
Universitätsfrauenklinik Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Bernd Gerber)

Die Wirkung von grünem Tee und Matchatee, sowie
ihrer Bestandteile Epigallocatechingallat und Quercetin
auf MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Philip Marahrens
geb. am 04.09.1987 in Lüneburg

Einreichung und Verteidigung: 2019

Rostock, November 2019

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger, Universität Rostock

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter, Universität Rostock, Universitätsfrauenklinik im Klinikum Südstadt
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Burkhard Hinz, Universität Rostock, Institut für Toxikologie und Pharmakologie
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Udo Schumacher, Universität Hamburg, Zentrum für Experimentelle Medizin / Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Das Mamma-Karzinom	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Risikofaktoren	3
1.1.4 Therapie	4
1.2 Zelllinien	7
1.2.1 MCF-7	7
1.2.2 MDA-MB-231	7
1.3 Testsubstanzen	8
1.3.1 Grüner Tee	8
1.3.2 Epigallocatechingallat	10
1.3.3 Quercetin	11
1.3.4 Tamoxifen	12
1.3.5 Estradiol	13
1.4 Zielstellung	14
2. Material und Methode	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Testsubstanzen	17
2.1.4 Zellkulturen	19
2.2 Methoden	20

2.2.1	Herstellung der Zellkulturen	20
2.2.2	Herstellung der Testsubstanzen	21
2.2.3	HPLC (Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie)	22
2.2.4	ATP-Lumineszenztest	25
2.2.5	MTT-Test	25
2.2.6	BrdU-Test	26
2.2.7	Neutralrot-Test	28
2.2.8	Glukosekonzentration	29
2.2.9	pH-Messung	29
2.2.10	Immunhistochemie	29
2.2.11	Oxidativer Stress	30
2.2.12	Statistische Auswertung	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	HPLC	32
3.1.1	Qualitative Bestimmung	32
3.1.2	Quantitative Bestimmung	36
3.2	ATP-Lumineszenztest	37
3.2.1	MDA-MB-231	37
3.2.2	MCF-7	39
3.2.3	Vergleich der Ergebnisse zwischen MDA-MB-231 und MCF-7	40
3.3	MTT-Test	41
3.3.1	Ergebnisse MTT-Test: MDA-MB-231	41
3.3.2	Ergebnisse MTT-Test: MCF-7	42
3.3.3	Vergleich der Ergebnisse zwischen MDA-MB-231 und MCF-7	43
3.4	BrdU-Test	44
3.4.1	BrdU-Test: MDA-MB-231	44
3.4.2	BrdU-Test: MCF-7	45
3.4.3	Vergleich der Ergebnisse BrdU-Test zwischen MDA-MB-231 und MCF-7	46
3.5	Neutralrot-Test	47
3.5.1	MDA-MB-231	47
3.5.2	MCF-7	48
3.5.3	Vergleich der Ergebnisse NRT-Test zwischen MDA-MB-231 und MCF-7	49
3.6	LDH-Test	49
3.7	Glukosekonzentration und pH-Wert	50
3.7.1	MDA-MB-231	50
3.7.2	MCF-7	51
3.8	Immunhistochemie	51

3.8.1 MDA-MB-231.....	52
3.8.2 MCF-7	53
3.9 Oxidativer Stress	54
3.9.1 MDA-MB-231.....	54
3.9.2 MCF-7	55
4. Diskussion	56
4.1 Diskussion von Material und Methoden	56
4.2 Diskussion der Ergebnisse	56
4.2.1 Diskussion der Ergebnisse HPLC.....	56
4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Zelltests.....	58
4.3 Ausblick.....	64
5. Zusammenfassung	65
6. Thesen.....	66
7. Publikationen	67
8. Literatur.....	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014	2
Abbildung 2: Östrogenbildung bei postmenopausalen Frauen.....	4
Abbildung 3: lichtmikroskopisches Bild von MCF-7-Zellen (Pfeil).....	7
Abbildung 4: lichtmikroskopisches Bild von MDA-MB-231-Zellen (Pfeil)	7
Abbildung 5: Übersicht über die Flavonoide	8
Abbildung 6: Strukturformeln der Catechine im grünen Tee	10
Abbildung 7: Fotos von Matchatee und grünem Tee.	10
Abbildung 8. Strukturformel von Quercetin	12
Abbildung 9: qualitative und quantitative Analyse von Stoffen anhand der HPLC.....	23
Abbildung 10: Schematischer Aufbau der HPLC	24
Abbildung 11: Prinzip des ATP-Lumineszenztests.....	25
Abbildung 12: Prinzip des MTT-Tests.....	26
Abbildung 13: Prinzip des BrdU-Tests	27
Abbildung 14: NRT: Aufnahme des Farbstoffes.....	28
Abbildung 15. Dreisatz zum Berechnen der Konzentration des Reinstoffes im Tee-Extrakt..	32
Abbildung 16: HPLC-Ergebnisse	33
Abbildung 17: HPLC-Ergebnisse	33
Abbildung 18: HPLC-Ergebnisse	34
Abbildung 19: HPLC-Ergebnisse	34
Abbildung 20: HPLC-Ergebnisse	35
Abbildung 21: HPLC-Ergebnisse	35
Abbildung 22: HPLC-Ergebnisse	36
Abbildung 23: HPLC-Ergebnisse	36
Abbildung 24: Zellviabilität MDA-MB-231: Messung ATP mit CellTiter-Glo®	37
Abbildung 25: Zellviabilität MCF-7: Messung ATP mit CellTiter-Glo®.....	39
Abbildung 26: Vergleich der Zellviabilität	40
Abbildung 27: Zellviabilität MDA-MB-231: MTT-Test	41
Abbildung 28: Zellviabilität MCF-7: MTT-Test.....	42
Abbildung 29: Vergleich der Zellviabilität	43

Abbildung 30: Zellproliferation MDA-MB-231: BrdU-Test.....	44
Abbildung 31: Zellproliferation MCF-7: BrdU-Test	45
Abbildung 32: Vergleich der Zellproliferation	46
Abbildung 33: Zellviabilität MDA-MB-231: Neutralrot-Test.....	47
Abbildung 34: Zellviabilität MCF-7: Neutralrot-Test.....	48
Abbildung 35: Vergleich der Zellviabilität	49
Abbildung 36: Glukosekonzentration und pH-Wert nach 24 h; MDA-MB-231.	50
Abbildung 37: Glukosekonzentration und pH-Wert nach 24 h; MCF-7.....	51
Abbildung 38: Immunhistochemie MDA-MB-231	52
Abbildung 39: Immunhistochemie MCF-7	53
Abbildung 40: Oxidativer Stress MDA-MB-231-Zellen	54
Abbildung 41: Oxidativer Stress MCF-7-Zellen.....	55
Abbildung 42: Poster für 37. Senologie-Kongress 2017, Berlin.....	68
Abbildung 43: Poster für 62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) 2018, Berlin.....	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der einzelnen Subtypen des Mammakarzinoms	1
Tabelle 2: Geräte.....	15
Tabelle 3: Gerbrauchs- und Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 5: Konzentrationen der untersuchten Substanzen.....	21
Tabelle 6: Konzentrationen von EGCG und Quercetin in den Tee-Extrakten	37

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+	plus, und
<	kleiner als
>	größer als
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
67-LR	67-kDa-Laminin-Rezeptor
AG	Antigen
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinasen B
ALND	Axilläre Lymphknotendisektion
ANOVA	analysis of variance
ATLAS	„Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter“-Studie
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AU	Absorbance Unit
Bcl-2-Protein	B-cell-lymphoma-2-Protein
BET	brusterhaltende Therapie
BRCA 1	BReast CAncer gene 1
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
C ₁₈	18-Kohlenstoff
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CP	Zellproliferation
CV	Zellviabilität
CYP2D6	Enzym aus der Cytochrom-P450-Gruppe
DEGRO	Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie
DFS	disease-free survival
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
EBS II	Estrogen-Binding Site 2
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EGF	Epidermal-Growth-Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ER	Estrogenrezeptor
ER ⁻	estrogenrezeptornegativ
ER α	Estrogenrezeptor Alpha
ER β	Estrogenrezeptor Beta
ER ⁺	estrogenrezeptorpositiv
et al.	und andere
Eth	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GCG	Gallocatechingallat
GT	Grüner Tee
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Dihydrogensulfat, Schwefelsäure
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
IgG	Immunglobulin G
ISH	InSitu-Hybridisierung
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
Matcha	Matchatee
MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7-Brustkarzinomzelllinie
mg	Milligramm
min	Minuten
MRM	modifiziert radikale Mastektomie
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
NRT	Neutralrot-Test
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
PR ⁻	progesteronrezeptornegativ
PR ⁺	progesteronrezeptorpositiv
p-Wert	Signifikanywert
RKI	Robert-Koch-Institut
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung

SERM	Selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulator
SLNE	Sentinel-Lymphknoten-Technik
TMB	Tetramethylbenzidin
u.a	unter anderem
U.S.	United States
USA	United States of America
UV	ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
α	Alpha
β	Beta

1. Einleitung

1.1 Das Mamma-Karzinom

1.1.1 Definition

Das Mammakarzinom manifestiert sich im peripheren duktulo-lobulären Parenchym der Mamma. Man unterscheidet daher primär zwischen dem aus den Epithelzellen der Milchgänge hervorgegangenen duktalem (Häufigkeit: 65 – 80 %) und dem aus den Drüsenläppchen hervorgegangenen lobulären (10 %) Karzinomen. Außerdem gibt es noch weitere Typen, wie z.B. die papillären, medullären und adenoid-zystischen Typen.

Des Weiteren klassifiziert man den Tumor nach seiner Aggressivität: entweder nichtinvasiv (in situ) oder invasiv, wenn die Basalmembran überschritten wurde [8,34]. 95 % der Mammakarzinome gehören zur Gruppe der Adenokarzinome [62]. Die Charakterisierung der Mammakarzinome erfolgt außerdem anhand des Rezeptorstatus (Tabelle 1). Estrogenrezeptorpositive (ER⁺) und progesteronrezeptorpositive (PR⁺) Krebszellen haben eine bessere Prognose, als rezeptornegative (ER⁻, PR⁻). Dahingegen haben Zellen mit einer Überexpression des „human epidermal growth factor receptor 2“ (HER2), einem epidermalemem Wachstumfaktor (EGF), der in etwa 15 – 20 % aller Brustkrebsfälle positiv ist [105], eine eher schlechte Prognose und gehen häufiger mit positiven Lymphknotenbiopsien einher [24]. Die schlechteste Prognose haben die sogenannten „Triple-negative“-Tumoren, welche ER⁻, PR⁻ und Her-2-negativ sind und daher keine Ansätze für eine rezeptorabhängige Therapie bieten. Die „Triple-negative“-Tumoren gehen in etwa einem Drittel mit einer Mutation im Breast-Cancer-Gen-1-Gen (BRCA-1) einher. Diese Mutation ist der häufigste Gendefekt, der zu einer Erhöhung des Life-Time-Risks für eine Brustkrebserkrankung auf bis zu 80 % führt [34,42,45].

Tabelle 1: Klassifikation der einzelnen Subtypen des Mammakarzinoms (nach St. Gallen, 2013):
 + = positiv, - = negativ, ER = Estrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, Ki-67 = Ki-67-Protein, HER2 = human epidermal growth factor receptor 2 [41].

Intrinsischer Subtyp	Tumorbiologische Parameter
Luminal A	ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ , Ki-67-Expression < 14 %
Luminal B (HER2 ⁻)	ER ⁺ , HER2 ⁻ + Ki-67-Expression >14 % oder PR ⁻
Luminal B (HER2 ⁺)	ER ⁺ , HER2 ⁺ , unabhängig von PR und Ki-67
HER2-positiv	HER2 ⁺ , ER ⁻ , PR ⁻
Triple-negativ	HER2 ⁻ , ER ⁻ , PR ⁻

1.1.2 Epidemiologie

Weltweit stellt Brustkrebs die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen, sowohl in Entwicklungs-, als auch in den Industrieländern dar [52].

In Deutschland war Brustkrebs im Jahre 2014 mit einem Anteil von über 30 % aller Krebserkrankungen die mit Abstand am häufigsten neu aufgetretene Krebserkrankung beim

weiblichen Geschlecht. Insgesamt erkrankten etwa 70.000 Frauen an Brustkrebs, was einer Erkrankungsrate (altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung) von fast 115 pro 100.000 entspricht. Das mittlere Erkrankungsalter waren 64 Jahre. Im Vergleich zum Jahr 2000 stieg die Anzahl der Neuerkrankungen um rund 15.000 Fälle. Die Wahrscheinlichkeit für Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken lag in Deutschland 2014 bei 12,9 % und entsprach somit in etwa auch dem Lebenszeitrisiko in den USA mit 12,4 % [89,103].

Auch bei den Krebssterbefällen der Frauen in Deutschland machte der Brustkrebs mit über 17 % den größten Anteil aller Krebserkrankungen aus. Das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu versterben liegt bei 3,5 %. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen lag 2014 bei über 80 % und damit im oberen Viertel im Vergleich aller Krebserkrankungen [89].

Im Jahr 2002 wurden in Deutschland die gesetzlichen Grundlagen für ein Mammographiescreening-Programm geschaffen, welches unter anderem bei jeder Frau ab 30 Jahren eine jährliche Tastuntersuchung der Brust durch den Arzt und zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr alle 2 Jahre eine Mammographie vorsieht. Die Teilnehmerate an dem Programm lag in Deutschland im Jahr 2010 bei knapp über 50 % der eingeladenen Frauen [23].

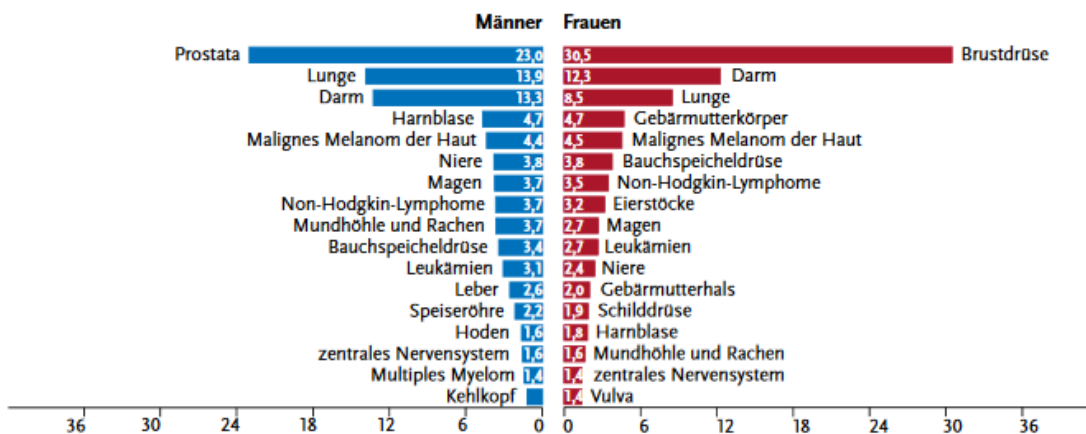


Abbildung 1: Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014: prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen (RKI 2017) [89].

Obwohl in Japan die Inzidenzraten von Brustkrebs und die brustkrebsbedingten Todesfälle in den letzten Jahren angestiegen sind, liegen sie noch deutlich unter denen z.B. der USA, wo die Raten allerdings inzwischen stagnieren bzw. sogar rückläufig sind. Dass die Raten in den USA nicht mehr steigen, wird auf die zunehmenden Vorsorgeuntersuchungen, wie das Screening, zurückgeführt [63].

In Deutschland und den USA lag die altersstandartisierte Mortalität des Brustkrebs bei der Frau in den Jahren 2000 – 2012 bei etwa 20 %, während sie in Japan im gleichen Zeitraum nur etwa 10 % betrug [59–61].

Der Anstieg der Brustkrebsraten in Japan wird vielfach mit dem Lebenswandel der Japanerinnen, weg von der traditionellen Ernährung hin zu Ernährungsformen der westlichen Welt mit mehr Fett- und Kalorienanteil, erklärt. Auch der Trend zu späteren Geburten in Japan erhöht das Risikoprofil, allerdings macht die Erhöhung der Prävalenz der Hauptrisikofaktoren (Menarchenalter, Alter bei erster Geburt, Anzahl der Geburten und Menopausenalter) nur etwa 40 % der Erhöhung der Brustkrebsrate unter den in die USA immigrierten Asiatinnen aus. 60 % des Risikozuwachses werden der Ernährungsumstellung in Richtung westlicher Nahrungsmittel zugeschrieben. So liegt das Brustkrebsrisiko von denen in Japan lebenden Japanerinnen um ein vielfaches niedriger, als das der Landsleute, die in den USA leben. Das gleiche gilt auch für Chinesinnen [21,63,113].

1.1.3 Risikofaktoren

Das Risiko, im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken wird von bestimmten Faktoren beeinflusst. Die drei wesentlichen Risikofaktoren sind dabei das weibliche Geschlecht, höheres Alter und eine positive Familienanamnese, wobei „der wichtigste populationsbezogene Risikofaktor für eine Brustkrebserkrankung [...] das fortgeschrittene Alter [ist]“ (Ortmann et al.) [82]. Bei einer positiven Familienanamnese ist es wichtig zu beachten, ob die Krebserkrankung bereits prä- oder erst postmenopausal auftrat. So ist das Brustkrebsrisiko nicht signifikant erhöht, wenn die Verwandte ersten Grades erst postmenopausal erkrankte. Dahingegen erhöht bereits das einseitige, prämenopausale Auftreten einer Brustkrebserkrankung bei der Mutter oder Schwester das eigene Risiko um etwa 30 %, auch an Brustkrebs zu erkranken [7]. Dabei sind 30 – 40% aller erblich bedingten Mammakarzinome mit einer Mutation des Tumorsuppressorgenes BRCA 1 oder 2 assoziiert [57].

Weitere wichtige endogene relative Multiplikatoren des absoluten Erkrankungsrisikos sind z.B. ein niedriges Menarchenalter (< 11 Jahre: 3-fach), ein hohes Menopausenalter (> 54 Jahre: 2-fach) oder eine späte erste Entbindung (> 40 Jahre: 3-fach). Während bei einem prämenopausal erhöhter Body-Mass-Index > 30 das relative Risiko sogar unter 1 sinken kann (0,7 – 2,9-fach), vervielfacht es sich postmenopausal bei einem BMI > 30 immer (1,9 – 2-fach). Ein Erklärungsansatz dafür ist eine gesteigerte Östrogenproduktion durch die Aromatisierung von Fettzellen bei postmenopausalen Frauen (Abbildung 2) [82].

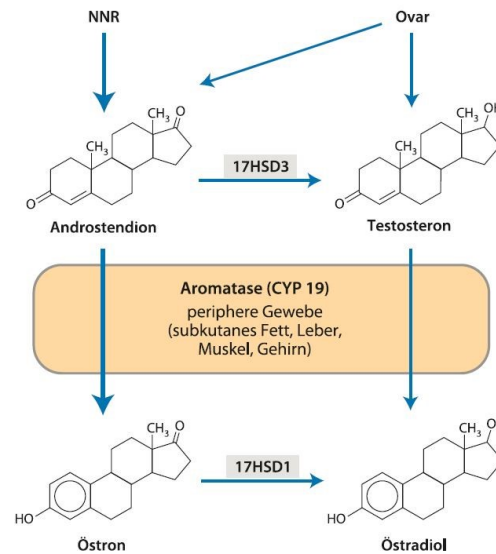


Abbildung 2: Östrogenbildung bei postmenopausalen Frauen; NNR = Nebennierenrinde, übernommen aus Freissmuth et al., 2012 [35].

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass erhöhte Östrogenspiegel im Blut einer Frau zu einem gesteigerten Brustkrebsrisiko führen [130]. In Anbetracht dieser Erkenntnis muss auch die exogene Zufuhr von Östrogenen in Form von oralen Kontrazeptiva sehr kritisch betrachtet werden, da die Möglichkeit besteht, dass sie das Brustkrebsrisiko erhöhen. Das höchste Risiko haben dabei Frauen, die ein orales Kontrazeptivum bereits 4 oder mehr Jahre vor einer ersten, voll ausgetragenen Schwangerschaft einnehmen [54]. Allerdings gibt es auch Studien, die einem Zusammenhang zwischen der Einnahme von oralen Kontrazeptiva und einem erhöhten Brustkrebsrisiko widersprechen [75].

1.1.4 Therapie

Die Primärtherapie des Mammakarzinoms basiert auf 5 Therapieoptionen, welche in Abhängigkeit von tumorbiologischen Parametern des Primärtumors und individuellen Faktoren der Patienten zum Einsatz kommen:

- die operative Therapie
- die Radiotherapie
- die systemischen Therapien:
 - o die zytostatische Therapie
 - o die endokrine Therapie
 - o die HER2-Antikörpertherapie.

1.1.4.1 Operative Therapie

Bei der operativen Therapie unterscheidet man zwischen der brusterhaltenden Therapie (BET) und der Mastektomie, hierbei meist die modifiziert radikale Mastektomie (MRM). Die BET mit nachfolgender Strahlentherapie zeigt hierbei keine Nachteile bezüglich des Überlebens gegenüber der MRM [48]. Etwa 70 % aller Tumorektomien werden heute

brusterhaltend operiert, jedoch muss bei ca. 5 – 10 % dieser Patientinnen nachresektiert werden, um eine R0-Resektion zu erreichen. So kann im Endeffekt bei 20 – 40 % aller Erkrankten nicht auf die Mastektomie verzichtet werden, da sonst keine lokale Tumorkontrolle gewährleistet werden kann [61].

Indikationen für eine MRM sind laut S3-Leitlinie:

- diffuse, ausgedehnte Kalzifikationen vom malignen Typ
- Multizentrität
- Inkomplette Entfernung des Tumors (inkl. Intraduktale Komponente), auch nach Nachresektion
- Inflammatorisches Mammakarzinom (auch nach erfolgreicher neoadjuvanter Therapie)
- Voraussichtlich nicht zufriedenstellendes kosmetisches Ergebnis bei BET
- Kontraindikationen zur Nachbestrahlung nach BET
- Wunsch der aufgeklärten Patientin [48].

Von der axillären Lymphknotendisektion (ALND) wird inzwischen immer mehr Abstand genommen und sie wird auch bei positivem Sentinel-Lymphknoten nicht mehr durchgeführt, wenn nicht mehr als 2 Makrometastasen vorhanden sind, Tumorstadium T1 oder T2 vorliegt, eine BET mit postoperativer Bestrahlung durch tangentielle Felder geplant ist oder eine adäquate adjuvante medikamentöse Tumorthherapie möglich ist. Bevorzugt wird die Sentinel-Lymphknoten-Technik (SLNE), die im Stadium I und IIa der ALND gleichwertig ist, aber den Vorteil einer geringeren Morbität hat [1,23].

1.1.4.2 Radiotherapie

Laut der S3-Leitlinie und der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) sollte einer BET immer eine adjuvante Radiotherapie der betroffenen Brust und der angrenzenden Thoraxwand folgen, dies gilt auch für Niedrigrisikopatientinnen (pN0), wobei sich hier die Effekte auf das 10-jahre-Rezidivrisiko stärker unterscheiden, abhängig von Faktoren, wie z.B. Rezeptorstatus und Alter [19,48,101].

Nach der MRM senkt eine adjuvante Strahlentherapie das Risiko eines lokoregionalen Rezidivs und bei Patientinnen mit hohem Lokalrezidivrisiko wird auch das Gesamtüberleben verbessert [31].

Indikationen für eine adjuvante Strahlentherapie nach MRM sind laut S3-Leitlinie:

- Tumorstadium T3 / T4
- pT3 pN0 R0 nur bei Vorliegen von sonstigen Risikofaktoren (Lymphgefäßinvasion, Grading G3, „close resection margin“, Prämenopausalstatus, Alter < 50 Jahre)
- R1-/R2-Resektion und fehlender Möglichkeit der sanierenden Nachresektion
- pN+ (> 3 Lymphknoten) [48].

Bei Patientinnen mit einem primär inoperablen oder inflammatorischen Tumor, sollte zunächst versucht werden, durch eine Systemtherapie ein Downstaging zu erreichen, um

wieder operabel zu werden. Gelingt dies nicht, kommt auch eine neoadjuvante Radiotherapie, ggf. in Kombination mit einer Systemtherapie, in Frage [48].

1.1.4.3 Systemische Therapien

Zytostatische Therapie

Eine adjuvante Chemotherapie ist für alle Patientinnen mit rezeptornegativen Tumoren vorgesehen, da die Krebsmortalität um ein Drittel reduziert werden kann. Allerdings fand die Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) 2011 in einer Metaanalyse heraus, dass auch Patientinnen mit rezeptorpositiven Tumoren von einer adjuvanten Chemotherapie profitierten im Gegensatz zu einer alleinigen endokrinen Therapie [29].

Die S3-Leitlinie führt folgende Indikationen für eine adjuvante Chemotherapie an:

- Her2-positive Tumore
- Hormonrezeptornegative Tumore
- Nodal-positive und –negative Tumore mit hohem Rezidivrisiko
- Tumore mit histopathologischem Differenzierungsgrad G III
- Erkrankungsalter < 35 Jahre [48].

Für einen triple-negativen Tumor empfiehlt 2015 die Internationale Brustkonferenz St. Gallen eine Chemotherapiekombination aus Anthrazyklin und Taxan. Für ER-negative und Her2-positive Tumore wird für Stadium T1 b und c (N0) eine Therapie mit Paclitaxel + 12 Monate Trastuzumab empfohlen. Für höhere T-Stadien oder bei Lymphknotenbefall gilt ein Schema mit zunächst einem Anthrazyklin und anschließender Gabe von einem Taxan + 12 Monate Trastuzumab als beste Option. Für ER- und HER2-positive Tumore gilt das gleiche Schema plus einer endokrinen Therapie [18]. Die S3-Leitlinie fordert für jede adjuvante Standard-Chemotherapie das Enthalten eines Taxans und die Therapiedauer einer anthrazyklin- und taxanhaltigen Therapie von 18 – 24 Wochen.

Neoadjuvant ist eine Chemotherapie (Anthrazyklin + Taxan bzw. bei Her2-positiv Trastuzumab) bei primär inoperablen oder inflammatorischen Tumoren indiziert und kann zu einer höheren BET-Rate führen, wobei sie im Gesamtüberleben einer adjuvanten Behandlung gleichwertig ist [48].

1.1.4.4 Endokrine Therapie

Auf die endokrine Therapie bei hormonrezeptorpositiven Tumoren wird im Kapitel 1.3.4. Tamoxifen näher eingegangen. Die endokrine Therapie sollte nach der Chemotherapie begonnen werden [48].

1.1.4.5 Antikörpertherapie

Patientinnen mit einem Her2-positivem (Überexpression) Tumor, der einen Durchmesser größer als 1 cm hat und immunhistochemisch einen Score von 3+ hat und / oder ISH-positiv ist, sollte mit Trastuzumab für 12 Monate behandelt werden. Bei einer adjuvanten Therapie sollte die Trastuzumabgabe simultan mit der Taxangabe begonnen werden [48].

1.2 Zelllinien

1.2.1 MCF-7

Die kommerziell erworbenen Brustkrebszellen der MCF-7-Reihe wurden in den 1970er Jahren aus dem Adenokarzinom einer 69jährigen Kaukasierin gewonnen. Sie exprimieren laut Literatur Estrogenrezeptoren [2,53]. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte tiefgefroren bei -185 °C in flüssigem Stickstoff.

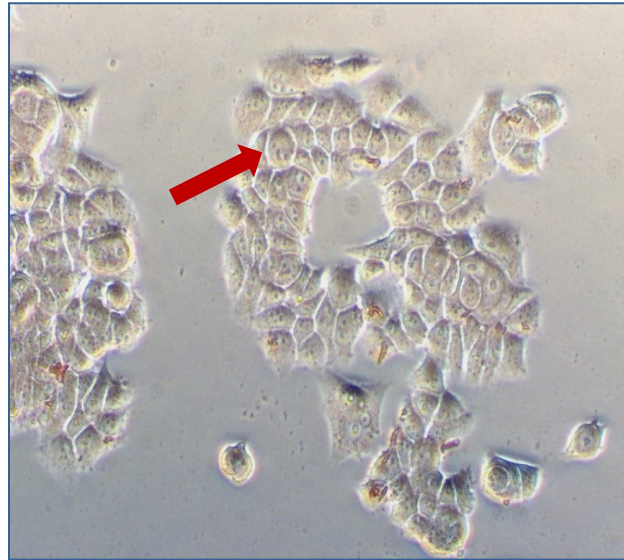


Abbildung 3: lichtmikroskopisches Bild von MCF-7-Zellen (Pfeil), Vergrößerung: 20fach.

1.2.2 MDA-MB-231

Die kommerziell erworbenen Brustkrebszellen der MDA-MB-231-Reihe wurden aus dem Adenokarzinom einer 51jährigen Kaukasierin gewonnen. Sie sind laut Literatur estrogenrezeptor-negativ. [3,53] Die Langzeitaufbewahrung erfolgte tiefgefroren bei -185 °C in flüssigem Stickstoff.



Abbildung 4: lichtmikroskopisches Bild von MDA-MB-231-Zellen (Pfeil), Vergrößerung: 20fach.

1.3 Testsubstanzen

Im Folgenden werden die Substanzen beschrieben, die bezüglich ihrer Wirkung auf die Zellviabilität und –proliferation der Brustkrebszellen MDA-MB-231 und MCF-7 untersucht wurden. Es handelt sich dabei um die selbst hergestellten Extrakte des Matcha-Tees und des grünen Tees. Diese wurden zum einen in Leitungswasser, zum anderen in 70 % - Ethanol gelöst. Des Weiteren wurden das mittels HPLC im grünen Tee ermittelte und kommerziell erworbene Catechin Epigallocatechingallat (EGCG) und das Flavonolol Quercetin in ihrer Wirkung auf die Tumorzellen getestet. EGCG wurde in Aquadest gelöst und Quercetin in 50% - DMSO. Als Kontrolle diente die Testung der Wirkung von kommerziell erworbenem und in 70% - Ethanol gelöstem Tamoxifen und Estradiol auf die zwei Krebszelllinien.

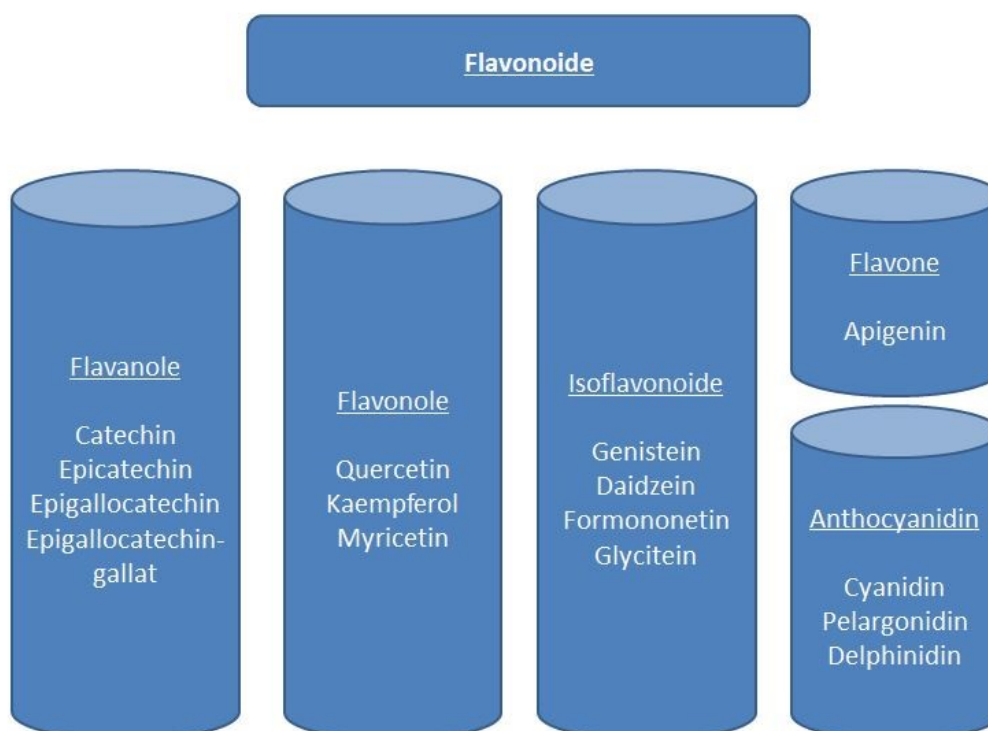


Abbildung 5: Übersicht über die Flavonoide, Abbildung modifiziert nach Liu (2004) [73].

1.3.1 Grüner Tee

Tee ist weltweit das am häufigsten konsumierte Getränk nach Wasser [124]. Dabei wurde in Deutschland im Jahr 2015 mit einem durchschnittlichen Pro-Kopf-Konsum von 28 Litern, was etwa 20.000 Tonnen Gesamtinlandsverbrauch entspricht, so viel Tee konsumiert, wie niemals zuvor. Seit 2005 stieg dabei bis heute der Anteil von grünem Tee (2005: 20 %) gegenüber schwarzem Tee (2005: 80%) auf inzwischen 30 %. Der Großteil (60,8 %) des in

Deutschland konsumierten Grüntees stammt von dem weltweit größten Teeproduzenten China [5].

Es wird vermutet, dass Tee zum ersten Mal bereits 2700 v.Chr in China getrunken wurde. Nach Europa gelangte er dann im 17. Jahrhundert durch den Handel der Briten und Holländer [122].

Genau wie schwarzer Tee wird der grüne Tee aus den Teesträuchern *Camellia sinensis* hergestellt [124]. Im Gegensatz zum schwarzen Tee, werden bei der Herstellung des grünen Tees die Blätter nicht fermentiert, sondern vor dem Rollen, Trocknen und Sieben mit Wasserdampf behandelt (japanische Methode) oder in einer eisernen Pfanne geröstet (chinesische Methode). Durch diesen Verarbeitungsschritt bleibt auch die grüne Farbe der Blätter erhalten (Abbildung 7) [22]. Beim schwarzen Tee wird durch den Fermentierungsprozess ein Großteil der Catechine zu Theaflavinen und Thearubiginen oxidiert, sodass der Gehalt an Catechinen weitaus geringer ist, als im grünen Tee [117]. Den Polyphenolen im grünen Tee wird in der Forschung aber ein großer gesundheitlicher Nutzen zugesprochen, z.B. bei der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen oder Krebserkrankungen [12]. Zu der Gruppe der Polyphenole gehören die Flavonoide, die wiederum in Flavanole und Catechine eingeteilt werden. Etwa 30 % der Trockensubstanz von frischen Teeblättern machen phenolische Verbindungen aus und beim grünen Tee gehören 90 % dieser polyphenolischen Verbindungen zu den Catechinen (zum Vergleich: im schwarzen Tee sind es 25 % Catechine) [6]. Den größten Anteil der Catechine macht mit über 50 % das Epigallocatechingallat (EGCG) aus, welches es in seiner Wirkung auf Brustkrebszellen zu untersuchen gilt [12]. Außerdem zählen noch das Epigallocatechin (EGC), das Epicatechingallat (ECG) und das Epicatechin (EC) zu den Catechinen (Abbildung 5, Abbildung 6). Diese machen allerdings nur 3 – 6 % (EGC, ECG) bzw. 1 – 3 % (EC) der Trockenmasse aus. Weitere Bestandteile der Teeblätter sind neben den Polyphenolen (in % der Trockenmasse): Proteine (15 %), Aminosäuren (4 %), Koffein (4 %), Rohfasern (26 %), Lipide (7 %), andere Kohlenhydrate (7 %), Pigmente, wie Chlorophyll und Carotinoide (2 %) und Mineralstoffe (5 %) [6]. Eine Tasse grüner Tee (100 ml) enthält etwa 20 – 100 mg EGCG. Das U.S. Department of Agriculture geht in seinen Untersuchungen von bis zu 200 mg / 100 g aufgebühtem grünen Tee aus [107,115].

Inzwischen setzt sich auf dem Markt immer stärker der sogenannte Matcha-Tee durch [92]. Er unterscheidet sich von den anderen Darreichungsformen dadurch, dass die Blätter mit einer Keramikmühle zu einem feinen Pulver gemahlen werden (Abbildung 7) und das in heißem Wasser gelöste Pulver komplett mitverzehrt wird. Fujioka et al. veröffentlichten 2016 eine Studie, in der sie beobachteten, dass der protektive Effekt des Matcha-Tees gegenüber Sauerstoffradikalen wesentlich höher ist, als der Effekt der normalen Teeblätter. Sie führen dies auf eine bessere Verfügbarkeit der Catechine zurück [36]. In dieser Arbeit wurden für die Herstellung der Extrakte ein Matcha-Teepulver und ein grüner Tee aus Blättern, welcher grob gemörsert wurde, verwendet.

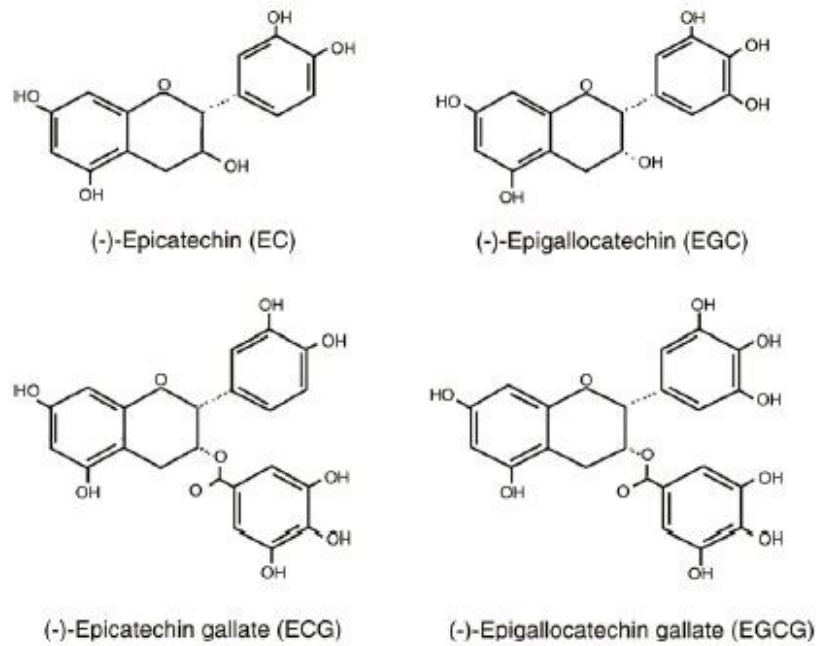


Abbildung 6: Strukturformeln der Catechine im grünen Tee (nach Koo) [60].



Abbildung 7: Fotos von Matchatee und grünem Tee.

1.3.2 Epigallocatechingallat

Epigallocatechingallat (EGCG) mit der Summenformel $C_{22}H_{18}O_{11}$ gehört zu den Catechinen, welche als Flavanole eine Untergruppe der Flavonoide sind. Flavonoide gehören zur Gruppe der Polyphenole (Abbildung 5) [120]. Es handelt sich bei EGCG um einen Ester des

Epigallocatechins und der Gallussäure. Es macht mit über 50 % den größten Anteil der Catechine im grünen Tee aus [12].

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die davon ausgehen, dass EGCG viele gesundheitsfördernde Effekte hat. So beschreiben z.B. Cao und Cao die hemmende Wirkung von EGCG auf die Angiogenese, welche für alle soliden Tumore essentiell für das Wachstum ist [135]. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen werden den Flavonoiden positive Effekte in der Prävention und Therapie zugesprochen [33,106] und bei der Therapie von Amyloidose [51]. Die Ohsaki-Studie beschrieb 2006 eine deutlich inverse Beziehung der Menge von konsumiertem grünen Tee und der Mortalität durch Kardiovaskuläre Erkrankungen [65]. In der Krebstherapie ist das EGCG immer wieder Gegenstand der Forschung. So werden ihm eine heilende und präventive Wirkung bei der Therapie des Brustkrebs zugesprochen, aber auch der Behandlungen von anderen Krebsarten, wie Lungen- und Prostatakrebs [79,109,112,112,132]. Als ein wichtiger Grund für die antikanzerogene Wirkung von grünem Tee wird das hohe antioxidative Potential vermutet das höher ist, als das des schwarzen Tees mit einem geringeren Catechingehalt, aber auch der fördernde Einfluss auf den Prozess der Apoptose [71,112]. Allerdings wird auch eine prooxidative Wirkung des EGCG diskutiert [37].

Wolfram et al. beschreiben einen antiadipösen Effekt in zahlreichen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien [125]. Auch in der HIV-Forschung wird EGCG inzwischen als eine mögliche neue Therapiesubstanz ins Auge gefasst [80].

Sogar in der Laienpresse wird das EGCG als Hoffnungsträger zur Therapie zahlreicher Krankheiten beworben [44]. Die Metabolisierung von EGCG ist noch nicht eindeutig geklärt. Während EC und EGC über den Urin ausgeschieden werden, wird bei EGCG ein enterohepatischer Kreislauf bzw. eine durch Mikrobiota im Dickdarm induzierte Konversion zu Phenylvalerolakton mit anschließender Abgabe ins Blut, diskutiert [17].

Für die Analyse in der HPLC und die Zelltests wurde kommerziell erworbenes EGCG der Firma Sigma-Aldrich genutzt. Es lag als Pulver vor und wurde in Aquadest gelöst.

1.3.3 Quercetin

Quercetin mit der Summenformel $C_{15}H_{10}O_7$ gehört zur Gruppe der Flavonole. Seinen Namen verdankt es dem französischen Arzt Joseph Du Chesne (1544 – 1609), genannt Quercetanus. [98]

Quercetin ist der Hauptvertreter der Flavonole und kommt β -glykosidisch gebunden ubiquitär in pflanzlicher Nahrung vor. Aufgebrühter grüner Tee enthält bis zu 4 mg / 100 g Quercetin. Außerdem kommt es in höheren Konzentrationen z.B. in Äpfeln und Zwiebeln vor [115]. Dem Quercetin werden u.a. anticancerogene [16,26,25,39], antioxidative [70,111], neuroprotektive [106] und kardioprotektive [85] Eigenschaften zugesprochen.

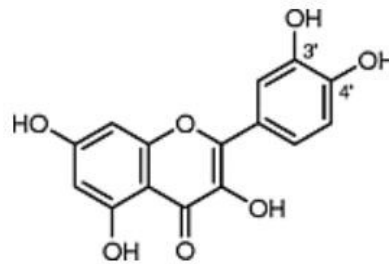


Abbildung 8. Strukturformel von Quercetin (aus RÖMPP, Thieme) [98].

1.3.4 Tamoxifen

Tamoxifen gehört zu den Selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs). Während es an estrogenrezeptorpositiven Brustkrebszellen antagonistisch wirkt, hat es am Knochengewebe und Endometrium eine schwach agonistische Wirkung. Gegenüber Estradiol hat Tamoxifen eine sehr geringe Affinität zu den Rezeptoren ER α und ER β und hat eine Plasmahalbwertszeit von bis zu 14 Stunden. Der aktive Metabolit von Tamoxifen ist Endoxifen, welcher unter Mithilfe von Enzymen (CYP2D6) in der Leber gebildet wird. Dies kann bei langsamen CYP2D6-Metabolisierern dazu führen, dass der therapeutische Plasmaspiegel von Endoxifen nicht erreicht wird [35]. Es gibt Untersuchungen, die zu dem Ergebnis kommen, dass Tamoxifen einen großen Teil seiner Wirkung auch über die Beeinflussung der mitochondrialen Apoptose ausübt und deshalb auch auf estrogennegative Zellen wirken könnte [55].

Tamoxifen ist bei prämenopausalen Brustkrebspatientinnen das Mittel der Wahl für eine adjuvante Therapie von estrogenrezeptor-positiven Tumoren. Die S3-Leitlinie empfiehlt eine Gabe von 20 mg pro Tag über 5 Jahre. Für postmenopausale Patientinnen wird auf die bezüglich des disease-free survivals (DFS) günstigeren Aromatasehemmer hingewiesen, jedoch alternativ auch die Tamoxifen-Mono-Behandlung oder eine sukzessive Kombinationsbehandlung aus SERM und Aromatasehemmer, welche auch gegenüber der Tamoxifen-Mono-Therapie mit einer geringeren Rezidivrate überlegen ist, empfohlen [28,48]. In Studien der Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) wurde demonstriert, dass die adjuvante, 5 Jahre andauernde, Tamoxifenbehandlung nach chemotherapeutischer und operativer Therapie die jährliche Mortalitätsrate um über 30 % senken konnte. Außerdem senkte sich die brustkrebsbedingte Sterblichkeit in den ersten zehn Jahren um 30 % und das Rezidivrisiko nach 15 Jahren reduzierte sich um 12 % [27,30].

Aufgrund der positiven Effekte nach bereits fünf Jahren Tamoxifenbehandlung setzte sich die „Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter“- Studie (ATLAS) neuerdings mit der Frage auseinander, ob eine Verdopplung zu noch länger anhaltenden und verbesserten Ergebnissen führen würde. Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass die 10 Jahre dauernde adjuvante Tamoxifen-Therapie mit einer signifikanten Verbesserung des DFS auch in der zweiten Dekade und der Halbierung der Gesamtmortalität in den Jahren 10 – 14 nach Diagnose einhergeht. Auf die nicht brustkrebsbedingte Mortalität zeigt es keinen Effekt [20].

Für die Behandlung mit Aromatasehemmern sieht die St.-Gallen-Konferenz keinen Vorteil darin, die Therapie länger als 5 Jahre fortzuführen [18].

Studien haben aber gezeigt, dass die Compliance von Brustkrebspatientinnen bezüglich der Einnahme Ihrer endokrinen Therapie mangelhaft ist. Obwohl die Patientinnen in Befragungen angaben, regelmäßig ihre Therapie einzunehmen, deuteten die Apotheken-Verordnungsdaten in Deutschland 2004 / 2005 darauf hin, dass nach 15 - 18 Monaten nur noch 54 % der Patientinnen ihre Rezepte einlösten [46]. Auch eine Studie der Havard Medical School kommt zu dem Ergebnis, dass nach 4 Jahren nur noch 50 % der Patientinnen ihre Medikation einnehmen [83]. Als ein wichtiger Grund für dieses Complianceproblem kommen die zahlreichen Nebenwirkungen von Tamoxifen, wie Hitzewallungen Übelkeit, Exantheme, erhöhte Thrombosegefahr, Schmerzen an Gewebe und Knochen durch proliferative Wirkung, erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinom und teilreversible Sehstörungen in Frage [56].

1.3.5 Estradiol

Estradiol ist ein aromatisiertes C₁₈ - Steroid, welches der Hauptvertreter der Estrogene ist. Neben seinen Hauptproduktionsorten im Ovar und den Theka-Zellen des Graaf-Follikels wird es auch in geringen Mengen im Hoden und der Nebennierenrinde gebildet. Wie schon in der Einleitung beschrieben kann Estradiol auch in Geweben mit Aromataseaktivität, wie z.B. dem Fettgewebe, produziert werden (Abbildung 2).

Während der Schwangerschaft ist die Plazenta an der Estradiol-Produktion beteiligt. Estrogene üben ihre Wirkung sowohl auf den weiblichen, als auch auf den männlichen Reproduktionstrakt aus. Dies geschieht über die Bindung an Estrogenrezeptoren, wobei die Affinität an Rezeptoren des Typs α wesentlich höher ist, als die für Typ β [40,50].

Estradiol gilt als Promotor des Brustkrebs und erhöhte Serumspiegel des Hormones sind mit einem höheren Risiko, an Brustkrebs zu erkranken assoziiert [13,47].

1.4 Zielstellung

Brustkrebs ist noch immer die häufigste Krebstodesursache der Frau. Auffällig ist dabei aber der große Unterschied der Inzidenzraten zwischen Japan, bzw. China und der westlichen Welt, wie Europa und den USA. Die unterschiedlichen Ernährungsformen sind daher immer wieder Bestandteil der Forschung, um zu ermitteln, welche Nahrungsbestandteile evtl. für dieses Phänomen verantwortlich sein könnten. Grüner Tee ist besonders in Japan ein Nationalgetränk und wird dort in großen Mengen verzehrt. Bereits in zahlreichen Studien wurde untersucht, ob grüner Tee für die niedrigeren Brustkarzinomraten in Asien verantwortlich sein könnte. Da das Catechin Epigallocatechingallat (EGCG) in hohen Konzentrationen im grünen Tee vorkommt, was durch meine HPLC-Analyse bestätigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Catechin für die Wirkung verantwortlich ist.

Ziel meiner Arbeit ist es, die bereits in anderen Studien gemachten Beobachtungen zu bestätigen, dass grüner Tee antikarzinogen beim Brustkarzinom wirkt und welchen Anteil dabei das EGCG hat. Der Fokus meiner Arbeit liegt dabei darauf, ob EGCG auch zur Therapie von estrogenrezeptor-negativen Zellen genutzt werden kann und ob sich die Wirkung im Vergleich zu den rezeptor-positiven Zellen unterscheidet.

Obwohl Tamoxifen bisher nur zur Therapie estrogenrezeptor-positiver Tumoren genutzt wurde, finden sich in der Literatur immer wieder Hinweise, dass Tamoxifen nicht nur über den Rezeptor wirkt, weshalb ich auch die Wirkung des Tamoxifens auf beide Zellreihen untersucht habe. Tamoxifen hat den großen Nachteil der starken Nebenwirkungen, wodurch eine schlechte Compliance der Patientinnen hervorgerufen wird. EGCG könnte vielleicht als Add-on-Medikament genutzt werden und evtl. ist es möglich, dadurch die Tamoxifen-Dosis zu reduzieren.

Da es unterschiedliche Darreichungsformen des grünen Tees auf dem Markt gibt, habe ich mich dazu entschieden, sowohl den Matcha-Tee, als auch den normalen Aufguss-Tee zu untersuchen, um zu erkennen, ob es dabei Unterschiede in der Wirkung gibt. Bei der Herstellung der Tee-Extrakte habe ich darauf geachtet, handelsübliche Teesorten zu nutzen und mich bei der Zubereitung an den allgemein üblichen Zubereitungsformen zu orientieren. Zunächst war es mein Ziel in der HPLC-Analyse die Inhaltsstoffe des grünen Tees nachzuweisen.

Mithilfe von verschiedenen Zelltests habe ich anschließend die Auswirkungen des grünen Tees bzw. Matchatees, des Epigallocatechingallats, des Quercetins, sowie von Tamoxifen und Estradiol auf die Zellviabilität und Zellproliferation von estrogenrezeptor-positiven MCF-7- und estrogenrezeptor-negativen MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen getestet. Die Testverfahren sind bereits in Vorarbeiten zu ähnlichen Themen mehrfach erprobt und bestätigt worden.

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgt mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA).

2. Material und Methode

2.1 Material

Unter diesem Punkt werden die Geräte, Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien und Chemikalien bzw. Reagenzien angegeben, die zur Erstellung der Ergebnisse nötig waren. Die Auflistung erfolgt in tabellarischer Form.

2.1.1 Geräte

Im Folgenden werden die Geräte aufgeführt, die für die Zellpflege, die Herstellung der Testsubstanzen und zur Durchführung der Versuche genutzt wurden.

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Name	Hersteller	Land
Hochleistungsflüssigkeits- - Chromatograph (HPLC)	Smartline Manager 5000 Smartline Pump 1000 Smartline UV- Detector 2500 Smartline RI Detector Smartline Column Thermostat	Knauer	Deutschland
HPLC - Säule	Vertex-Säule 250 x 4 mm Eurosphere 100-5 C 18 mit integrierter Vorsäule	Knauer	Deutschland
HPLC - Injektionsspritze	Injektionsspritze 100 µl	Knauer	Deutschland
HPLC - Software	ClarityChrom V 2.6.	Knauer	Deutschland
Excel 2010		Windows	USA
Mikrowelle	Discover SP	CEM GmbH	Deutschland
Vakuum-Konzentrator- Zentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf	Deutschland
Waage	Sartorius Basic	Sartorius AG	Deutschland
Waage	MT 5	Mettler Toledo	USA
Zentrifuge	Universal 320R	Hettich	Deutschland
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Instruments	Deutschland
Rollenmischer	RM 5	Hecht	Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuum Pump MZ 2 NT	Vacuubrand	Deutschland
Mikroskop	Axiostar Plus	Zeiss	Deutschland
Mikroskop	Axiocvert 40 C	Zeiss	Deutschland

Mikroskop-Kamera	AxioCam MRc	Zeiss	Deutschland
pH-Mess-Elektrode	Orion 3 Star pH Benchtop	Thermo Scientific	USA
Brutschrank	Function Line	Heraeus Instruments	Deutschland
Gefrierschrank	Herafreeze	Heraeus Instruments	Deutschland
Gefriertruhe		Liebherr Premium	Schweiz
Kühlschrank		Liebherr Premium	Schweiz
Wärmeschrank	SM 400	Memmert	Deutschland
Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Heraeus Instruments	Deutschland
Vortexer	Reax 2000	Heidolph	Deutschland
Plattenrüttler	TPM – 2	Sarstedt	Deutschland
Microplate Reader	Model 680	Bio Rad	USA
Multimode Reader	GloMax Discover	Promega	USA
Glucoseautomat	Biosen 5140	EKF - Diagnostic	Deutschland
Pipetten	Research	Eppendorf	Deutschland
Multipipette	Multipipette Plus	Eppendorf	Deutschland
Eismaschine	AF 80	Scotsman	USA
Handmörser			

2.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden werden die Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien aufgeführt, die für die Zellpflege und zur Durchführung der Versuche genutzt wurden.

Tabelle 3: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Land
50 ml Zentrifugationsröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen	Schweiz
15 ml Zentrifugationsröhrchen	TPP (Techno Plastic Products AG), Trasadingen	Schweiz
1,5 ml Zentrifugationsröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen	Deutschland
35 ml Glasröhrchen mit Silikondeckel		
Röhrchenständer		
Zellkulturflaschen 550 ml, 250 ml, 50 ml	Greiner, bio-one, Frickenhausen	Deutschland
Pipettenspitzen 10 – 5000 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht	Deutschland
Aufsätze Multipipette 3 – 200 µl	Eppendorf	Deutschland

24-Well Zellkultur Testplatte, transparent	TPP (Techno Plastic Products AG), Trasadingen	Schweiz
96-Well- Zellkultur-Testplatte, transparent	Greiner bio-one, Frickenhausen	Deutschland
96-Well- Zellkultur-Testplatte, weiß	Promega, Madison	USA
Glasflasche mit Deckel 500, 1000 ml		
Glasschalen		
Kunststoffwanne für Pipettenkamm		
Bürker - Zählkammer	Fein-Optik, Jena	Deutschland
Kunststoffpipette 3 ml		
Parafilm	American National Can	USA
Glaspipette 10 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen	Deutschland
Filter für 50 ml - Zentrifugationsröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen	Deutschland
Magnet-Rührstäbchen		
Glucose Standard Cups	CARE diagnostica	Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Testsubstanzen

Im Folgenden werden die Chemikalien und Reagenzien aufgeführt, die für die Zellpflege und zur Durchführung der Versuche genutzt wurden.

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Zusatzbezeichnung	Hersteller	Land
Grüner Tee Teeblätter			
Grüner Tee Matcha-Puver			
Genistein	CAS-Nr.: 446-72-0	Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland
Quercetin	CAS-Nr.: 117-39-5	Sigma-Aldrich, Steinheim	Deutschland
Epigallocatechingallate (EGCG)	CAS-Nr.: 989-51-5	Sigma-Aldrich, Steinheim	Deutschland
Tamoxifen		Sigma-Aldrich, Steinheim	Deutschland
17β- Estradiol		Sigma-Aldrich, Steinheim	Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	CAS-Nr.: 67-68-5	Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland

Aqua destilliert		Eigenherstellung	
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM): mit Phenolrot, mit 10 % FKS	Dulbecco´s Modified Eagle Medium: mit 4,5 g/L Glukose, mit 20 ml/L L-Glutamin, 100ml/L FKS, 2 ml/L Penicillin/Streptomycin (100x), 5 ml/L Amphotericin B (250 µg/ml), 15 mg/L Phenolrot	CC-Pro, Oberdorla	Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM): ohne Phenolrot, mit 10 % FKS	mit 4,5 g/L Glukose, mit 20 ml/L L-Glutamin, 100 ml/L FKS, 2 ml/L Penicillin/Streptomycin (100x), 5 ml/L Amphotericin B (250 µg/ml)	CC-Pro, Oberdorla	Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM): ohne Phenolrot, mit 1 % FKS	mit 4,5 g/L Glukose, mit 20 ml/L L-Glutamin, 10 ml/L FKS, 2 ml/L Penicillin/Streptomycin (100x), 5 ml/L Amphotericin B (250 µg/ml)	CC-Pro, Oberdorla	Deutschland
FKS	Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim	USA
Amphotericin B	250 µl / ml	PAA, Cölbe	Deutschland
Penicillin / Streptomycin	10000 U / ml Penicillin + 10 mg / ml Streptomycin	PAA, Cölbe	Deutschland
Trypsin	Trypsin-EDTA 10x (5000 mg / l Trypsin, 2000 mg / l EDTA)	CC-Pro, Oberdorla	Deutschland
Trypan Blau	Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco, Auckland	Neuseeland
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland
Cell Proliferation Kit I (MTT)		Roche, Basel	Schweiz

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colometric)		Roche, Basel	Schweiz
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)		Roche, Basel	Schweiz
In Vitro Toxicology Assay Kit, Neutral Red based		Sigma-Aldrich, Steinheim	USA
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay		Promega, Madison	USA
Progesteron-Antikörper	PR antibody, IgG, unconjugated, Rabbit, Monoclonal	Biorbyt, Cambridge	Großbritannien
Estrogen Beta Antikörper	Mouse IgG2a	BioLegend, San Diego	USA
Estrogen Alpha Antikörper	Rabbit monoclonal IgG	Biorbyt, Cambridge	Großbritannien
H₂O₂	Wasserstoffperoxid 35 %	Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland
LinRed IHC	Substratkit für Peroxidase	Linaris, Dossenheim	Deutschland
Impress Reagent Kit Peroxidase (IHC)	Anti-Mouse/Rabbit Ig MP-7500 R.T.U. Normal Horse Serum (2,5 %)	Vector, Burlingame	USA
Formafix 4 %	gepuffert	Grimm med. Recycling GmbH, Torgelow	Deutschland
pH-Puffer		Thermo Scientific, Waltham	USA
Ethanol 70%		Eigenherstellung	
Methanol		J.T. Baker, Deventer	Niederlande

2.1.4 Zellkulturen

Zellbezeichnung	Rezeptorstatus
MCF-7 (ATCC HTB-22)	ER+, PR+
MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)	ER-, PR-

2.2 Methoden

Im Folgenden wird die Durchführung der für die Erstellung der Ergebnisse notwendigen Experimente und Vorbereitungen, wie z.B. die Zellpflege und Herstellung der Testsubstanzen, beschrieben.

Um bei den Zelltests ausschließen zu können, dass Testergebnisse nur aufgrund der Interaktion zwischen den Testsubstanzen und dem DMEM-Mediums untereinander entstehen, wurden bei allen Tests zunächst die Extrakte nur in Medium gegeben und die Test-Well mit dem jeweiligen Testverfahren überprüft. So konnte die Beeinflussung der Testergebnisse durch Interaktionen ausgeschlossen werden.

Zur Berechnung der Testergebnisse (in Prozent der Negativkontrolle) wurde beim CellTiter-Glo-Test, dem MTT-Test, BrdU-Test und Neutralrot-Test folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellviabilität / Zellproliferation in \%} \\ = 100 \times \frac{(\text{Experimenteller Wert} - \text{Leerwert Medium}) - (\text{Zellsuspension} - \text{Leerwert Medium})}{(\text{Lösungsmittel} - \text{Leerwert Medium}) - (\text{Zellsuspension} - \text{Leerwert Medium})}$$

2.2.1 Herstellung der Zellkulturen

Die Karzinomzellen liegen in DMSO-Medium in Stickstoff gefroren vor. Zur Kultivierung müssen die Zellen schonend aufgetaut werden. Dies geschieht zunächst auf Eis und anschließend bei Raumtemperatur. Nachdem die Zellen aufgetaut sind, muss das DMSO ausgewaschen werden. Dazu werden die Zellen in ein 50 ml – Röhrchen überführt, mit 15 ml DMEM versetzt und dann 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Zellpellet wird nach Entfernung des Überstandes mit 5 ml DMEM resuspendiert und in einer kleinen Zellkulturflasche mit Bakterienfilter zum Gasaustausch im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Bei der Zellpflege werden dreimal pro Woche entweder das Medium in den Kulturflaschen gewechselt oder die Zellen in eine neue, größere Zellkulturflasche passagiert. Die jeweilige Maßnahme richtet sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit der Carcinomzellen.

Beim Mediumwechsel wird das Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und durch die gleiche Menge neuen Mediums ersetzt. Zeigt sich lichtmikroskopisch eine Konfluenz von 70 – 90 %, müssen die Zellen in eine größere, bzw. auf mehrere gleichgroße Flaschen überführt werden. Dazu müssen die Zellen, welche über Peptidbindungen am Boden der Kulturflasche haften, von diesem mittels Trypsin (Trypsin-EDTA) gelöst werden. Um zu verhindern, dass sich das Trypsin am FKS und nicht an den Zellen anlagert, wird der Boden der Zellkulturflasche nach Entfernung des Mediums zunächst mit PBS gespült. Anschließend wird der Flaschenboden mit ausreichend Trypsin versetzt. Nach 5 min Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ haben sich die Zellen gelöst, und die Trypsin-Zell-Lösung wird mit der 1,5 – fachen Menge DMEM und FKS neutralisiert, um zu verhindern, dass die Zellen durch das Trypsin zerstört werden. Das FKS legt sich dabei um die Zellen. Anschließend wird diese Suspension in ein 50 ml – Röhrchen überführt und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Danach wird der Überstand entfernt und das Zellpellet wieder in

10 ml DMEM resuspendiert. Entsprechend der zuvor festgestellten Zelldichte wird nun eine bestimmte Menge der Zellsuspension in eine oder mehrere gleichgroße oder eine größere Gewebekulturflasche, überführt und je nach Flaschengröße noch mit weiterem Medium versetzt. Nun kommen die neu bestückten Kulturflaschen wieder in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

2.2.2 Herstellung der Testsubstanzen

Die Lösungen der Testsubstanzen wurden selbstständig hergestellt. Der grüne Tee wurde jeweils in Wasser und 70 %-Ethanol gelöst und in zwei unterschiedlichen Konzentrationen in die Zellkultur gegeben. Dafür wurde zunächst jeweils 1 g des Matcha-Teepulvers bzw. der grob gemörserten Teeblätter abgewogen und dann in 10 ml Aquadest bzw. 70 % - Ethanol gelöst. Anschließend wurden die Lösungen in einer Mikrowelle (Discover SP) erhitzt. Dies erfolgte bei den Wasserextrakten mit den Einstellungen 70 °C bei 80 Watt für 20 min und für die Ethanolextrakte mit 60 °C bei 80 Watt für 20 min. Daraufhin wurden die Extrakte zentrifugiert, der Überstand filtriert und es erfolgte mittels eines Vakuum-Konzentrators (Eppendorf Concentrator S301) bei 45 °C das Einengen auf ein Drittel der Ausgangslösung. Anschließend wurden die Extrakte bei - 80 °C zur Aufbewahrung eingefroren. Vor jeder Anwendung wurden die Tee-Extrakte nach dem Auftauen erneut zentrifugiert.

Das Epigallocatechingallat wurde in destilliertem Wasser gelöst und in sieben unterschiedlichen Konzentrationen in den Zellkulturen getestet.

Quercetin wurde in 50 % - DMSO gelöst und in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen in den Zellkulturen getestet. Die in 70 %-Ethanol gelösten Tamoxifen- und Estradiollösungen wurden je in einer Konzentration untersucht.

Die genaue Konzentration kann man Tabelle 5 entnehmen.

Tabelle 5: Konzentrationen der untersuchten Substanzen

Substanz	Konzentration in Röhrchen	Endkonzentration in Zellkultur
Matchatee in H ₂ O	300 µg / µl	3000 µg / ml
Matchatee in C ₂ H ₆ O (70%)	300 µg / µl	3000 µg / ml
Grüner Tee in H ₂ O	300 µg / µl	3000 µg / ml
Grüner Tee in C ₂ H ₆ O (70%)	300 µg / µl	3000 µg / ml
Epigallocatechingallat in H ₂ O	18 µg / µl	180 µg / ml
Epigallocatechingallat in H ₂ O	15 µg / µl	150 µg / ml

Epigallocatechingallat in H ₂ O	12 µg / µl	120 µg / ml
Epigallocatechingallat in H ₂ O	9 µg / µl	90 µg / ml
Epigallocatechingallat in H ₂ O	1 µg / µl	10 µg / ml
Epigallocatechingallat in H ₂ O	4,5 µg / µl	45 µg / ml
Epigallocatechingallat in H ₂ O	0,45 µg / µl	4,5 µg / ml
Quercetin in 1:2 DMSO	3 µg / µl	30 µg / ml
Quercetin in 1:2 DMSO	0,3 µg / µl	3 µg / ml
Estradiol	0,00272 µg / µl	0,0272 µg / ml
Tamoxifen	5,6 µg / µl	56 µg / ml

2.2.3 HPLC (Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie)

Die Chromatographie ist ein Trennprozess, bei dem ein Probengemisch anhand seiner physiko-chemischen Eigenschaften zwischen zwei Phasen verteilt wird und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Detektion durchläuft. Bei den zwei Phasen handelt es sich um eine mobile und eine stationäre Phase, wobei die mobile Phase an der stationären Phase vorbeiläuft, bis sie am Ende eine UV-Detektionskammer passiert. Die HPLC wird auch als Hochdruck-Chromatographie bezeichnet, da sie mit sehr hohen Drücken arbeitet, die durch pulsationsarme Pumpen und dünne Metallsäulen gebildet werden.

Ausgewertet wird am Ende die Retentionszeit, d.h. die Zeit nach der das Signal für einen Stoff, welches durch den UV-Detektor detektiert wird, in Form eines Peaks auf dem Bildschirm erscheint. Dieser Zeitpunkt ist für jeden Stoff des Gemisches bei gleich gewählten Bedingungen charakteristisch, hat also dieselbe Qualität. Anhand der Fläche des jeweiligen Peaks können auch quantitative Aussagen getroffen werden.

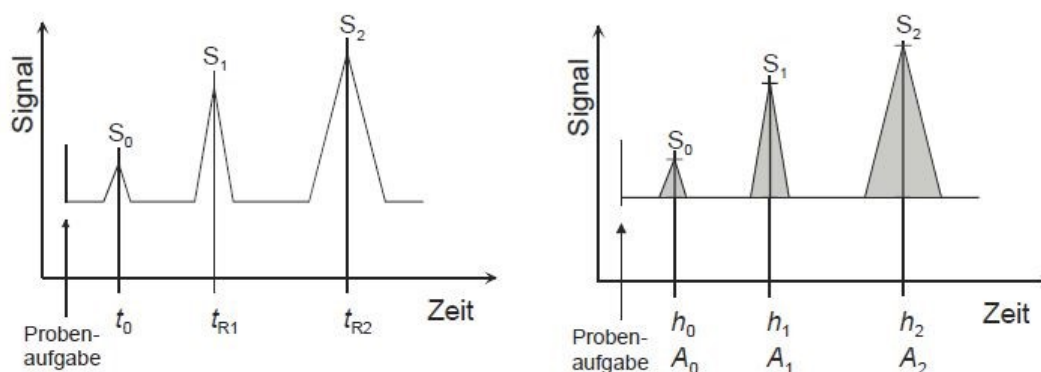


Abbildung 9: qualitative und quantitative Analyse von Stoffen anhand der HPLC. Die qualitative Analyse (links) orientiert sich dabei an den Retentionszeiten (t_r) und die quantitative (rechts) an den Peakflächen (A) bzw. Höhen (h), Grafik übernommen aus Gey 2015 [38].

Für diese Arbeit wird eine Umkehrphasenchromatographie genutzt. Die polare mobile Phase besteht dabei aus Aquadest bzw. DMSO und als stationäre Phase dient eine hydrophobe Kohlenstoffsäule (C 18). Dies führt dazu, dass, während unpolare Verbindungen ein wesentlich stärkeres Bindungsverhalten zu den Oberflächengruppen der stationären Phase aufweisen, die hydrophilen Substanzen wesentlich affiner zur mobilen Phase sind und somit die Säule wesentlich schneller durchlaufen, d.h. zu einem früheren Zeitpunkt detektiert und als Peaks aufgezeichnet werden. Um zu verhindern, dass Stoffe, die ähnliche Polaritätseigenschaften haben, nahezu zeitgleich detektiert werden und somit zu einer Überlagerung oder zu gedrängten Aneinanderreihung von Peaks führen, werden zur Erstellung eines Elutionsgradienten zwei unterschiedliche Lösungsmittel als mobile Phase genutzt, beginnend mit Aquadest. Nach 5 Minuten wird zunehmend DMSO dazugemischt, bis bei Minute 10 die mobile Phase zu 100 % aus der DMSO-Phase besteht. Da DMSO ein sehr starkes Lösungsmittel ist, löst es auch sehr stark adharänte Moleküle aus der stationären Phase heraus und führt sie so dem Detektor zu. Um ein Aufquellen der Stahlsäule zu verhindern wurde in Rücksprache mit der Herstellerfirma Knauer DMSO mit 10% Aquadest und das Aquadest mit 10% Methanol versetzt [38].

In Abbildung 10 ist der Aufbau einer HPLC-Anlage schemenhaft dargestellt. Aus einem Elutionsmittelvorratsgefäß wird die mobile Phase mit Hochdruck über einen Entgaser zu dem Injektor gepumpt, wo dann ohne Druckverlust die Probe (20 μ l) in das Elutionsmittel gelangt. Danach durchläuft das Proben-Elutionsmittelgemisch eine der Hauptsäule vorgeschaltete Filtersäule, um mögliche Probenkontaminationen herauszufiltern und z.B. ein Verstopfen der Säule zu verhindern. Schließlich gelangt die mobile Phase mit der Probe dann in die Hauptsäule, wo die Substanzen der Probe, wie oben beschrieben, aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften in verschiedene Interaktionen mit der stationären Phase eintreten, um dann zum Schluss als aufgetrennte Stoffe nach unterschiedlichen Retentionszeiten per UV-Licht detektiert und grafisch dargestellt werden zu können.

Durchführung:

1. HPLC-Apparatur und Steuerungsprogramm ClarityChrom® starten
2. Spülen des Pumpenkreislaufs mit der „Purge“-Funktion
3. Probenspritze mit 20 µl des zu untersuchenden Extrakts füllen und in Injektionsstutzen setzen
4. Starten der Messung
5. Injektion des Extrakts in die Injektionsschleife
6. Nach 3 Minuten mittels der „Injection“-Funktion Injektion der Probe aus der Schleife in den Messkreislauf. Die Messung wird automatisch neu gestartet.
7. Messung läuft für 40 Minuten, dabei wechselt die Zusammensetzung der mobilen Phase je nach Einstellung des Messprotokolls
8. Beenden der Messung nach 40 Minuten abspeichern der Ergebnisse
9. Abzug des Leerwertes von Messergebnis mittels Software (Clarity Chrome)
10. Flächenberechnung der Peaks mittels Software (Clarity Chrome)

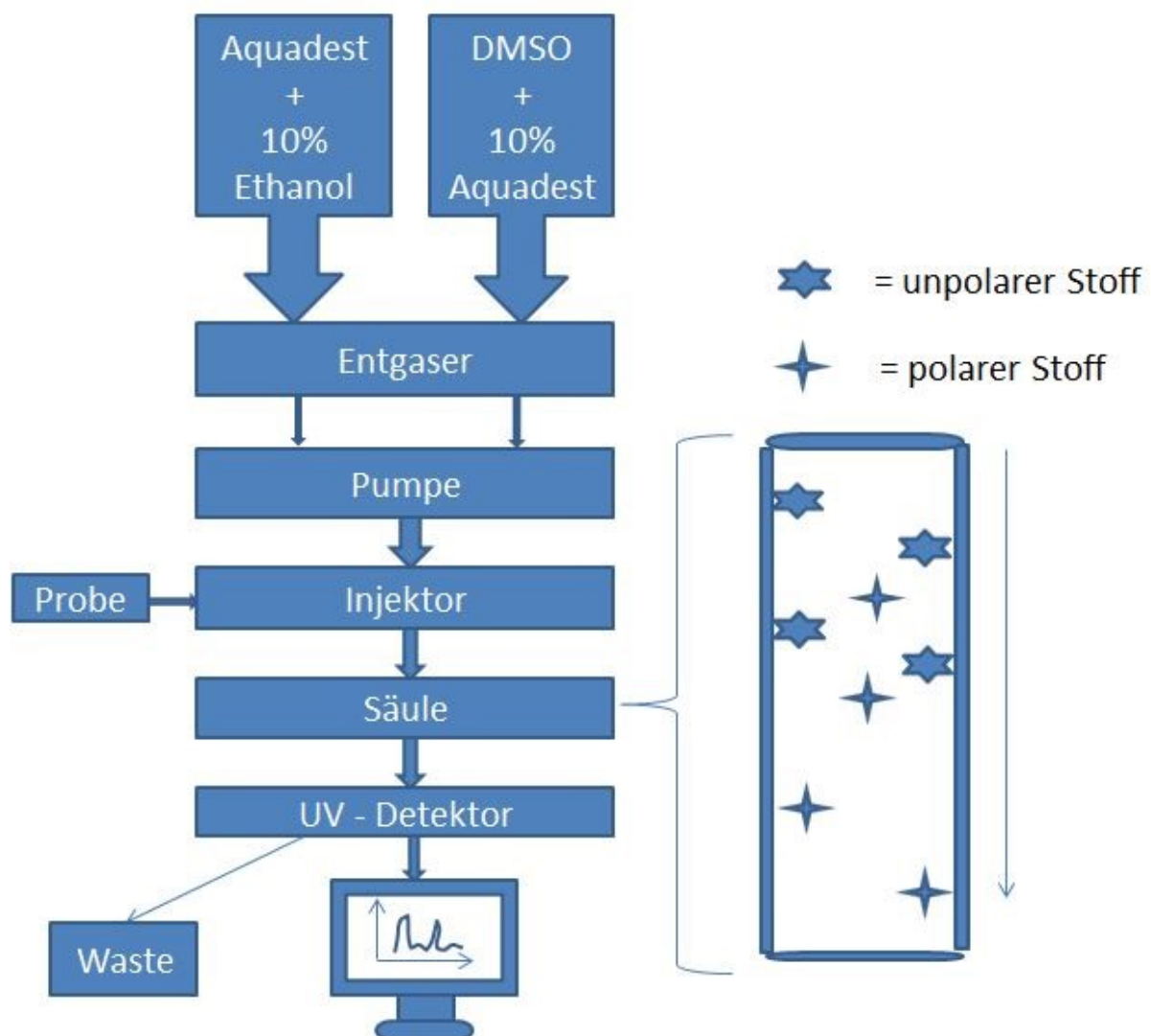


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der HPLC (modifiziert nach Gey) [38].

2.2.4 ATP-Lumineszenztest

Der CellTiter-Glo-Luminescent-Test dient der Darstellung der Anzahl lebender Zellen anhand der Detektion von ATP als Marker für metabolisch aktive Zellen. Die Menge an gemessenem ATP ist dabei direkt proportional zur Anzahl der Lebendzellen. Durch die Zugabe des Reagenz werden die Zellen lysiert und es bindet eine temperaturstabile Glühwürmchen-Luziferase (vom *Photuris pennsylvanica*) an das freiwerdende ATP (Abbildung 11). Gleichzeitig kommt es zu einer Hemmung der ATPase, um die Menge des freiwerdenden ATPs aufrecht zu erhalten. Die Quantifizierung der lumineszierenden Signale erfolgt mittels eines Lumineszenz-Readers [86].

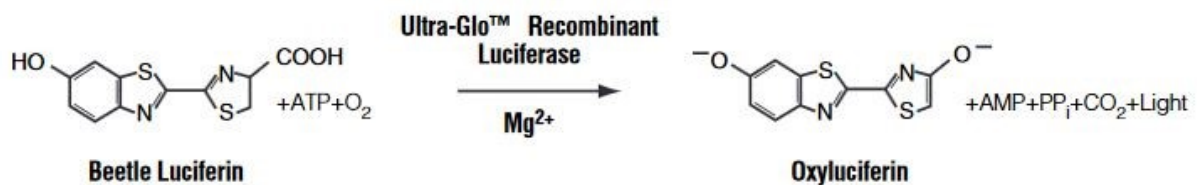


Abbildung 11: Prinzip des ATP-Lumineszenztests: Die Luziferase oxygeniert das Luziferin unter Mitwirkung von Magnesium, ATP und Sauerstoff, übernommen aus Technical Bulletin (Promega 2015) [86].

Durchführung

1. 100 µl / Well Zellsuspension in 96-Well-Platte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.
2. Zugabe von 1 µl / Well Extrakt. Anschließend wieder 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3. Mixen des CellTiter-Glo-Substrates mit dem CellTiter-Glo-Puffer.
4. Zugabe von 100 µl / Well des Reagenz.
5. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur (davon die ersten 2 min auf einem Plattenrüttler).
6. Umpipettieren der Zellkultur-Reagenz-Gemische in eine weiße, intransparente 96-Well-Platte (zur Vermeidung von Lichtleitung in benachbarte Wells).
7. Messung der Wells mit dem Lumineszenzreader im Programm CellTiter-Glo.

2.2.5 MTT-Test

Der MTT-Test dient zur Bestimmung der Viabilität von metabolisch aktiven Zellen. Das Prinzip basiert auf der Umwandlung des gelben MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) in den violetten Farbstoff Formazan (Abbildung 12). Diese Fähigkeit besitzen allerdings nur vitale Zellen. Es wird vermutet, dass dieser Prozess unter der Reduktion von NADH⁺ zu NAD⁺ stattfindet. Aufgrund dieser Annahme kann davon ausgegangen werden, dass der MTT-Test die mitochondriale Aktivitäten der Zellen misst [91].

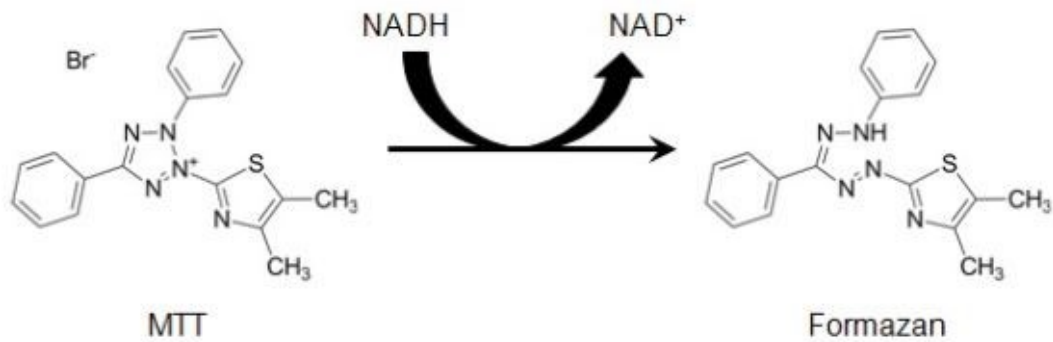


Abbildung 12: Prinzip des MTT-Tests: Umwandlung von MTT zu Formazan, übernommen aus Riss et al. [88].

Durchführung:

1. 100 µl / Well Zellsuspension in 96-Well-Platte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
2. Mediumwechsel.
3. Zugabe von 1 µl / Well Extrakt. Anschließend 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
4. Zugabe 10 µl / Well MTT-Reagenz.
5. 4 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
6. Zugabe von 100 µl / Well der Solubilisierungslösung.
7. Messung am ELISA-Reader bei 570 nm; Referenz 655 nm.

2.2.6 BrdU-Test

Der BrdU-Zellproliferationstest ist ein kolorimetrischer Immunoassay, der auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle der Base Thymidin in die DNA basiert (Abbildung 13) und so der Bestimmung der Zellproliferation dient. Nach der Inkubation der Zell-Extrakt-Gemische und der Kontrollen mit dem zugegebenen BrdU und dem Einbau des Thymidinanalogons durch die Polymerase in die DNA werden die Zellen durch das FixDenat-Reagenz denaturiert. Der nun dazugegebene Peroxidase-gekoppelte Anti-BrdU-Antikörper kann an das BrdU der neu synthetisierten DNA binden. Bei dem Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper aus Maushybridzellen. Anschließend wird das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugefügt, welches durch die an den BrdU-Anti-Brdu-Immunkomplex konjugierte Peroxidase zu einem blauen Farbumschlag führt, der in seiner Intensität mit der Menge neu synthetisierter DNA korreliert. Die Absorption des Reaktionsproduktes wird mittels des ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen [90].

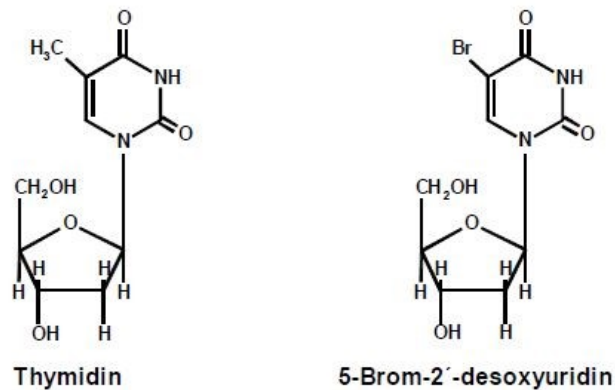


Abbildung 13: Prinzip des BrdU-Tests: Einbau des 5-Brom-2'-desoxyuridins (BrdU) anstelle der Base Thymidin, übernommen aus Cell Proliferation ELISA (Roche 2004) [90].

Durchführung:

Neben den bei allen durchgeführten Tests nötigen Kontrollen und Blindwerten, musste beim BrdU-Zellproliferationstest noch eine Backgroundkontrolle angesetzt werden, um Hinweise auf unspezifische Bindung des Anti-BrdU-PODs an Zellen ohne BrdU-Einbau erhalten zu können.

1. 100 μl / Well Zellsuspension in 96-Well-Platte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
2. Zugabe von 1 μl / Well Extrakt. Anschließend wieder 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3. Zugabe von 10 μl / Well BrdU. Anschließend 3 h Inkubation im Brutschrank bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
4. Entfernen des Mediums durch vorsichtiges Abklopfen.
5. Zugabe von 200 μl / Well FixDenat. Anschließend 30 min Inkubation bei Raumtemperatur.
6. Entfernen des FixDenat durch vorsichtiges Abklopfen.
7. Zugabe von 100 μl / Well Anti-BrdU-POD-Solution. Anschließend 60 min Inkubation bei Raumtemperatur.
8. Entfernen der Anti-BrdU-POD-Solution.
9. 3 x waschen mit 200 μl / Well Waschlösung.
10. Zugabe von 100 μl / Well Substratlösung. Anschließend 20 min Inkubation bei Raumtemperatur.
11. Abstoppen der Reaktion mit 25 μl / Well 1 M H_2SO_4 .
12. Messung am ELISA-Reader bei 450 nm; Referenz 620 nm.

2.2.7 Neutralrot-Test

Mit Hilfe dieses Assays kann die Anzahl lebender Zellen detektiert und somit Rückschlüsse auf die Zelltoxizität ermittelt werden. Das Prinzip beruht auf dem Neutralrot-Farbstoff. Dieser wird von lebenden Zellen aktiv in die Zelle transportiert und dort in den Lysosomen gespeichert. Tote Zellen haben diese Möglichkeit nicht. Nach der Zugabe und Inkubation des Farbstoffes werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend der Farbstoff mit einer angesäuerten Ethanol-Lösung aus den Zellen wieder gelöst. Bei der anschließenden ELISA-Messung können nun die Menge von Farbstoff pro Well gemessen werden und damit Rückschlüsse auf die Anzahl lebender Zellen und somit die Zytotoxizität des jeweiligen Extraktes im Verhältnis zur High-Control gezogen werden [104].

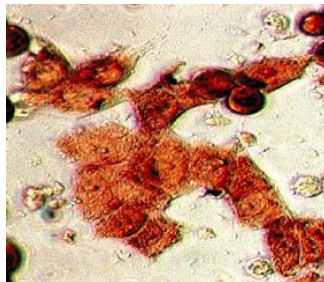


Abbildung 14: NRT: Aufnahme des Farbstoffes durch vitale MCF-7-Zellen, lichtmikroskopische Aufnahme (10fache Vergrößerung).

Durchführung: Aufgrund starker Kristallbildung und damit verbundener Anreicherung des Neutralrot-Reagenz bei Anlehnung an die Protokollvorgaben wurde der Versuch etwas abweichend vom Standardprotokoll durchgeführt. Anhand zahlreicher Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen des NRT-Reagenzes wurde die Konzentration 3 % bei einem eingestellten pH von 7,2 über einen Zeitraum von 60 min als optimale Voraussetzung für ein gutes Ablaufen des Tests ermittelt. Wie im Protokoll vorgeschlagen, wurde statt des Kit-Bestandteils Neutral Red Assay Fixative das selbst hergestellte PBS genutzt, da die Zellen so beim Waschen besser in den Wells verblieben.

1. 100 μ l / Well Zellsuspension in 96-Well-Platte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
2. Zugabe von 1 μ l / Well Extrakt. Anschließend wieder 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3. Mediumwechsel auf DMEM hell ohne Zusätze (pH-Wert auf 7,2 eingestellt)
4. Zugabe von 3 % NRT-Reagenz
5. 60 min Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
6. Entfernung des Mediums.
7. Spülen der Wells mit 200 μ l / Well PBS.
8. Auffüllen der Wells mit 100 μ l / Well Neutral Red Solution.
9. 15 min Plattenrüttler.
10. Messung am ELISA-Reader bei 570 nm; Referenz 655 nm.

2.2.8 Glukosekonzentration

Die Tumorzellen benötigen für ihren Stoffwechsel Glukose als Energieträger für die mitochondrielle, aerobe Glykolyse. Zur Bestimmung der Glukosekonzentration in den einzelnen Wells wurde ein Test verwendet der auf einem elektrochemischen Messprinzip mit Biosensor beruht. Mittels des Enzyms Glukoseoxidase reagiert die in der Probe enthaltene β -D-Glukose zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Eine Elektrode detektiert das H_2O_2 und der daraus generierte Stromfluss ist proportional zur Glukosekonzentration. Die Messung erfolgte vollautomatisch am Biosen 5140 der Firma EKF-Diagnostic.

Durchführung:

1. 100 μ l / Well Zellsuspension in 96-Well-Platte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
2. Zugabe von 1 μ l / Well Extrakt. Anschließend wieder 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
3. Abpipettieren des Mediumüberstandes der Wells.
4. Zentrifugation.
5. Entnahme von 20 μ l des Überstandes.
6. Zugabe der 20 μ l in Eppendorfröhrchen mit Reaktionslösung.
7. Messung (Biosen 5140).

2.2.9 pH-Messung

Die pH-Messung erfolgte mit einer pH-Glaselektrode der Firma Thermo Scientific. Vor jeder Messreihe wurde die Elektrode kalibriert.

2.2.10 Immunhistochemie

Um die beiden Zelllinien bezüglich der Exprimierung von Estrogen- (ER- α und - β) und Progesteronrezeptoren (PR) zu charakterisieren wurde die Immunhistochemie verwandt. Das Nachweisverfahren funktioniert nach dem Sandwich-ELISA-Prinzip. Zunächst bindet ein primärer Antikörper (AK) an das Antigen (AG), also den Rezeptor. Hierfür wurden monoklonare IgG-Antikörper des Kaninchens (PR und ER- α) und der Maus (ER- β) genutzt. Dann wird ein Sekundär-AK hinzugegeben, der an den Primär-AK bindet. Ein Enzymkomplex (ImmPress HRP polymer Reagent) reagiert mit dem sekundären AK. Anschließend wird als Substrat LinRed hinzugegeben. Liegen nun Antigen-Antikörper-Komplexe vor, kommt es zu einer braun-rötlichen Reaktion, die unter dem Mikroskop betrachtet werden kann.

Durchführung:

1. 300 µl / Well Zellsuspension in 24-Well-Platte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
2. Abpipettieren des Mediums und 3 x mit PBS waschen.
3. Zugabe von 300 µl / Well Formafix 4 %. Anschließend 30 min Inkubation bei Raumtemperatur.
4. 3 x mit PBS waschen
5. Zugabe von 300 µl / Well H₂O₂ (0,3 %).
6. 2 x mit PBS waschen, 5 min einwirken lassen und dabei zwischendurch leicht schwenken.
7. Zugabe von 4 Tropfen (entspricht 200 µl) / Well Horse-Serum zur Eindämmung von unspezifischen Reaktionen. Anschließend 20 min Inkubation bei Raumtemperatur.
8. Entfernen des Horse-Serums (außer bei Negativkontrolle im 4. Well).
9. Zugabe von 4 Tropfen / Well Primär-AK (1. Well: ER α -AK, 2. Well: ER β -AK, 3. Well: PR-AK). Anschließend 12 h Inkubation im Kühlschrank.
10. Abpipettieren der AK und 3 x mit PBS waschen.
11. Zugabe von 4 Tropfen / Well sekundärer AK. Anschließend 30 min Inkubation bei Raumtemperatur.
12. 3 x mit PBS waschen.
13. Zugabe von 4 Tropfen / Well LinRed. Anschließend 20 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur.
14. Abstoppen der Reaktion mit Leitungswasser.
15. Betrachten der Wells unter dem Mikroskop und Anfertigen von Fotos.

2.2.11 Oxidativer Stress

Mithilfe des Hydrogen Peroxide Colorimetric/Fluorometric Assay Kits der Firma Biovision wurde ermittelt, ob in den getesteten Proben im Vergleich zur Negativkontrolle freie Sauerstoffradikale (ROS = Reactive Oxygen Species) entstehen. Als quantitativer Parameter dient hier die Menge an entstandenem Wasserstoffperoxid (H₂O₂), welche photometrisch ermittelt wird, wobei die Konzentration von H₂O₂ proportional zur gemessenen optischen Dichte ist. Aus Kostengründen wurde dieser Test nur einmal durchgeführt.

Durchführung

1. 100 µl / Well Zellsuspension in 96-Well-Platte zur Zellkultivierung angesetzt. Anschließend 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.
2. Zugabe von 1 µl / Well Extrakt. Anschließend 48 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

3. Ansetzen der Reagenzien: Lösen des OxiRedTM in 220 µl DMSO und der Horse Radish Proxidase (HRP) in 220 µl H₂O₂ - haltigem Assay-Puffer.
4. Überpipetieren von 50 µl Zellkulturüberstand in 96-Well-Platte.
5. Herstellung von H₂O₂ – Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0,1,2,3,4 und 5 nmol / Well H₂O₂.
6. Zugabe zu den Wells von 50 µl Reaktionsmix (48 µl H₂O₂ – haltiger Assay-Puffer + 1 µl HRP-Lösung + 1 µl OxiRedTM-Lösung).
7. Vortexen, anschließend 10 min Inkubation bei Raumtemperatur.
8. Messung am ELISA-Reader bei 570 nm.

2.2.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Tests wurden in Rücksprache mit Frau Dipl.-Math. Diettrich vom Institut für Biostatistik der Universität Rostock zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) mit Posthoc-Test nach Bonferroni durchgeführt. Für diese Verfahren wurde das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 22 genutzt. Es wurde, wie allgemein üblich, ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und ein Konfidenzintervall von 95 % gewählt. Die Signifikanz der Testergebnisse wurde mit dem p-Wert angegeben. Ergebnisse, die ein $p < 0,05$ zeigten wurden dabei als statistisch signifikant angenommen.

Signifikante Unterschiede wurden zwischen den jeweiligen Testergebnissen und den Negativkontrollen mit korrespondierendem Lösungsmittel, sowie zwischen den beiden Zellreihen untersucht.

Die Berechnung der Korrelationen fand für intervallskalierte Merkmale anhand des Pearsonschen Maßkorrelationskoeffizienten mit MS Excel 2010 statt. Dabei wurde ab einem Betrag von $r > 0,9$ eine sehr hohe Korrelation angenommen [64].

3. Ergebnisse

3.1 HPLC

Im Folgenden werden die Ergebnisse der HPLC-Analysen dargestellt. Es wurden für jedes Tee-Extrakt und die Reinextrakte jeweils drei Messdurchgänge durchgeführt, um zu erkennen, ob es zwischen den einzelnen Messdurchgängen zu Unterschieden in der Ergebnisdarstellung kommt. Die folgenden Abbildungen zeigen übereinandergelegte HPLC-Graphen der einzelnen Tee-Extrakte + je ein Reinstoff. Liegen zwei Peaks übereinander, bedeutet das, sie haben die gleiche Retentionszeit und da diese für jeden Stoff charakteristisch ist, kann man davon ausgehen, dass zwei sich deckende Peaks denselben Stoff darstellen.

Für die quantitative Analyse der in den Tee-Extrakten enthaltenen Reinstoffe wurde zunächst mittels der HPLC-Software (Clarity Chrome) die Fläche der jeweiligen Peaks ermittelt. Da die Konzentrationen der Reinstoffe bekannt waren, konnte anschließend mittels Dreisatz die Menge des im Tee-Extrakt enthaltenen Reinstoffes berechnet werden.

$$\frac{C_{\text{Reinstoff}}}{A_{\text{Reinstoff}}} = \frac{C_{\text{Reinstoff im Tee-Extrakt}}}{A_{\text{Reinstoff im Tee-Extrakt}}}$$

Abbildung 15. Dreisatz zum Berechnen der Konzentration des Reinstoffes im Tee-Extrakt, C = Konzentration, A = Peakfläche

3.1.1 Qualitative Bestimmung

Die qualitative Bestimmung fand anhand übereinstimmender Retentionszeiten der Grüntee-Extrakte mit den Reinsubstanzen statt.

3.1.1.1 Matchatee in 70 %-Ethanol gelöst

Es konnten im Matchatee-Extrakt, in Ethanol, gelöst mittels der HPLC die Stoffe Quercetin und EGCG nachgewiesen werden. Die Retentionszeit liegt für das Quercetin bei 12,9 min und für das EGCG bei 10,7 min.

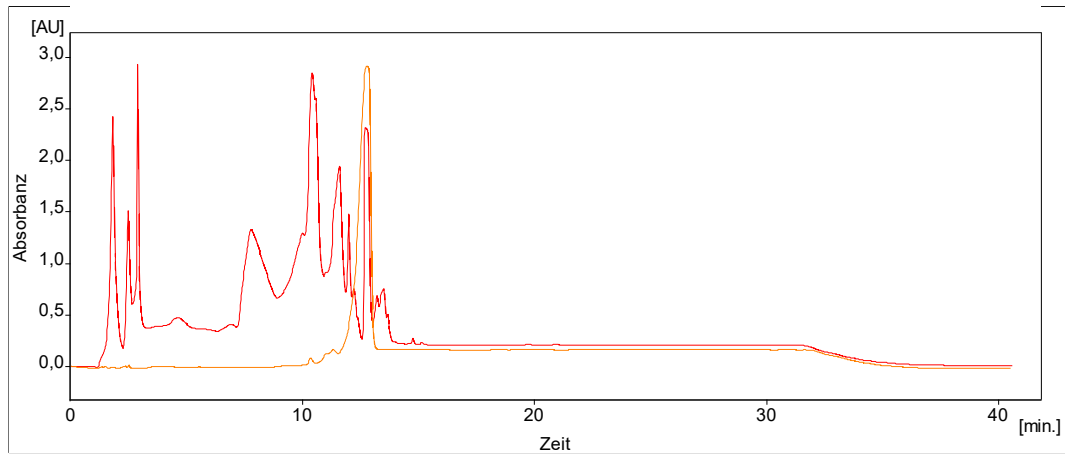


Abbildung 16: HPLC-Ergebnisse in AU / min (Ordinate = Absorbance Unit, Abszisse = Zeit in min): Matchatee 70 % - Ethanol gelöst (rot), Quercetin in 50 % - DMSO gelöst (orange).

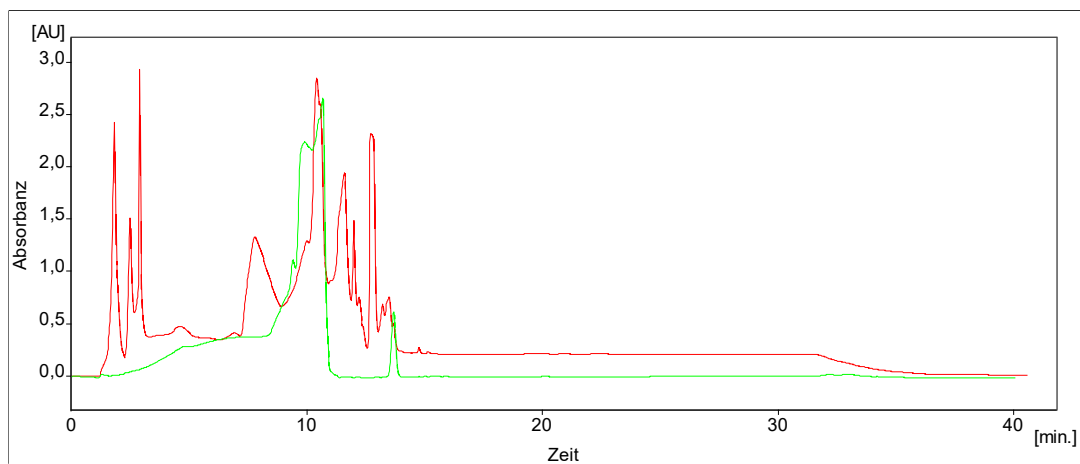


Abbildung 17: HPLC-Ergebnisse in AU / min (Ordinate = Absorbance Unit, Abszisse = Zeit in min): Matchatee in 70 % - Ethanol gelöst (rot), EGCG in Aquadest gelöst (grün).

3.1.1.2 Grüner Tee in 70 %-Ethanol gelöst

Es konnten im Grüntee-Extrakt, in Ethanol gelöst, mittels der HPLC die Stoffe Quercetin und EGCG nachgewiesen werden. Die Retentionszeit liegt für das Quercetin bei 12,9 min und für das EGCG bei 10,7 min.

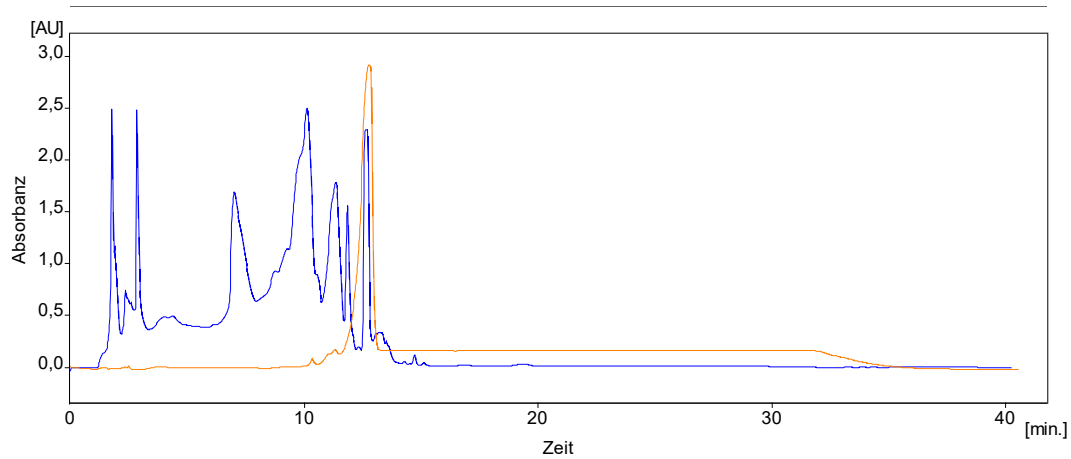


Abbildung 18: HPLC-Ergebnisse in AU / min (Ordinate = Absorbance Unit, Abszisse = Zeit in min): Grüner Tee in 70 % - Ethanol gelöst (blau), Quercetin in 50 % - DMSO gelöst (orange).

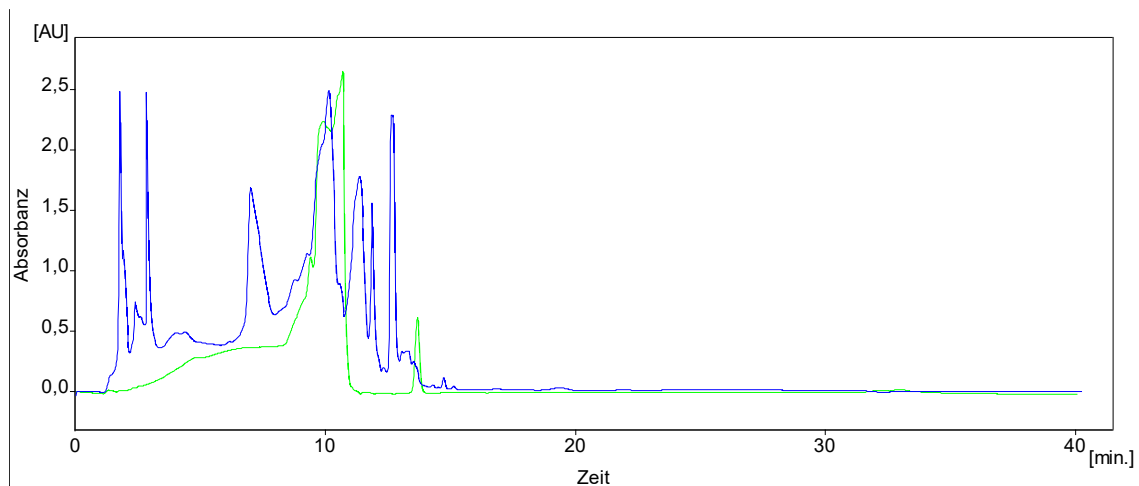


Abbildung 19: HPLC-Ergebnisse in AU / min (Ordinate = Absorbance Unit, Abszisse = Zeit in min): Grüner Tee in 70 % - Ethanol gelöst (blau), EGCG in Aquadest gelöst (hellgrün).

3.1.1.3 Matchatee in H₂O gelöst

Es konnten im Matchatee-Extrakt in H₂O gelöst mittels der HPLC die Stoffe Quercetin und EGCG nachgewiesen werden. Die Retentionszeit liegt für das Quercetin bei 12,9 min und für das EGCG bei 10,7 min.

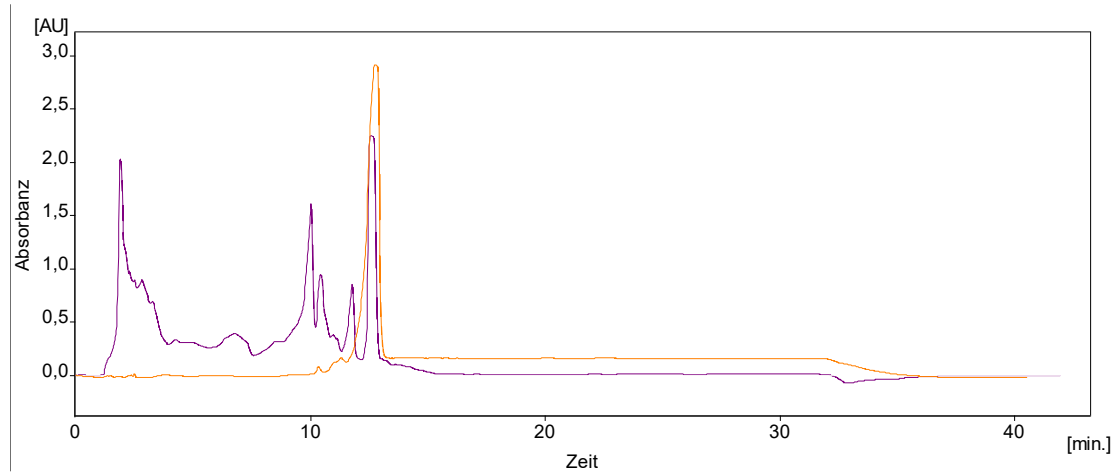


Abbildung 20: HPLC-Ergebnisse in AU / min (Ordinate = Absorbance Unit, Abszisse = Zeit in min): Matchatee in H₂O gelöst (lila), Quercetin in 50 % - DMSO gelöst (orange).

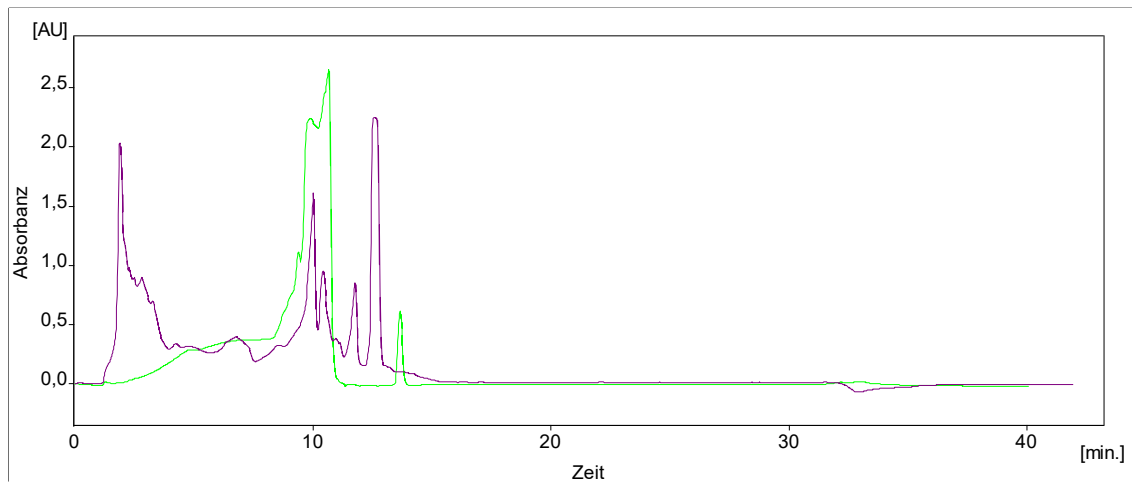


Abbildung 21: HPLC-Ergebnisse in AU / min (Ordinate = Absorbance Unit, Abszisse = Zeit in min): Matchatee in H₂O gelöst (lila), EGCG in Aquadest gelöst (grün).

3.1.1.4 Grüner Tee in H₂O gelöst

Es konnten im Grüntee-Extrakt in H₂O gelöst mittels der HPLC die Stoffe Quercetin und EGCG nachgewiesen werden. Die Retentionszeit liegt für das Quercetin bei 12,9 min und für das EGCG bei 10,7 min.

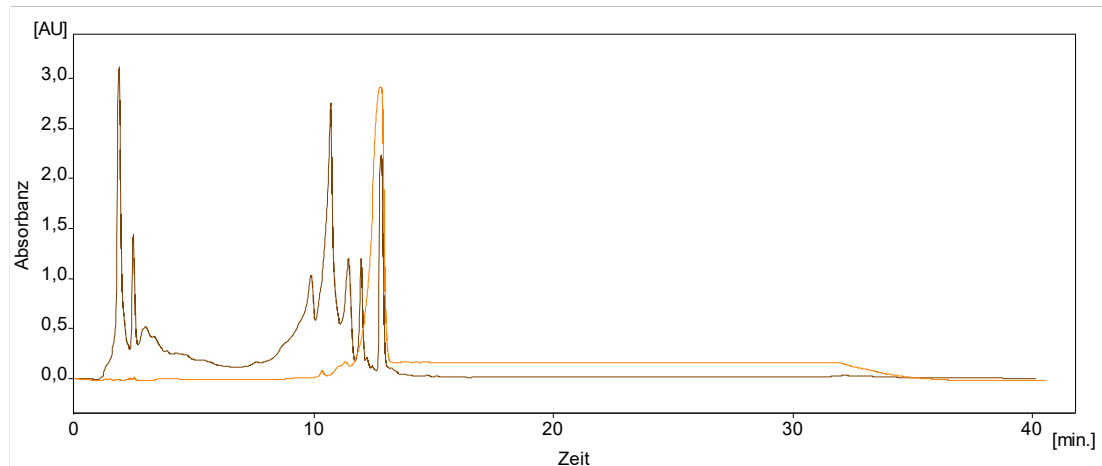


Abbildung 22: HPLC-Ergebnisse in AU / min (Ordinate = Absorbance Unit, Abszisse = Zeit in min): Grüner Tee in H₂O gelöst (braun), Quercetin in 50 % - DMSO gelöst (orange).

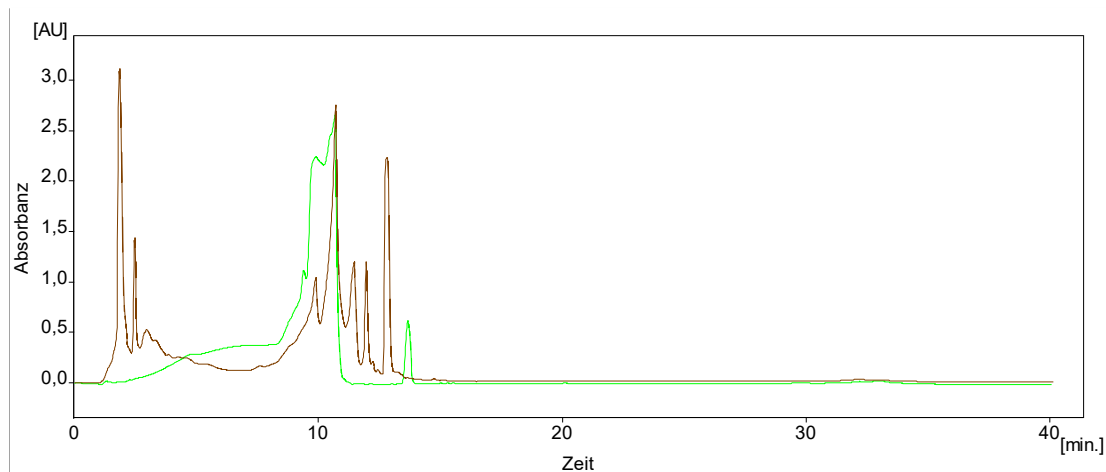


Abbildung 23: HPLC-Ergebnisse in AU / min (Ordinate = Absorbance Unit, Abszisse = Zeit in min): Grüner Tee in H₂O gelöst (braun), EGCG in Aquadest gelöst (grün).

3.1.2 Quantitative Bestimmung

Anhand der Flächen konnten die Mengen der Reinstoffe EGCG und Quercetin in den jeweiligen Tee-Extrakten ermittelt werden. Die Bestimmung wurde zwei Mal durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet. Dabei ergaben sich folgende Konzentrationen:

Tabelle 6: Konzentrationen von EGCG und Quercetin in mg / ml in den Tee-Extrakten (0,3 g Tee / 1 ml H₂O).

	[EGCG]	[Quercetin]
Matchatee in 70%-Ethanol	13,5 mg / ml	1,0 mg / ml
Grüner Tee in 70%-EThanol	15,6 mg / ml	1,1 mg / ml
Matchatee in H ₂ O	6,0 mg / ml	1,2 mg / ml
Grüner Tee in H ₂ O	11,0 mg / ml	1,1 mg / ml
Mittelwert	11,5 mg / ml	1,1 mg / ml

3.2 ATP-Lumineszenztest

Im Folgenden werden die Ergebnisse des CellTiter-Glo®-Tests der Firma Promega für die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 dargestellt. Es handelt sich bei dem Testkit um einen Lumineszenz-Test zur Detektierung von ATP. Es wurde pro Testdurchgang pro Substanz eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurden vier Testdurchgänge gemacht.

3.2.1 MDA-MB-231

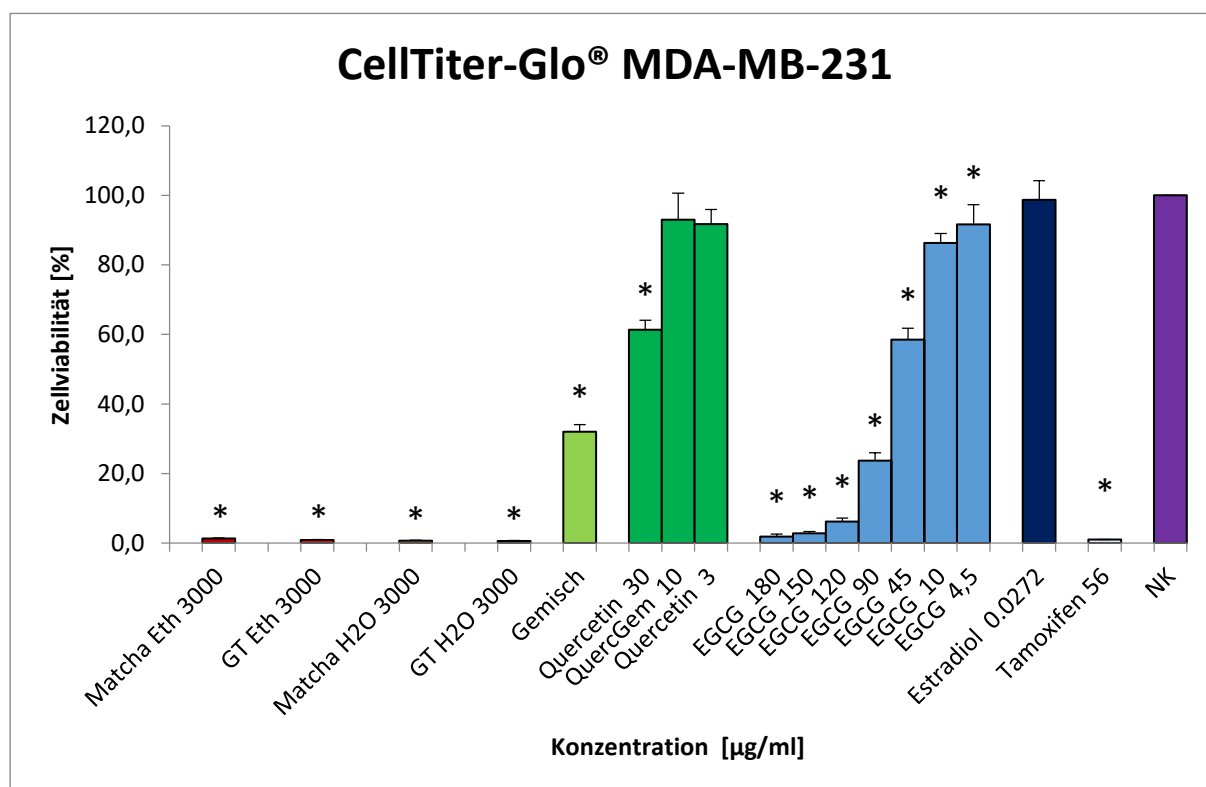


Abbildung 24: Zellviabilität MDA-MB-231: Messung ATP mit **CellTiter-Glo®** nach 24 h ; Einfluss der Tee-Extrakte (Matchatee, GT = Grüner Tee, Eth. = in 70 % - Ethanol gelöst, H₂O = in Wasser gelöst), des Gemisches (EGCG + Quercetin), der Reinstoffe Quercetin und EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen und von Estradiol und Tamoxifen als Kontrollen auf die Viabilität von MDA-MB-231 im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK = 100 %); dargestellt wird der Mittelwert mit positiver Standardabweichung; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle (p < 0,05); Negativkontrollen sind jeweils die Lösungsmittel der Testsubstanzen auf MDA-MB-231 (Matcha Eth, GT Eth, Estradiol, Tamoxifen = 70 % - Ethanol; Matcha H₂O, GT H₂O, EGCG = Wasser; Quercetin = DMSO).

Die Tee-Extrakte haben signifikant in beiden Lösungsmitteln, Ethanol und Wasser, eine stark hemmende Wirkung auf die Zellviabilität (CV) der Zelllinien MDA-MB-231. Die Zellviabilität, gemessen am ATP-Gehalt im Verhältnis zur Negativkontrolle, liegt in allen Fällen bei unter 2 % und somit ist die getestete Konzentration weit höher, als die ED 50. Durch das Gemisch, welches anhand der durch die HPLC ermittelten Konzentrationen von EGCG und Quercetin hergestellt wurde, findet eine signifikante Hemmung der Zellviabilität statt (CV = 32 %; SD = 2,1). Quercetin erreicht in allen gemessenen Konzentrationen nicht die ED 50 und nur in der Konzentration 30 µg / ml hemmt es (CV = 61,3 %; SD = 2,8) signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle die Zellviabilität. Anhand der Messungen der unterschiedlichen EGCG-Konzentrationen lässt sich gut eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nachvollziehen (Korrelation r: - 0,96, dh. Betrag von r > 0,9). Mit steigender Konzentration nimmt signifikant bei allen Messungen die Hemmung der Zellviabilität zu. Die Konzentrationen 180, 150, 120 und 90 µg / ml liegen dabei über der ED 50. Unter Estradioleinwirkung verändert sich die Zellviabilität (98,7 %; SD = 5,6) im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant. Dahingegen hemmt die getestete Konzentration von Tamoxifen signifikant die Zellviabilität der MDA-MB-231 und liegt weit über der ED 50 (CV < 1 %).

3.2.2 MCF-7

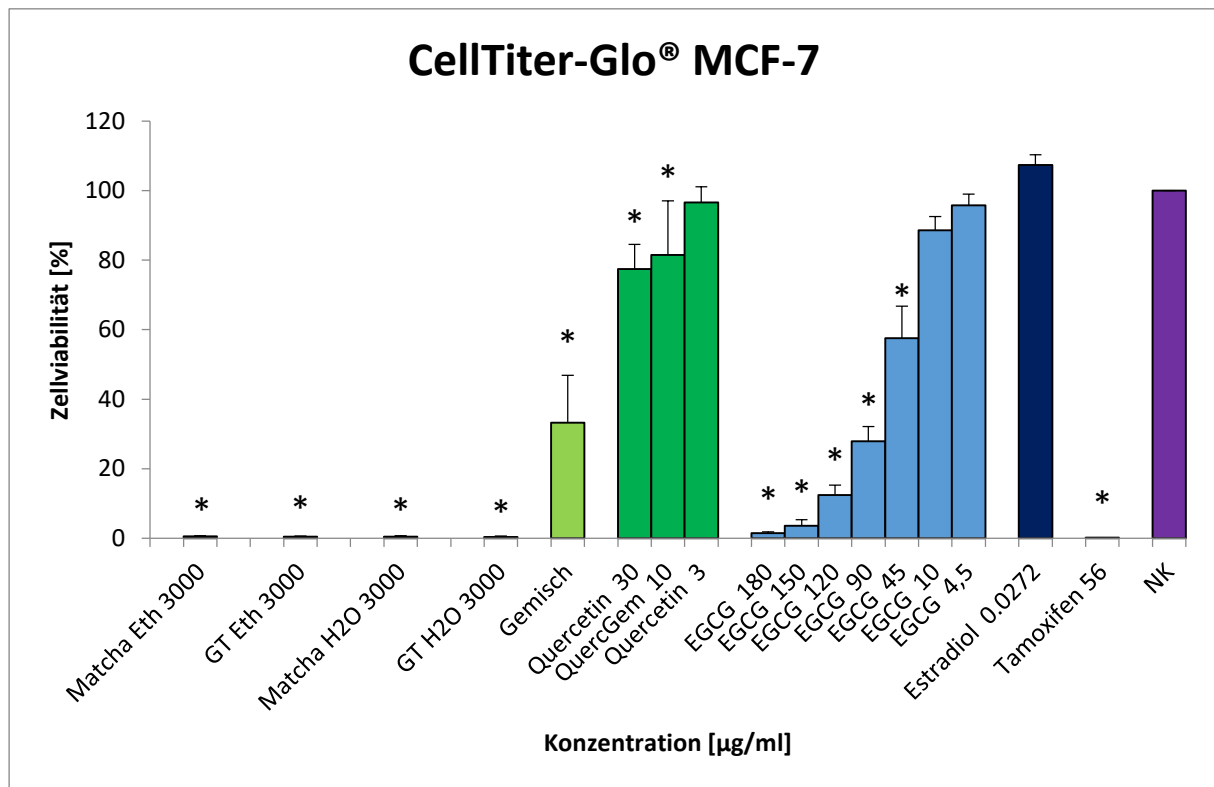


Abbildung 25: Zellviabilität MCF-7: Messung ATP mit **CellTiter-Glo®** nach 24 h; Einfluss der Tee-Extrakte (Matchatee, GT = Grüner Tee, Eth. = in 70 % - Ethanol gelöst, H₂O = in Wasser gelöst), des Gemisches (EGCG + Quercetin), der Reinstoffe Quercetin und EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen und von Estradiol und Tamoxifen als Kontrollen auf die Viabilität von MCF-7 im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK = 100 %); dargestellt wird der Mittelwert mit positiver Standardabweichung; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle ($p < 0,05$); Negativkontrollen sind jeweils die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf MCF-7 (Matcha Eth, GT Eth, Estradiol, Tamoxifen = 70 % - Ethanol; Matcha H₂O, GT H₂O, EGCG = Wasser; Quercetin = DMSO).

Die Ergebnisse des CellTiter-Glo®-Tests der Zellreihe MCF-7 unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der Zellreihe MDA-MB-231. Auch bei MCF-7 liegt die getestete Dosis aller Tee-Extrakte deutlich über der ED 50 (CV < 2 %), genau wie das Gemisch (VC = 33,2 %; SD = 13,6). Quercetin hemmt in der Konzentration 30 µg / ml (CV = 77,5 %; SD = 7,1) und anders als bei MDA-MB-231 auch in der Konzentration 10 µg / ml (CV = 81,5; SD = 15,6), signifikant die Zellviabilität, beide Konzentrationen liegen aber deutlich unter der ED 50. Auch bei MCF-7 stellt sich bei der Untersuchung der EGCG-Konzentrationen eine Korrelation in Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit dar mit einem Betrag von $r = 0,97$. Die Konzentrationen 180 – 90 µg / ml liegen, wie auch bei MDA-MB-231 über der ED 50, die niedrigeren Konzentrationen darunter, wobei nur 45 µg / ml signifikant ist. Estradiol führt zu einer leichten Zellproliferation (CV = 107,3 %; SD = 3,0) und Tamoxifen zu einer starken Hemmung (CV = 0,2 %; SD = 0,0).

3.2.3 Vergleich der Ergebnisse zwischen MDA-MB-231 und MCF-7

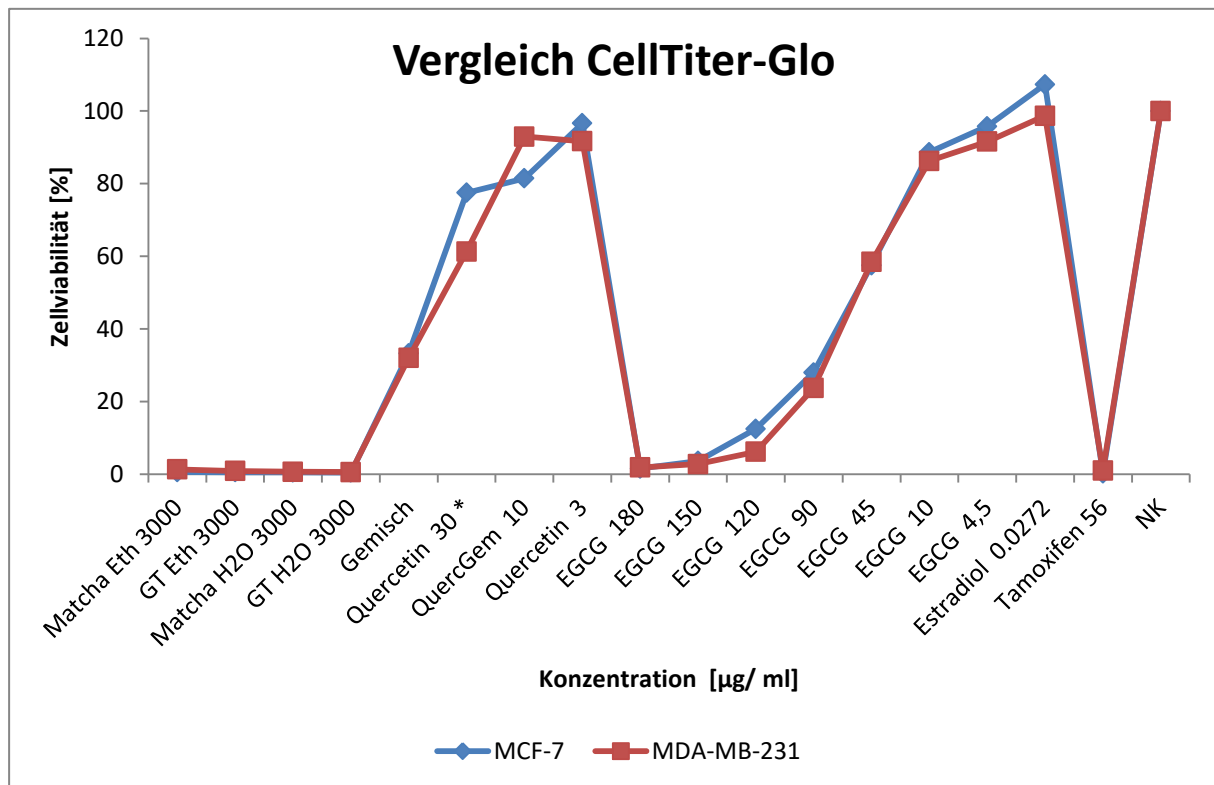


Abbildung 26: Vergleich der Zellviabilität zwischen MDA-MB-231 (rot) und MCF-7 (blau): Messung ATP mit CellTiter-Glo® nach 24 h; Zellviabilität in % (Negativkontrolle (NK) = 100 %), * = signifikanter Unterschied zwischen MCF-7 und MDA-MB-231 ($p < 0,05$).

Im Vergleich der Testergebnisse im CellTiter-Glo®-Assay zeigt sich nur bei der Messung für Quercetin in der Konzentration 30 µg / ml ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Zellreihen.

3.3 MTT-Test

Im Folgenden werden die Ergebnisse des MTT-Tests der Firma Roche für die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 dargestellt. Der MTT-Test bildet die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien ab.

3.3.1 Ergebnisse MTT-Test: MDA-MB-231

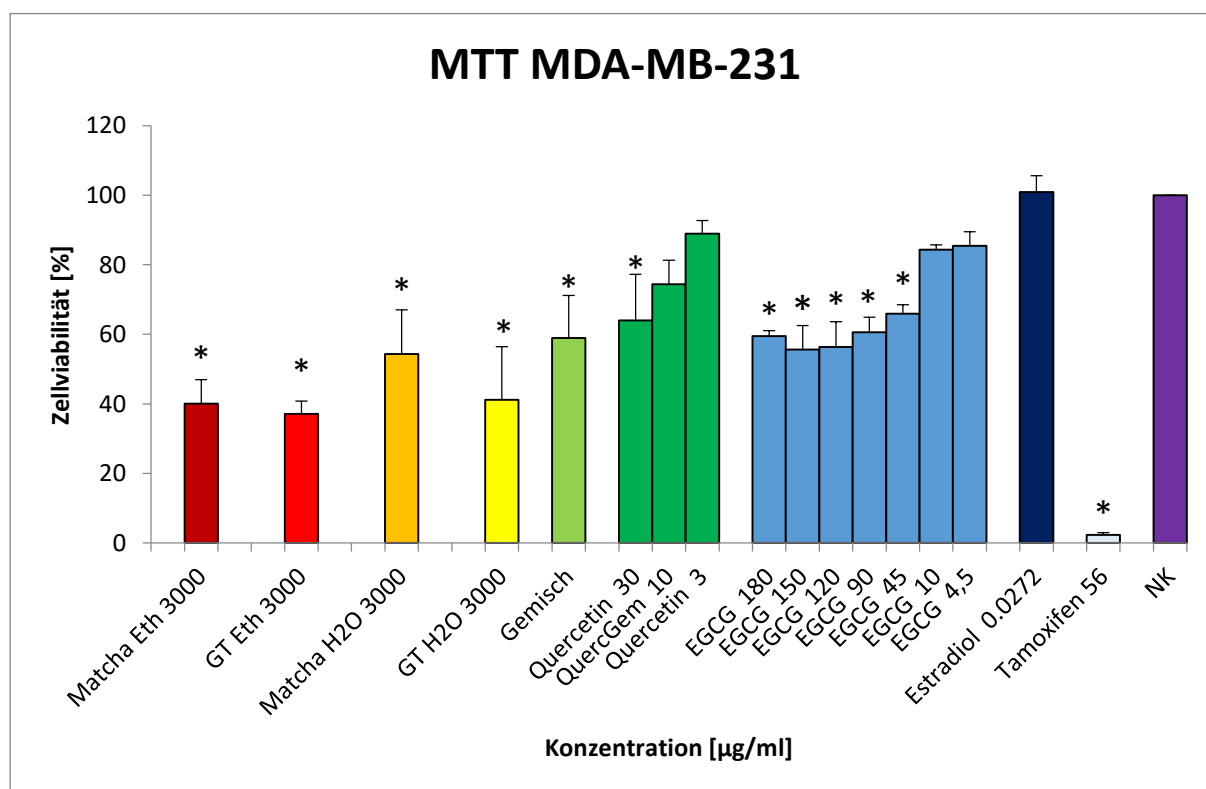


Abbildung 27: Zellviabilität MDA-MB-231: **MTT-Test** nach 48 h; Einfluss der Tee-Extrakte (Matchatee, GT = Grüner Tee, Eth. = in 70 % - Ethanol gelöst, H₂O = in Wasser gelöst), des Gemisches (EGCG + Quercetin), der Reinstoffe Quercetin und EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen und von Estradiol und Tamoxifen als Kontrollen auf die Viabilität von MDA-MB-231 im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK = 100%); dargestellt wird der Mittelwert mit positiver Standardabweichung; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle ($p < 0,05$); Negativkontrollen sind jeweils die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf MDA-MB-231 (Matcha Eth, GT Eth, Estradiol, Tamoxifen = 70 % - Ethanol; Matcha H₂O, GT H₂O, EGCG = Wasser; Quercetin = DMSO).

Die in Ethanol gelösten Tee-Extrakte haben in beiden Lösungsmitteln eine hemmende Wirkung auf die Zellen und liegen bis auf den in Wasser gelösten Matchatee alle über der ED₅₀ (GT Eth: CV = 37,2 %; SD = 3,7; Matcha Eth: CV = 40,1 %; SD = 6,9; GT H₂O: CV = 41,2 %; SD = 15,3; Matcha H₂O: CV = 54,4 %; SD = 12,7). Das Gemisch hemmt signifikant die Zellviabilität, liegt aber unter der ED₅₀ (CV = 59,0 %; SD = 12,2). Bei Quercetin zeigt sich eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit, wobei nur die höchsten Konzentrationen statistisch signifikant gegenüber der Negativkontrolle sind (30 µg / ml: VC = 64,0 %; SD = 13,3). Die Ergebnisse des Einflusses von EGCG auf MDA-MB-231 liegen alle unter der ED₅₀, allerdings ist die Hemmung auf die Viabilität größer, als bei MCF-7.

Estradiol zeigt keinen Einfluss auf die Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (CV = 100,8 %; SD = 4,8) und Tamoxifen liegt weit über der ED₅₀ (CV = 2,3; SD = 0,6).

3.3.2 Ergebnisse MTT-Test: MCF-7

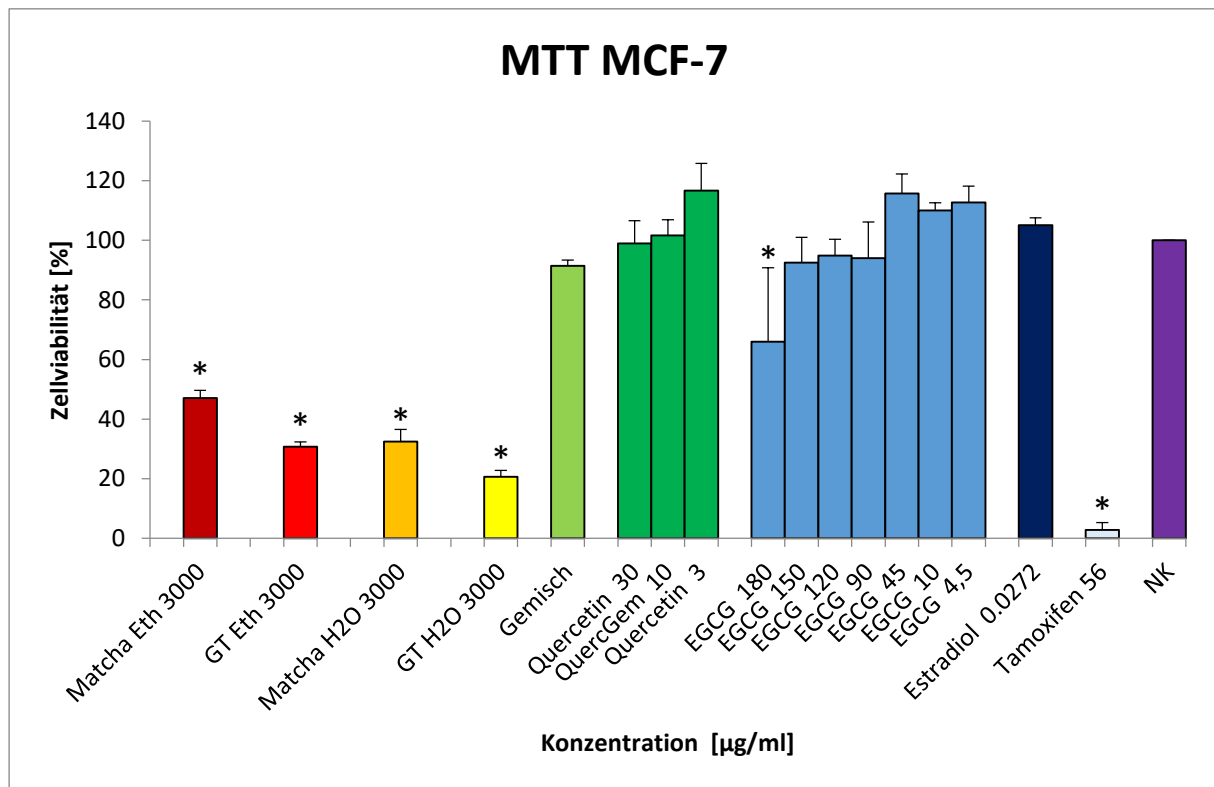


Abbildung 28: Zellviabilität MCF-7: **MTT-Test** nach 48 h; Einfluss der Tee-Extrakte (Matchatee, GT = Grüner Tee, Eth. = in 70 % - Ethanol gelöst, H₂O = in Wasser gelöst), des Gemisches (EGCG + Quercetin), der Reinstoffe Quercetin und EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen und von Estradiol und Tamoxifen als Kontrollen auf die Viabilität von MCF-7 im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK = 100%); dargestellt wird der Mittelwert mit positiver Standardabweichung; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle ($p < 0,05$); Negativkontrollen sind jeweils die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf MCF-7 (Matcha Eth, GT Eth, Estradiol, Tamoxifen = 70 % - Ethanol; Matcha H₂O, GT H₂O, EGCG = Wasser; Quercetin = DMSO).

Beim MTT-Test für die MCF-7 Zellen erreichen alle Tee-Extrakte die ED₅₀ (Matcha H₂O: CV = 32,4 %; SD = 4,1; GT H₂O: CV = 20,7 %; SD = 2,1; Matcha Eth: CV = 47,1 %; SD = 2,6; GT Eth: CV = 30,8; SD = 1,6). Das Gemisch hat nur einen geringen Einfluss auf die Zellviabilität (CV = 91,4 %; SD = 2,0). Bei den Ergebnissen Quercetin fällt auf, dass alle Werte über denen der Negativkontrolle liegen (10 µg / ml: CV = 101,6; SD = 5,3; 3 µg / ml: CV = 116,6; SD = 9,1), bzw. nur knapp darunter (30 µg / ml: CV = 99%, SD = 7,6), also einen positiven Effekt auf die Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle haben. Es ergibt sich aber keine statistische Signifikanz. Auffällig sind auch die sehr hohen Viabilitätswerte der EGCG-Proben, die bei den Konzentrationen 45 – 4,5 µg / ml sogar bei über 100 % liegen. Statistisch signifikant ist nur das Ergebnis für die höchste EGCG-Konzentration 180 µg / ml (CV = 66,0; SD = 24,9).

3.3.3 Vergleich der Ergebnisse zwischen MDA-MB-231 und MCF-7

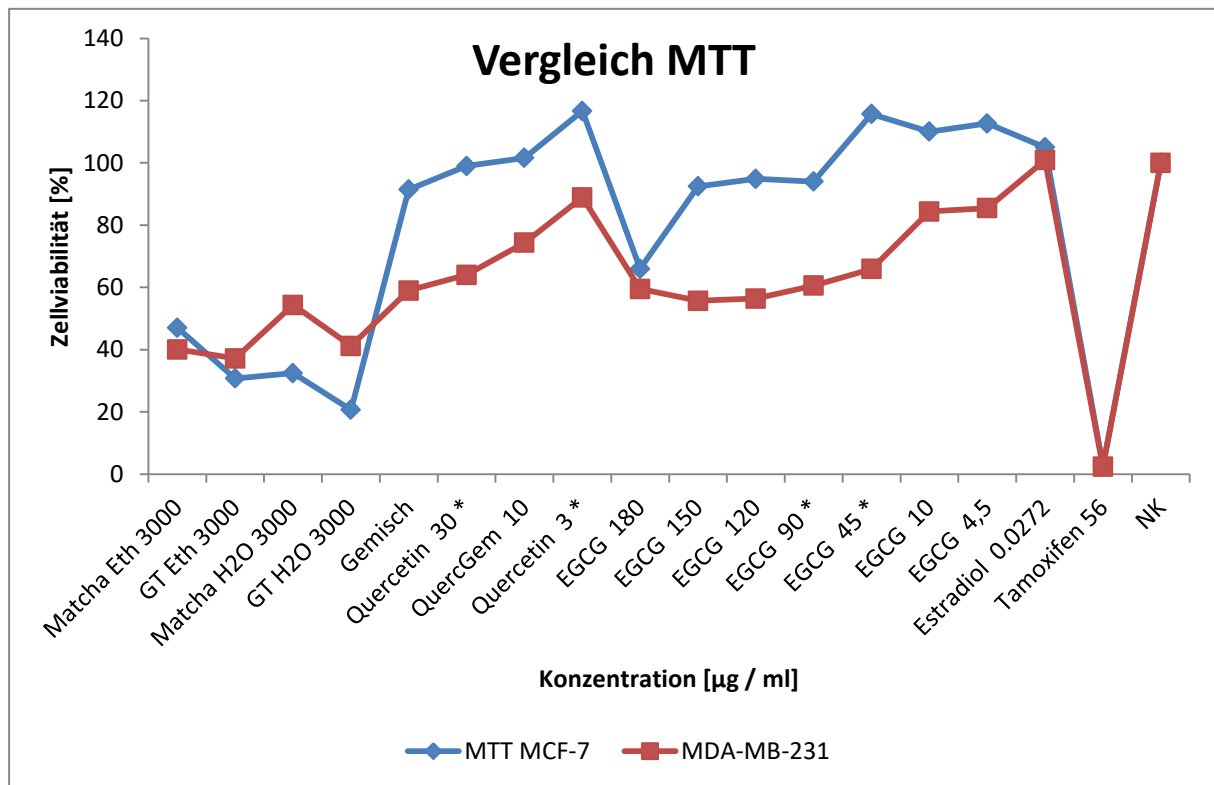


Abbildung 29: Vergleich der Zellviabilität zwischen MDA-MB-231 (rot) und MCF-7 (blau): MTT-Test nach 48 h; Zellviabilität in % (Negativkontrolle (NK) = 100 %); * = signifikanter Unterschied zwischen MCF-7 und MDA-MB-231 ($p < 0,05$).

Im Vergleich der Testergebnisse im MTT-Test zeigt sich nur bei den Messungen für Quercetin in der Konzentration 3 und 30 µg / ml, sowie bei EGCG in den Konzentrationen 45 und 90 µg / ml ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Zellreihen.

3.4 BrdU-Test

Im Folgenden werden die Ergebnisse der BrdU-Tests der Firma Roche für die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 dargestellt. Es handelt sich bei dem Test um einen Zellproliferationstest zur Ermittlung neu synthetisierter DNA.

3.4.1 BrdU-Test: MDA-MB-231

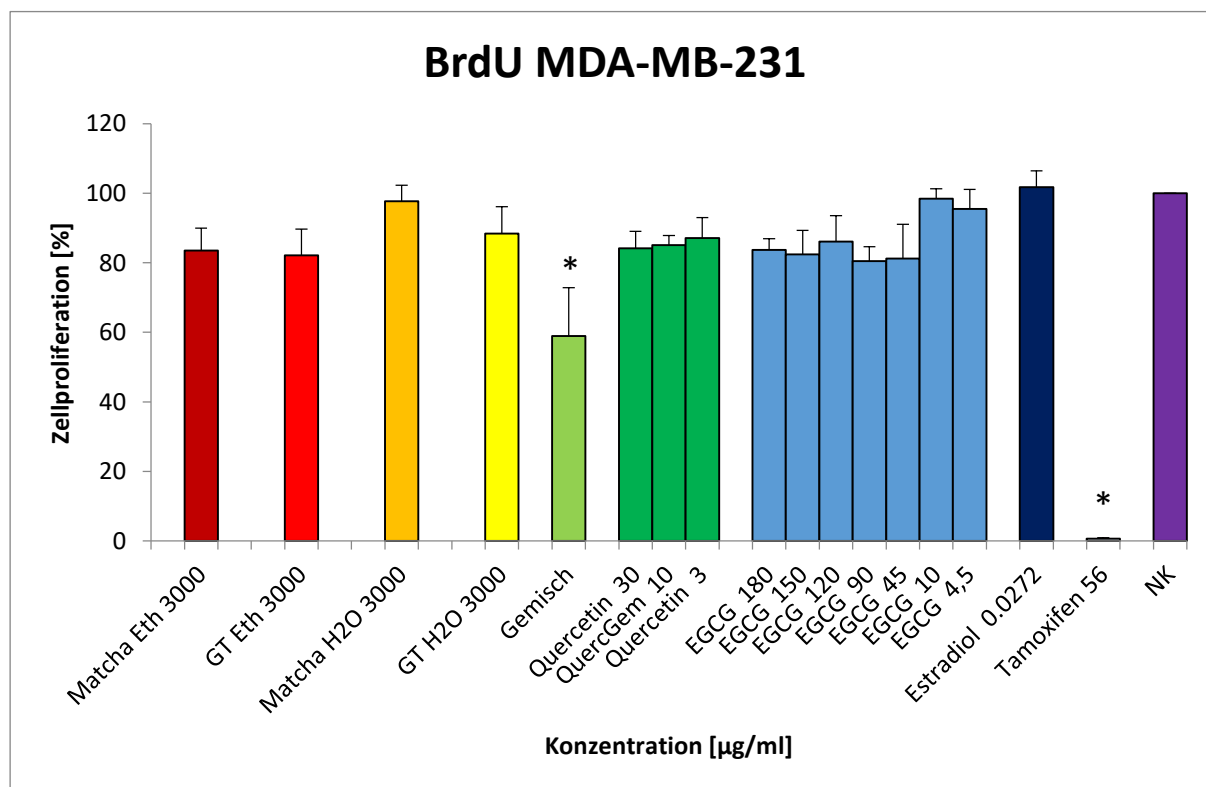


Abbildung 30: Zellproliferation MDA-MB-231: **BrdU-Test** nach 24 h; Einfluss der Tee-Extrakte (Matchatee, GT = Grüner Tee, Eth. = in 70 - % Ethanol gelöst, H₂O = in Wasser gelöst), des Gemisches (EGCG + Quercetin), der Reinstoffe Quercetin und EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen und von Estradiol und Tamoxifen als Kontrollen auf die Proliferation von MDA-MB-231 im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK = 100 %); dargestellt wird der Mittelwert mit positiver Standardabweichung; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle ($p < 0,05$); Negativkontrollen sind jeweils die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf MDA-MB-231 (Matcha Eth, GT Eth, Estradiol, Tamoxifen = 70 % - Ethanol; Matcha H₂O, GT H₂O, EGCG = Wasser; Quercetin = DMSO).

Beim BrdU-Zellproliferationstest für MDA-MB-231 fällt auf, dass alle gemessenen Extrakt-Konzentrationen, bis auf Tamoxifen (CP = 1,0 %; SD = 0,2), unter der ED 50 liegen. Das Gemisch zeigt signifikant die stärkste hemmende Wirkung auf die Zellproliferation (CP = 51,9 %; SD = 16,8) und hemmt stärker, als die beiden Einzelsubstanzen Quercetin 30 µg / ml (CV = 84,2 %, SD = 5,0) und EGCG 120 µg / ml (CP = 86,1 %, SD = 7,5). Die Ergebnisse für Quercetin zeigen eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit, allerdings fallen die Zuwachsraten der Zellproliferation mit absteigender Konzentration nur sehr gering aus (30 µg / ml: CP = 84,2 %; SD = 5,0; 10 µg / ml: CP = 85,1 %, SD = 2,7; 3 µg / ml: CP = 87,1 %; SD = 5,9). Estradiol hat kaum (CP = 101,7 %; SD = 4,7) und Tamoxifen einen starken (CP = 0,71 %; SD = 0,23) Einfluss auf die Zellproliferation im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.4.2 BrdU-Test: MCF-7

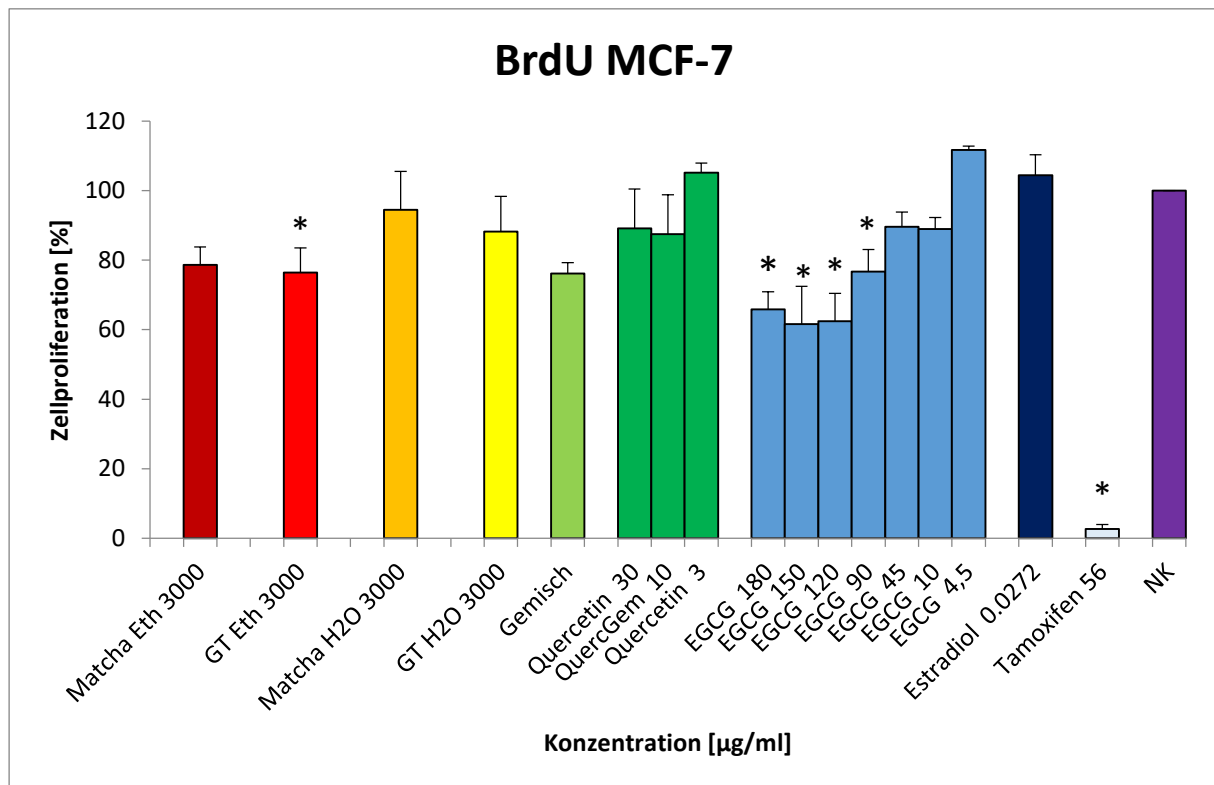


Abbildung 31: Zellproliferation MCF-7: BrdU-Test; Einfluss der Tee-Extrakte (Matchatee, GT = Grüner Tee, Eth. = in 70 % - Ethanol gelöst, H₂O = in Wasser gelöst), des Gemisches (EGCG + Quercetin), der Reinstoffe Quercetin und EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen und von Estradiol und Tamoxifen als Kontrollen auf die Proliferation von MCF-7 im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK = 100 %); dargestellt wird der Mittelwert mit positiver Standardabweichung; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle ($p < 0,05$); Negativkontrollen sind jeweils die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf MCF-7 (Matcha Eth, GT Eth, Estradiol, Tamoxifen = 70 % - Ethanol; Matcha H₂O, GT H₂O, EGCG = Wasser; Quercetin = DMSO).

Im BrdU-Test für MCF-7 erreicht keines der Extrakte die ED₅₀, außer Tamoxifen (CP = 2,7 %; SD = 1,3). Die niedrigsten, getesteten Konzentrationen von Quercetin (3 µg / ml: CP = 105,2 %; SD = 2,7) und EGCG (4,5 µg / ml: CP = 111,7 %; SD = 1,1) zeigen einen proliferationsfördernden Effekt im Verhältnis zur Negativkontrolle, genau wie Estradiol (CP = 104,5 %; SD = 5,9).

3.4.3 Vergleich der Ergebnisse BrdU-Test zwischen MDA-MB-231 und MCF-7

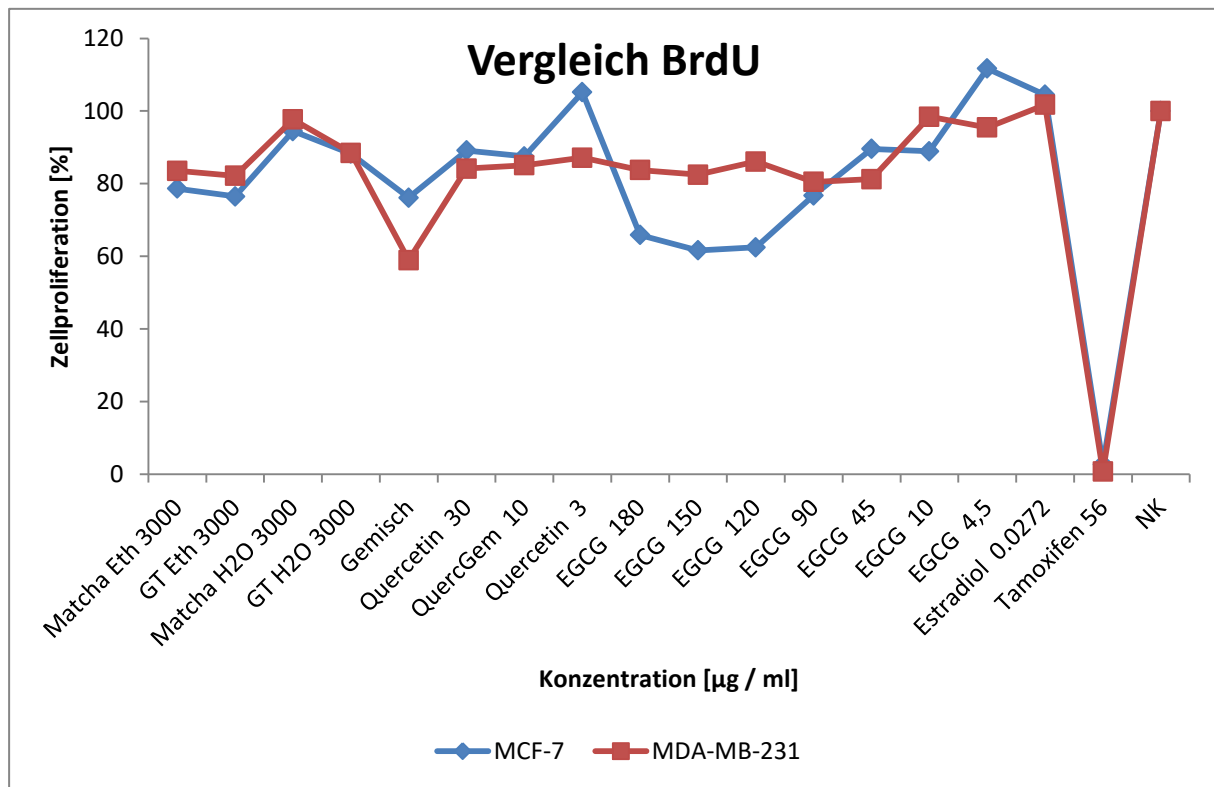


Abbildung 32: Vergleich der Zellproliferation zwischen MDA-MB-231 (rot) und MCF-7 (blau): BrdU-Zellproliferationstest nach 24 h; Zellviabilität in % (Negativkontrolle (NK) = 100 %).

Beim BrdU-Test zeigten sich bei keiner der Messungen signifikante Unterschiede zwischen den MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen.

3.5 Neutralrot-Test

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Neutralrot-Tests der Firma Sigma-Aldrich dargestellt. Es handelt sich bei dem Test um einen Zellviabilitätstest und Zytotoxizitätstest zur Ermittlung vitaler Zellen.

3.5.1 MDA-MB-231

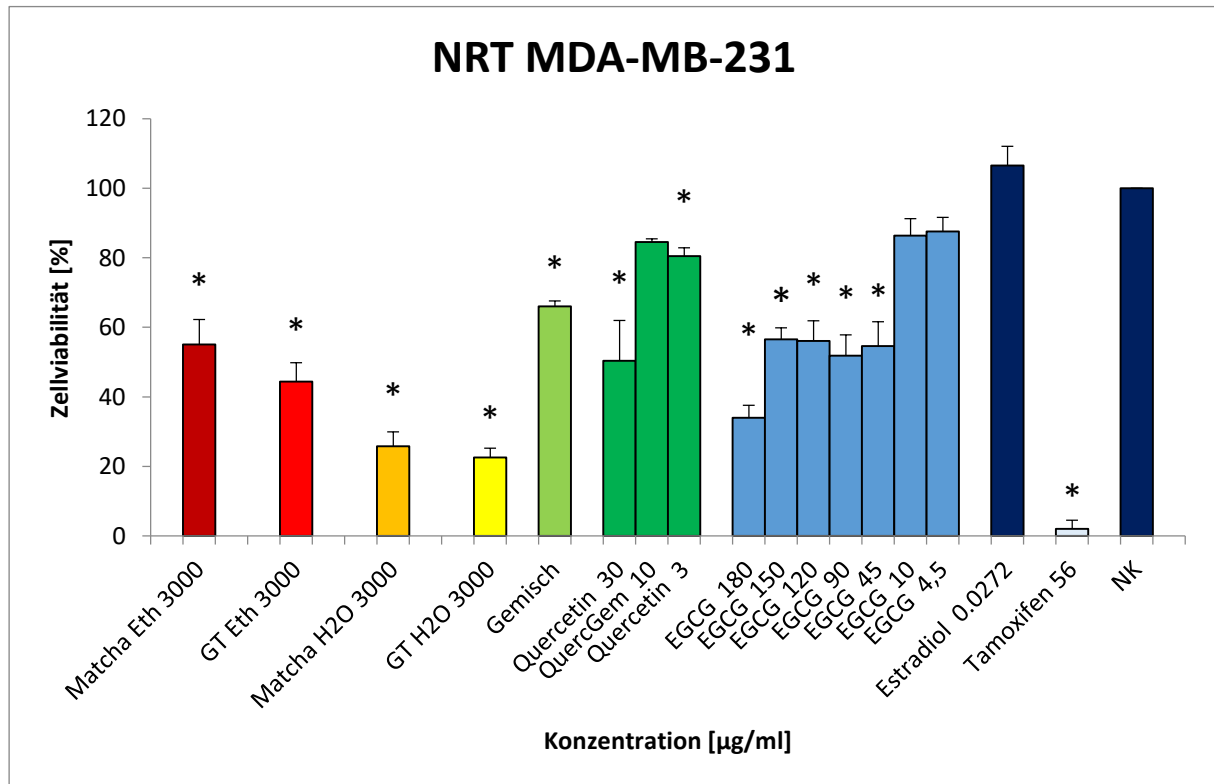


Abbildung 33: Zellviabilität MDA-MB-231: **Neutralrot-Test**; Einfluss der Tee-Extrakte (Matchatee, GT = Grüner Tee, Eth. = in 70 % - Ethanol gelöst, H₂O = in Wasser gelöst), des Gemisches (EGCG + Quercetin), der Reinstoffe Quercetin und EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen und von Estradiol und Tamoxifen als Kontrollen auf die Viabilität von MDA-MB-231 im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK = 100 %); dargestellt wird der Mittelwert mit positiver Standardabweichung; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle ($p < 0,05$); Negativkontrollen sind jeweils die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf MDA-MB-231 (Matcha Eth, GT Eth, Estradiol, Tamoxifen = 70 % - Ethanol; Matcha H₂O, GT H₂O, EGCG = Wasser; Quercetin = DMSO).

Bei dem Neutralrot-Test mit MDA-MB-231 zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Hemmung zwischen den in Ethanol und den in Wasser gelösten Tee-Extrakten. Während die Zellen nach der Behandlung mit dem Wasser-Extrakt eine Zellviabilität von 22,6 % (SD = 2,6) beim GT und 25,8 % (SD = 4,1) beim Matchatee aufzeigen, liegt der Bereich der Viabilitätsmessungen mit den Ethanolextrakten zwischen 44,3 % (SD = 5,5) für den GT und 55,1 % (SD = 7,2) beim Matchatee. Alle gemessenen Viabilitätswerte der Tee-Extrakte sind im Verhältnis zur Negativkontrolle statistisch signifikant. EGCG zeigt in den Konzentrationen 180 – 45 µg / ml eine deutliche Hemmung der Zellviabilität im Vergleich zur NK (CV = 34 – 56 %), aber lediglich in der Konzentration 180 µg / ml wird die ED₅₀ erreicht.

3.5.2 MCF-7

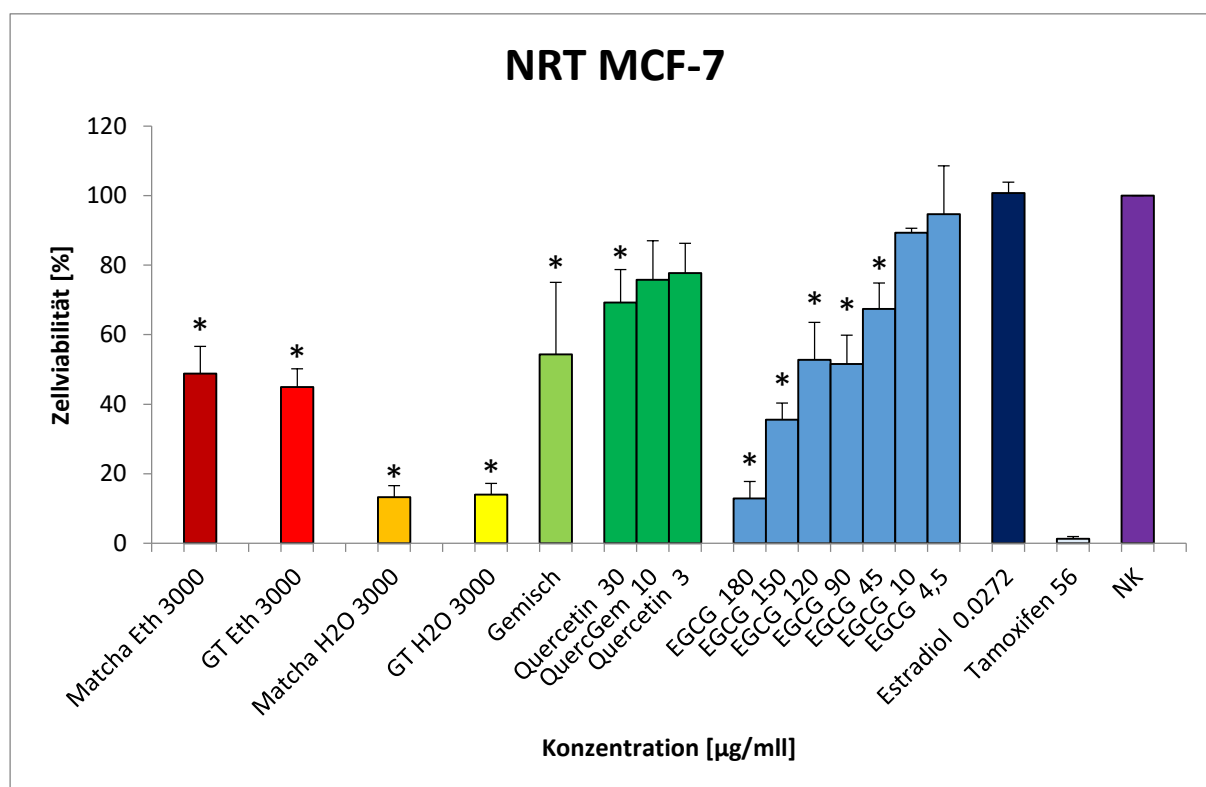


Abbildung 34: Zellviabilität MCF-7: **Neutralrot-Test**; Einfluss der Tee-Extrakte (Matchatee, GT = Grüner Tee, Eth. = in 70 % - Ethanol gelöst, H₂O = in Wasser gelöst), des Gemisches (EGCG + Quercetin), der Reinstoffe Quercetin und EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen und von Estradiol und Tamoxifen als Kontrollen auf die Viabilität von MCF-7 im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK = 100 %); dargestellt wird der Mittelwert mit positiver Standardabweichung; * = signifikante Wirkung in Bezug auf Negativkontrolle ($p < 0,05$); Negativkontrollen sind jeweils die Wirkungen der Lösungsmittel der Testsubstanzen auf MCF-7 (Matcha Eth, GT Eth, Estradiol, Tamoxifen = 70 % - Ethanol; Matcha H₂O, GT H₂O, EGCG = Wasser; Quercetin = DMSO).

Bei den Messungen der MCF-7-Zellen mit dem Neutralrot-Test fällt, wie auch bei den MDA-MB-231-Zellen auf, dass die in Wasser gelösten Tee-Extrakte (Matcha H₂O: CV = 13,3 %; SD = 3,3; GT H₂O: CV = 14,0 %, SD = 3,2) eine deutlich stärker hemmende Wirkung auf die Zellviabilität haben, als die Ethanolextrakte (Matcha Eth. CV = 45,0; SD = 5,2; GT Eth: 48,8 %; SD = 7,8).

EGCG erreicht in den Konzentrationen 180 (CV = 13,0 %; SD = 4,8) und 150 µg / ml (CV = 35,5 %; SD = 4,8) und 90 µg / ml (CV = 31,6 %; SD = 7,1) die ED 50. Quercetin führt nur in der höchsten gemessenen Konzentrationen (CV = 69,2 %; SD = 9,5) signifikant zu einer Hemmung der Viabilität. Keines der gemessenen Extrakte führt zu einer Viabilitätssteigerung (> 100 %), lediglich Estradiol ergibt einen ähnlichen Wert (CV = 100,7 %; SD = 3,2), wie die Negativkontrolle. Unter Tamoxifenbehandlung liegt die Zellviabilität bei nur 1,3 %.

3.5.3 Vergleich der Ergebnisse NRT-Test zwischen MDA-MB-231 und MCF-7

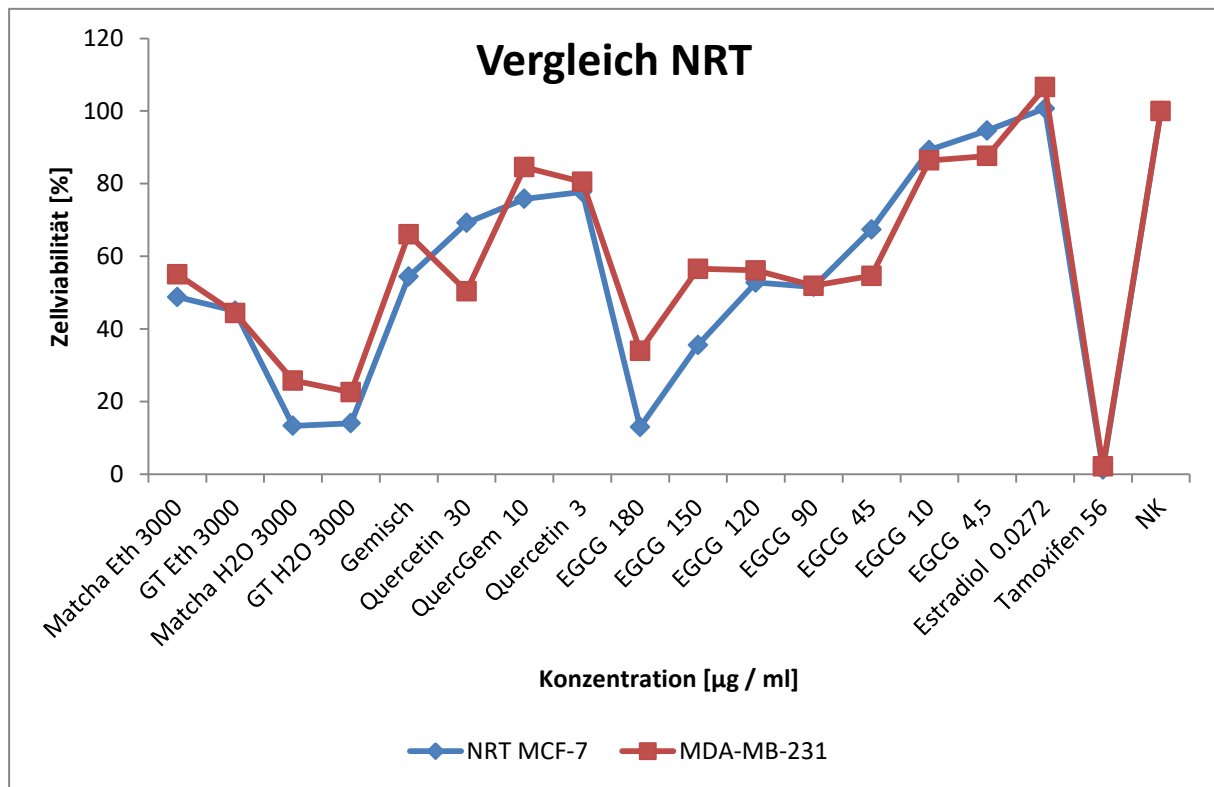


Abbildung 35: Vergleich der Zellviabilität zwischen MDA-MB-231 (rot) und MCF-7 (blau): NRT-Zellviabilitätstest nach 24 h; Zellviabilität in % (Negativkontrolle (NK) = 100 %).

Beim Neutralrot-Test ergibt sich bei keiner der Messungen ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Zellreihen.

3.6 LDH-Test

Mithilfe des LDH-Zytotoxizitätstests der Firma Roche sollte eine zytotoxische Wirkung der getesteten Substanzen auf die MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen untersucht werden. Wie bei allen anderen durchgeführten Zelltests wurde auch beim LDH-Test zusätzlich zu den Tests mit Zellsuspensionen eine Gegenprobe mit Extrakt-Medium-Gemischen ohne Zellen durchgeführt. Bei diesem Test stellte sich heraus, dass die Ergebnisse des LDH-Tests nicht auf den LDH-Gehalt im Zellüberstand zurückzuführen waren, sondern auf Interaktionen zwischen dem Extrakt und den Messmethoden. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Eigenfärbung der Gemische zu falsch positiven Ergebnissen in der photometrischen Messung mittels ELISA führte. Die Ergebnisse des LDH-Tests konnten daher nicht verwendet werden und es wurde stattdessen das Neutralrot-Testverfahren durchgeführt.

3.7 Glukosekonzentration und pH-Wert

3.7.1 MDA-MB-231

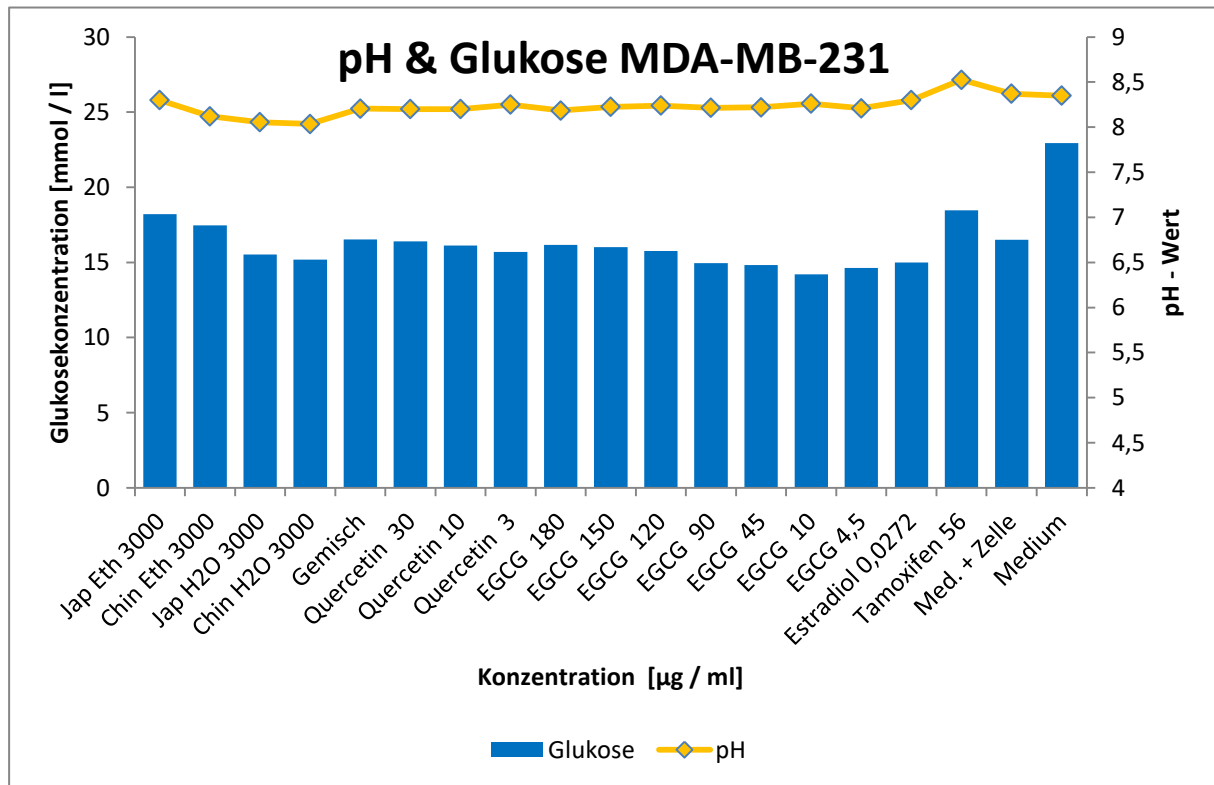


Abbildung 36: Glukosekonzentration und pH-Wert nach 24 h; MDA-MB-231.

Bei den Glukosemessungen der Zellüberstände der MDA-MB-231-Zellen ist zu erkennen, dass bei allen Zellkulturen die Glukosekonzentration (z.B. EGCG 120 µg / ml: 17 mmol / l) im Vergleich zum Medium (22,93 mmol/l) abgenommen hat. Es fällt auf, dass bei Tamoxifen und den Ethanolextrakten die Glukosekonzentration am höchsten bleibt (Tamoxifen: 19,9 mmol / l).

Der pH-Wert verhält sich bei den Grüntee-Extrakten gleichgerichtet zu den Glukosekonzentrationen, dh. Bei niedrigerer Glukosekonzentration sinkt auch der pH-Wert etwas ab (Matcha-Tee Ethanol: 8,30; Grüner Tee H2O: 8,04), bleibt aber im basischen Bereich. Bei allen anderen Extrakten bleibt der pH-Wert konstant im basischen Bereich, lediglich Tamoxifen zeigt einen etwas höheren pH-Wert, als der Rest (pH = 8,52).

3.7.2 MCF-7

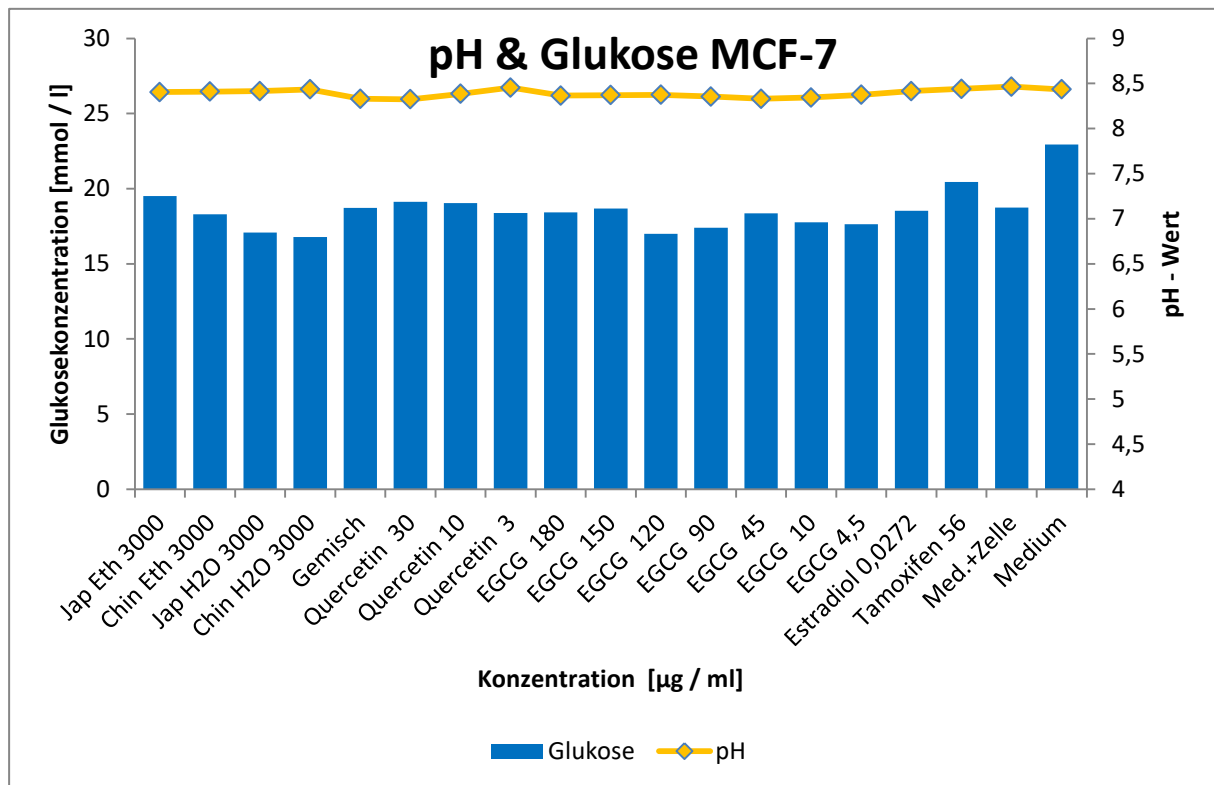


Abbildung 37: Glukosekonzentration und pH-Wert nach 24 h; MCF-7.

Genau wie bei den MDA-MB-231-Zellen fällt auch bei den MCF-7- Zellen bei allen Extrakten die Glukosekonzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zur Medium-Kontrolle (22,93 mmol / l) ab, allerdings mit durchschnittlich 20 % in einem geringeren Verhältnis als bei den MDA-MB-231-Zellen (30 % Abfall im Durchschnitt). Der geringste Abfall kann wieder beim Tamoxifen beobachtet werden mit 20,45 mmol / l (89,2 % der NK Medium).

Die pH-Werte bleiben sehr konstant und verändern sich nur geringfügig (pH = 8,41 – 8,46).

3.8 Immunhistochemie

Mithilfe der immunhistochemischen Untersuchungen wird untersucht, ob die Zelllinien MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Estrogen- und Progesteronrezeptoren exprimieren. Eine braun-rötliche Reaktion der Zellen bedeutet einen positiven Befund für den jeweils getesteten Rezeptortyp. Untersucht wurden die Estrogenrezeptoren α (ER α) und β (ER β) sowie ein Progesteronrezeptor (PR). Um die Ergebnisse korrekt einordnen zu können und zur Überprüfung der Funktionsweise des Testkits wurde eine Negativkontrolle (NK) ohne Antikörper angelegt.

Im Folgenden sind die lichtmikroskopischen Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung dargestellt.

3.8.1 MDA-MB-231

Die Immunhistochemie der Zellreihe MDA-MB-231 zeigte bei keinem der Antikörper eine rotbraune Reaktion unter dem Mikroskop (Abbildung 38), sodass bewiesen wurde, dass MDA-MB-231 weder ER α und ER β , noch PR exprimiert. Dies entspricht der Beschreibung des Herstellers [3].

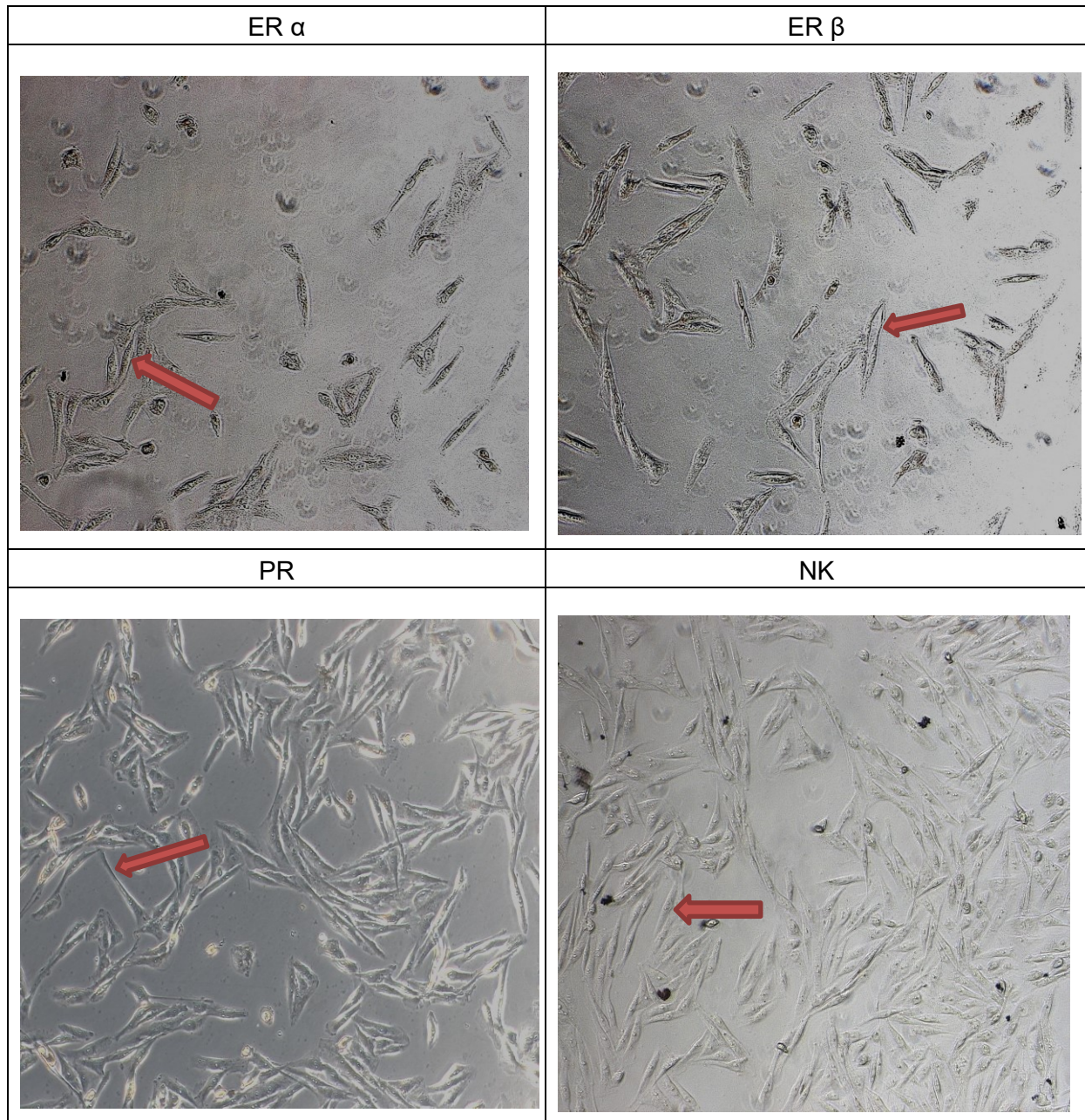


Abbildung 38: Immunhistochemie MDA-MB-231; lichtmikroskopische Aufnahmen in 10x Vergrößerung; Pfeile = MDA-MB-231- Zellen; bei allen getesteten Rezeptoren keine rotbraune Reaktion = keine Expressierung von ER α , ER β oder PR; auch Negativkontrolle (NK) ohne Farbreaktion.

3.8.2 MCF-7

Die Immunhistochemie der Zellreihe MCF-7 zeigte bei den Antikörpern für ER α , ER β und PR eine rot-braune Reaktion unter dem Mikroskop (Abbildung 39), sodass bewiesen wurde, dass MCF-7-Zellen ER α und ER β , sowie PR exprimieren. Dies entspricht der Beschreibung des Herstellers [2].

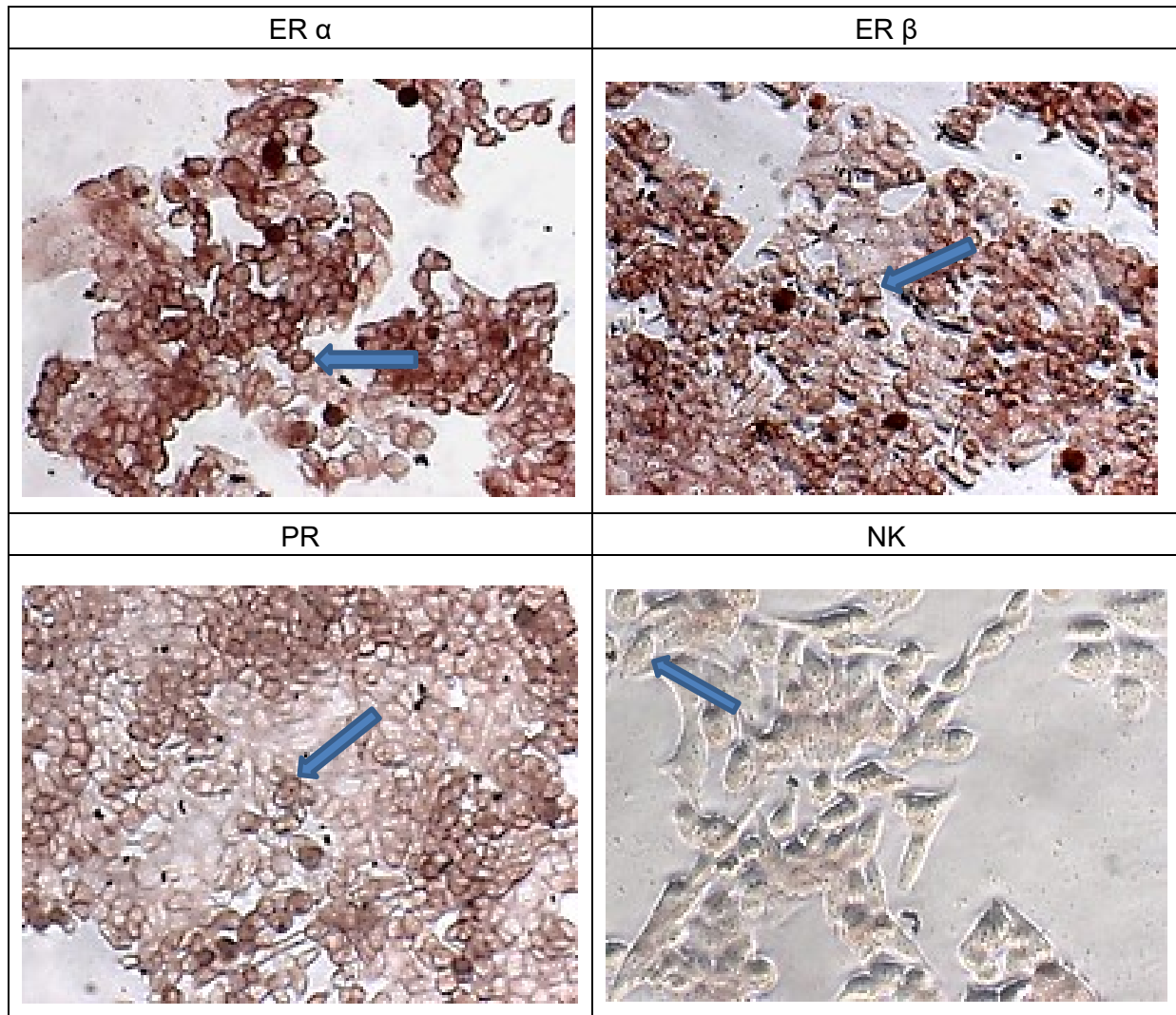


Abbildung 39: Immunhistochemie MCF-7; lichtmikroskopische Aufnahmen in 10x Vergrößerung; Pfeile = MCF-7- Zellen; bei allen getesteten Rezeptoren hat eine rotbraune Reaktion stattgefunden = Exprimierung von ER α , ER β oder PR; Negativkontrolle (NK) ohne Farbreaktion.

3.9 Oxidativer Stress

Der Test zum oxidativen Stress wurde zur Überprüfung des Metabolismus der Zellen herangezogen. Als Indikator für oxidativen Stress wurde eine Erhöhung der H_2O_2 – Konzentration in der Zellkultur angenommen.

3.9.1 MDA-MB-231

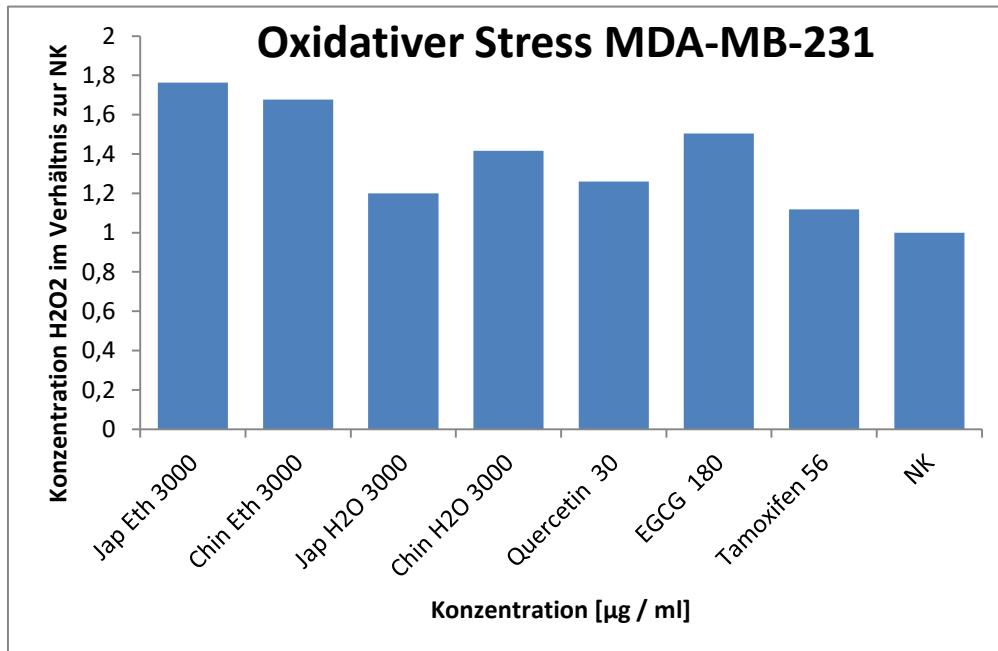


Abbildung 40: Oxidativer Stress MDA-MB-231-Zellen, Konzentration von H_2O_2 im Zellkulturüberstand im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK).

Es zeigt sich, dass bei allen Extrakt-Suspensionen die Konzentration an H_2O_2 im Vergleich zu der Negativkontrolle zunimmt. Den stärksten Zuwachs verbuchen die in Ethanol gelösten Grüntee-Extrakte mit Werten bis zum 1,7-fachen der NK. Auch das EGCG lässt eine Steigerung der H_2O_2 – Konzentration auf das 1,5-fache erkennen.

3.9.2 MCF-7

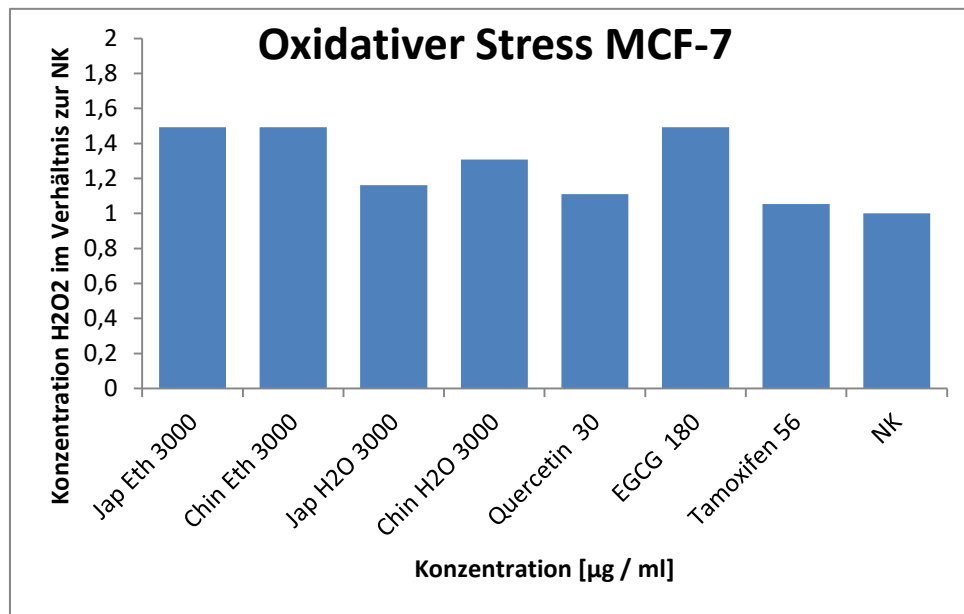


Abbildung 41: Oxidativer Stress MCF-7-Zellen, Konzentration von H₂O₂ im Zellkulturüberstand im Verhältnis zur Negativkontrolle (NK).

Ähnlich wie bei den MDA-MB-231-Zellen zeigen auch bei den MCF-7-Zellen die in Ethanol gelösten Grüntee-Extrakte und das EGCG-Extrakt die höchsten H₂O₂-Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle an mit Werten bis zum 1,5 fachen.

4. Diskussion

4.1 Diskussion von Material und Methoden

Die Herstellung der Teeextrakte orientierte sich an den traditionellen Zubereitungsformen von grünem Tee zum Verzehr in Japan [99,100]. Daher wurde das Wasserextrakt bei 70 °C hergestellt. Um herauszufinden, ob durch Ethanol eine bessere Lösung der Inhaltsstoffe möglich ist, wurde der Tee zudem in 70 %-Ethanol gelöst. Hier wurde aufgrund des niedrigeren Siedepunktes von Ethanol die Temperatur auf 60 °C herabgesetzt.

Die HPLC ist ein etabliertes Prinzip zur Auftrennung von Stoffgemischen und der qualitativen, sowie quantitativen Analyse seiner einzelnen Bestandteile [9,38].

Die MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen sind allgemein übliche Zellreihen zur Untersuchung der Wirkung auf estrogenrezeptor-positive und -negative Brustkrebszellen und werden für *in vitro* Studien genutzt [15,55,95,102].

Die Wirkung von Substanzen auf die Zellreihen wird anhand von Viabilitäts- und Proliferationsparametern der Zellen charakterisiert.

Der MTT-Test zur Bestimmung der Mitochondrienaktivität ist ein häufig genutzter Test für diesen Zweck [4,59,74]. Allerdings fanden Wang et al. in ihren Vergleichsuntersuchungen der Wirkung von EGCG auf Brustkrebszellen mithilfe des MTT-Tests und eines ATP-Assays heraus, dass sich die Viabilitätswerte zwischen diesen beiden Tests stark unterschieden, trotz gleich getesteter Konzentration des EGCGs [118]. Auf dieses Problem wird in dem Kapitel 4.2.2.4. EGCG näher eingegangen.

Da bis dato im Forschungslabor nicht die Möglichkeit bestand, ATP-Lumineszenzmessungen durchzuführen, wurde mir von der Firma Promega probeweise ein Lumineszenzreader GloMax-Discover zur Verfügung gestellt, und ich konnte das Prinzip neu im Labor etablieren. Zur Messung der Zellproliferationsraten ist der BrdU-Test ein allgemein üblicher Assay, der die Menge von neu synthetisierter DNA anhand des Einbaus von BrdU anstelle der Base Thymidin detektiert [90,108].

Da die Ergebnisse des LDH-Tests aufgrund der Interaktion der Extrakte mit den Testreagenzien nicht korrekt ausgewertet werden konnten, wurde als Alternative der Neutralrot-Test gewählt. Hier ergab sich nach der Gegenprobe keine Einschränkung in der Auswertung der Ergebnisse [87,104].

Des Weiteren fanden pH- und Glukosemessungen der Kulturen statt, um den Verbrauch von Glukose durch vitale Zellen und eine Veränderung des pH-Wertes ggf. nachzuweisen.

Zusammenfassend erlauben die gewählten Methoden eine Aussage über *in vitro*-Effekte der in dieser Arbeit getesteten Substanzen auf die Mammakarzinomzellreihen MCF-7 und MDA-MB-231.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Diskussion der Ergebnisse HPLC

Mithilfe der HPLC konnte EGCG und Quercetin in allen Grüntee-Extrakten nachgewiesen werden. Dies entspricht auch den Beobachtungen in der Literatur [115]. Der Beweis wurde anhand der Deckungsgleichheit von Peaks angeführt, da dies eine gleiche Retentionszeit

bedeutet. Anhand der Flächen der Peaks der Tee-Extrakte und der Reinsubstanzen, deren Konzentration bekannt war, konnte per Dreisatz die Konzentration der Reinsubstanzen EGCG und Quercetin in den Tee-Extrakten semiquantitativ berechnet werden. Anschließend fand noch eine Gegenprobe mithilfe des Additionsverfahrens statt, bei dem die errechnete Menge EGCG direkt dem Grüntee-Extrakt zugegeben wurde. Dabei konnte die errechnete Konzentration bestätigt werden [38].

Es stellte sich heraus, dass die Konzentrationen von EGCG in den Extrakten des chinesischen grünen Tees, also den Blättern, höher ausfielen als in den Extrakten des japanischen Tees. Dies widerspricht zunächst der Untersuchung von Fujioka et al., die herausfanden, dass der Catechingehalt im Matchatee wesentlich höher ist als in dem Blätteraufguss [36]. Hier gilt es aber die Verzehrweise der unterschiedlichen Zubereitungsformen zu beachten. Während beim Aufguss der Teeblätter nur der Aufguss getrunken wird, nimmt man beim Matchatee auch das Pulver mit der Flüssigkeit zu sich. Das bedeutet, alle Bestandteile des Tees werden der Verdauung zugeführt. Damit die Extrakte nicht die Filter der HPLC verstopfen und Messergebnisse bei den Zelltests durch Schwebeteilchen verfälscht werden, wurden beide Extrakte filtriert und zentrifugiert, sodass die Messung des Matchatees nicht ganz genau der tatsächlichen Aufnahme von Teebestandteilen bei normalem Verzehr entspricht. Dies könnte auch die niedrigeren Konzentrationen des EGCGs erklären. In der Literatur schwanken die Angaben, wie viel EGCG eine Tasse grüner Tee enthält, zwischen 20 – 200 mg [107,115]. Ein Vergleich der Angaben ist schwierig, da bei der Angabe einer Tasse von unterschiedlichen Volumina ausgegangen wird (70 – 250 ml) bzw. gar keine Angaben zur Menge gemacht werden und häufig auch unklar ist, wie viel grüner Tee aufgegossen wird. Zudem wird meist nicht zwischen Matchatee und normalem Tee unterschieden. Geht man davon aus, dass 2 g Teepulver bzw. -blätter mit 150 ml Wasser aufgegossen werden, liegt der durchschnittliche, von mir ermittelte EGCG-Gehalt in einer Tasse grünem Tee bei ca. 80 mg.

Es muss davon ausgegangen werden, dass EGCG sich unter Zellkulturbedingungen durch Auto-Oxidation und Dimerisierung in seiner Struktur verändert, denn besonders in Leitungswasserlösungen konnten Sang et al. eine erhöhte Instabilität des EGCG-Moleküls beobachten, was sie auf Eisenbestandteile im Wasser zurückführen. Weitere Faktoren, welche die Molekülstabilität beeinflussen, sind u.a. pH-Wert, Temperatur und die Konzentration von EGCG [94,137]. Sang et al. wiesen nach, dass in RPMI-1640-Medium (benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute), welches dem von mir verwendeten DMEM sehr ähnlich ist, bei 37 °C bereits nach einer Stunde fast das komplette EGCG zerfallen war. Während bei hohen Konzentrationen EGCG eher zu GCG (Galocatechingallat) geformt wird, kommt es bei niedrigeren Konzentrationen eher zu Dimerbildungen, zudem sind Halbwertszeiten bei hohen Konzentrationen länger. Mit diesen Erkenntnissen können auch die großen Schwankungen in der Literatur bezüglich der Menge an EGCG in einer Tasse Tee erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass unterschiedlich lange Zeiten zwischen der Präparation und Messung, unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen bestanden. Vermutlich ist ein Teil des EGCG schon nach der Zubereitung der Extrakte zum Zeitpunkt der Mengenbestimmung zerfallen [94].

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Zelltests

Im Folgenden werden die einzelnen Substanzen, welche auf die Brustkarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7 getestet wurden, besprochen.

4.2.2.1 Estradiol

Estradiol wurde als Positivkontrolle getestet, da es auf estrogenrezeptorpositive Brustkrebszellen proliferationsfördernd wirken soll [13,47]. In den Versuchen konnte aber weder bei MDA-MB-231, noch bei MCF-7 eine signifikante Steigerung der Vitalität bzw. Proliferation festgestellt werden. Liu et al. liefern dafür eine Erklärung, indem sie eine Hemmung der ER α -induzierten Proliferation durch antagonistische Wirkungen des ER β beschreiben, der auch von den MCF-7-Zellen exprimiert wird [72]. Die getestete Estradiolkonzentration liegt über den physiologischen Werten [123]. Effenberger beschreibt 2004 in ihrer Arbeit, dass durch steigende Estradiolkonzentrationen die Affinität zu den Estrogenrezeptoren α und β verringert wird. Es kann also angenommen werden, dass aufgrund der gewählten Estradioldosen keine Viabilitätssteigerung eingetreten ist [32].

4.2.2.2 Tamoxifen

Als weitere Kontrolle diente die Behandlung der Zellen mit dem SERM Tamoxifen. Es ist das Mittel der Wahl für die adjuvante Therapie von estrogenrezeptorpositiven Tumoren und wirkt über seinen Metaboliten Endoxifen [56]. In allen Zellversuchen zeigte sich eine nahezu vollständige Hemmung der Viabilität und Proliferation, unabhängig vom Rezeptorstatus. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Wirkung des Tamoxifens nicht nur über die Estrogenrezeptoren generiert wird. Kallio et al. und Chisholm et al. stellten fest, dass Tamoxifen bei MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen proapoptotisch wirkt. Bei den estrogenrezeptornegativen Zellen stellten Chisholm et al. sogar einen synergistischen proapoptotischen Effekt fest, wenn Tamoxifen mit EGCG kombiniert wurde. Diese Beobachtung konnte auch von Scandlyn et al. *in vivo* bestätigt werden [15,55,96].

4.2.2.3 Grüner Tee

Der aus den Teesträuchern *Camellia sinensis* hergestellte grüne Tee ist u.a. in Japan ein Nationalgetränk und wird dort in großen Mengen konsumiert. Auffällig ist die deutlich niedrigere Brustkrebsrate in Japan und China im Vergleich zur westlichen Welt [63,113,124]. Studien weisen darauf hin, dass die niedrigere Inzidenz mit dem hohen Konsum von grünem Tee zusammenhängt [127].

In allen Zelltests zeigte sich eine Reduzierung der Viabilitäts-, Vitalitäts- und Proliferationswerte, allerdings fällt diese recht unterschiedlich aus. Im ATP-Lumineszenztest erreichten alle Grüntee-Extrakte Werte, die denen des Tamoxifens entsprechen (Abbildung 24, Abbildung 25) und deutlich über der ED₅₀ liegen. Auch beim MTT-, BrdU-, und NRT-Test konnte eine Hemmung der Werte im Vergleich zur Nk beobachtet werden, allerdings lagen die gemessenen Konzentrationen häufig unter der ED₅₀. Es wird davon ausgegangen, dass EGCG für einen Großteil der antikarzinogenen Wirkung des Grüntees verantwortlich ist

[12,79,112,136]. Auch Wang et al. beobachteten, wie bereits oben beschrieben, wesentlich höhere Viabilitätswerte im MTT-Test im Vergleich zu den ATP-Messungen [118]. Als Erklärung können hier die Ergebnisse von Bruggisser et al. und Peng et al. herangezogen werden, die beobachteten, dass Antioxidantien und Flavonoide beim MTT-Test zu einer Reduktions-Reaktion des MTTs zum Farbstoff Formazan, auch ohne Anwesenheit von lebenden Zellen, führen. Die Menge an entstandenem Formazan wird photometrisch gemessen und es werden somit falsch hohe Viabilitätsergebnisse angezeigt [10,84].

Die Analyse der Tee-Extrakte mithilfe der HPLC zeigt neben den Peaks für EGCG und Quercetin zahlreiche weitere Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten (Abbildung 16 – Abbildung 23). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht weiter ermittelt, welchen Anteil diese Substanzen an der antikarzinogenen Wirkung des grünen Tees haben.

4.2.2.4 EGCG

EGCG ist das Catechin, welches im grünen Tee den größten Anteil hat und dem u.a. eine antikarzinogene Wirkung nachgesagt wird [12,79,109,112,134]. In der S3-Leitlinie von 2012 wird EGCG bereits beschrieben als häufig von Patientinnen eingesetzte komplementäre Methode [3]. Es konnte mithilfe der HPLC in den untersuchten Tee-Extrakten nachgewiesen werden (Abbildung 17, Abbildung 19, Abbildung 21, Abbildung 23).

Besonders deutlich konnte im ATP-Lumineszenztest eine hoch korrelativ ($|r| = 0,97$) konzentrationsabhängige Hemmung der Zellviabilität bei beiden Brustkrebszellen beobachtet werden, die in den höchsten Konzentrationen der Wirkung des Tamoxifens entsprachen. Wang et al. führten den gleichen ATP-Assay mit MCF-7-Zellen und EGCG durch, wobei sie EGCG-Konzentrationen von 4,5 – 54 $\mu\text{g} / \text{ml}$ testeten. Ihre Ergebnisse zeigten schon bei den niedrigeren Konzentrationen nach 24 h eine Hemmung der Zellviabilität. Auch beim MTT-Test fand bei Wang et al. nur eine Überprüfung von Konzentrationen statt, die den niedrigsten von mir getesteten entsprechen. Die Viabilitätswerte nach 48 h sind vergleichbar mit den von mir gemachten Beobachtungen nach 48 h und liegen auch dort deutlich höher, als die Werte im ATP-Test, was wiederum mit den Beobachtungen von Bruggisser et al. und Peng et al. erklärt werden kann, dass MTT durch Antioxidantien zu Formazan reduziert wird [10,84,118]. Für MDA-MB-231 ermittelten Thangapazham et al. in ihren Versuchen niedrigere Viabilitätswerte beim MTT-Test mit EGCG in unterschiedlichen Konzentrationen als ich nach 48 h. Die EC_{50} lag bei Ihnen bei 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, während die EC_{50} in meinen Versuchen durch keine der gemessenen Konzentrationen im MTT-Test bei den MDA-MB-231-Zellen erreicht wurde [112]. Sowohl Wang et al. als auch Thangapazham et al. führten die Messungen außerdem nach 24, 48, 72 und Thangapazham auch nach 96 h durch. Alle Ergebnisse zeigten dabei, dass die Zellviabilität mit fortgeschrittener Zeit weiter abnahm [112,118]. Eine Erklärung für die unterschiedlich hohen Viabilitätswerte, trotz gleicher Testverfahren und gleicher EGCG-Konzentrationen, könnte der pH-Wert sein. Bereits 1997 beschrieben Zhu et al., dass Catechine bei niedrigen pH-Werten wesentlich stabiler sind als bei alkischen pH-Werten [137]. Meine pH-Messungen ergaben immer basische pH-Werte, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die EGCG-Verbindung sehr instabil waren. In den Untersuchungen von Wang et al. und Thangapazham et al. finden sich keine Angaben zu den pH-Werten der Zellkulturen. Es besteht also die Möglichkeit, dass sie mit

niedrigeren pH-Werten arbeiteten und es so aufgrund der höheren Stabilität der Catechine auch zu einer stärkeren Hemmung der Zellviabilität kam.

Zur Messung der Zellproliferation nutzten Wang et al. einen Test, bei dem die neu synthetisierte DNA quantifiziert wurde, allerdings per Lumineszenz (Cy-QUANTH NF Cell Proliferation Assay, Invitrogen Corporation). Genau wie beim MTT- und ATP-Assay testeten sie nur Konzentrationen von 4,5 – 36 µg / ml. Sie erreichten nach 24 h mit keiner der gemessenen Konzentrationen die ED₅₀ [118]. Auch bei meinen Untersuchungen erreichten alle Konzentrationen im BrdU-Test zur Messung der Zellproliferation für MCF-7 nicht die ED₅₀. Auffällig ist jedoch, dass bei den MDA-MB-231-Zellen das Gemisch aus den, mittels HPLC berechneten, Konzentrationen von EGCG und Quercetin eine stärkere Wirkung entfaltete, als die beiden Einzelsubstanzen alleine. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre die Einflussnahme der beiden Substanzen gemeinsam auf den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und damit eine Beeinflussung des endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), also der Neovaskularisierung, welche für die Nährstoffversorgung des Tumors essentiell ist. Van Aller et al. konnten nachweisen, dass EGCG eine hemmende Wirkung auf diesen Signalweg, z.B. bei MDA-MB-231-Zellen hat, Bruning bestätigte in seiner Arbeit die hemmende Wirkung Quercetins auf mTOR [11,116]. Gu et al. beobachteten in ihrer in-vivo-Studie mit Mäusen, dass die orale Gabe von EGCG zu einem kleineren Tumolvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe führte, was sie mit der Hemmung des VEGF begründen [43]. Wang et al. zeigten 2014 in ihren Ergebnissen mit einem Xenograft-Prostatatumor-Maus-Modell, dass die Kombination aus EGCG und Quercetin zu einer stärkeren Bioverfügbarkeit und geringeren Methylierung des Catechins führte. Die Tumorgröße konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen gesenkt werden. Sie stellten fest, dass die Quercetin und EGCG in Kombination zu einer signifikanten Reduzierung von phosphoryliertem AKT (pAKT) führten [119]. Scandlyn et al. kombinierten EGCG mit Tamoxifen und maßen bei rezeptornegativen Tumoren in-vivo eine Reduzierung von mTOR um 78 % [96].

Die Wirkmechanismen, die zur anticarcinogenen Wirkung von EGCG führen, sind immer wieder Gegenstand der Forschung. Verschiedene Vergleichsstudien zeigten, dass die proliferations- und viabilitätshemmende Wirkung nur für Tumorzellen gilt, aber wohl keine negativen Effekte auf normale Gewebezellen hat [14,121,131]. Allerdings beschrieben Furukawa et al. auch, dass es im Beisein von Metallionen mittels der Fentonreaktion zu Schäden an der DNA normaler Zellen kommen kann [37].

Da es bei meinen Untersuchungen kaum signifikante Unterschiede zwischen den Wirkungen des EGCGs auf die estrogenrezeptor-negativen MDA-MB-231 und –positiven MCF-7 gab, kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung nicht, oder zumindest nicht ausschließlich, über die Estrogenrezeptoren generiert wird. Tachibana et al. und Umeda et al. fanden heraus, dass EGCG über ihr Bindungsverhalten mit dem Oberflächenrezeptor 67-kDa-Laminin-Rezeptor (67-LR) ihr anticarcinogene Wirkung entfalten [110,114]. Der 67-LR spielt u.a. in der Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle [81]. Mittal et al. zeigten in ihren Versuchen, dass EGCG bei MCF-7 Zellen die Telomerase hemmt, welche in mehr als 90 % aller Fälle bei Tumoren erhöht ist [76]. Roy et al. beschreiben eine erhöhte Expression von p53 und dem proapoptotischen Protein Bax, sowie eine erniedrigte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 bei estrogenrezeptornegativen Brustkrebszellen unter EGCG-Einfluss [74].

Obwohl die Mehrheit der Studien davon ausgeht, dass EGCG eine antioxidative Wirkung hat, beschreiben z.B. Furukawa et al., dass von EGCG eine prooxidative Wirkung und somit die Entstehung von Wasserstoffperoxid gefördert wird [37]. Auch Yang et al. stellen zur Diskussion, ob die so häufig beschriebene antioxidative Wirkung von EGCG z.B. für seine antikanzinogene Wirkung verantwortlich ist oder evtl. das durch die prooxidative Wirkung entstandene H_2O_2 z.B. an apoptotischen Effekten einen großen Anteil hat [133]. Forester et al. gehen in ihrem Review davon aus, dass EGCG sowohl anti-, als auch prooxidative Wirkungen hat, die jeweilige Wirkweise aber von Faktoren, wie dem pH-Wert oder dem Redoxstatus, abhängig sind. Diese Thesen werden durch meine Ergebnisse im oxidativen Stress gestützt, da sowohl bei den Tee-Extrakten als auch beim EGCG und Quercetin die H_2O_2 -Konzentrationen in der Zellkultur höher sind als bei der Negativkontrolle (Abbildung 40, Abbildung 41). Aufgrund fehlender Angaben zu Standardkonzentrationen und Grenzwerten in der Literatur, kann allerdings keine qualitative Einordnung der Ergebnisse bezüglich der Stärke des oxidativen Stresses vorgenommen werden.

Es gilt zu berücksichtigen, dass die meisten Studien bisher *in vitro* Untersuchungen waren und somit nicht die Bioverfügbarkeit des EGCG beim Menschen berücksichtigt ist. Yang et al. fanden in einer Patientenstudie ($n = 18$) heraus, dass der Konsum von 3 g entkoffeiniertem Grünem Tee (EGCG-Gehalt: 73 mg / g) zu einer Plasmakonzentration von maximal 326 ng / ml führten. Während eine Steigerung von 1,5 g auf 3 g zu einer Verdreifachung der EGCG-Plasma-Konzentration führte, konnte ein Steigerungs-Effekt bei einer Dosis von 4,5 g nicht mehr beobachtet werden. Es erscheint also, dass eine Sättigung der EGCG-Aufnahme erreicht wurde [134]. Chow et al. testeten die Bioverfügbarkeit von EGCG mit der Gabe von EGCG-Kapseln. Sie maßen Plasma-Werte von 439 ng / ml nach Gabe von 800 mg EGCG, bzw. 388 ng / ml nach Gabe von 800 mg entkoffeiniertem EGCG (Polyphenol E) [49]. Die Werte zeigen, dass die Bioverfügbarkeit im Plasma beim Menschen sehr gering ist.

Einen Weg, um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen beschreiben Landis-Piwowar et al., die sowohl *in vitro* als auch im Tierexperiment *in vivo* nachweisen konnten, dass ein Prodrug des EGCG, bei dem die Hydroxyl-Gruppen durch Peressigsäuregruppen vor der Methylierung geschützt wurden, zu einer größeren Bioverfügbarkeit führten und stärker in den Mammakarzinomzellen akkumulierten [67]. Sie fanden 2007 heraus, dass die Methylierung des EGCG durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zu einer geringeren antikanzerogenen Wirkung der Catechine führt [68]. Diese Aussage deckt sich auch mit den Beobachtungen von Wu et al., die zeigen konnten, dass vor allem Trägerinnen des COMT-L-Allels, einer nur gering aktiven COMT-Form, von den antikanzerogenen Wirkungen der Catechine profitierten, während bei Trägerinnen der hochaktiven Form (COMT-H) kein Unterschied bezüglich des Brustkrebsrisikos zwischen Teetrinkerinnen und Nicht-Teetrinkerinnen bestand [129]. Mit diesen Erkenntnissen und Landis-Piwowars et al. Studie von 2010, in der sie nachweisen konnten, dass MDA-MB-231 die COMT-H-Form besitzen, eröffnet sich eine weitere Option, die Wirkung der Catechine, zumindest für diese Zellreihe, durch den Einsatz von COMT-Hemmern zu verstärken [66].

Sowohl bei *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass EGCG einer Gewichtsabnahme dienlich sein kann. Wolfram et al. und Moon et al. konnten *in vitro*

nachweisen, dass die Differenzierung der Adipozyten durch EGCG gehemmt wird [78,126]. Auch in vivo konnte beobachtet werden, dass der Konsum von grünem Tee zu einem geringeren Fettkörperanteil führte [125,128]. Da Fettleibigkeit z.B. aufgrund der Aromatisierung von Fettzellen (Abbildung 2) ein Risikofaktor u.a. für die Entstehung von Brustkrebs ist, könnte EGCG auch aus diesem Grund protektiv wirken [82].

4.2.2.5 Quercetin

Das Flavonol Quercetin wurde mittels HPLC im grünen Tee nachgewiesen (Abbildung 16, Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 22).

Es zeigt sich in nahezu allen Tests eine Hemmung der Zellviabilität, mit Ausnahme der MCF-7-Zellen im MTT-Test, bei dem alle Ergebnisse über 100 % Zellviabilität liegen, allerdings ohne statistische Signifikanz. Die Ergebnisse des NRT, MTT-Test für MDA-MB-231, und ATP-Lumineszenztests zeigen die stärkste Hemmung bei der höchsten Konzentration. In keinem der Tests erreichten die getesteten Konzentrationen die ED_{50} . Beim MTT-Test und ATP-Lumineszenztest war der Unterschied der Hemmung in der höchsten Konzentration des Quercetins zwischen den MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen signifikant. In beiden Fällen hemmte Quercetin die estrogenrezeptor-negativen Zellen stärker als die –positiven.

In der Studie von Scambia et al. hemmt Quercetin konzentrationsabhängig über die Bindung an die Estrogenbindungsdomäne Typ II (EBS II) sowohl das Wachstum von MCF-7-, als auch MDA-MB-231-Zellen [94]. Lee et al. erklären die Induktion der Apoptose von MCF-7-Zellen durch Quercetin mit der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen, welche den proapoptischen AMPK α 1/ASK1/p38-Signalweg aktivieren [69]. Duo et al. erkennen die apoptotische Wirkung des Quercetins in Hochregulierung des Bax-Proteins and Reduzierung des Bcl-2-Proteins [25]. Genau wie EGCG wirkt auch Quercetin hemmend auf die mTOR-Signalkaskade [58].

4.2.2.6 Ergebnisse der Immunhistochemie und pH- bzw. Glukosemessungen

Mithilfe der Immunhistochemie konnte der Rezeptorstatus in den Herstellerangaben der Zellen bestätigt werden. Es handelte sich bei den MCF-7-Zellen um estrogen- und progesteronrezeptor-positive und bei den MDA-MB-231-Zellen um estrogen- und progesteronrezeptor-negative Brustkrebszellen [2,3,53].

Bei der Bestimmung der Glucosekonzentration zeigte sich sowohl bei MCF-7, als auch bei MDA-MB-231 eine Abnahme der Konzentration bei allen Substanzen im Vergleich zum Medium ohne Zellen. Am geringsten war der Abfall bei der Zugabe von Tamoxifen ausgeprägt, was mit einem schnellen Untergang der Zellen zu erklären ist. Kallio et al. beschrieben 2005, dass bereits 5 – 7 μ M Tamoxifen, sowohl bei MCF-7, als auch bei MDA-MB-231-Zellen in weniger als 60 Minuten zum Zelltod führen [55]. Der im Verhältnis zu den MCF-7-Zellen stärker ausgeprägte Abfall des Glukosespiegels kann z.B. durch die geringere Methylierung der Catechine durch die COMT begründet werden, wodurch die Catechine effizienter die Viabilität hemmen konnten [66].

Bei der Bestimmung der pH-Werte zeigen sich alle pH-Werte im basischen Bereich, was dafür spricht, dass kein anaerober Stoffwechsel mit Laktatanstieg stattfand, da dies eher zu einem sauren pH geführt hätte [50].

4.2.2.7 Methodenkritik

Wie vorangegangen bereits erwähnt, konnten die Ergebnisse des LDH-Tests der Firma Roche nicht genutzt werden, da Kontrolluntersuchungen ergaben, dass die starke Eigenfärbung der Extrakte zu falsche hohen Werten bei den Messungen führten.

Um sicherzustellen, dass die getestete Konzentration an Catechinen auch wirklich der Ausgangskonzentration entspricht, hätte man die Extrakte vor jeder Testung neu herstellen müssen, um dem Zerfall des Catechins, abhängig u.a. von Zeit und pH-Wert, vorzubeugen [102].

Für die bessere Einordnung des klinischen Nutzens der Studie wäre es sinnvoll gewesen, neben den Einzelextrakten auch die Kombination aus EGCG und Tamoxifen auf die Brustkarzinomzellen zu untersuchen, um einen etwaigen Synergismus zu erkennen.

In der HPLC könnte der Gradient der Lösungsmittel noch stärker abgeflacht werden, damit eine genauere Auftrennung der Substanzen stattfindet und die Ergebnisse noch präziser interpretiert werden können.

4.3 Ausblick

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass grüner Tee positive Effekte auf die Gesundheit hat. Aufgrund der antikarzinogenen Ergebnisse für Brustkrebs aus *in vitro*- und *in vivo*-Studien und der Ergebnisse meiner Versuche kann davon ausgegangen werden, dass grüner Tee und speziell EGCG antikarzinogen wirkt.

Ein Problem für die Therapie mit EGCG ist die geringe Bioverfügbarkeit, die durch die orale Applikation des Catechins nur erreicht werden kann. Hier ist es zu empfehlen, zunächst in Tier-Studien, z.B. im athymischen Mausmodell mit Xenograft-Tumor, zu ermitteln, ob es z.B. möglich ist, EGCG als intravenöse Infusion zu verabreichen, um so den First-Pass-Effekt zu umgehen [77]. Ein weiterer Ansatz wäre die Gabe eines EGCG-Prodrugs, welches von Landis-Piwowar et al. beschrieben wurde und zu einer besseren Bioverfügbarkeit führte [67]. Dem vorausgehend sollten allerdings Untersuchungen angestellt werden, ob EGCG in höheren Dosen auch toxische Effekte haben kann. Schönthal berichtet von Fällen, in denen hohe Dosen von grünem Tee zu hepatotoxischen Effekten geführt haben sollen, wobei nicht eindeutig nachzuweisen war, welche Bestandteile des Tees dafür verantwortlich sind. Auch weist er auf die Gefahren von Interaktionen des EGCG mit Medikamenten hin, z.B. durch eine Beeinflussung von Enzymen, wie dem Cytochrom-P450-System [97].

Eine weitere Möglichkeit, EGCG in der Brustkrebstherapie zu etablieren, wäre die Kombinationstherapie aus Tamoxifen und EGCG. Der Vorteil von EGCG liegt dabei in der geringeren Nebenwirkungsrate. Sakata et al. und Chisholm et al. zeigten sowohl für MCF-7, als auch MDA-MB-231 einen synergistisch antiproliferativen und zytotoxischen Effekt, wenn Tamoxifen und EGCG kombiniert verabreicht werden [15,93]. Scandlyn et al. konnten diese Ergebnisse *in vivo* mit Mäusen bestätigen. Sie beobachteten eine antiproliferative Wirkung durch das EGCG in Kombination mit niedrigen Tamoxifendosen (75 µg / kg) bei den Tieren mit triple-negativem Mammakarzinom [96]. Um diesen Effekt besser verstehen zu können, sollten die Wirkprinzipien der beiden Substanzen intensiver untersucht werden. Denn eine reine estrogenrezeptorabhängige Wirkung des Tamoxifens ist aufgrund fehlender Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den zwei Zellreihen sehr unwahrscheinlich. Hier gilt es an die Untersuchungen zur Beeinflussung der Apoptose und der Neovaskularisierung anzuknüpfen. Für das Verständnis der Wirkungsweise von EGCG wäre es interessant die Rolle des 67-kDa-Laminin-Rezeptors weiter zu erforschen [81,114].

Generell kann gesagt werden, dass es aufgrund der Instabilität der Catechine im Grünen Tee sinnvoll ist, den Tee kurz nach dem Zubereiten zu konsumieren. Fertiggetränke scheinen hinsichtlich ihrer positiven Gesundheitsaspekte durch die Catechine ungeeignet zu sein, da die Konzentration an EGCG stark abnimmt [94,137].

5. Zusammenfassung

Ziel dieser *in vitro*-Studie war es, das antikazinogene Potential von grünem Tee, seinen Bestandteilen Epigallocatechingallat und Quercetin sowie des Tamoxifens auf estrogenrezeptor-negative und -positive Zellen zu untersuchen. Hierbei galt es zunächst mittels HPLC nachzuweisen, dass beide Stoffe im grünen Tee enthalten sind und in welcher Menge. Anschließend sollte mithilfe verschiedener Testmethoden die Wirkung des Grüntees und der Einzelsubstanzen auf MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen untersucht werden.

Die Grüntee-Extrakte wurden mittels Mikrowellentechnik aus handelsüblichem grünem Tee hergestellt und in Ethanol, sowie Leitungswasser gelöst. Die kommerziell hergestellten Einzelsubstanzen wurden in Aquadest und DMSO bzw. Ethanol gelöst. Anschließend erfolgte eine qualitative und semiquantitative HPLC-Analyse der Extrakte. Hier konnte bestätigt werden, dass sowohl der Grüntee als auch der Matchatee Epigallocatechingallat und Quercetin enthalten.

Für die Zellversuche wurden kommerziell erworbenen estrogenrezeptor-negative MDA-MB-231- sowie estrogenrezeptor-positive MCF-7-Zellen genutzt. Der Rezeptorstatus wurde immunhistochemisch bestätigt. Anschließend wurden diverse Funktions-, Viabilitäts- und Zytotoxizitätstests durchgeführt, um die Wirkung der Substanzen auf die Brustkarzinomzellen zu untersuchen.

Nach der Inkubation mit den Grüntee-Extrakten, dem EGCG, Quercetin und Tamoxifen zeigte sich in allen Zelltests eine Abnahme der Viabilität bzw. der Proliferation der Karzinomzellen, wobei die Intensität unter den verschiedenen Testverfahren z.T. stark variierte. Als Erklärung dient hier z.B. beim MTT-Test eine Interaktion der Substanzen mit den Testlösungen, woraus falsch hohe Viabilitätswerte resultieren können. Es zeigte sich bei allen Zelltests, dass es kaum bzw. keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung der Substanzen zwischen den zwei Zellreihen gab. Die Messungen des pH-Wertes zeigten bei allen Zellkulturen basische pH-Werte an.

Es konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass EGCG und Quercetin in grünem Tee enthalten sind und sowohl die Einzelsubstanzen als auch der grüne Tee selbst eine antikarzinogene Wirkung, sowohl auf estrogenrezeptor-positive als auch -negative Brustkarzinomzellen haben. Auch für Tamoxifen konnte diese Wirkung für beide Zellreihen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Wirkungen nicht bzw. nicht nur über die Estrogenrezeptoren generiert werden.

6. Thesen

Thema: Die Wirkung von grünem Tee und Matchatee, sowie ihren Bestandteilen Epigallocatechingallat und Quercetin auf MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkarzinomzellen

Eingereicht von Philip Marahrens

1. Brustkrebs ist die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau.
2. In Japan und China ist die Brustkrebsinzidenz bedeutend niedriger als in der westlichen Welt.
3. Das Mittel der 1. Wahl zur Rezidivprophylaxe ist noch immer Tamoxifen.
4. Tamoxifen hat viele Nebenwirkungen, die zu Complianceproblemen führen.
5. Die Zellassays BrdU, MTT, CellTiter-Glo-Luminescent-Test und Neutralrot werden zur Beurteilung der Proliferation, Zellviabilität und Zytotoxizität genutzt.
6. EGCG ist ein Catechin, welches im grünen Tee vorkommt.
7. Quercetin ist ein Flavonol, das im grünen Tee vorkommt.
8. MCF-7-Zellen sind estrogenrezeptor-positiv und MDA-MB-231-Zellen sind estrogenrezeptor-negativ.
9. EGCG hemmt *in vitro* die Zellviabilität von Brustkarzinomzellen.
10. Quercetin hemmt *in vitro* die Zellviabilität von Brustkarzinomzellen
11. Der LDH-Test der Firma Roche ist aufgrund der Wechselwirkungen des Reagenz mit dem Zellextrakt nicht geeignet die Zelltoxizität zu bestimmen.
12. EGCG wirkt unabhängig vom Estrogenrezeptorstatus der Brustkarzinomzellen
13. Tamoxifen wirkt auch bei estrogenrezeptor-negativen Brustkarzinomzellen
14. Ein Problem in der Therapie mit EGCG ist die niedrige Bioverfügbarkeit beim Menschen
15. Eine Antitumorale Wirkung der Grünteeextrakte und der untersuchten Reinstoffextrakte ist für weitere Studien *in vivo* von großem Interesse. Es wäre bei positiven Ergebnissen z.B. die Ergänzung der Tamoxifentherapie um das Epigallocatechingallat und damit in der Folge evtl. eine Reduzierung der nebenwirkungsreichen Tamoxifendosis denkbar.

7. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

1) Onkology Reports

Schröder L*, **Marahrens P***, Koch J G, Heidegger H, Vilsmeier T, Phan-Brehm, T, Hofmann, S, Mahner S, Jeschke U, Richter D U. (2018): Effects of green tea, matcha tea and their components epigallocatechin gallate and quercetin on MCF-7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *Oncology Reports* 2019; 41(1): 387-396, DOI: 10.3892/or.2018.6789

(*Contributed equally)

2) Geburtshilfe und Frauenheilkunde

Schröder L*, **Marahrens P***, Koch J G, Mahner S, Jeschke U, Richter D U. (2018): Die Wirkung von grünem Tee und Matchatee, sowie ihrer Bestandteile Epigallocatechingallat und Quercetin auf MCF-7- und MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen. *Geburtshilfe Frauenheilkunde* 2018; 78(10): 248, DOI: 10.1055/s-0038-1671513

3) Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie 2017

Marahrens P, Hafer L, Jung M, Briese V, Gerber B, Richter D U. (2017): Grüner Tee zur (Rezidiv-)Prophylaxe von Brustkrebs – eine in-vitro Untersuchung mit estrogenrezeptor-positiven (MCF-7) und estrogenrezeptor-negativen (MDA-MB-231) Brustkarzinomzellen. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 2017; 14(02): A1-A53, DOI: 10.1055/s-0037-1602510

Grüner Tee zur (Rezidiv-)Prophylaxe von Brustkrebs ?

P Marahrens, L Hafer, M Jung, V Briese, B Gerber, DU Richter

Eine *in vitro* Untersuchung mit estrogenrezeptor-positiven (MCF-7) und -negativen (MDA-MB-231) Brustkarzinomzellen

Einleitung

Brustkrebs ist weltweit die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen ¹. In Japan ist grüner Tee ein Nationalgetränk, und dort ist die Brustkrebsrate deutlich niedriger als in der westlichen Welt ². *In vitro* wird untersucht, ob grüner Tee und sein Catechin Epigallocatechingallat (EGCG) zur Therapie und (Rezidiv-)Prophylaxe von Brustkrebs genutzt werden könnte und dies vom Rezeptorstatus des Tumors abhängig ist.

Material / Methoden

Qualitative und semiquantitative Analyse von EGCG in selbst hergestellten Grüntee-Extrakten aus grünem Tee (GT) und Matchatee (jeweils gelöst in H₂O bzw. Ethanol) mittels High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC), dann Zellanzucht von estrogenrezeptor-positiven (MCF-7) und -negativen (MDA-MB-231) Brustkarzinomzellen (Nachweis des Rezeptorstatus mittels Immunhistochemie (IHC)); Zugabe der Tee-Extrakte bzw. des synthetischen EGCGs bzw. Tamoxifens und Zelltestmessungen mittels ATP-Lumineszenz (Mitochondrienaktivität), BrdU (Zellproliferation), Neutralrot-Test (Zellviabilität).

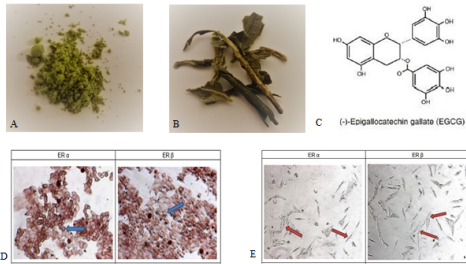


Abb.: (A) Matcha-Tee, (B) Grüner Tee, (C) Strukturformel EGCG, (D) IHC MCF-7: ER-α und -β = positiv, (E) IHC MDA-MB-231: ER-α und -β = negativ

Ergebnisse

In der HPLC konnte EGCG in den Tee-Extrakten nachgewiesen werden. In allen drei Zelltests zeigt sich eine Reduzierung der Viabilitätswerte bzw. Zellproliferation nach Behandlung mit den Tee-Extrakten bzw. dem äquivalenten EGCG. Besonders ausgeprägt war dies im ATP-Lumineszenztest zu beobachten, wo reproduzierbar eine vergleichbare Wirkung wie die des Tamoxifens (Zellviabilität < 2 %) erreicht werden konnte. In der Wirkung der hier getesteten Substanzen auf MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Wirkung zwischen den zwei Zellreihen.

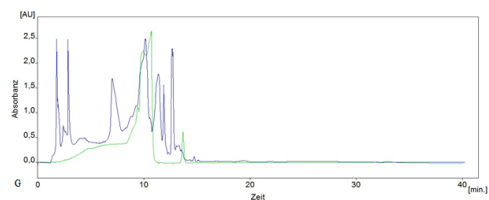
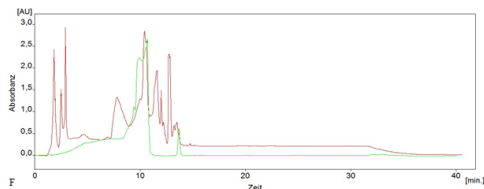


Abb.: (F) + (G): HPLC-Ergebnisse, rot = Matchatee, blau = Grüner Tee, grün = EGCG

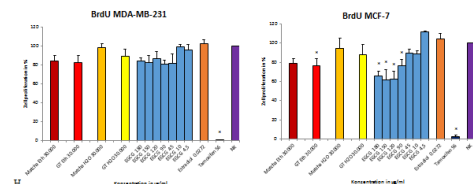
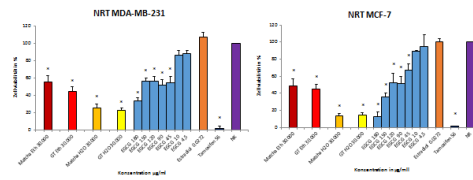
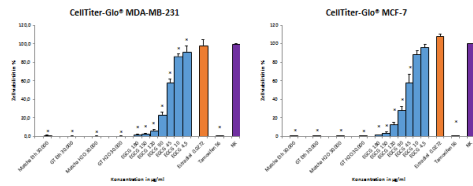


Abb.: (H) Ergebnisse der Zelltests für die Zellreihen MDA-MB-231 und MCF-7; CellTiter-Glo® = ATP-Lumineszenztest (48 h), NRT = Neutralrot-Test (24 h), BrdU = BrdU-Zellproliferationstest (24 h), als Negativkontrolle (NK) dient das jeweilige Lösungsmittel in Zellkultur. * = signifikanter Unterschied zur NK (p < 0,05)

Schlussfolgerung

Die *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass grüner Tee und Tamoxifen hemmend auf die Zellviabilität und Zellproliferation der zwei Zelllinien wirken. Dabei scheint EGCG einen großen Anteil der Wirkung des Grüntees auszumachen. Aufgrund der rezeptorstatusunabhängigen Ergebnisse wird vermutet, dass die getesteten Stoffe über mehrere, unterschiedliche Signalwege in den Zellzyklus eingreifen. Die Erkenntnisse können als Grundlage für weitere Untersuchungen zu Wirkmechanismen und Bioverfügbarkeit der Substanzen dienen.

Literatur

¹ Benzon J, Jatoi I (2012) The global breast cancer burden. *Future Oncol* 8(6): 697–702
² Sakis K, Sobue T (2009) Epidemiology of Breast Cancer in Japan and the US. *JMAJ* 53(1): 39–44



Effects of green tea and matcha tea as well as their components epigallocatechin gallate and quercetin on MCF-7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells.

Lennard Schröder^{1‡}, Philip Marahrens^{2‡}, Julian G. Koch¹, Helene Heidegger¹, Theresa Vilsmeier¹, Thuy Phan-Brehm¹, Simone Hofmann¹, Sven Mahner¹, Udo Jeschke¹, Dagmar-U. Richter²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, LMU Munich
²Department of Obstetrics and Gynecology, University of Rostock

Background:

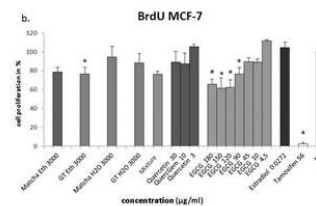
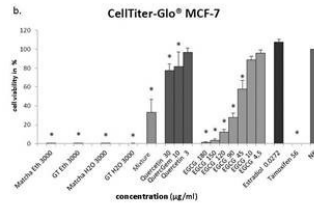
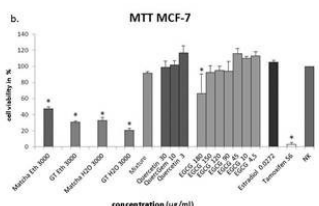
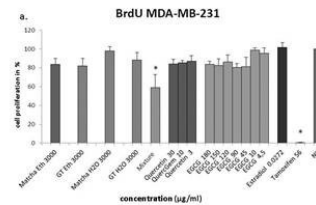
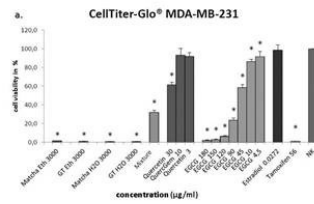
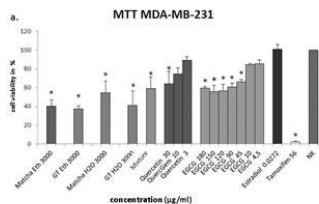
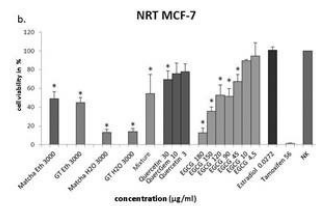
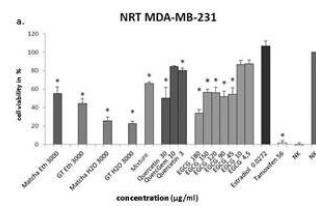
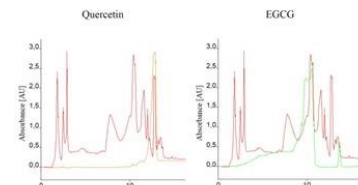
Herein we investigated the anticarcinogenic potential of green tea and its components epigallocatechin gallate (EGCG) and quercetin, as well as tamoxifen on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells.

Methods:

By means of high performance liquid chromatography the quantity of EGCG and quercetin in green tea was analyzed. The cells receptor status was confirmed immunohistochemically. Various viability and cytotoxicity tests were then performed to investigate the effect of the substances. After incubation of the cells with green tea extracts, EGCG, quercetin, and tamoxifen, a decrease in viability or in proliferation was found in all cell tests, with varying degrees of effect depending on the assay used.

Results:

Effects were similar on both cell lines. This work confirmed that EGCG and quercetin are contained in green tea and that both substances in pure form as well as green tea itself all have an anticarcinogenic effect on both estrogen receptor positive and negative breast cancer cells. This effect could also be demonstrated with tamoxifen in both cell lines.



Conclusion:

These results suggest that the effects observed are not only generated via estrogen receptor mediated pathways.

in collaboration with:

View original publication at [Oncology Reports](https://www.oncoline.net)



62. Kongresses der DGGG, 31.10.–03.11.2018, Berlin City Cube
 Dr. med. univ. Henrik Lennard Wilhelm Schröder • lennard.schroeder@med.uni-muenchen.de
 Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe • Klinikum der Universität München – Campus Innenstadt • Maistrasse 11 • D-80337 München • www.frauenklinik-maistrasse.de

Abbildung 43: Poster für 62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) 2018, Berlin

8. Literatur

1. A. Giuliano A , Hunt K K, Ballman K V, Beitsch P D, Whitworth P W, Blumencranz P W, Leitch A M, Saha S, McCall L M, Morrow M (2011): Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis. *JAMA* 305(6): 569–575.
2. ATCC Standards (2016): MCF7 (ATCC® HTB-22™). https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo_country=de#characteristics, 20.11.2016.
3. ATCC Standards (2016): MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx#characteristics>, 19.11.2016.
4. Baliga M S, Meleth S, Katiyar S K (2005): Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clin Cancer Res* 11(5): 1918–1927.
5. Beling A: Tee als Wirtschaftsfaktor, Jahresbericht_2015_250516:Layout 1: Deutscher Teeverband e.V., www.teeverband.de, 20.11.2016
6. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P (2008): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Aufl. Springer Medizin Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
7. Berek J S, Hacker N F (2015): *Berek and Hacker's Gynecologic Oncology*, 6. Aufl. Wolters Kluwer Health, Philadelphia.
8. Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A (2008): *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 5. Aufl. Thieme, Stuttgart.
9. Bronner W, Beecher G (1998): Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 805(1-2): 137–142.
10. Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H (2002): Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. *Planta Med* 68(5): 445–448.
11. Bruning A (2013): Inhibition of mTOR Signaling by Quercetin in Cancer Treatment and Prevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents* 13(7): 1025–1031.
12. Cabrera C, Artacho R, Giménez R (2006): Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition* 25(2): 79–99.
13. Cauley J A (1999): Elevated Serum Estradiol and Testosterone Concentrations Are Associated with a High Risk for Breast Cancer. *Ann Intern Med* 130(4_Part_1): 270.
14. Chen Z P, Schell J B, Ho C-T et al (1998): Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Letters* 129(2): 173–179.
15. Chisholm K, Bray B J, Rosengren R J (2004): Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* 15(9): 889–897.
16. Chou C-C, Yang J-S, Lu H-F et al (2010): Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res* 33(8): 1181–1191.

17. Clifford M N, van der Hooft J J J, Crozier A (2013): Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *Am J Clin Nutr* 98(6 Suppl): 1619S-1630S.
18. Coates A S, Winer E P, Goldhirsch A et al (2015): Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 26(8): 1533–1546.
19. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R & Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2011): Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death. *The Lancet* 378(9804): 1707–1716.
20. Davies C, Pan H, Godwin J et al (2013): Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer. *The Lancet* 381(9869): 805–816.
21. Deapen D, Liu L, Perkins C et al (2002): Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int J Cancer* 99(5): 747–750.
22. Deutscher Teeverband e.V. (2017): Alles über Tee. www.teeverband.de. Zugriff am 13.1.2017.
23. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Hrsg. *Onkopedia Leitlinien: Gynäkologische Tumoren*. Elsevier.
24. Downs-Holmes C S P: Breast cancer: overview and update. *The Nurse Practitioner* 36(12): 20–27.
25. Duo J, Ying G-G, Wang G-W et al (2012): Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep* 5(6): 1453–1456.
26. Duo J, Ying G-G, Wang G-W et al (2012): Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep* 5(6): 1453–1456.
27. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2011): Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen. *The Lancet* 378(9793): 771–784.
28. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2015): Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer. *The Lancet* 386(10001): 1341–1352.
29. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2005): Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival. *The Lancet* 366(9503): 2087–2106.
30. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2005): Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival. *The Lancet* 365(9472): 1687–1717.
31. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2005): Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival. *The Lancet* 366(9503): 2087–2106.
32. Effenberger K (2004): Der Einfluss von Phytoestrogenen auf Estrogenrezeptor gesteuerte Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellpopulationen – Untersuchung

- potentieller pflanzlicher Alternativen zur Hormonersatztherapie in der Menopause, Hamburg.
33. Ehrnhoefer D E, Bieschke J, Boeddrich A et al (2008): EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 15(6): 558–566.
 34. Fink D, Jonat W, Köchli O et al (2005): *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Springer Medizin Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
 35. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2012): *Pharmakologie & Toxikologie*. Springer Medizin Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
 36. Fujioka K, Iwamoto T, Shima H et al (2016): The Powdering Process with a Set of Ceramic Mills for Green Tea Promoted Catechin Extraction and the ROS Inhibition Effect. *Molecules* 21(4): 474.
 37. Furukawa A, Oikawa S, Murata M et al (2003): (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochemical Pharmacology* 66(9): 1769–1778.
 38. Gey M H (2015): *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, 3. Aufl. Springer Spektrum, Berlin.
 39. Gibellini L, Pinti M, Nasi M et al (2011): Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 591356.
 40. Goerke K, Valet A (2014): *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*, 7. Aufl. Urban Fischer Verlag - Lehrbücher, s.l..
 41. Goldhirsch A, Winer E P, Coates A S et al (2013): Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24(9): 2206–2223.
 42. Greenup R, Buchanan A, Lorzio W et al (2013): Prevalence of BRCA Mutations Among Women with Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) in a Genetic Counseling Cohort. *Annals of Surgical Oncology* 20(10): 3254–3258.
 43. Gu J-W, Makey K L, Tucker K B et al (2013): EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression. *Vasc Cell* 5(1): 9.
 44. Gukelberger-Felix G (2012): *Grüner Tee - Der Zauberstoff*. <http://www.spiegel.de/gesundheit/ernaehrung/gruener-tee-wie-der-wirkstoff-ecgc-die-gesundheit-foerdert-a-869518.html>, 9.2.2017.
 45. Haag P, Hanhart N (2016): *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*, 8. Aufl. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach.
 46. Hadji P, Ziller V, Kalder M, Torode J, Jakisch C (2007): Non-Compliance in der adjuvanten endokrinen Therapie des Mammakarzinoms. *Frauenarzt* 48(2).
 47. Hankinson S E, Willett W C, Manson J E et al (1998): Plasma Sex Steroid Hormone Levels and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 90(17): 1292–1299.
 48. Hellberg A (2012): *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*, Langversion 3.0, Aktualisierung 2012.
 49. H. Chow H S, Cai Y, Alberts D S, Hakim I, Dorr R, Shahi F, Crowell J A, Yang C S and Hara Y (2001): Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose

- administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 10(1): 53–58.
50. Horn F (2005): *Biochemie des Menschen*, 3. Aufl. Thieme, Stuttgart.
 51. Hunstein W (2007): Epigallocatechin-3-gallate in AL amyloidosis: a new therapeutic option? *Blood* 110(6): 2216.
 52. John - Benson R and Jatoi I: The global breast cancer burden. *Future Oncology*, June 2012 ,Vol. 8, No. 6, Pages 697-702.
 53. Kim J B, O'Hare M J, Stein R (2004): Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast cancer research* 6(1): 22–30.
 54. Kahlenborn C, Modugno F, Potter D M, Severs W B (2011): Oral Contraceptive Use as a Risk Factor for Premenopausal Breast Cancer: A Meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings* Volume 81, Issue 10, October 2006: 1290–1302.
 55. Kallio A, Zheng A, Dahllund J et al (2005): Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 10(6): 1395–1410.
 56. Karow T L-R R (2016): *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Eigenverlag.
 57. Kaufmann M, Jonat W, von Minckwitz G (2001): Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer Mammakarzinome. *Deutsches Ärzteblatt* 98(33): A2121-2123.
 58. Klappan A K, Hones S, Mylonas I et al (2012): Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol* 137(1): 25–36.
 59. Komori A, Yatsunami J, Okabe S, Abe S, Hara K, Suganuma M, Kim M J, Fujiki H (1993): Anticarcinogenic Activity of Green Tea Polyphenols. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 23(3): 186–190.
 60. Koo, S. I., Noh, S. K. (2007): Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *The Journal of nutritional biochemistry* 18(3): 179–183.
 61. Kreienberg R (2006): *Management des Mammakarzinoms*, 3. Aufl. Springer, Berlin.
 62. Kumar V A A: *Pathologic Basic of Disease*, 8. Aufl. Saunders Elsevier, Philadelphia
 63. Kumiko SAIKA T S (2009): Epidemiology of Breast Cancer in Japan and the US. *JMAJ* 52(1): 39–44.
 64. Kundt G, Krentz H (2008): *Epidemiologie und medizinische Biometrie*, 3. Aufl. Shaker, Aachen.
 65. Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, Nishino Y, Tsubono Y, Tsuji I (2006): Green Tea Consumption and Mortality Due to Cardiovascular Disease, Cancer, and All Causes in JapanThe Ohsaki Study. *JAMA* 296(10): 1255–1265.
 66. Landis-Piowar K, Di C., Chan T H et al (2010): Inhibition of catechol-O-methyltransferase activity in human breast cancer cells enhances the biological effect of the green tea polyphenol (-)-EGCG. *Oncology reports* 24(2): 563.
 67. Landis-Piowar K R, Huo C, Di Chen et al (2007): A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Research* 67(9): 4303–4310.
 68. Landis-Piowar K R, Wan S B, Wiegand R A et al (2007): Methylation suppresses the proteasome-inhibitory function of green tea polyphenols. *J Cell Physiol* 213(1): 252–260.

69. Lee Y-K, Hwang J-T, Kwon D Y et al (2010): Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK α 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Letters* 292(2): 228–236.
70. Lee D E, Chung M-Y, Lim T G et al (2013): Quercetin suppresses intracellular ROS formation, MMP activation, and cell motility in human fibrosarcoma cells. *J Food Sci* 78(9): H1464-9.
71. Leenen R, Roodenburg A J C, Tijburg L B M et al (2000): A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr* 54(1): 87–92.
72. Liu M-M, Albanese C, Anderson C M et al (2002): Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 277(27): 24353–24360.
73. Liu R H (2004): Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition* 134(12): 3479–3485.
74. Roy A M, Baliga M S, Katiyar S K (2005): Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and Caspase-3 activation. *Molecular Cancer Therapeutics* 1(4): 81–90.
75. Marchbanks P A., McDonald J A., Wilson H G., Folger S G., Mandel M G., Daling J R., Bernstein L, Malone K E, Ursin G, Strom B L, Norman S A, Wingo P A, Burkman R T, Berlin J A, Simon M S, Spirtas R, Weiss L K (2002): Oral Contraceptives and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 346(26): 2025–2032.
76. Mittal A, Pate M, Wylie R et al (2004): EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. *Int J Oncol*.
77. Miyazawa T (2000): Absorption, metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. *BioFactors* 13(1-4): 55–59.
78. Moon H-S, Chung C-S, Lee H-G et al (2007): Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. *Obesity (Silver Spring)* 15(11): 2571–2582.
79. Nakachi K, Suemasu K, Suga K et al (1998): Influence of Drinking Green Tea on Breast Cancer Malignancy among Japanese Patients. *Japanese Journal of Cancer Research* 89(3): 254–261.
80. Nance C L, Shearer W T (2003): Is green tea good for HIV-1 infection? *J Allergy Clin Immunol* 112(5): 851–853.
81. Nelson J, McFerran N V, Pivato G et al (2008): The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci Rep* 28(1): 33–48.
82. Ortmann O, Albert U S, Schulz K D (2008): 077-001_S3_Brustkrebs-Frueherkennung_lang_02-2008_02-2011: 49–56.
83. Partridge A H, Wang P S, Winer E P et al (2003): Nonadherence to adjuvant tamoxifen therapy in women with primary breast cancer. *J Clin Oncol* 21(4): 602–606.
84. Peng L, Wang B, Ren P (2005): Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 45(2): 108–111.
85. Perez-Vizcaino F, Duarte J (2010): Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med* 31(6): 478–494.

86. Promega (2015): TECHNICAL BULLETIN: CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf>, 31.1.2017.
87. Repetto G, del Peso A, Zurita J L (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3(7): 1125–1131.
88. Riss TL, Moravec RA, Niles AL (2013): Cell Viability Assays. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader#!po=6.81818>.
89. Robert-Koch-Institut (2017): Krebs in Deutschland 2013/2014. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf;jsessionid=9E1E53425AF4596FA157095F43E6ED6E.1_cid372?__blob=publicationFile, 21.2.2018
90. Roche (2004): Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/fdc412ae-96ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>, 31.1.2017.
91. Roche (2005): Protocol: Cell Proliferations Kit I (MTT). <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/319a443d-d6ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>, 31.1.2017.
92. Römer J (2013): Trend-Getränk Matcha - Schaumschläger aus Japan. <http://www.spiegel.de/gesundheit/ernaehrung/matcha-tee-der-schaumschlaeger-aus-japan-a-879543.html>, 9.2.2017.
93. Sakata M, Ikeda T, Imoto S et al (2011): Prevention of mammary carcinogenesis in C3H/OuJ mice by green tea and tamoxifen. *Asian Pac J Cancer Prev* 12(2): 567–571.
94. Sang S, Lee M-J, Hou Z et al (2005): Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J Agric Food Chem* 53(24): 9478–9484.
95. Scambia G, Mancuso S, Panici P B et al (1993): Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 54(3): 462–466.
96. Scandlyn M J, Stuart E C, Somers-Edgar T J et al (2008): A new role for tamoxifen in oestrogen receptor-negative breast cancer when it is combined with epigallocatechin gallate. *Br J Cancer* 99(7): 1056–1063.
97. Schonthal A H (2011): Adverse effects of concentrated green tea extracts. *Mol Nutr Food Res* 55(6): 874–885.
98. Schreier P M B (2012): Quercetin. <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-17-00181~>, 24.2.2017.
99. Schweikart J: Grüner Tee - Bancha Tee. <http://www.gruenertee.de/bancha/>. Zugriff am 27.6.2017.
100. Schweikart J Matcha: Zubereitung von Matcha-Tee. <http://www.gruenertee.de/zubereitung/matcha-tee/>. Zugriff am 27.6.2017.
101. Sedlmayer F, Sautter-Bihl M-L, Budach W et al (2013): DEGRO practical guidelines: radiotherapy of breast cancer I: radiotherapy following breast conserving therapy for invasive breast cancer. *Strahlenther Onkol* 189(10): 825–833.

102. Sen T, Moulik S, Dutta A et al (2009): Multifunctional effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in downregulation of gelatinase-A (MMP-2) in human breast cancer cell line MCF-7. *Life sciences* 84(7): 194–204.
103. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013): Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63(1): 11–30.
104. Sigma Product information: In vitro Toxicology Assay Kit Neutral Red Based. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox4bul.pdf>, 31.1.2017.
105. Smith I, Procter M, Gelber R D et al (2007): 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The Lancet* 369(9555): 29–36.
106. Solanki I, Parihar P, Mansuri M L et al (2015): Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Adv Nutr* 6(1): 64–72.
107. Stangl V, Lorenz M, Stangl K (2006): The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol Nutr Food Res* 50(2): 218–228.
108. Stephen HSU, Jill Lewis, Baldev Singh, Patricia Schoenlein, Tokio Osaki, Mohammad Athar, Alan G. Porter, Georg Schuster (2003): Green Tea Polyphenol Targets the Mitochondria in Tumor Cells Inducing Caspase 3-dependent Apoptoses. *Anticancer Research* (23): 1533–1540.
109. Stuart E C, Scandlyn M J, Rosengren R J (2006): Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer. *Life sciences* 79(25): 2329–2336.
110. Tachibana H, Koga K, Fujimura Y et al (2004): A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol* 11(4): 380–381.
111. Terao J (2009): Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum Nutr* 61: 87–94.
112. Thangapazham, R. L., Singh, A. K., Sharma, A., Warren, J., Gaddipati, J. P., & Maheshwari, R. K. (2007): Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 245(1): 232–245.
113. Tominaga S, Kuroishi T (1995): Epidemiology of breast cancer in Japan. *Breast Cancer* 2(1): 1–7.
114. Umeda D, Yano S, Yamada K et al (2008): Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem* 283(6): 3050–3058.
115. USDA-ARS-BHNRC-Nutrient data Lab (2007): USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80400525/Data/Flav/Flav02-1.pdf>.
116. van Aller G S, Carson J D, Tang W et al (2011): Epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, is a dual phosphoinositide-3-kinase/mTOR inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 406(2): 194–199.
117. Vanessa Crespy G W (2004): A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in Vivo Animal Models. *Journal of Nutrition* (0022-3166/04): 3431–3440.
118. Wang P, Henning S M, Heber D (2010): Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One* 5(4): e10202.

119. Wang P, Vadgama J V, Said J W et al (2014): Enhanced inhibition of prostate cancer xenograft tumor growth by combining quercetin and green tea. *The Journal of nutritional biochemistry* 25(1): 73–80.
120. Watzl B R G (2001): Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48(12): 498–502.
121. Weisburg J H, Weissman D B, Sedaghat T et al (2004): In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95(4): 191–200.
122. Weisburger J H (1997): Tea and health: a historical perspective. *Cancer Letters* (114): 315–317.
123. Weyerstrahl T S M (2013): *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*, 4. Aufl. Thieme.
124. Wolf A, Bray G A, Popkin B M (2008): A short history of beverages and how our body treats them. *Obes Rev* 9(2): 151–164.
125. Wolfram S, Wang Y, Thielecke F (2006): Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res* 50(2): 176–187.
126. Wolfram S, Raederstorff D, Wang Y, Teixeira S, R, Elste V, Weber P (2005): TEAVIGOTM (Epigallocatechin Gallate) Supplementation Prevents Obesity in Rodents by Reducing Adipose Tissue Mass. *Annals of Nutrition and Metabolism* 49(1): 54–63.
127. Wu A H, Yu M C, Tseng C-C et al (2003): Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *Int J Cancer* 106(4): 574–579.
128. Wu C H, Lu F H, Chang C S et al (2003): Relationship among habitual tea consumption, percent body fat, and body fat distribution. *Obes Res* 11(9): 1088–1095.
129. Wu, A. H., Tseng, C. C., Van Den Berg, D., & Mimi, C. Y. (2003): Tea intake, COMT genotype, and breast cancer in Asian-American women. *Cancer Research* 63(21): 7526–7529.
130. Yager J D, Davidson N E (2006): Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354(3): 270–282.
131. Yamamoto T, Hsu S, Lewis J et al (2003): Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 307(1): 230–236.
132. Yang C S, Lambert J D, Ju J et al (2007): Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicol Appl Pharmacol* 224(3): 265–273.
133. Yang, C. S., Hong, J., Hou, Z., Sang, S (2004): Green tea polyphenols: antioxidative and prooxidative effects. *The Journal of Nutrition* 134(11): 3181.
134. Yang, Chung S., Chen, Laishun, Lee M-J, Balentine, Douglas, Kuo, May Chen, Schantz, Stimson P. (1998): Blood and Urine Levels of Tea Catechins after Ingestion of Different Amounts of Green Tea by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (7): 351–354.
135. Yihai Cao R C (1999): Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 398: 381.
136. Zeng L, Holly J M P, Perks C M (2014): Effects of physiological levels of the green tea extract epigallocatechin-3-gallate on breast cancer cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 61.
137. Zhu Q Y, Zhang A, Tsang D et al (1997): Stability of Green Tea Catechins. *J. Agric. Food Chem.* 45(12): 4624–4628.