wurde kurz geschwenkt, bevor es für 15 Minuten auf Eis gelegt wurde. Dieser Schritt musste rasch geschehen, weil konzentriertes DMSO eine zytotoxische Wirkung besitzt. Danach wurden die Kryotubes in einem Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Gefrierschrank entnommen und für etwa 15 Minuten auf Eis gelegt. Dann wurde die gefrorene Zellsuspension mit den Händen angewärmt und mit 5 ml vorgewärmten Kultivierungsmedium versetzt. Um das zytotoxische DMSO zu entfernen, wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 5 ml frischen Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine 25 cm² Kulturflasche überführt und inkubiert.

Nach etwa 24 Stunden wurde ein vollständiger Medienwechsel vollzogen um mögliche DMSO-Rückstände zu entfernen. Für gewöhnlich zeigten diese Zellen einige Tage später ein konfluentes Wachstum und konnten für die Experimente verwendet werden.

6.2 CCID- Assay

6.2.1 Durchführung der Versuche

Für die Experimente waren ein konfluenter Monolayer sowie 3-5 Tage inkubierte Sphäroide notwendig. Die Qualität des Monolayers und der Sphäroide wurde vor dem Experiment kontrolliert. Waren weniger dicht bewachsene Zonen auf dem Monolayer vorhanden, wurden diese markiert, damit diese Stellen später von der Platzierung der Sphäroide ausgespart werden konnten.

Zuerst wurden 18 Stück 15 ml Zentrifugenröhrchen vorbereitet und 12 davon mit jeweils 1 ml DPBS befüllt. Sie dienten zum Waschen der Sphäroide. Zur Bereitung der Flavonoidverdünnungen wurden in 4 Röhrchen jeweils 3 ml EGM-2MV vorbereitet. Für die Waschschrte wurde ein weiteres Plastikvial mit 12 ml DPBS

befüllt. Zur Bereitstellung des CellTrackers wurden 6 ml EGM-2MV in ein Vial vorgelegt.

Der CellTracker Green wurde auf Zimmertemperatur angewärmt und 1,2 µl (0,2 µl/ml Medium) in das vorbereitete Vial pipettiert und im Vortex gemischt.

Anschließend wurde das EGM-2MV Medium vom Monolayer abgenommen und die Endothelzellen mit DPBS gewaschen. Für die Auswertung und Differenzierung der Sphäroide wurden die Endothelzellen mit der hergestellten CellTracker-Medium-Mischung (je 0,5 ml pro Well) angefärbt. Dazu wurde der Monolayer für 1 Stunde mit der Mischung inkubiert.

Zum Waschen der Sphäroide wurden in jedes der 12 vorbereiteten Röhrchen mit 1 ml DPBS 8 Sphäroide aus der 96-Well-Platte übergeführt, wobei ein Stück der Spitze der 1-ml-Eppendorfpipette abgeschnitten wurde, um die Sphäroide nicht zu beschädigen.

Die Experimente wurden mit 3 verschiedenen Konzentrationen (75 µM bzw. 50 µM bei Gossypetin, 25 µM, 10 µM) des jeweiligen Flavonoids und einer Kontrolle durchgeführt. Zur Erstellung der Flavonoidverdünnungen wurden die 50 mM Stammlösungen mit DMSO in Eppendorfgläsern auf 25 und 10 mM verdünnt.

Tabelle 4: Berechnung der Flavonoidverdünnungen aus einer 50 mM Stammlösung

Konzentration	Menge der 50 mM Stammlösung	Menge an DMSO	Verdünnung
10 mM	1,0 µl	4,0 µl	1:5
25 mM	2,5 µl	2,5 µl	1:1

Jeweils 3 µl der hergestellten Verdünnungen wurde in die Zentrifugenröhrchen zum vorgelegten EGM-2MV Medium pipettiert. Für die Höchstkonzentration von 75 µM wurden 4,5 µl der 50 mM Stammlösung zum Medium hinzugefügt.

Um Lösungsmittelleffekte auszuschließen, wurde für die Kontrolle 3 µl DMSO in das EGM-2MV Medium gemischt.

Nachdem die gewaschenen Sphäroide abgesunken waren, konnte der Medienüberstand entfernt werden. Dann wurden die Sphäroide unter leichtem Aufwirbeln mit je 1 ml der Flavonoidverdünnungen bzw. der Kontrolle versetzt und für 30 min inkubiert.

Die Endothelzellen mit dem CellTracker wurden nach einer Stunde aus dem Inkubator genommen, anschließend wurde der CellTracker abpipettiert. Mit einem Waschschrift mit 0,5 ml DPBS pro Well wurden etwaige Rückstände des CellTrackers entfernt. Dann wurde EGM-2MV in jedes Well pipettiert und der Monolayer bis zur Überführung der Sphäroide inkubiert.

Nach der Inkubation der Sphäroide mit den Flavonoidverdünnungen wurde das Medium über den Endothelzellen entnommen und die Sphäroide auf den Zellrasen platziert.

Es folgte eine Inkubationszeit von 4 Stunden für SW620- und MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen und 3 Stunden für SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen.

6.2.2 Dokumentation

Die Dokumentation der Experimente erfolgte mit dem Axiovert 35 Fluoreszenzmikroskop mit integrierter Kamera. Mit der ZEN Pro Imaging Software von Zeiss konnten Fotos in 2 Bildebenen angefertigt werden. In Bildebene 1 wurden die gefärbten Endothelzellen durch einen FITC-Filter und UV-Licht visualisiert. Bildebene 2 entstand mit üblicher Beleuchtung und zeigte ein Abbild der Sphäroide in schwarz-weiß.

Durch die Aufnahme der Bilder in zwei verschiedenen Ebenen konnten die Gaps im Zellrasen und die Sphäroide für die weitere Interpretation vermessen werden.

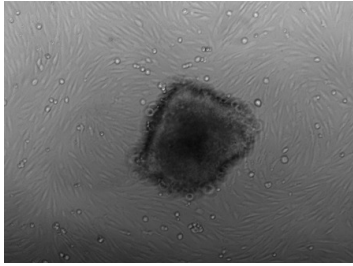


Abbildung 10: Bildebene 2:
Normalbeleuchtung

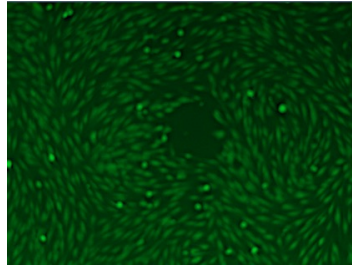


Abbildung 11: Bildebene 1:
UV-Licht und FITC-Filter

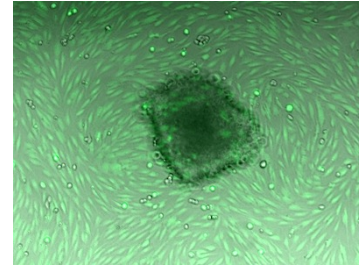


Abbildung 12: Kombination
beider Bildebenen

Die 24-Well-Platte wurde nach der Inkubationszeit aus dem Inkubator entnommen und für 5-10 min in den Kühlschrank gestellt, um die Enzymreaktionen zu stoppen und den Zustand der Zellen für die Dokumentation zu fixieren.

Mit der ZEN Pro Imaging Software konnten alle Sphäroide einzeln fotografiert werden.

6.2.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der ZEN 2012 lite Software der Firma Zeiss. Die Konturen der Sphäroide wurden in Bildebene 2 mit Hilfe der „Graphics-Contour“ Funktion manuell umrandet. Die Flächen wurden automatisch berechnet und in eine Excel-Tabelle übertragen. Die Größe der entstandenen Gaps wurde in Bildebene 1 vermessen und ebenfalls in die Excel-Datei übertragen. Für eine statistische Signifikanz waren mindestens 12 Messungen pro Verdünnung notwendig.

Die Verhältnisse von Gap zu Sphäroid-Größen wurden mit Hilfe von Excel berechnet.

Die Mittelwerte der Kontrolle wurden als 100 % gesetzt. Aus mindestens 12 bis maximal 24 Sphäroiden nach Behandlung mit 10 μM , 25 μM und 75/50 μM Flavonoidlösung wurden ebenfalls Mittelwerte berechnet.

Die Werte konnten anschließend für die weitere statistische Auswertung in GraphPad Prism übertragen werden.

GraphPad Prism:

Die Statistiksoftware GraphPad Prism wurde zur Erstellung von Ergebnisdigrammen und zur Berechnung statistischer Daten herangezogen.

Die Signifikanz wurde mit einem gepaartem T-Test bestimmt.

Um die Wirkung der einzelnen Flavonoide zu vergleichen, wurden IC_{50} -Werte ermittelt.

Die IC_{50} -Werte wurden mithilfe von GraphPad Prism über eine halblogarithmische Darstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve ermittelt.

7 Ergebnisse der CCID-Assays

7.1 Wirkung von Oroxylin A

Oroxylin A ist ein Flavon mit einer OCH₃-Gruppe in Position 6 und einer OH-Gruppe in Position 5 und 7. Die Substanz weist keine Hydroxylierung in Ring B auf.

7.1.1 Wirkung von Oroxylin A auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tabelle 5: Parameter der Testung von Oroxylin A (SW620, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	16	100	64,31 µM
10 µM	15	87,02	
25 µM	17	74,76	
75 µM	17	45,42	

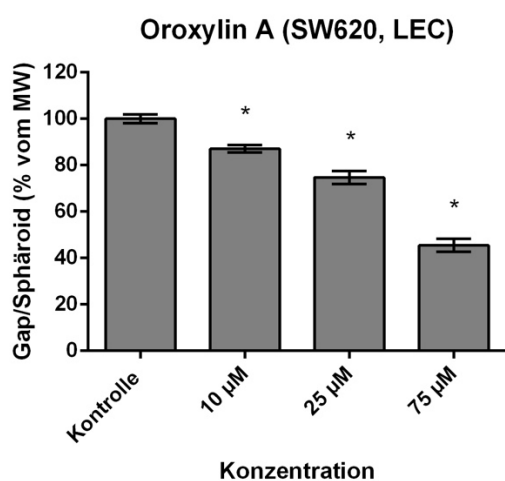


Abbildung 13: Hemmung der Gap-Bildung durch Oroxylin A (SW620, LEC); p<0,05

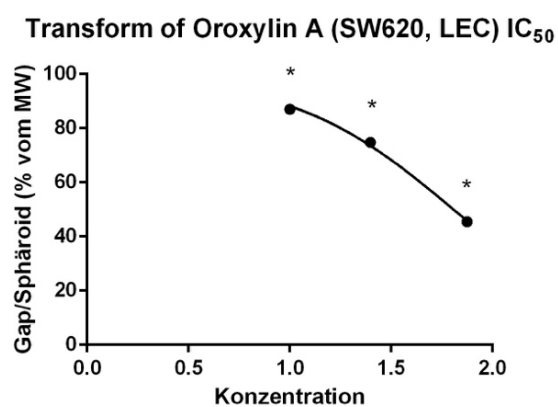


Abbildung 14: Berechnung der IC₅₀ von Oroxylin A (SW620, LEC); p<0,05

Oroxylin A führte im Testsystem mit SW620-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen zu einer signifikanten Abnahme der Gap-Bildung mit geringer Standardabweichung in allen Konzentrationen ($p < 0,05$). Bei der Höchstkonzentration von $75 \mu\text{M}$ wurde die Größe der CCID-Flächen um etwa 55 % gehemmt. Die IC_{50} von $64,31 \mu\text{M}$ bestätigt die gute Inhibierung der Gap-Entstehung in diesem Experiment.

7.1.2 Wirkung von Oroxylin A auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tabelle 6: Parameter der Testung von Oroxylin A (SW620, BEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC_{50}
Kontrolle	15	100	67,12 μM
10 μM	17	91,36	
25 μM	17	81,07	
75 μM	15	45,76	

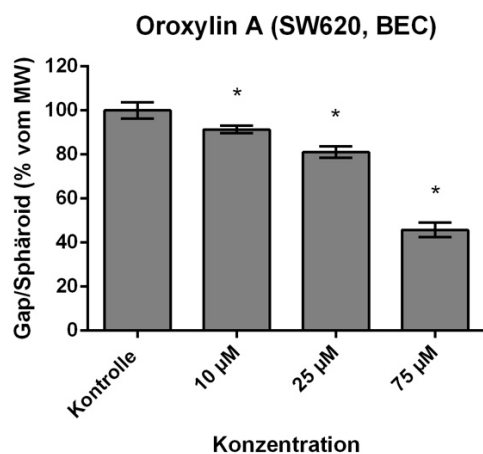


Abbildung 15: Hemmung der Gap-Bildung durch Oroxylin A (SW620, BEC); $p < 0,05$

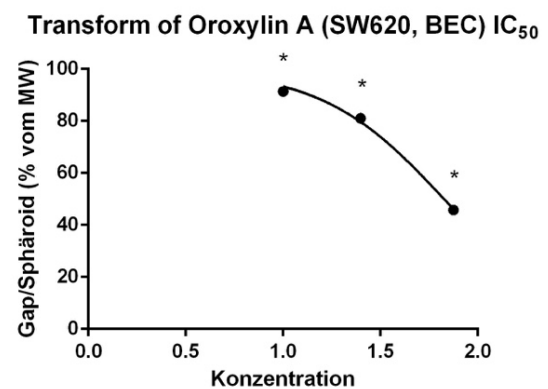


Abbildung 16: Berechnung der IC_{50} von Oroxylin A (SW620, BEC); $p < 0,05$

In der Versuchsanordnung SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen zeigte Oroxylin A annähernd die gleiche Wirkintensität wie im Testsystem SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen. Die IC_{50} war in beiden Testsystemen fast ident.

7.2 Wirkung von Wogonin

Wogonin ist ein Flavon mit einer Methoxygruppe in Position 8, einer Hydroxylgruppe in Position 5, 7 und keiner Hydroxylierung in Ring B.

Wogonin gehörte zusammen mit Oroxylin A zu den lipophilsten der getesteten Flavonoide. Die beiden Flavone unterscheiden sich nur durch die unterschiedliche Position der Methoxy-Gruppe in Ring A. Bei Oroxylin A befindet sich die OCH₃-Gruppe in Position 6 - im Gegensatz zu Position 8 bei Wogonin.

7.2.1 Wirkung von Wogonin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tabelle 7: Parameter der Testung von Wogonin (SW620, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	17	100	59,62 µM
10 µM	15	88,23	
25 µM	17	76,95	
75 µM	16	42,12	

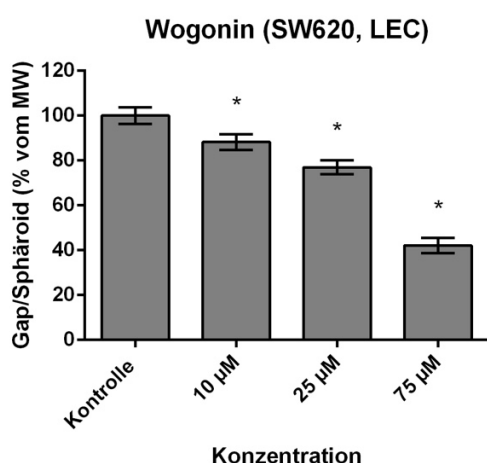


Abbildung 17: Hemmung der Gap-Bildung durch Wogonin (SW620, LEC); p<0,05

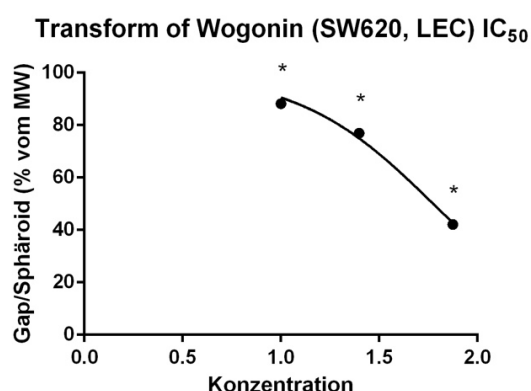


Abbildung 18: Berechnung der IC₅₀ von Wogonin (SW620, LEC); p<0,05

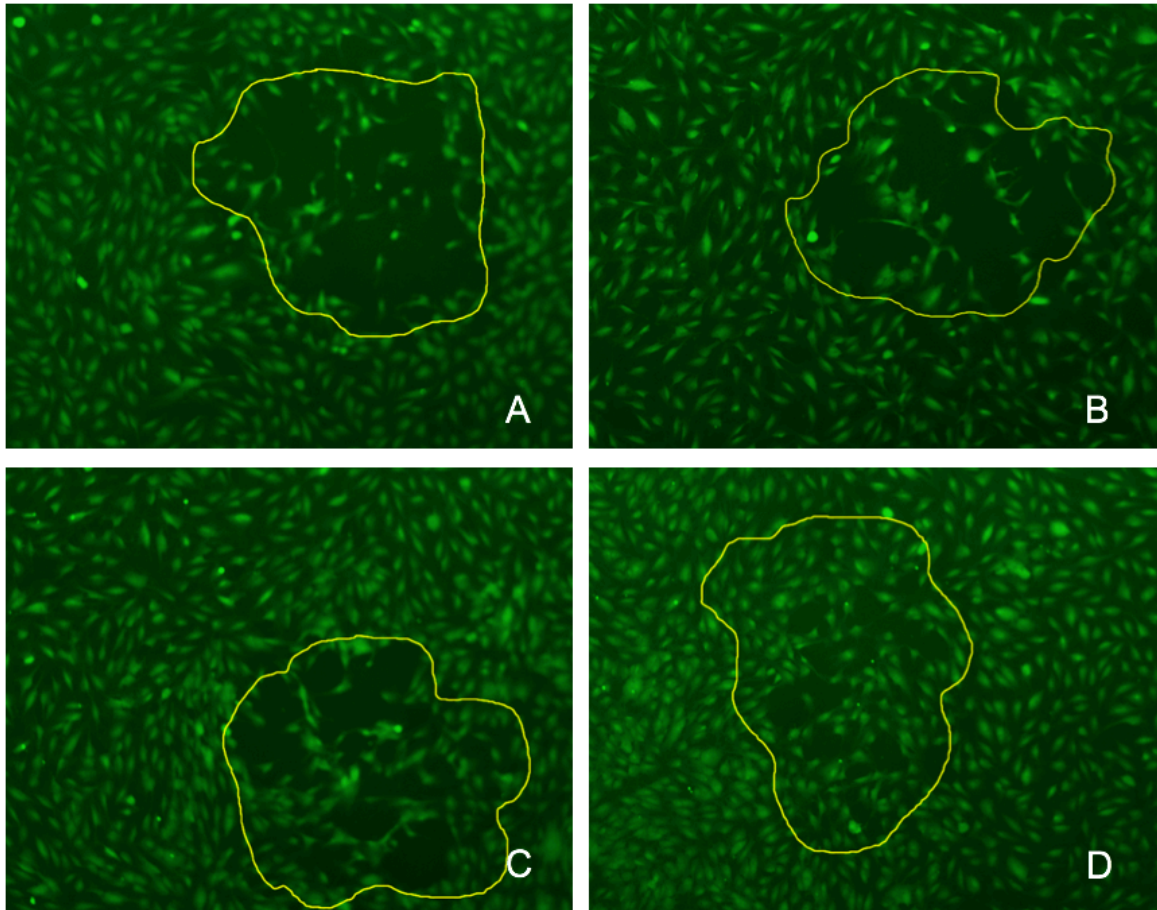


Abbildung 19: Abnahme der CCIDs durch die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Wogonin (SW620, LEC)

A: Gaps einer Kontrolle (ohne Substanzeinfluss), B: Gaps bei Behandlung mit 10 μM Wogonin, C: Gaps bei Behandlung mit 25 μM Wogonin, D: Gaps bei Behandlung mit 75 μM Wogonin. Die gelben Umrandungen stellen die Umrisse der darüberliegenden Sphäroide dar.

Im Testsystem SW620-Sphäroide auf LECs führte Wogonin zu einer deutlichen Verkleinerung der CCIDs (Abbildung 19). Die IC_{50} lag bei 59,62 μM .

7.2.2 Wirkung von Wogonin auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tabelle 8: Parameter der Testung von Wogonin (SW620, BEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	17	100	45,93 µM
10 µM	15	93,08	
25 µM	14	85,99	
75 µM	13	19,46	

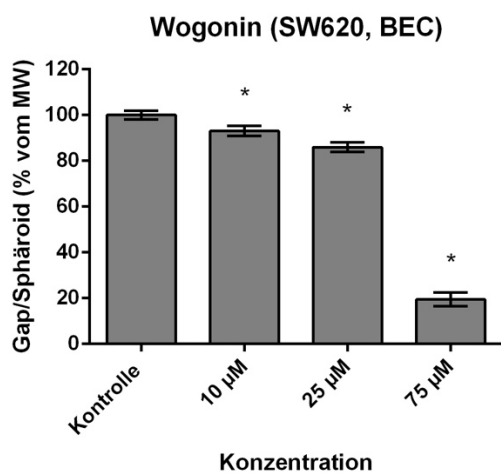


Abbildung 20: Hemmung der Gap-Bildung durch Wogonin (SW620, BEC); $p < 0,05$

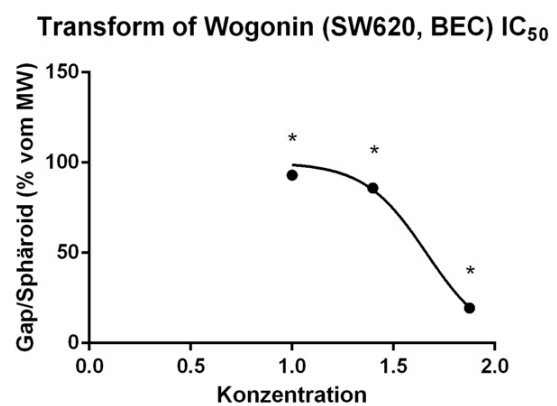


Abbildung 21: Berechnung der IC₅₀ von Wogonin (SW620, BEC); $p < 0,05$

In der Versuchsanordnung mit SW620-Sphäroiden auf Blutendothelzellen kam es zu einer starken Hemmung der CCIDs bei einer Konzentration von 75 µM, wo die Gap-Bildung um ca. 80 % gehemmt wurde. Die IC₅₀ betrug 45,93 µM und bestätigt die gute anti-intravasative Wirkung von Wogonin in diesem Experiment.

7.3 Wirkung von Norwogonin

Norwogonin unterscheidet sich von Wogonin durch die Verknüpfung einer Hydroxyl- statt einer Methoxygruppe in Position 8.

7.3.1 Wirkung von Norwogonin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tabelle 9: Parameter der Testung von Norwogonin (SW620, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	18	100	nicht extrapoliert
10 µM	17	91,42	
25 µM	15	88,36	
75 µM	15	86,64	

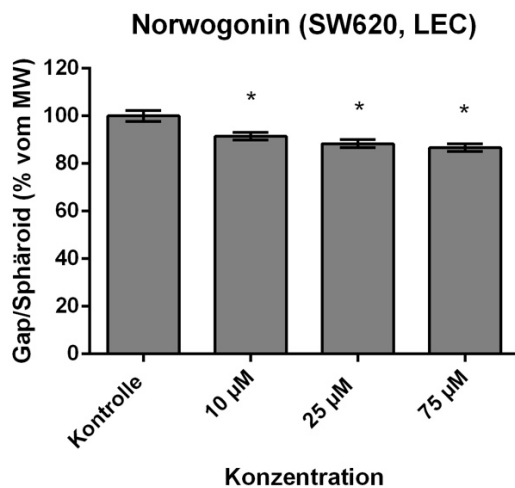


Abbildung 22: Hemmung der Gap-Bildung durch Norwogonin (SW620, LEC); $p < 0,05$

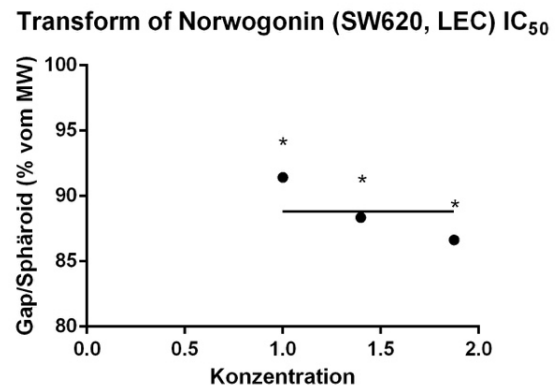


Abbildung 23: Berechnung der IC₅₀ von Norwogonin (SW620, LEC); $p < 0,05$

Norwogonin zeigte eine minimale, aber signifikante Reduktion der CCID- Flächen auf LECs. Die Gap-Bildung wurde um weniger als 15 % gehemmt. Die IC₅₀ konnte aufgrund des geringen Effektes von Norwogonin nicht extrapoliert werden.

7.3.2 Wirkung von Norwogonin auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tabelle 10: Parameter der Testung von Norwogonin (SW620, BEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	14	100	377,90 µM
10 µM	14	96,68	
25 µM	14	86,42	
75 µM	13	78,23	

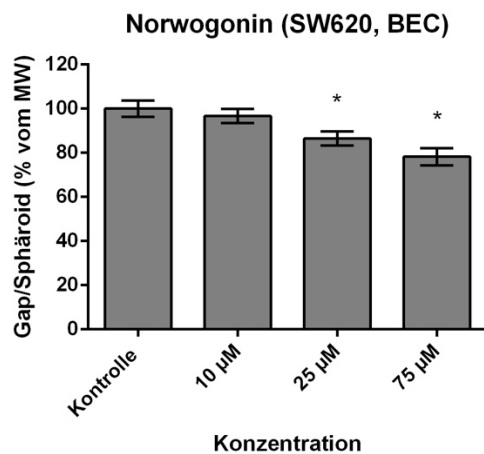


Abbildung 24: Hemmung der Gap-Bildung durch Norwogonin (SW620, BEC); $p < 0,05$

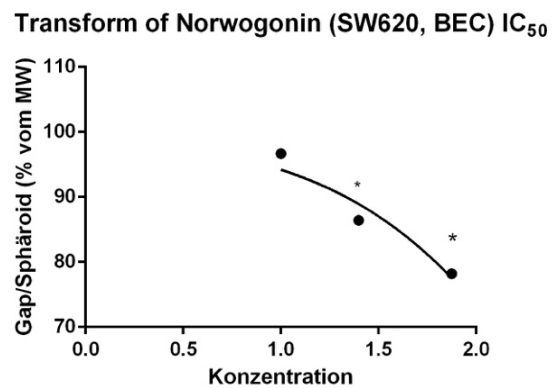


Abbildung 25: Berechnung der IC₅₀ von Norwogonin (SW620, BEC); $p < 0,05$

Im Testsystem SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen zeigte Norwogonin ebenfalls eine sehr geringe Wirkung. Die extrapolierte IC₅₀ betrug 377,90 µM.

7.3.3 Wirkung von Norwogonin auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tabelle 11: Parameter der Testung von Norwogonin (MCF7, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	17	100	nicht extrapoliert
10 µM	16	98,07	
25 µM	14	96,39	
75 µM	15	93,16	

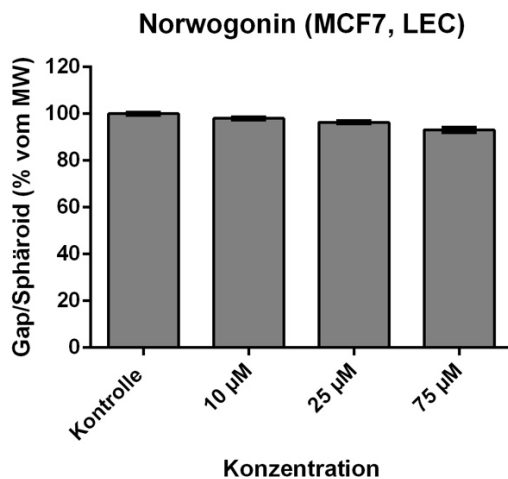


Abbildung 26: Hemmung der Gap-Bildung durch Norwogonin (MCF7, LEC); $p < 0,05$

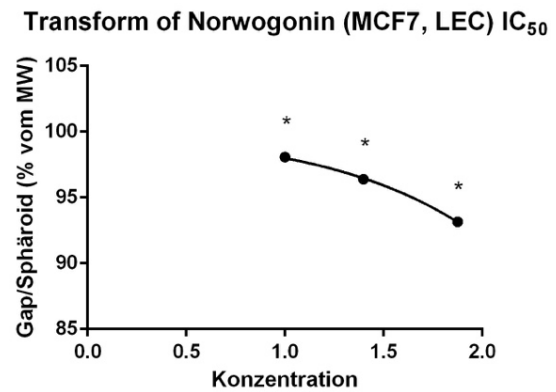


Abbildung 27: Berechnung der IC₅₀ von Norwogonin (MCF7, LEC); $p < 0,05$

Norwogonin mit MCF7-Sphäroiden zeigte, wie auch schon im Testsystem mit SW620-Sphäroiden auf LECs keine Wirkung. Die IC₅₀ konnte auch hier nicht extrapoliert werden. Aufgrund der minimalen Effekte in allen drei Versuchsreihen kann Norwogonin im CCID-Assay als unwirksam betrachtet werden.

7.4 Wirkung von Chrysoeriol

Chrysoeriol ist ein Flavon mit einer OCH₃-Gruppe in Position 3' und einer OH-Gruppe in Position 5, 7 und 4'.

7.4.1 Wirkung von Chrysoeriol auf SW620-Sphäroide auf LECs

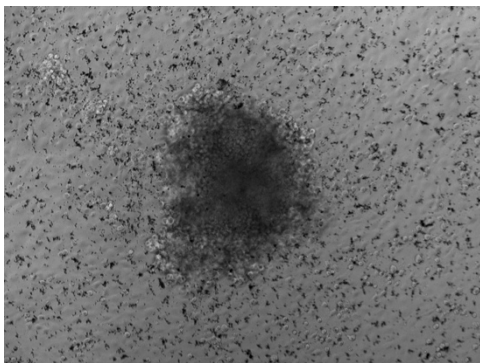


Abbildung 28: Kristallbildung bei 75 µM Chrysoeriol (SW620, LEC)

Bei Chrysoeriol kam es zu einer intensiven Kristallbildung beim Zusatz von 75 und 25 µM zum Puffer. Vermutlich war die Löslichkeitsgrenze bei 25 µM bereits überschritten. Die Wahl eines anderen Lösungsmittels statt DMSO wäre eine Möglichkeit, das Ausfallen zu unterbinden. Aufgrund der Vergleichbarkeit mit den anderen Experimenten wurde dies jedoch nicht durchgeführt.

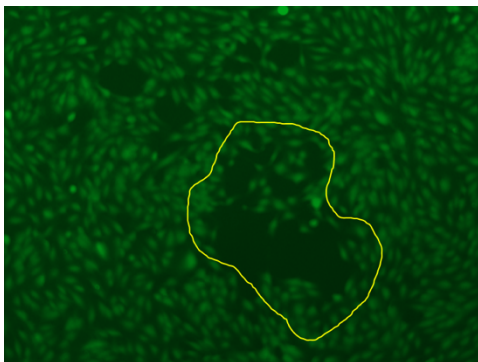


Abbildung 29: Monolayer Kontrolle (SW620, LEC)

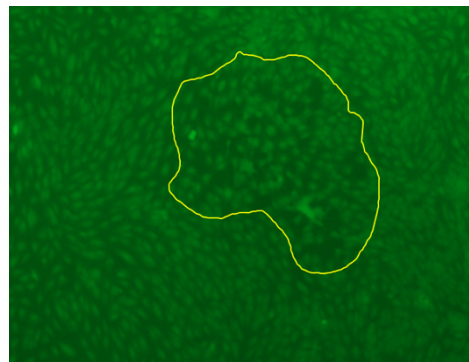


Abbildung 30: Monolayer nach Behandlung der Sphäroide mit 25 µM Chrysoeriol (SW620, LEC)

Des Weiteren zeigte sich bei Chrysoeriol eine verstärkte Proliferation der Endothelzellen nach der Inkubation. In Abbildung 30 scheint die Endothelschicht vielzelliger und die Endothelzellen kleiner im Gegensatz zur Kontrolle (Abbildung 29). Aufgrund dieser Tatsachen war bei Chrysoeriol keine IC₅₀-Bestimmung möglich. Die Substanz konnte daher nicht in die Auswertung miteinbezogen werden.

7.4.2 Wirkung von Chrysoeriol auf SW620-Sphäroide auf BECs

Wie schon bei der Testung von SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen kam es auch auf Blutendothelzellen zur Kristallbildung von Chrysoeriol ab einer Konzentration von 25 µM und zur verstärkten Proliferation der Endothelzellen nach der Inkubation. Daher war auch hier keine Auswertung möglich.

7.5 Wirkung von Diosmetin

Diosmetin ist ein Flavon mit einer Methoxygruppe in Position 4' und einer Hydroxylgruppe in Position 5, 7 und 3'.

Diosmetin unterscheidet sich von Chrysoeriol durch die unterschiedliche Position der Substituenten in Ring B. Chrysoeriol trägt die OCH₃-Gruppe in Position 3' und die OH-Gruppe in Position 4'. Bei Diosmetin ist die Position der beiden Substituenten in Ring B genau umgekehrt.

7.5.1 Wirkung von Diosmetin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tabelle 12: Parameter der Testung von Diosmetin (SW620, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	13	100	155,10 µM
10 µM	15	81,32	
25 µM	13	71,29	
75 µM	13	59,70	

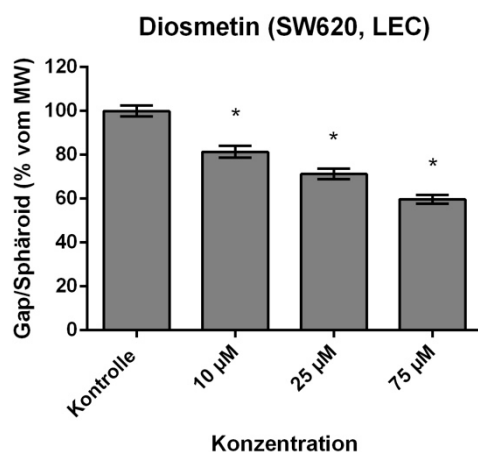


Abbildung 31: Hemmung der Gap-Bildung durch Diosmetin (SW620, LEC); p<0,05

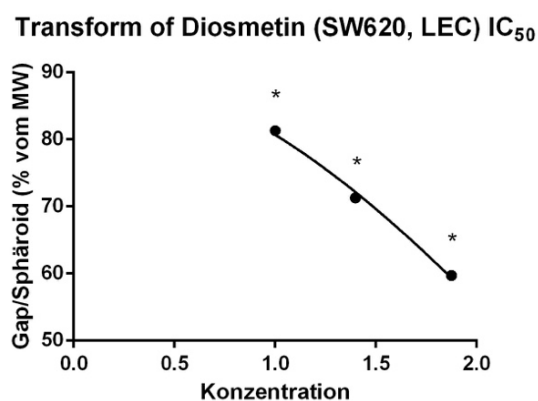


Abbildung 32: Berechnung der IC₅₀ von Diosmetin (SW620, LEC); p<0,05

Die Größe der CCID-Flächen nahm bei zunehmender Konzentration von Diosmetin kontinuierlich ab. Bei der höchsten Konzentration wurde sie um ca. 40 % reduziert. Die IC_{50} war mit 155,10 μM im Vergleich zu den anderen Flavonoiden aber sehr hoch.

7.5.2 Wirkung von Diosmetin auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tabelle 13: Parameter der Testung von Diosmetin (SW620, BEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC_{50}
Kontrolle	18	100	86,08 μM
10 μM	14	87,62	
25 μM	15	61,56	
75 μM	12	55,56	

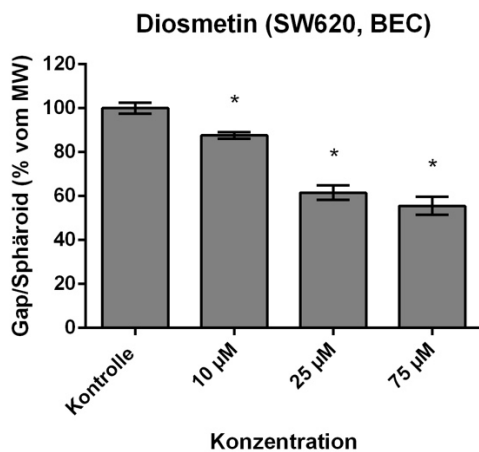


Abbildung 33: Hemmung der Gap-Bildung durch Diosmetin (SW620, BEC); $p < 0,05$

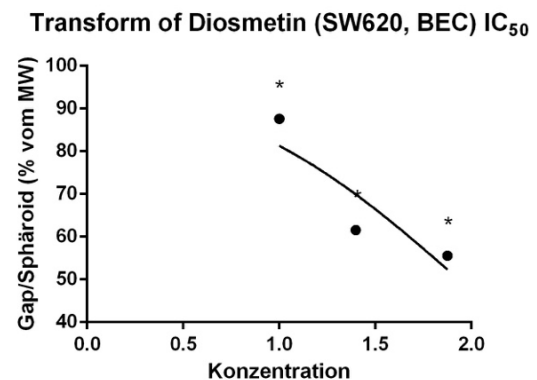


Abbildung 34: Berechnung der IC_{50} von Diosmetin (SW620, BEC); $p < 0,05$

Im Testsystem SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen zeigte Diosmetin in der Höchstkonzentration eine Hemmwirkung auf die Gap-Bildung von ca. 45 %. Die IC_{50} war mit 86,08 μM etwa um die Hälfte niedriger als im Experiment mit SW620-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen.

7.6 Wirkung von Nepetin

Nepetin ist ein Flavon mit einer Hydroxylgruppe in Position 7, 4' und 5'. Die Substanz besitzt außerdem eine Methoxygruppe in Position 6. Sie stellt eine wichtige Komponente des Flavonoidkomplexes von *Scrophularia lucida* L. dar.

7.6.1 Wirkung von Nepetin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tabelle 14: Parameter der Testung von Nepetin (SW620, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	17	100	35,20 µM
10 µM	14	90,71	
25 µM	17	64,32	
75 µM	16	21,03	

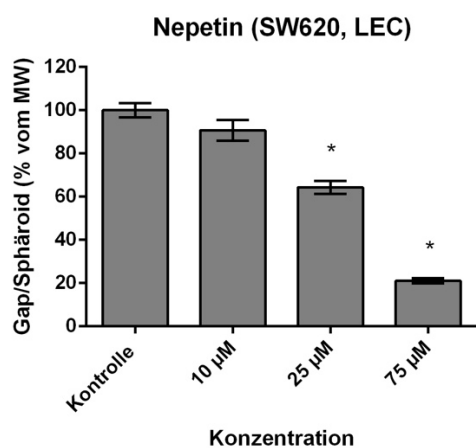


Abbildung 35: Hemmung der Gap-Bildung durch Nepetin (SW620, LEC); $p < 0,05$

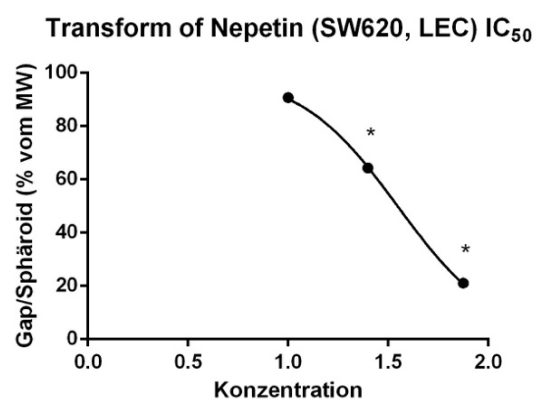


Abbildung 36: Berechnung der IC₅₀ von Nepetin (SW620, LEC); $p < 0,05$

Durch Behandlung mit 75 µM Nepetin kam es zu einer starken Hemmung der CCIDs durch SW620-Sphäroide auf LECs, wobei die Gap-Bildung um etwa 80 % reduziert wurde. Die IC₅₀ betrug 35,20 µM.

7.6.2 Wirkung von Nepetin auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tabelle 15: Parameter der Testung von Nepetin (SW620, BEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	16	100	113,10 µM
10 µM	18	93,00	
25 µM	15	87,95	
75 µM	14	61,98	

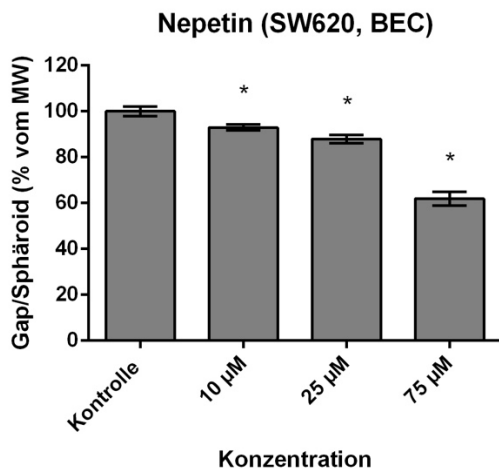


Abbildung 37: Hemmung der Gap-Bildung durch Nepetin (SW620, BEC); $p < 0,05$

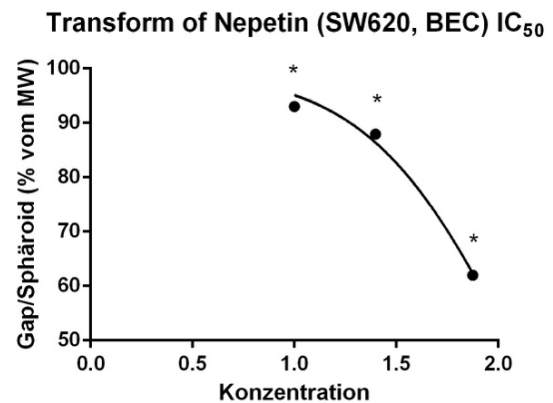


Abbildung 38: Berechnung der IC₅₀ von Nepetin (SW620, BEC); $p < 0,05$

Im Testsystem SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen zeigte Nepetin eine deutlich geringere Wirkung als im Experiment mit Lymphendothelzellen. Die Dosis-Wirkungs-Kurve verlief weitaus flacher. Die IC₅₀ mit 113,10 µM war deutlich höher.

7.7 Wirkung von Gossypetin

Gossypetin war mit 6 OH-Gruppen in Position 3, 5, 7, 8, 3' und 4' das hydrophilste Flavonoid in dieser Testreihe. Im Gegensatz zu allen anderen Testsubstanzen war Gossypetin zudem das einzige Flavonol. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen musste die Höchstkonzentration von 75 μM auf 50 μM gesenkt werden.

7.7.1 Wirkung von Gossypetin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tabelle 16: Parameter der Testung von Gossypetin (SW620, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100	62,26 μM
10 μM	19	92,46	
25 μM	15	74,14	
50 μM	14	57,56	

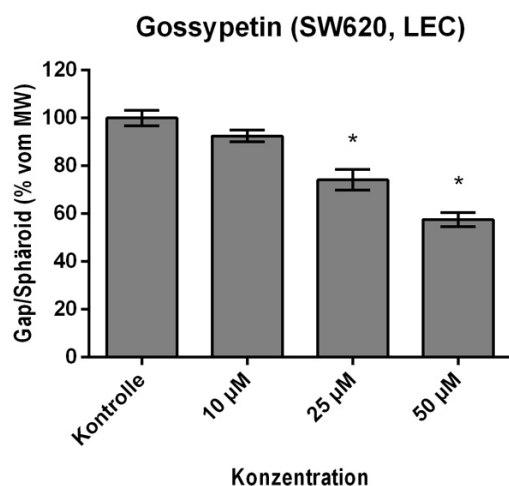


Abbildung 39: Hemmung der Gap-Bildung durch Gossypetin (SW620, LEC); $p < 0,05$

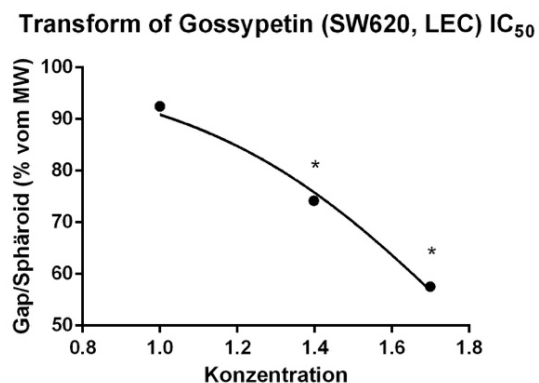


Abbildung 40: Berechnung der IC₅₀ von Gossypetin (SW620, LEC); $p < 0,05$

Gossypetin zeigte in der Versuchsanordnung SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen eine moderate anti-intravasative Wirkung. Eine signifikante Reduktion der CCIDs war ab einer Konzentration von 25 μM gegeben ($p < 0,05$).

7.7.2 Wirkung von Gossypetin auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tabelle 17: Parameter der Testung von Gossypetin (SW620, BEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	18	100	26,19 μM
10 μM	14	91,63	
25 μM	13	49,98	
50 μM	14	22,08	

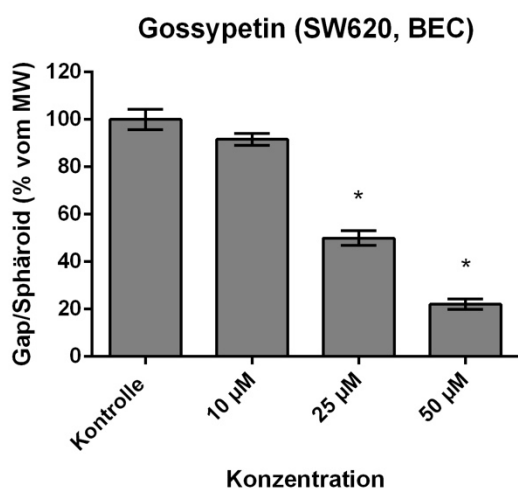


Abbildung 41: Hemmung der Gap-Bildung durch Gossypetin (SW620, BEC); $p < 0,05$

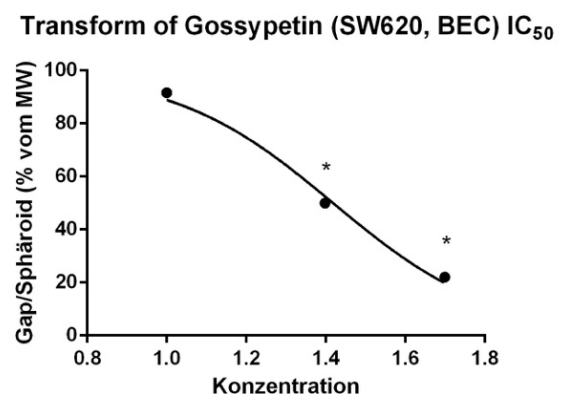


Abbildung 42: Berechnung der IC₅₀ von Gossypetin (SW620, BEC); $p < 0,05$

Obwohl Gossypetin, aufgrund der 6 OH-Gruppen relativ hydrophil ist, zeigte die Substanz in diesem Experiment eine sehr gute Wirkung. Bei Behandlung mit 50 μM betrug die Größe der CCIDs nur mehr etwa ein Fünftel im Vergleich zu unbehandelten Sphäroiden. Mit einer IC₅₀ von 26,19 μM erreichte Gossypetin in

dieser Versuchsanordnung das beste Ergebnis aller CCID-Assays dieser Testreihe.

7.8 Wirkung von Homoeriodictyol

Homoeriodictyol ist ein Flavanon und weist jeweils eine Hydroxylgruppe in Position 5, 7 und 4' und eine Methoxygruppe in Position 3' auf.

7.8.1 Wirkung von Homoeriodictyol auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tabelle 18: Parameter der Testung von Homoeriodictyol (SW620, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	17	100	138,80 µM
10 µM	16	95,92	
25 µM	17	84,14	
75 µM	21	65,97	

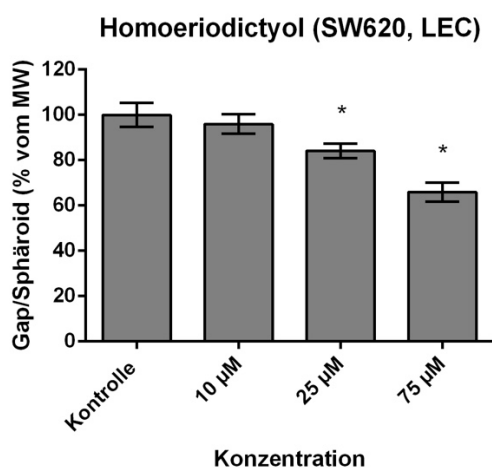


Abbildung 43: Hemmung der Gap-Bildung durch Homoeriodictyol (SW620, LEC); p<0,05

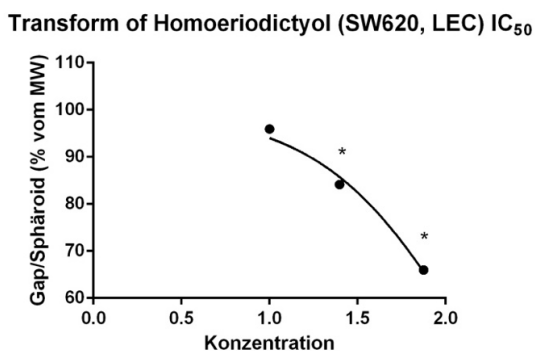


Abbildung 44: Berechnung der IC₅₀ von Homoeriodictyol (SW620, LEC); p<0,05

In der Versuchsanordnung mit SW620-Sphäroiden auf LECs zeigte sich eine dosisabhängige, minimale Verminderung der Gap-Entstehung.

7.8.2 Wirkung von Homoeriodictyol auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tabelle 19: Parameter der Testung von Homoeriodictyol (SW620, BEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	13	100	nicht extrapoliert
10 µM	12	95,97	
25 µM	17	86,37	
75 µM	13	83,08	

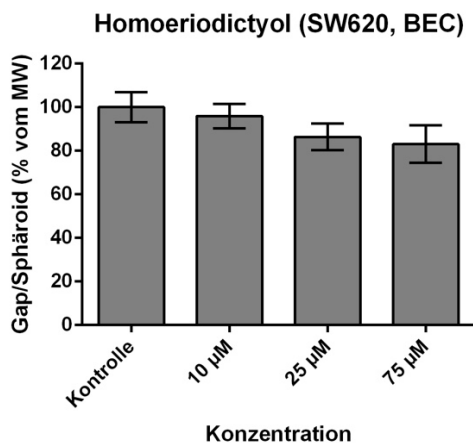


Abbildung 45: Hemmung der Gap-Bildung durch Homoeriodictyol (SW620, BEC); p<0,05

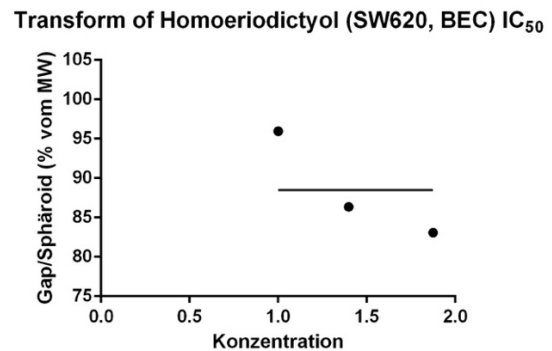


Abbildung 46: Berechnung der IC₅₀ von Homoeriodictyol (SW620, BEC); p<0,05

Im Testsystem SW620-Sphäroide mit Blutendothelzellen zeigte Homoeriodictyol keine Wirkung. Die Gap-Bildung wurde bei der Höchstkonzentration von 75 µM um etwa 17 % reduziert. Die IC₅₀ konnte aufgrund des geringen Effektes von Homoeriodictyol nicht extrapoliert werden.

7.9 Wirkung von Eriodictyol

Eriodictyol ist wie Homoeriodictyol ein Flavanon. Die Substanz unterscheidet sich von Homoeriodictyol durch eine Hydroxyl- anstatt einer Methoxygruppe in Position 3'.

7.9.1 Wirkung von Eriodictyol auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tabelle 20: Parameter der Testung von Eriodictyol (MCF7, LEC)

Konzentration	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW Gap/Sphäroid (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	16	100	nicht extrapoliert
10 µM	16	97,52	
25 µM	14	96,21	
75 µM	16	90,95	

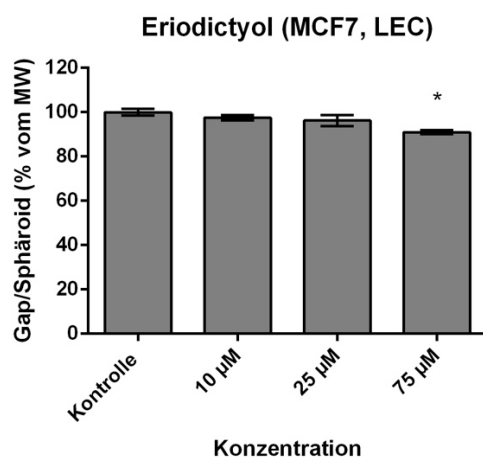


Abbildung 47: Hemmung der Gap-Bildung durch Eriodictyol (MCF7, LEC); $p < 0,05$

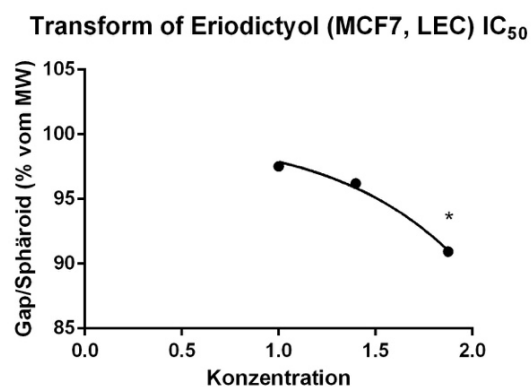


Abbildung 48: Berechnung der IC₅₀ von Eriodictyol (MCF7, LEC); $p < 0,05$

Die Substanz war bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit getestet worden (Smöch, 2015). Weil Eriodictyol in der Testvariante mit Brustkrebssphäroiden keine Wirkung gezeigt hatte und Stabilitätsprobleme nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnten, wurde das Experiment im Zuge dieser Arbeit mit

frisch hergestellter Stammlösung wiederholt. Mit fast identen Mittelwerten der Gap/Sphäroid-Verhältnisse wurden die bereits vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Abbauvorgänge oder Stabilitätsprobleme der Stammlösung innerhalb einer Woche konnten daher ausgeschlossen werden. Die Unwirksamkeit von Eriodictyol im Testsystem MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen kann als gesichert angesehen werden, auch wenn in den Testsystemen mit SW620-Sphäroiden eine deutliche Wirkung vorhanden war (Smöch, 2015).

8 Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, verschiedene Flavonoide im CCID-Assay zu testen und Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu analysieren.

Im Testsystem SW620-Sphäroide auf LECs und BECs wurden die Flavonoide Oroxylin A, Wogonin, Norwogonin, Chrysoeriol, Diosmetin, Nepetin, Gossypetin und Homoeriodictyol getestet. In der Versuchsanordnung mit MCF7-Sphäroiden auf LECs wurden Norwogonin und Eriodictyol auf die Fähigkeit, die CCID-Bildung zu hemmen, untersucht.

8.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

8.1.1 Wirkung der Flavonoide auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tabelle 21: IC₅₀-Werte der Testsubstanzen für SW620-Zellen auf LECs

Substanz	IC ₅₀
1. Nepetin	35,20 µM
2. Wogonin	59,62 µM
3. Gossypetin	62,26 µM
4. Oroxylin A	64,31 µM
5. Homoeriodictyol	138,80 µM
6. Diosmetin	155,10 µM
7. Norwogonin	nicht extrapoliert

In der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen erreichte Nepetin den besten IC₅₀-Wert. Wogonin, Gossypetin und Oroxylin A zeigten mit IC₅₀-Werten unter 65 µM ebenfalls eine moderate anti-intravasative Wirkung.

Bei Homoeriodictyol und Diosmetin war eine signifikante dosisabhängige, allerdings sehr geringe Verminderung der Gap-Größen sichtbar.

Wogonin und Oroxylin A waren die lipophilsten Testsubstanzen der Versuchsreihe, was die Annahme stützt, dass die Lipophilie einen Einfluss auf die Wirkintensität hat. Nepetin und Diosmetin sind Isomere, unterscheiden sich jedoch deutlich in der Wirkung. Es scheint für die Wirkung von Vorteil zu sein, wenn wie bei Nepetin, die OCH₃-Gruppe in Ring A anstatt wie bei Diosmetin in Ring B verknüpft ist. Der schwache Effekt von Homoeriodictyol ist wahrscheinlich auf das Fehlen der Doppelbindung in Ring C zurückzuführen.

8.1.2 Wirkung der Flavonoide auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tabelle 22: IC₅₀-Werte der Testsubstanzen für SW620-Zellen auf BECs

Substanz	IC ₅₀
1. Gossypetin	26,19 µM
2. Wogonin	45,93 µM
3. Oroxylin A	67,12 µM
4. Diosmetin	86,08 µM
5. Nepetin	113,10 µM
6. Norwogonin	377,90 µM
7. Homoeriodictyol	nicht extrapoliert

Gossypetin war mit 6 OH-Gruppen die hydrophilste Substanz in dieser Testreihe. Dennoch wurde die Größe der CCID-Flächen in der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen durch Gossypetin am stärksten gehemmt. Gute Ergebnisse erzielten wie schon im Testsystem SW620-Sphäroide auf LECs Wogonin und Oroxylin A, was die Annahme, dass die Gap-Entstehung bei erhöhter Lipophilie stärker minimiert wird, bestätigte.

Diosmetin und Nepetin unterscheiden sich von Wogonin und Oroxylin A durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe. Daraus lässt sich ableiten, dass die Wirkung mit steigender Zahl an Hydroxylgruppen abnimmt. Auch Norwogonin, das sich durch eine OH- anstatt einer OCH₃-Gruppe von Wogonin unterscheidet und nahezu keinen Effekt zeigte, bestätigt diese Annahme.

Gossypetin mit 6 Hydroxylgruppen stellte eine Ausnahme dar.

8.1.3 Wirkung der Flavonoide auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tabelle 23: IC₅₀-Werte der Testsubstanzen für MCF7-Zellen auf LECs

Substanz	IC ₅₀
1. Norwogonin	nicht extrapoliert
2. Eriodictyol	nicht extrapoliert

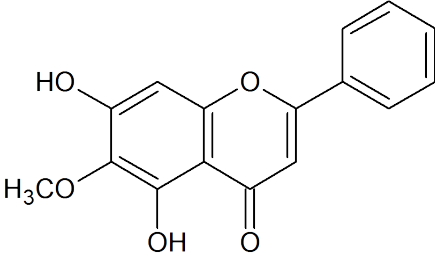
In der Versuchsanordnung Brustkrebssphäroide auf Lymphendothelzellen wurden nur zwei Substanzen getestet. Beide hatten keinen Einfluss auf die Gap-Größe. Norwogonin vermochte in keiner der drei Testvarianten die Bildung der CCIDs zu inhibieren.

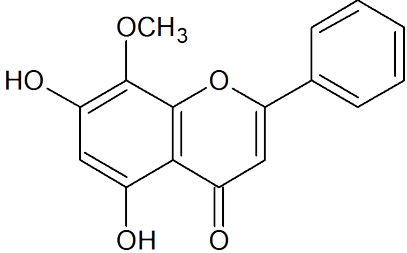
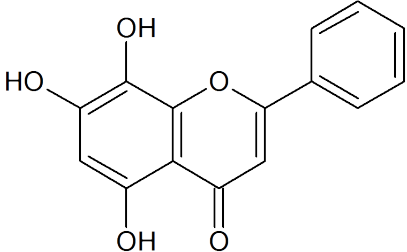
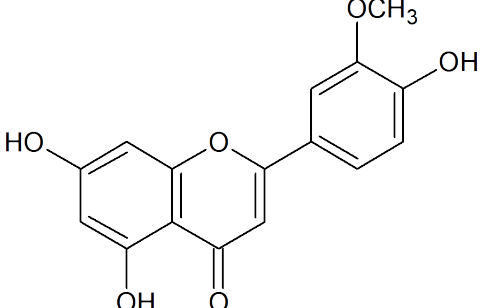
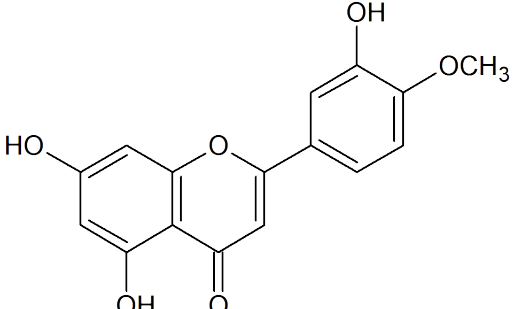
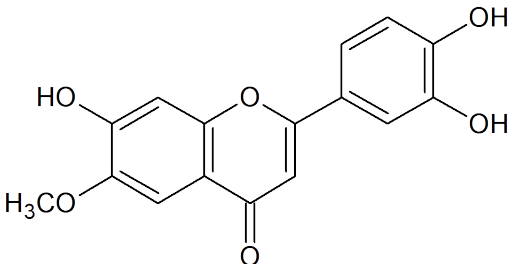
Bei Eriodictyol ist das Fehlen der Doppelbindung in Position 2 bis 3 vermutlich der Grund für die Inaktivität.

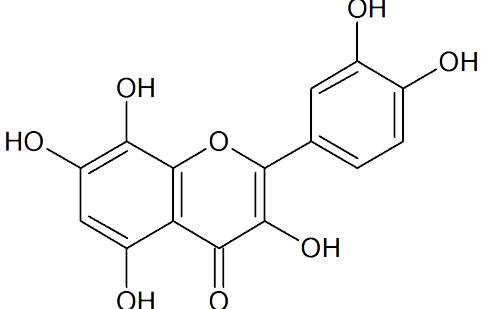
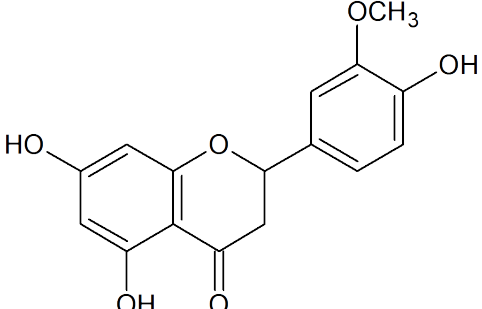
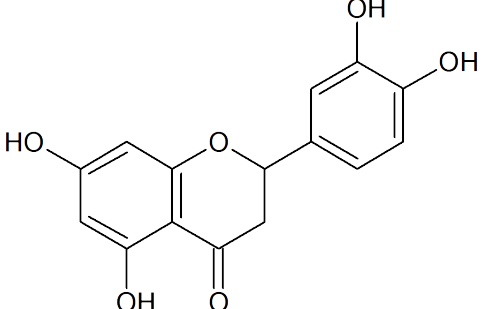
8.1.4 Zusammenfassende Analyse aller Ergebnisse

Tabelle 24 zeigt die Wirkung der Behandlung von SW620-Sphäroide auf BECs (1), SW620-Sphäroide auf LECs (2) und MCF7-Sphäroide auf LECs (3) mit neun verschiedenen Flavonoiden.

Tabelle 24: IC₅₀-Werte in den unterschiedlichen Versuchsanordnungen. (1) SW620-Sphäroide auf BECs, (2) SW620-Sphäroide auf LECs und (3) MCF7-Sphäroide auf LECs

Substanz	Struktur	IC ₅₀
1. Oroxylin A		(1) IC ₅₀ = 67,12 µM (2) IC ₅₀ = 64,31 µM

2. Wogonin		<p>(1) $IC_{50} = 45,93 \mu M$ (2) $IC_{50} = 59,62 \mu M$</p>
3. Norwogonin		<p>(1) $IC_{50} = 377,90 \mu M$ (2) nicht extrapoliert (3) nicht extrapoliert</p>
4. Chrysoeriol		<p>Wegen Auskristallisieren der Substanz nicht bestimmbar</p>
5. Diosmetin		<p>(1) $IC_{50} = 86,08 \mu M$ (2) $IC_{50} = 155,10 \mu M$</p>
6. Nepetin		<p>(1) $IC_{50} = 113,10 \mu M$ (2) $IC_{50} = 35,20 \mu M$</p>

7. Gossypetin		(1) $IC_{50} = 26,19 \mu M$ (2) $IC_{50} = 62,26 \mu M$
8. Homoeriodictyol		(1) nicht extrapoliert (2) $IC_{50} = 138,80 \mu M$
9. Eriodictyol		(3) nicht extrapoliert

Zusammenfassend zeigte sich, dass Flavonoide mit höherer Lipophilie eine stärkere Hemmwirkung auf die Gap-Bildung im CCID-Assay hatten. Eine Ausnahme war Gossypetin, da es trotz der vergleichsweise geringen Lipophilie die Größe der CCID-Flächen im Testsystem mit SW620-Sphäroiden auf BECs am stärksten hemmte. Bei Eriodictyol und Homoeriodictyol war vermutlich das Fehlen der Doppelbindung in Position 2 bis 3 für den schwachen Effekt verantwortlich.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: SW620 bei Konfluenz.....	13
Abbildung 2: SW620-Sphäroid nach 4 Tagen	13
Abbildung 3: MCF7 bei Konfluenz.....	13
Abbildung 4: MCF7-Sphäroid nach 3 Tagen	13
Abbildung 5: Nicht konfluente LECs.....	14
Abbildung 6: Konfluente LECs	14
Abbildung 7: Konfluente BECs	14
Abbildung 8: Verlauf des Sphäroidwachstums von SW620-Zellen	21
Abbildung 9: Monolayer.....	22
Abbildung 10: Bildebene 2: Normalbeleuchtung	26
Abbildung 11: Bildebene 1: UV-Licht und FITC-Filter	26
Abbildung 12: Kombination beider Bildebenen	26
Abbildung 13: Hemmung der Gap-Bildung durch Oroxylin A (SW620, LEC); p<0,05	28
Abbildung 14: Berechnung der IC ₅₀ von Oroxylin A (SW620, LEC); p<0,05	28
Abbildung 15: Hemmung der Gap-Bildung durch Oroxylin A (SW620, BEC); p<0,05	29
Abbildung 16: Berechnung der IC ₅₀ von Oroxylin A (SW620, BEC); p<0,05	29
Abbildung 17: Hemmung der Gap-Bildung durch Wogonin (SW620, LEC); p<0,05	30
Abbildung 18: Berechnung der IC ₅₀ von Wogonin (SW620, LEC); p<0,05	30
Abbildung 19: Abnahme der CCIDs durch die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Wogonin (SW620, LEC).....	31
Abbildung 20: Hemmung der Gap-Bildung durch Wogonin (SW620, BEC); p<0,05	32
Abbildung 21: Berechnung der IC ₅₀ von Wogonin (SW620, BEC); p<0,05	32
Abbildung 22: Hemmung der Gap-Bildung durch Norwogonin (SW620, LEC); p<0,05	33
Abbildung 23: Berechnung der IC ₅₀ von Norwogonin (SW620, LEC); p<0,05	33
Abbildung 24: Hemmung der Gap-Bildung durch Norwogonin (SW620, BEC); p<0,05	34

Abbildung 25: Berechnung der IC ₅₀ von Norwogonin (SW620, BEC); p<0,05	34
Abbildung 26: Hemmung der Gap-Bildung durch Norwogonin (MCF7, LEC); p<0,05	35
Abbildung 27: Berechnung der IC ₅₀ von Norwogonin (MCF7, LEC); p<0,05	35
Abbildung 28: Kristallbildung bei 75 µM Chrysoeriol (SW620, LEC).....	36
Abbildung 29: Monolayer Kontrolle (SW620, LEC)	36
Abbildung 30: Monolayer nach Behandlung der Sphäroide mit 25 µM Chrysoeriol (SW620, LEC)	36
Abbildung 31: Hemmung der Gap-Bildung durch Diosmetin (SW620, LEC); p<0,05	38
Abbildung 32: Berechnung der IC ₅₀ von Diosmetin (SW620, LEC); p<0,05	38
Abbildung 33: Hemmung der Gap-Bildung durch Diosmetin (SW620, BEC); p<0,05	39
Abbildung 34: Berechnung der IC ₅₀ von Diosmetin (SW620, BEC); p<0,05	39
Abbildung 35: Hemmung der Gap-Bildung durch Nepetin (SW620, LEC); p<0,05	40
Abbildung 36: Berechnung der IC ₅₀ von Nepetin (SW620, LEC); p<0,05	40
Abbildung 37: Hemmung der Gap-Bildung durch Nepetin (SW620, BEC); p<0,05	41
Abbildung 38: Berechnung der IC ₅₀ von Nepetin (SW620, BEC); p<0,05.....	41
Abbildung 39: Hemmung der Gap-Bildung durch Gossypetin (SW620, LEC); p<0,05	42
Abbildung 40: Berechnung der IC ₅₀ von Gossypetin (SW620, LEC); p<0,05	42
Abbildung 41: Hemmung der Gap-Bildung durch Gossypetin (SW620, BEC); p<0,05	43
Abbildung 42: Berechnung der IC ₅₀ von Gossypetin (SW620, BEC); p<0,05	43
Abbildung 43: Hemmung der Gap-Bildung durch Homoeriodictyol (SW620, LEC); p<0,05	44
Abbildung 44: Berechnung der IC ₅₀ von Homoeriodictyol (SW620, LEC); p<0,05	44
Abbildung 45: Hemmung der Gap-Bildung durch Homoeriodictyol (SW620, BEC); p<0,05	45
Abbildung 46: Berechnung der IC ₅₀ von Homoeriodictyol (SW620, BEC); p<0,05	45

Abbildung 47: Hemmung der Gap-Bildung durch Eriodictyol (MCF7, LEC); $p < 0,05$	46
Abbildung 48: Berechnung der IC_{50} von Eriodictyol (MCF7, LEC); $p < 0,05$	46

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Flavonoide in der Testreihe dieser Arbeit.....	4
Tabelle 2: Testsubstanzen	11
Tabelle 3: Substanzeinwaagen zur Herstellung von 50 mM Stammlösungen	12
Tabelle 4: Berechnung der Flavonoidverdünnungen aus einer 50 mM Stammlösung	24
Tabelle 5: Parameter der Testung von Oroxylin A (SW620, LEC)	28
Tabelle 6: Parameter der Testung von Oroxylin A (SW620, BEC).....	29
Tabelle 7: Parameter der Testung von Wogonin (SW620, LEC)	30
Tabelle 8: Parameter der Testung von Wogonin (SW620, BEC)	32
Tabelle 9: Parameter der Testung von Norwogonin (SW620, LEC)	33
Tabelle 10: Parameter der Testung von Norwogonin (SW620, BEC)	34
Tabelle 11: Parameter der Testung von Norwogonin (MCF7, LEC)	35
Tabelle 12: Parameter der Testung von Diosmetin (SW620, LEC).....	38
Tabelle 13: Parameter der Testung von Diosmetin (SW620, BEC)	39
Tabelle 14: Parameter der Testung von Nepetin (SW620, LEC)	40
Tabelle 15: Parameter der Testung von Nepetin (SW620, BEC).....	41
Tabelle 16: Parameter der Testung von Gossypetin (SW620, LEC).....	42
Tabelle 17: Parameter der Testung von Gossypetin (SW620, BEC)	43
Tabelle 18: Parameter der Testung von Homoeriodictyol (SW620, LEC).....	44
Tabelle 19: Parameter der Testung von Homoeriodictyol (SW620, BEC)	45
Tabelle 20: Parameter der Testung von Eriodictyol (MCF7, LEC).....	46
Tabelle 21: IC_{50} -Werte der Testsubstanzen für SW620-Zellen auf LECs	48
Tabelle 22: IC_{50} -Werte der Testsubstanzen für SW620-Zellen auf BECs.....	49
Tabelle 23: IC_{50} -Werte der Testsubstanzen für MCF7-Zellen auf LECs	50
Tabelle 24: IC_{50} -Werte in den unterschiedlichen Versuchsanordnungen. (1) SW620-Sphäroide auf BECs, (2) SW620-Sphäroide auf LECs und (3) MCF7- Sphäroide auf LECs	50

11 Literaturverzeichnis

- Bachmeier B., Nerlich A.G., Iancu C.M., Cilli M., Schleicher E., Vené R., Dell'Eva R., Jochum M., Albini A., Pfeffer U. (2007) The chemopreventive polyphenol curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. *Cell. Physiol. Biochem.* 19 (1-4),137-52.
- Boire A., Covic L., Agarwal A., Jacques S., Sherifi S., Kuliopulos A. (2005) PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120 (3), 303–313.
- Eichsteininger J. (2015) Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Flavonoiden im CCID-Assay. Diplomarbeit, Univ. Wien.
- Fidler I.J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3 (6), 453-458.
- Galindez J.D.S., Lanza A.M.D., Matellano L.F. (2002) Biologically Active Substances from the Genus *Scrophularia*. *Pharm. Biol.* 40 (1), 45-59.
- Giessrigl B., Yazici G., Teichmann M., Kopf S., Ghassemi S., Atanasov A.G., Dirsch V.M., Grusch M., Jäger W., Özmen A., Krupitza G. (2012) Effects of *Scrophularia* extracts on tumor cell proliferation, death and intravasation through lymphoendothelial cell barriers. *Int. J. Oncol.* 40 (6), 2063-2074.
- Juncker-Jensen A., Deryugina E.I., Rimann I., Zajac E., Kupriyanova T.A., Engelholm L.H., Quigley J.P. (2013) Tumor MMP-1 activates endothelial PAR1 to facilitate vascular intravasation and metastatic dissemination. *Cancer Res.* 73 (14), 4196–4211.

Kerjaschki D., Bajo-Horvath Z., Rudas M., Sexl V., Schneckenleithner C., Wolbank S., Bartel G., Krieger S., Kalt R., Hantusch B., Keller T., Nagy-Bojarszky K., Huttary N., Raab I., Lackner K., Krautgasser K., Schachner H., Kaserer K., Rezar S., Madlener S., Vonach C., Davidovits A., Nosaka H., Hämmerle M., Viola K., Dolznig H., Schreiber M., Nader A., Mikulits W., Gnant M., Hirakawa S., Detmar M., Alitalo K., Nijman S., Offner F., Maier T.J., Steinhilber D., Krupitza G. (2011) Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mamma carcinoma xenografts in mouse. *J. Clin. Invest.* 121 (5), 2000-2012.

Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*. Diplomarbeit, Univ. Wien.

Mutschler E., Schaible H.G., Vaupel P. (2007) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 115-123.

Nguyen C.H., Senfter D., Basilio J., Holzner S., Stadler S., Krieger S., Huttary N., Milovanovic D., Viola K., Simonitsch-Klupp I., Jäger W., de Martin R., Krupitza G. (2015) NF- κ B contributes to MMP1 expression in breast cancer spheroids causing paracrine PAR1 activation and disintegrations in the lymph endothelial barrier *in vitro*. *Oncotarget* 6 (36), 39262-39275.

Smöch C. (2015) Aktivität verschiedener Flavonoide im CCID-Assay. Diplomarbeit, Univ. Wien.

Teuscher E., Melzig M.F., Lindequist U. (2012) Biogene Arzneimittel, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 299-319.

Viola K., Kopf S., Huttary N., Vonach C., Kretschy N., Teichmann M., Giessrigl B., Raab I., Stary S., Krieger S., Keller T., Bauer S., Hantusch B., Szekeres T., de Martin R., Jäger W., Mikulits W., Dolznig H., Krupitza G., 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, 564-569.

Vonach C., Viola K., Giessrigl B., Huttary N., Raab I., Kalt R., Krieger S., Vo T.P.N., Madlener S., Bauer S., Marian B., Hämmerle M., Kretschy N., Teichmann M., Hantusch B., Stary S., Unger C., Seelinger M., Eger A., Mader R., Jäger W., Schmidt W., Grusch M., Dolznig H., Mikulits W., Krupitza G. (2011) NF- κ B mediates the 12(S)-HETE-induced endothelial to mesenchymal transition of lymphendothelial cells during the intravasation of breast carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 105, 263–271.

Wagener C., Müller O. (2010) Molekulare Onkologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 1-18, 351-366.