

Zell- und strahlenbiologische Effekte von pentazyklischen Triterpensulfamaten in humanen Mammakarzinomzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
von Elena Anne Pflüger

Betreuer: Professor Dr. med. Dirk Vordermark

Gutachter:
Prof. Dr. Alexander Eckert, Nürnberg
PD Dr. Bülent Polat, Würzburg

Datum der Verteidigung: 13.12.2024

Referat

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung sowie die häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen bei Frauen. Die Induktion der Hypoxie-induzierten Carboanhydrase IX (CA IX) ist in Mammakarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert. Dadurch ist sie ein interessantes *target* zur gezielten Behandlung von Tumorzellen in hypoxischen Arealen. Sulfamate hemmen Carboanhydrasen wie CA IX und können in Kombination mit Bestrahlung radiosensitivierend wirken. Naturstoffe wie pentazyklische Triterpene rücken aufgrund ihrer antitumorösen Eigenschaften mehr in das Interesse der Tumorthherapie. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von fünf neu entwickelten Triterpensulfamaten hinsichtlich ihrer zell- und strahlenbiologischen Effekte an vier Mammakarzinomzelllinien. Zytotoxizitätsanalysen mittels Sulforhodamin-B-Assay bzw. Zellkoloniebildungstests ergaben eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zytotoxizität der Triterpensulfamate und eine gesteigerte Zytotoxizität unter Hypoxie in den Mammakarzinomzelllinien. Dabei wies das Maslinsulfamat MSBA-S die höchste Zytotoxizität auf. Alle fünf Triterpensulfamate verursachten eine konzentrationsabhängige Reduktion des klonogenen Zellüberlebens, wobei MSBA-S ebenfalls die stärksten Effekte hervorrief. Mittels Zellkernanalyse (DAPI-Assay) wurde für alle Substanzen eine apoptoseinduzierende Wirkung nachgewiesen. Auch hier verursachte MSBA-S die höchste Apoptoserate. Während die Triterpensulfamate PSBA-S, USBA-S und BSBA-S in Wundheilungs-Assays migrationshemmend wirkten, wurden MSBA-S und BSBA-S in Kombination mit Bestrahlung als *radiosensitizer* identifiziert. Insgesamt stellt der Einsatz von Triterpensulfamaten einen vielversprechenden Ansatz für die Mammakarzinomtherapie dar. Insbesondere das Maslinsulfamat MSBA-S erscheint aufgrund der hohen Zytotoxizität und Effekte auf die Strahlensensitivität besonders geeignet. Die Anwendbarkeit von Triterpensulfamaten als Tumorthapeutika muss jedoch noch *in vivo* überprüft werden.

Pflüger, Elena: Zell- und strahlenbiologische Effekte von pentazyklischen Triterpensulfamaten in humanen Mammakarzinomzellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 49 Seiten, 2024

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	Einleitung	1
1.1	Mammakarzinom	1
1.2	Bestrahlung, Tumorhypoxie und Carboanhydrase IX	2
1.3	Pentazyklische Triterpene	4
1.4	Pentazyklische Triterpensulfamate	5
2	Zielstellung	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Material	8
3.1.1	Zelllinien	8
3.1.2	Geräte	9
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	10
3.1.4	Chemikalien und Lösungen	11
3.1.5	Software	11
3.1.6	BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S	12
3.2	Methoden	13
3.2.1	Zellkultivierung	13
3.2.2	SRB-Assay	14
3.2.3	Zellkoloniebildungstest	15
3.2.4	DAPI-Assay	15
3.2.5	Wundheilungs-Assay	16
3.2.6	Radiosensitivität	16

4 Ergebnisse	18
4.1 Zytotoxizität der pentazyklischen Triterpensulfamate	18
4.2 Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate auf das klonogene Zellüberleben	19
4.3 Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate auf die Apoptoserate	23
4.4 Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate auf die Zellmigration	25
4.5 Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate auf die Radiosensitivität	26
5 Diskussion	28
5.1 Material und Methoden	28
5.2 Effekte auf Zytotoxizität und klonogenes Zellüberleben	28
5.3 Einfluss auf die Apoptoserate	35
5.4 Einfluss auf die Zellmigration	37
5.5 Effekte auf die Radiosensitivität	38
5.6 Zusammenfassung	40
6 Literaturverzeichnis	42
7 Thesen	49
Eidesstattliche Erklärung	
Danksagung	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
BRCA-1	<i>breast cancer 1</i> (Brustkrebsgen 1)
BRCA-2	<i>breast cancer 2</i> (Brustkrebsgen 2)
BS	Betulinsäure
BSBA-S	Benzyl 3 β -aminosulfonyloxy-lup-20(29)-en-28-amid
CA	<i>carbonic anhydrase</i>
CA IX	<i>carbonic anhydrase IX</i> (Carboanhydrase IX)
CAI	<i>carbonic anhydrase inhibitors</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMF 10	Dosis modifizierender Faktor 10
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Östrogenrezeptor
FKS	fetales Kälberserum
Gy	Gray
h	<i>hour</i> (Stunde)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER 2	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha
M	Molar
mg	Milligramm
mM	Millimolar
min	Minute
ml	Milliliter
MS	Maslinsäure
MSBA-S	Benzyl 2 α ,3 β -bis(aminosulfonyloxy)-olean-12-en-28-amid
MV	Megavolt
μ	Mikro
Nr.	Nummer
OER	<i>oxygen enhancement ratio</i> (Sauerstoffverstärkungsfaktor)

OS	Oleanolsäure
OSBA-S	Benzyl 3 β -aminosulfonyloxy-olean-12-en-28-amid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PS	Platansäure
PSBA-S	Benzyl 3 β -aminosulfonyloxy-20-oxo-30-norlupan-28-amid
PR	Progesteronrezeptor
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
SRB	Sulforhodamin B
Tab.	Tabelle
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i> (<i>Triple negative</i> Brustkrebs)
US	Ursolsäure
USBA-S	Benzyl 3 β -aminosulfonyloxy-urs-12-en-28-amid
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor)
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsbehörde)

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

Laut aktueller WHO-Klassifizierung der Tumoren der Mamma gibt es aktuell 43 verschiedene histologische Subtypen in der Gruppe der invasiven Karzinome (1). Anhand von immunhistochemischen Markern wird das Vorkommen von Östrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR) und dem humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER 2), als auch der Proliferationsindex Ki67 bestimmt. Durch die Bestimmung des Hormon- und Rezeptorstatus können die Karzinome in die fünf Subtypen Luminal A, Luminal B, Luminal + HER2-positiv, HER2-positiv und *triple*-negativ unterschieden werden (2). 72 % der Luminal A-Tumoren haben durch ihre gute Differenzierung und den niedrigen Proliferationsindex Ki67 eine sehr gute Prognose, wohingegen HER2-positive Tumoren die schlechteste Prognose haben (3,4).

Auch *triple*-negative Mammakarzinome weisen eine schlechte Prognose auf. Sie exprimieren weder Östrogen (ER)- oder Progesteron (PR) - Rezeptoren noch Rezeptoren für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor 2 (HER2). Deshalb reagieren sie nicht auf endokrine Therapien und auch die aktuell angewandte konventionelle adjuvante Chemoradiotherapie ist wenig effektiv, wodurch das Auftreten von Rezidiven aus Mikrometastasen begünstigt wird (5).

Etwa jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (6). Brustkrebs hat sowohl hormonelle, genetische als auch Lebensstil-assoziierte Ursachen. Risikofaktoren sind ein hohes Alter, Adipositas, Nikotin- und Alkoholkonsum, eine Bestrahlung der Brust und eine hohe Brustdichte (7,8). Regelmäßige körperliche Aktivität hingegen senkt das Risiko einer Brustkrebserkrankung (9). Hormonell erhöht eine längere Östrogenexposition durch frühe Menarche, späte Menopause und Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen das Brustkrebsrisiko (10). Durch Reduktion der Östrogenexposition senkt jede Schwangerschaft das Brustkrebsrisiko um 5-10 % (7).

Weniger als 10% der Mammakarzinome sind genetisch bedingt und werden durch Mutationen verursacht. Am häufigsten sind die Gene *BRCA-1* und *BRCA-2* betroffen, welche für Tumorsuppressorgene codieren (11). Die hierdurch entstehenden Mammakarzinome sind häufiger *triple*-negativ (12).

Die Diagnose Brustkrebs wird in den meisten Fällen entweder im Rahmen einer *Screening*-Untersuchung oder durch das Auftreten von Symptomen gestellt. Die Durchführung von *Screening*-Untersuchungen in Form einer Mammographie an gesunden Frauen zwischen den 50. und 69. Lebensjahr ist mit der Diagnose von kleineren Tumoren, mit geringerer Metastasierungswahrscheinlichkeit, weniger Bedarf an radikalen Axillarresektionen und seltenerem Einsatz von Chemotherapeutika assoziiert (13,14).

Wurde aufgrund der *Screening*-Untersuchung der Verdacht auf ein Mammakarzinom geäußert, folgt die Gewinnung einer Probe durch Feinnadel-Aspiration, Stanzbiopsie oder chirurgische Exzision zur Bestimmung von Biomarkern und Einteilung in molekulare Subtypen. (15).

Die Therapieoptionen für Brustkrebs werden inzwischen individuell an den jeweiligen Karzinomtyp angepasst. Den Hauptbestandteil der Therapie bildet die chirurgische Resektion. Im Anschluss an eine brusterhaltende Therapie erfolgt immer eine Bestrahlung des Tumorbettes, welche das Rezidivrisiko halbiert und die Brustkrebs-assoziierte Mortalität um ein Sechstel reduziert (16).

Unterstützend erfolgt eine Systemtherapie in Form von Chemotherapie, endokriner Therapie oder Antikörpertherapie, wodurch das Rezidivrisiko und die brustkrebsspezifische Mortalität reduziert werden (17).

1.2 Bestrahlung, Tumorhypoxie und Carboanhydrase IX

Im Rahmen der Strahlentherapie wird hauptsächlich Photonenstrahlung verwendet, welche durch Hydrolyse von Wasser und Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden hervorruft. Die Wahrscheinlichkeit eines molekularen Schadens durch die Entstehung freier Radikale steigt mit der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, welcher die Stabilisierung biochemischer Schäden begünstigt (18).

Die meisten DNA-Schäden können durch eine Reihe komplexer Reparaturmechanismen behoben werden. Dennoch können nicht reparierte oder falsch rekombinierte Doppelstrangbrüche zur Einleitung von Zelltod wie Apoptose oder Nekrose führen.

Die Strahlempfindlichkeit von Zellen wird unter anderem durch die Reoxygenierung bestimmt, welche eng mit dem Sauerstoffeffekt

zusammenhängt. Dieser besagt, dass bei Bestrahlung unter hypoxischen Bedingungen 2- bis 3 mal mehr Zellen überleben als unter Normoxie (19). Der indirekte Strahleneffekt ist abhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff, da Sauerstoff die durch Hydroxyradikale gebildeten DNA-Schäden fixiert. Im Falle der Röntgenstrahlung überwiegt die indirekte Strahlung, sodass der Sauerstoffverstärkungsfaktor (OER = *oxygen enhancement ratio*) bei 2-3 liegt (19). Demnach sind Tumorzellen in hypoxischen Arealen resistenter gegenüber Röntgenstrahlung als Tumorzellen in normoxischen Arealen (20).

Studien zeigen, dass Tumorhypoxie in invasivem Wachstum und Metastasierung resultiert und aufgrund des verringerten Ansprechens auf Bestrahlung und Chemotherapie ein schlechteres klinisches *Outcome* zur Folge hat (21,22). Unter Hypoxie wird der Hypoxie-induzierte Faktor 1 α (HIF-1 α) als Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 in den Tumorzellen stabilisiert. HIF-1 α ist mit einer schlechten Prognose und Therapieresistenz assoziiert und findet sich in vielen Tumorentitäten hochreguliert (23). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 initiiert die Transkription Hypoxie-assoziiierter Zielgene und regt somit die Angiogenese (VEGF) und die Erythropoese (EPO1) an. Zusätzlich werden Gene der Zellproliferation, Apoptose, Zellmigration und Invasion induziert (24). Ein essenzielles HIF-1 reguliertes Enzym unter Hypoxie ist die Carboanhydrase IX (CA IX).

Carboanhydrasen (CA) sind Zink-Metalloenzyme, die die Hydratisierung von CO₂ zu Bikarbonat und einem Proton katalysieren. Die durch CA IX katalysierte Hydrolyse gewährleistet die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Werts und bewirkt gleichzeitig eine extrazelluläre Azidifizierung. Das saure extrazelluläre Milieu unterstützt proliferative und prometastatische Prozesse, steigert die Tumoradhäsion und vermindert das Ansprechen der Zellen auf Chemo- und Radiotherapie (25,26). Im Menschen gibt es 14 unterschiedliche Isoenzyme der CA (27). Tumorzellen exprimieren vor allem die membran-assoziierten Isoformen CA IX und CA XII sowie intrazelluläre CA, wie CA I und CA II (28–31). Das durch HIF-1 α in vielen Mammakarzinomen überexprimierte Auftreten von CA IX ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (59, 62).

CA IX ist durch ihr fast ausschließlich auf Tumorzellen beschränktes Vorkommen ein attraktives *target* zur selektiven Behandlung von Tumoren. Die

Effektivität von CA IX-Inhibitoren wurde schon in vielen präklinischen Studien an unterschiedlichen Tumormodellen und am Maus-Modell demonstriert. Sie zeigen einen hemmenden Einfluss auf das Zellüberleben sowie die Migration und Invasion (33). Zudem sind CA IX- Inhibitoren in der Lage, die Radiosensitivität verschiedener Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* zu erhöhen (25,34,35).

1.3 Pentazyklische Triterpene

Die Betulinsäure (BS) ist ein pentazyklisches Triterpen mit Lupan-Grundgerüst. Sein Reduktionsprodukt Betulin befindet sich in hohen Konzentrationen in der Rinde von Birkengewächsen. BS zeigt *in vitro* zytotoxische Effekte auf diverse Tumorentitäten, wie das Lungenkarzinom, kolorektale Karzinome als auch das Mammakarzinom (36). Gleichzeitig ist die Zytotoxizität für normale Zellen wie Fibroblasten oder Lymphozyten gering (37). BS wirkt antiproliferativ, zytotoxisch und Apoptose-induzierend in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien (36,38).

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten eine Zunahme der Zytotoxizität und radiosensitivierenden Wirkung von BS unter Hypoxie aufzeigen (39). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BS die Proliferation und Migration in Glioblastom-, Pankreas- und Melanomzelllinien inhibiert, als auch die Bildung des Topoisomerase-I-DNA-Komplexes hemmt (39–41)

Die Oleanolsäure (OS) ist ein pentazyklisches Triterpen, welches sich in Oliven, aber auch in vielen anderen Pflanzenarten wie der Ringelblume oder dem Schwarzdorn findet. OS wurden entzündungshemmende und antitumoröse Eigenschaften nachgewiesen (42). Außerdem konnte *in vitro* durch Kombination von Bestrahlung und Behandlung mit OS eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens an Gliomzellen aus Ratten und menschlichen Lungenkarzinomzellen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung erreicht werden (43). Auch verschiedene Derivate der OS zeigten antitumoröse Eigenschaften. So wirkt Oleanolsäure-Methylester über die Induktion von Apoptose und die Produktion von ROS zytotoxisch auf Kopf-Hals-Tumoren(44) und für das OS-Derivat SZC015 konnte eine Induktion von Apoptose und Autophagie an humanen Brustkrebszellen nachgewiesen werden (44,45).

Auch die Ursolsäure (US) findet sich weit verbreitet in verschiedenen Pflanzenarten, darunter in Kräutern wie Rosmarin und Thymian. US wirkt unter

anderem entzündungshemmend, antimikrobiell, antidiabetisch und antitumorös (46–49). Ihr pharmakologischer Effekt wird jedoch durch ihre limitierte Löslichkeit in Wasser und eine beschränkte orale Bioverfügbarkeit eingeschränkt, weshalb Derivate der US vermehrt in den Fokus der Forschung rücken (50). *In vitro*-Studien weisen bei US und US-Derivaten auf eine hohe Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen bei gleichzeitig geringer Toxizität für Normalgewebe hin (51).

Über die biologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Platansäure (PA) ist im Vergleich zu anderen Triterpenen bisher noch wenig bekannt. Sie hat ein Norlupan-Grundgerüst und findet sich vor allem in Bäumen aus der Familie der Platanengewächse. Für sie und ihre Derivate konnte eine Inhibition der HIV-Replikation in H9-Lymphozyten nachgewiesen werden (52). 2017 wurde entdeckt, dass PS-Derivate das Enzym Butyrylcholinesterase hemmen, von dem angenommen wird, dass es zum Fortschreiten von Alzheimererkrankungen beiträgt (53). Außerdem konnten für PS und ihre Derivate unter anderem auch zytotoxische Effekte an humanen Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden (54).

Maslinsäure (MS) ist in niedriger Konzentration in vielen Heilpflanzen enthalten. Die höchste Konzentration finden sich jedoch in Oliven (*Olea europaea* L.). MS wirkt selektiv zytotoxisch auf Tumorzellen, proapoptotisch, antiproliferativ, antiinflammatorisch und hemmt die Angiogenese in verschiedenen Tumorentitäten (55–58). Ihre Derivate zeigen ebenfalls antiretrovirale Eigenschaften am HIV (59). Derivate mit Modifikationen an C2 und C3 erreichten eine höhere Zytotoxizität und bessere Selektivität zwischen malignen und nicht-malignen Zellen (60).

1.4 Pentazyklische Triterpensulfamate

Es zeigte sich, dass durch die Modifikation des pentazyklischen triterpenoiden Grundgerüsts an C3 und C28 nicht nur die Löslichkeit der Naturstoffe gesteigert, sondern auch ihre Zytotoxizität erhöht werden konnte. Beispielsweise führt die Veresterung von pentazyklischen Triterpenen an C3 zu einer besseren Bioverfügbarkeit und die Amidierung an C28 erhöht die Wasserlöslichkeit und trägt zu einer stärkeren Zytotoxizität bei (61). Für einige pentazyklische Triterpensulfamate konnte eine Inhibition von Tumor-assoziierten Carbo-

anhydrasen (CA) wie hCA IX, hCAXII und hCAII nachgewiesen werden (62–66). Sulfonamide bzw. Sulfamate sind aufgrund ihrer Struktur in der Lage, das Zink-Ion im katalytisch aktiven Zentrum der Carboanhydrasen zu binden und somit deren Funktion zu hemmen (67). Untersuchungen der eigenen AG konnten nach Behandlung mit dem Carboanhydraseinhibitor (CAI) U-104 Effekte auf Zellmigration, klonogenes Zellüberleben sowie Radiosensitivierung in Mammakarzinomzellen nachweisen (68). Forschungsgruppeninterne Arbeiten an Mammakarzinomzellen ergaben zudem, dass Betulinylsulfamate und Betulinsulfonamide Apoptose induzieren, die Migration und die Hypoxie-induzierte Genexpression hemmen und in Kombination mit Bestrahlung radiosensitivierend wirken (65,66,69).

Da AG-interne Arbeiten mit dem Naturstoff Betulinsäure und weiteren Triterpenderivaten diverse antitumoröse Eigenschaften und besonders eine hohe Effektivität unter Hypoxie nachweisen konnten, stellt die Kombination aus CA-Inhibitoren wie Sulfonamiden oder Sulfamaten mit pentazyklischen Triterpenen einen interessanten Ansatz zum gezielten Angriff auf hypoxische Tumorzellen dar. Um zu untersuchen welcher Bedeutung die Triterpenkomponente bei Triterpensulfamaten zukommt, entwickelte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. René Csuk (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Organische Chemie) strukturähnliche pentazyklische Triterpensulfamate von BS, OS, US, PS und MS.

2 Zielstellung

Die Zielstellung dieser Studie ist es, die fünf strukturähnlichen Triterpensulfamate PSBA-S, BSBA-S, OSBA-S, USBA-S sowie MSBA-S hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und ihrer Effekte auf das klonogene Zellüberleben, die Radiosensitivität, die Apoptoserate, sowie auf die Migration von humanen Mammakarzinomzellen zu untersuchen. Zur Synthese dieser Substanzen wurden verschiedene pentazyklische Triterpene mit bekannten antitumorösen Eigenschaften mit einer bzw. zwei Sulfamatgruppen gekoppelt. Diese Triterpensulfamate wurden an drei *triple*-negativen (Hs578T, MDA-MB-231 und BT-20) und einer Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinie (MCF-7) untersucht.

Die folgenden Fragen wurden in dieser Arbeit bearbeitet:

1. Welche Zytotoxizität weisen die pentazyklischen Triterpene durch Kopplung mit dem CAI auf die Zelllinien auf?
2. Wie beeinflussen die Triterpensulfamate das klonogene Zellüberleben unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen?
3. Verursachen die Triterpensulfamate eine Apoptoseinduktion?
4. Beeinflussen die Triterpensulfamate die Migration der Mammakarzinomzellen?
5. Haben die Triterpensulfamate einen Einfluss auf die Radiosensitivität von hypoxischen Mammakarzinomzellen?

Ziel ist es, die Bedeutung von strukturähnlichen Triterpensulfamat-Konjugaten für die Tumorthherapie von Mammakarzinomen *in vitro* zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Die vier in dieser Arbeit verwendeten Mammakarzinomzelllinien wurden von Prof. Dr. Jürgen Dittmer, Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle, zur Verfügung gestellt.

Tab. 1 Verwendete Mammakarzinomzelllinien (70–73).

Bezeichnung	Ursprung	ATCC®- Nr.	Referenz
Hs578T	<i>triple</i> -negatives humanes Mammakarzinom	HTB-126™	Hackett <i>et al.</i> , 1977
MDA-MB-231	<i>triple</i> -negatives humanes Mammakarzinom	HTB-26™	Cailleau <i>et al.</i> , 1974
BT-20	<i>triple</i> -negatives humanes Mammakarzinom	HTB-19™	Lasfargues <i>et al.</i> , 1958
MCF-7	ER-Rezeptor-positives humanes Mammakarzinom	HTB-22™	Soule <i>et al.</i> , 1973

3.1.2 Geräte

Die Kultivierung der Zelllinien sowie die Durchführung der Versuche erfolgten in den Zellkulturlaboren der Arbeitsgruppe „Molekulare Strahlenbiologie“ der Universitäts- und Poliklinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Tab. 2 Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Gefrierschrank FROSTER LABEX 96	Kirsch medical, Willstätt-Sand
Pipettierhilfe pipetus®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HeraSafe HS 18 Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments, Hanau
Vortex-Genie 2®	Scientific Industries, Cambridge, UK
Zentrifuge Rotofix 32 A	Andreas Hettich GmbH + Co. KG, Tuttlingen
CASY-Zellzähler	Omni life science, Bremen
Heratherm® General Protocol Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
TECAN GENios FL TWT	Tecan Trading Ag, Männedorf
Fluoreszenzmikroskop BZ-8000	Keyence, Osaka, Japan
Linearbeschleuniger Oncor Impression IMPRT	Siemens, Berlin

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
BD Gas Pak EZ Anarobier Pouch System	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Cytospin-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Deckgläschen	VWR International GmbH, Darmstadt
Handschuhe Micro-Touch	Ansell, Iselin, USA
Pipetten Tips	Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Tubes	Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
Silikon <i>inserts</i>	ibidi GmbH, Gräfelfing
0,2 µm Sterilfilter	VWR International GmbH, Darmstadt
75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
25 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
6-Well Platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
12-Well Platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
96-Well Platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

3.1.4 Chemikalien und Lösungen

Tab. 4 Verwendete Chemikalien und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller
DAPI	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
FKS	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Formalin	Chemsolute, TH Geyer, Renningen
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mitomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pyruvat	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
ProLong® Gold Antifade Reagenz	Life technologies GmbH, Darmstadt
RPMI 1640 Kulturmedium	Lonza, Walkersville, USA
SRB-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trizma® Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

3.1.5 Software

Zur Berechnung der Substanzkonzentration, durch welche eine halb-maximale Inhibition des Zellwachstums (IC_{50}) hervorgerufen wird als auch zur Berechnung des Dosis-modifizierenden Faktors 10 (DMF 10) wurde die Software OriginPro, OriginLab, Massachusetts, USA verwendet.

3.1.6 BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S

Gegenstand der Versuche waren die Substanzen Benzyl 3 β -aminosulfonyloxy-lup-20(29)-en-28-amid (BSBA-S), Benzyl 3 β -aminosulfonyloxy-olean-12-en-28-amid (OSBA-S), Benzyl 3 β -aminosulfonyloxy-urs-12-en-28-amid (USBA-S), Benzyl 3 β -aminosulfonyloxy-20-oxo-30-norlupan-28-amid (PSBA-S) und Benzyl 2 α ,3 β -bis(aminosulfonyloxy)-olean-12-en-28-amid (MSBA-S) (Abb.1). Da für das Vorhandensein einer Benzylamid-Einheit an C28 eine höhere Zytotoxizität und bessere Tumorselektivität im Vergleich zu einer Ester-Einheit beschrieben wurde, wurden Benzylamide als Stammverbindungen für die Synthese dieser neuer Triterpen-Derivate gewählt (74). Zusätzlich soll durch eine Modifikation an C2 bzw. C3, wie zuvor an anderen Triterpensulfamaten gezeigt, eine Inhibition Tumor-assoziiertes Carboanhydrasen erreicht werden (64). Als Ausgangsstrukturen wurden die Triterpene BS, OS, US, PS und MS verwendet.

Die Substanzen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. René Csuk (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Organische Chemie) als kristallines Pulver synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden die Substanzen abgewogen, mit DMSO in Lösung gebracht und durch einen 0,2 μ m Sterilfilter filtriert. Die 20 μ M Stammlösungen wurden bei 4°C gelagert.

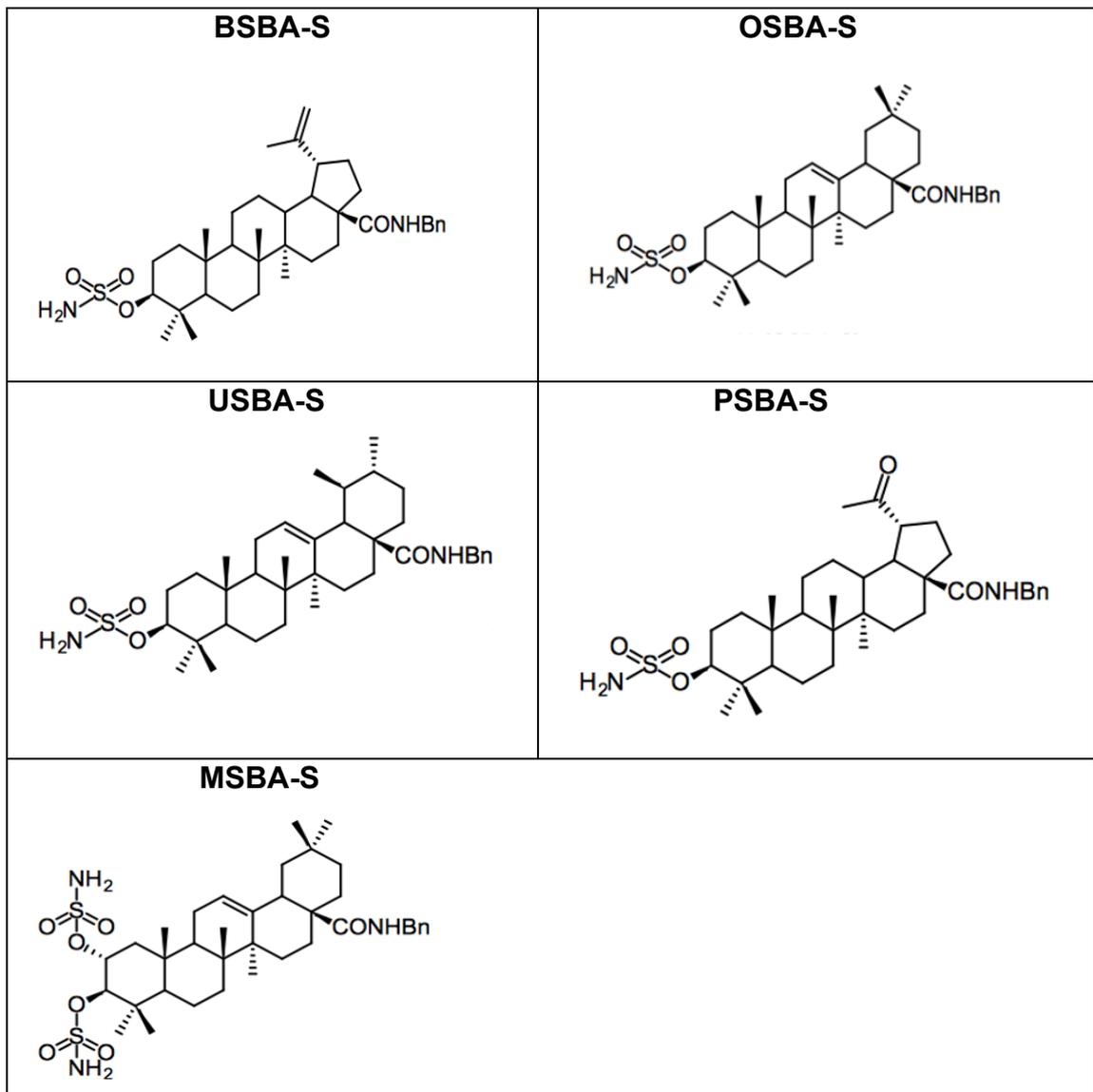


Abb.1) Strukturformeln der verwendeten Triterpensulfamate. Benzyl 3β-aminosulfonyloxy-lup-20(29)-en-28-amide (BSBA-S), Benzyl 3β-aminosulfonyloxy-olean-12-en-28-amide (OSBA-S), Benzyl 3β-aminosulfonyloxy-urs-12-en-28-amide (USBA-S), Benzyl 3β-aminosulfonyloxy-20-oxo-30-norlupan-28-amide (PSBA-S), Benzyl 2α,3β-bis(aminosulfonyloxy)-olean-12-en-28-amide (MSBA-S).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter Standardbedingungen unter 37°C, 5 % CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit im RPMI 1640 Kulturmedium, welches durch den Hersteller bereits mit L-Glutamin und 25 mM HEPES angereichert ist. Es erfolgte die Zugabe von 10% FKS, 1% Pyruvat, und 2%

Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde im Rahmen des Passagierens in Abhängigkeit der Zelldichte je nach Zelllinie alle 2-5 Tage durchgeführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst. Das Abstoppen dieser Reaktion erfolgte nach 5 min durch Zugabe von FKS-haltigem Kulturmedium.

Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Cellstar® Tube pipettiert und für 5 min mit 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das verbleibende Zellpellet anschließend in 3 ml Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des CASY-Zellzählers. Eine definierte Anzahl an Zellen wurde in eine neue sterile Zellkulturflasche eingestreut.

Durch die Verwendung des BD GasPak EZ Anaerobier Pouch Systems konnte in den Versuchen, welche unter Hypoxie durchgeführt wurden, ein hypoxisches Milieu (0,1% O₂) erzeugt werden. Anschließend erfolgte bei allen Versuchen, normoxisch oder hypoxisch, die Kultivierung bei 37°C, 5 % CO₂ und bei maximaler Luftfeuchte für 24 h.

3.2.2 SRB-Assay

Für die Bestimmung der Zytotoxizität der Substanzen wurde der Sulforhodamin B (SRB)-Assay verwendet. Die Zellen wurden in 96-Well Platten eingestreut und 24 h inkubiert. Anschließend wurden sie mit Konzentrationen von 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 40 µM, 50 µM und 100 µM der Substanzen BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 96 h unter Standardbedingungen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit eiskalter 10 %iger Trichloressigsäure fixiert. Die Inkubation fand unter Normoxie statt, um einen ersten Überblick über die Zytotoxizität der Substanzen zu gewinnen. Anschließend wurden sie mit Eiswasser gewaschen und mit 0,4%iger SRB-Lösung eingefärbt. Vor dem Trocknen wurden die Zellen erneut mit 1%iger Essigsäure gewaschen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 540 nm durch den TECAN GENios FL TWT. Hierfür wurden die fixierten Zellen in 300 µl 20 mM Trizma® Base gelöst. Aus mindestens drei Versuchsansätzen wurde somit für jede Substanz und für jede Zelllinie die Konzentration mittels Origin ermittelt, bei der eine halb-maximale Inhibition des Zellwachstums (IC₅₀) durch die jeweilige Substanz hervorgerufen wird.

3.2.3 Zellkoloniebildungstest

24 h nach dem Einstreuen in 6-well Platten wurden die Zellen für weitere 24h mit den Substanzen (40 µM BSBA-S, OSBA-S, USBA-S oder PSBA-S und 10 µM MSBA-S) inkubiert. Anschließend wurden sie trypsiniert, gezählt und jeweils 300 bis 600 Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen eingestreut. Nach 12-14 Tagen, in Abhängigkeit von der Proliferationsrate der jeweiligen Zelllinie, wurden die in der Zwischenzeit gebildeten Zellkolonien mit Formalin fixiert und mit Giemsa-Lösung eingefärbt. Die 12-14-tägige Inkubation wurde sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie durchgeführt, um in diesem zweiten Schritt eine potenzielle Verstärkung der Zytotoxizität unter Hypoxie aufzuzeigen. Es wurden nur Kolonien von 50 Zellen oder mehr in die Zählung aufgenommen. Jeder Zellkoloniebildungstest erfolgte als Doppelbestimmung. Anschließend wurde zunächst die absolute Plattiereffizienz ermittelt, indem der Quotient aus den eingestreuten Zellen und den entstandenen Zellkolonien gebildet wurde. Nun wurde die die Anzahl der Zellkolonien nach Behandlung mit der jeweiligen Substanz mit der Kontrolle, welche mit DMSO behandelt wurde, ins Verhältnis gesetzt und somit die relative Plattiereffizienz bestimmt.

3.2.4 DAPI-Assay

Die Zellen wurden in 12-Well Platten eingestreut und nach 24 h mit den Substanzen für weitere 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Der DAPI-Assay wurde unter Normoxie durchgeführt. Bei den Versuchen unter hypoxischen Bedingungen zeigten sich Veränderungen an den Zellkernen, die das Auszählen der apoptotischen Zellkerne erschwerte, wodurch diese Versuche nicht ausgewertet werden konnten. Die Zellen wurden trypsiniert, bei 800 rpm für 4 min zentrifugiert und der Überstand des Mediums entfernt. Danach wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellen wurden mit 70%igem Ethanol fixiert. Ca. 250 µl der fixierten Zellen wurden in einem Cytospin-Kammer-Röhrchen mehrfach mit 1.500 rpm auf einem Deckgläschen zentrifugiert und somit darauf fixiert. Die fixierten Zellen wurden nun für 5 min mit dem membrangängigen Farbstoff 4,6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) inkubiert und danach 3 Mal mit PBS gewaschen. Das Deckgläschen wurde mit ProLong® Gold Antifade Reagenz eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop

BZ-8000 mikroskopiert. Der Anteil der apoptotischen Zellkerne an der Gesamtheit der Zellkerne wurde exemplarisch an 100 Zellkernen visuell gezählt.

3.2.5 Wundheilungs-Assay

Die Zellen wurden in 12-Well Platten innerhalb der 4 Well eines Silikon *inserts* eingestreut, wobei eine kreuzförmige Fläche von definierter Größe im Zentrum frei bleibt. Nach 24 h wurden die Zellen mittels Mitomycin in den Zyklusarrest überführt. Nach weiteren 2 h wurden sie mit 40 μM BSBA-S, OSBA-S, USBA-S oder PSBA-S oder mit 10 μM MSBA-S inkubiert. Da durch die kurze zeitliche Abfolge der Arbeitsschritte das Anlegen sowie die Beibehaltung eines hypoxischen Milieus mit dem BD GasPak EZ Anaerobier Pouch System schwer zu realisieren ist, wurden die Versuche zum Migrationsverhalten ausschließlich unter Normoxie durchgeführt. Nach 24 h wurde das *insert* entfernt, und es erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-800 eine Bildaufnahme der zellfreien Fläche. Die zweite Bildaufnahme erfolgte 16 h nach der ersten Bildaufnahme. Die relative Migrationsrate wurde aus der Änderung der zellfreien Fläche nach Entfernen des *inserts* ($t = 0$ h) und zum Endzeitpunkt ($t = 16$ h) für jede Substanz in Relation zu einer unbehandelten DMSO-Kontrolle berechnet.

3.2.6 Radiosensitivität

Analog zum Zellkoloniebildungstest wurden die Zellen in 6-Well Platten eingestreut und nach einer 24-stündigen Inkubation mit 5 μM MSBA-S bzw. 40 μM OSBA-S mit 6 Gy, 10 Gy oder 14 Gy an einem Linearbeschleuniger bestrahlt und anschließend nach einer Stunde in 75 cm^2 Zellkulturflaschen eingestreut. Durch das BD GasPak EZ Anaerobier Pouch System wurde ein hypoxisches Milieu hergestellt, da der Rückgang der Radiosensitivität von Karzinomzellen unter Hypoxie ein zentrales Problem der Tumorbehandlung darstellt und untersucht werden sollte, ob die neuen Triterpensulfamate eine mögliche Behandlungsoption darstellen.

Nach 12-14 d wurden die Zellen mit Formalin fixiert und mit Giemsa-Lösung eingefärbt. Es wurden erneut nur Kolonien von ≥ 50 Zellen gezählt. Das Verhältnis der Anzahl der Kolonien nach Bestrahlung wurde untereinander und mit der Anzahl der Kolonien in einer nicht-bestrahlten Kontrolle verglichen. Alle

Radiosensitivitäts-Assays erfolgten als Doppelbestimmung. Der Dosis-modifizierende Faktor 10 (DMF 10) wurde definiert als Verhältnis der überlebenden Fraktion einer mit DMSO behandelten Kontrolle zur überlebenden Fraktion der mit den Substanzen behandelten Zellen. Er gibt an, wie groß der Anteil der Behandlung mit einer Substanz an der Absenkung der relativen Plattiereffizienz auf 10 % ist. Ein DMF 10 >1 spricht für eine Radiosensitivierung. Und ein DMF 10 <1 für eine Radioprotektion.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zell- und strahlenbiologische Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S auf die *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinien Hs578T, BT-20 und MDA-MB-231 und auf die Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinomzelllinie MCF-7 untersucht. Der SRB-Assay erfolgte unter Normoxie und der Zellkoloniebildungstest unter Normoxie und Hypoxie. Der Wundheilungs-Assay und der DAPI-Assay wurde unter Normoxie durchgeführt. Die Effekte auf die Radiosensitivität wurden unter Hypoxie durchgeführt, da der Rückgang der Radiosensitivität von Karzinomzellen unter Hypoxie ein zentrales Problem der Tumorbehandlung darstellt.

Das Lösungsmittel DMSO hatte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen keinen Einfluss auf die Mammakarzinomzellen, weshalb auf die Darstellung unbehandelter Kontrollen verzichtet wurde.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen einer Publikation der eigenen Arbeitsgruppe von Petrenko *et. al* 2021 veröffentlicht.

4.1 Zytotoxizität der pentazyklischen Triterpensulfamate

Die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} wurde mittels SRB unter normoxischen Bedingungen ermittelt, um die Zytotoxizität der Substanzen zu ermitteln und in den weiterführenden Versuchen zur Klonogenität, Radiosensitivierung, Migration und Analyse der Zelltodrate die Wirkung der Substanzen vergleichen zu können.

Alle Substanzen zeigten eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zytotoxizität in den Zelllinien Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7 und BT-20 (Tab. 5). Die niedrigste Effektivität zeigte sich bei PSBA-S mit IC_{50} -Werten zwischen 9 μ M und >100 μ M. BSBA-S, OSBA-S und USBA-S zeigten eine moderate Effektivität mit IC_{50} -Werten von 7 μ M bis 27 μ M (BSBA-S), 3,5 μ M bis 24 μ M (OSBA-S), bzw. 8 μ M bis 19 μ M (USBA-S). Die höchste Effektivität (Zytotoxizität) hatte MSBA-S. Bei allen vier Mammakarzinom-Zelllinien lagen die IC_{50} -Werte zwischen 4 μ M und 6 μ M.

Am potentesten erwiesen sich alle Substanzen an der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7.

Initiale, im Folgenden nicht gezeigte Versuche mit den Triterpensulfamaten BSBA-S, OSBA-S, USBA-S und PSBA-S bei einer Konzentration von 20 µM, welches ungefähr dem Durchschnitt der IC₅₀-Werte der vier verwendeten Zelllinien entspricht, ergaben nur geringe Effekte auf das klonogene Zellüberleben, die Zelltodformen und die Zellmigration. Deshalb wurden für die weiteren Untersuchungen der Mechanismen OSBA-S, PSBA-S, USBA-S und BSBA-S mit einer Konzentration von 40 µM verwendet. Für das stark zytotoxisch wirkende MSBA-S wurden 5 µM bzw. 10 µM verwendet.

Tab. 5 IC₅₀-Werte der Substanzen BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S nach 72h Inkubation. Dargestellt sind die Versuche unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂) (n = 3, Mittelwerte ± SD).

	MDA-MB-231	Hs578T	BT-20	MCF-7
BSBA-S	23,3 ± 2,8	15,6 ± 2,5	26,9 ± 6,9	6,6 ± 1,6
OSBA-S	23,7 ± 5,2	15,8 ± 2,2	16,2 ± 6,4	3,5 ± 4,5
USBA-S	15,2 ± 7,1	18,8 ± 6,4	16,2 ± 4,0	7,5 ± 3,2
PSBA-S	>100	16,9 ± 4,5	32,0 ± 4,5	9,3 ± 2,5
MSBA-S	3,7 ± 0,8	3,8 ± 2,4	5,8 ± 1,6	4,9 ± 1,9

4.2 Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate auf das klonogene Zellüberleben

Die Effekte auf das klonogene Zellüberleben wurden an den triple-negativen Zelllinie Hs578T und MDA-MB-231 untersucht. Diese beiden Zelllinien bildeten kompakte, gut zu erkennende Kolonien und erwiesen sich somit gut zum Auszählen mit bloßem Auge geeignet. Die Zelllinien BT-20 und MCF-7 bildeten eher lose und somit schwerer zu erkennende Kolonien, weshalb wir auf die Untersuchung an diesen Zelllinien verzichteten. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung und p-Wert angegeben.

An der Zelllinie Hs578T verursachte die Behandlung mit BSBA-S, USBA-S und MSBA-S eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens unter Normoxie (Abb. 2). Nach Inkubation mit 40 µM BSBA-S reduzierte sich die relative Plattiereffizienz auf 73,2 % ± 22,1% (p=0,10) verglichen mit der mit DMSO

behandelten Kontrolle. Nach Inkubation mit 40 μM USBA-S betrug die relative Plattiereffizienz mit Mittelwert $81,3\% \pm 13,7\%$ ($p=0,17$). Nach Inkubation mit 10 μM MSBA-S betrug die relative Plattiereffizienz $15,5\% \pm 3,4\%$ ($p=0,001$). OSBA-S und PSBA-S hatte keine reduzierende Wirkung auf die relative Plattiereffizienz. Inkubation mit 40 μM OSBA-S führten zu einer relativen Plattiereffizienz von $105,9\% \pm 35,6$ ($p=0,79$). Die Behandlung mit 40 μM PSBA-S führte zu einer relativen Plattiereffizienz von $101,1\% \pm 15,2\%$ ($p=0,93$).

Anschließend wurden die Versuche mit identischem Versuchsaufbau und gleicher Dosierung der Substanzen, jedoch unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt (Abb. 2). Hier konnte bei allen Substanzen eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens beobachtet werden. Die relative Plattiereffizienz der Hs578T-Zellen fiel bei allen Substanzen niedriger aus als bei den Versuchen unter Normoxie. Die Behandlung mit BSBA-S resultierte in einer relativen Plattiereffizienz von $68,1\% \pm 28,2\%$ ($p=0,10$). Behandlung mit OSBA-S führte zu einer relativen Plattiereffizienz von $64,4\% \pm 11,9\%$ ($p=0,05$). Nach Behandlung mit USBA-S lag die relative Plattiereffizienz bei $65,1\% \pm 24,2\%$ ($p=0,07$). Nach Behandlung mit PSBA-S wurde eine relative Plattiereffizienz von $80,9\% \pm 30,9\%$ ($p=0,35$) beobachtet. Die Behandlung mit 10 μM MSBA-S erzielte mit einer relativen Plattiereffizienz von $4,2\% \pm 0,9\%$ ($p=0,001$) den stärksten Effekt.

Um die Effekte der Behandlung mit den Triterpensulfamaten unter Normoxie und unter Hypoxie zu vergleichen, wurde für jeden Versuch der Quotient aus der relativen Plattiereffizienz unter Normoxie und der relativen Plattiereffizienz unter Hypoxie gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert berechnet. Ein Mittelwert des Quotienten von 1 spricht für gleiche Effekte unter Normoxie und unter Hypoxie. Ein Mittelwert >1 zeigt einen stärkeren Effekt unter Hypoxie an, während ein Wert <1 für einen schwächeren Effekt unter Hypoxie spricht. Bei Behandlung mit 40 μM BSBA-S lag der Quotient bei $1,14 \pm 0,39$ ($p=0,57$). Der Quotient der Behandlungen mit 40 μM OSBA-S lag bei $1,65 \pm 0,36$ ($p=0,04$) und der Quotient für die Behandlung mit 40 μM USBA-S bei $1,33 \pm 0,36$ ($p=0,19$). Für die Behandlungen mit 40 μM PSBA-S ergab sich ein Quotient von $1,37 \pm 0,49$ ($p=0,26$). Der größte Unterschied zwischen der Behandlung unter Normoxie und der Behandlung unter Hypoxie wurde nach Inkubation mit 10 μM MSBA-S beobachtet. Hier betrug der Quotient $3,5 \pm 0,49$ ($p=0,0009$).

Bei den Untersuchungen an der Zelllinie MDA-MB-231 zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Unter normoxischen Bedingungen induzierten alle verwendeten Triterpensulfamate eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens (Abb. 3). Nach Behandlung mit 40 μM BSBS-S betrug die relative Plattiereffizienz im Mittelwert $84,5\% \pm 32,1\%$ ($p=0,45$). Inkubation mit 40 μM OSBA-S reduzierte die relative Plattiereffizienz auf $62,7\% \pm 38,26\%$ ($p=0,17$). Nach Behandlung mit 40 μM USBA-S wurde eine relative Plattiereffizienz von $84,11\% \pm 26,95\%$ ($p=0,36$) beobachtet und nach Behandlung mit 40 μM PSBA-S betrug die relative Plattiereffizienz $80,58\% \pm 2,72\%$ ($p=0,0002$). Auch in der Zelllinie MDA-MB-231 konnte der stärkste Effekt nach Behandlung mit 10 μM MSBA-S beobachtet werden. Die Behandlung reduzierte die relative Plattiereffizienz auf $42,08\% \pm 14,28\%$ ($p=0,002$).

Wurden die Zellen unter hypoxischen Bedingungen mit den Substanzen inkubiert betrug die relative Plattiereffizienz bei 40 μM BSBA-S im Mittelwert $75,08\% \pm 9,15\%$ ($p=0,009$). Nach Inkubation mit 40 μM OSBA-S wurde eine relative Plattiereffizienz von $65,29\% \pm 26,74\%$ ($p=0,09$) und nach Inkubation mit 40 μM USBA-S $82,09\% \pm 6,06\%$ ($p=0,01$). Die Behandlung mit 40 μM MSBA-S reduzierte die relative Plattiereffizienz auf $86,38\% \pm 12,87\%$ ($p=0,14$). Wie schon zuvor erzielte die Behandlung mit 10 μM MSBA-S den stärksten Effekt und reduzierte die relative Plattiereffizienz auf $23,71\% \pm 14,40$ ($p=0,0008$) (Abb. 3). Für die Behandlung mit BSBA-S lag der Quotient aus relativer Plattiereffizienz unter Normoxie und unter Hypoxie im Mittelwert bei $1,17 \pm 0,6$ ($p=0,64$). Für OSBA-S lag der Quotient bei $1,03 \pm 0,81$ ($p=0,95$). Das Verhältnis von normoxischer zu hypoxischer Behandlung ergab bei USBA-S einen Quotienten von $1,02 \pm 0,38$ ($p=0,94$) und für PSBA-S einen Quotienten von $0,93 \pm 0,15$ ($p=0,49$). Die stärkste Zunahme des Effektes unter Hypoxie zeigte die Behandlung mit MSBA-S. Hier betrug der Quotient aus den relativen Plattiereffizienzen der normoxischen und hypoxischen Behandlung $2,13 \pm 0,93$ ($p=0,10$).

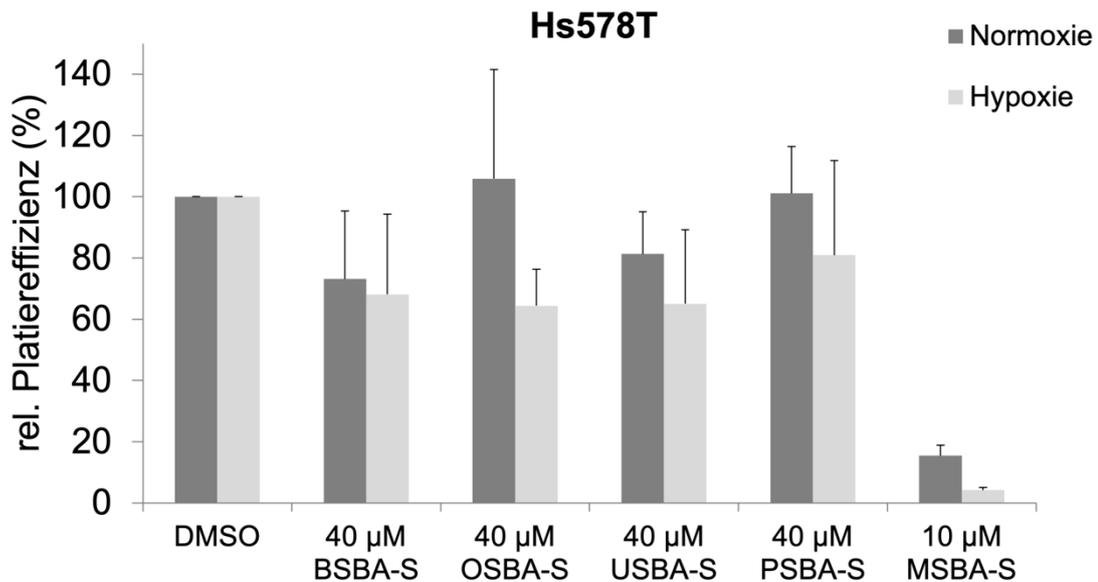


Abb. 2) Relative Plattiereffizienz der Zelllinie Hs578T nach Inkubation mit den Triterpensulfamaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellkoloniebildungstests jeweils unter Normoxie (21% O₂) und unter Hypoxie (0,1% O₂). (n=3, Mittelwerte + SD).

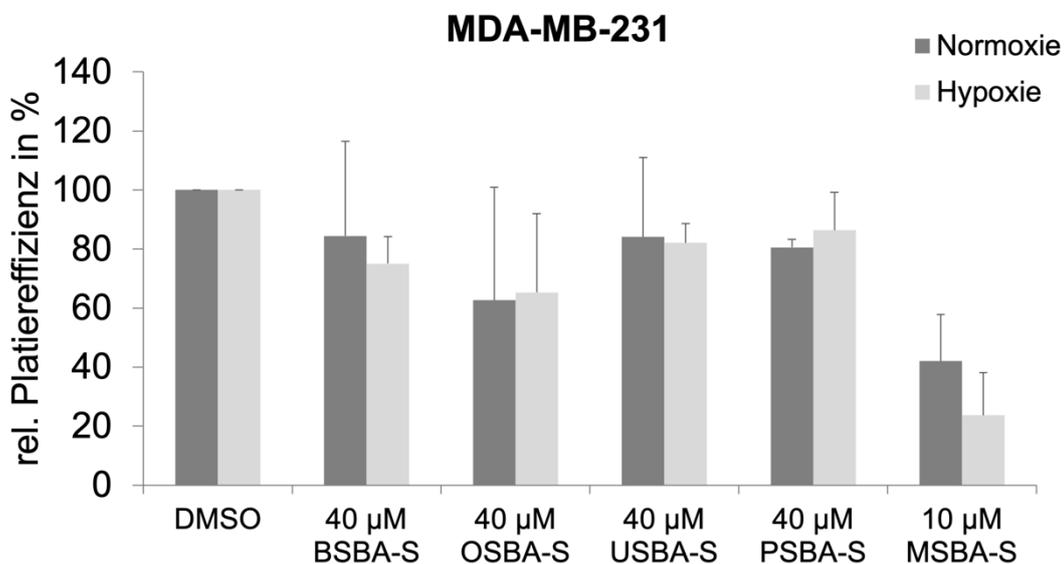


Abb. 3) Relative Plattiereffizienz der Zelllinie MDA-MB-231 nach Inkubation mit den Triterpensulfamaten. Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellkoloniebildungstests jeweils unter Normoxie (21% O₂) und unter Hypoxie (0,1% O₂). (n=3, Mittelwerte + SD).

4.3 Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate auf die Apoptoserate

Die Apoptoserate mittels DAPI-Analyse stellt die Anzahl apoptotischer Zellkerne an der Gesamtzahl der Zellkerne, verrechnet mit der DMSO-Kontrolle, dar (Abb. 6). Angegeben sind hier die Mittelwerte, Standardabweichung und die p-Werte.

In der Zelllinie Hs578T führte die Inkubation von 40 μM BSBA-S zu einer Apoptoserate von $9,3\% \pm 2,8\%$ ($p=0,14$). Nach Behandlung mit 40 μM OSBA-S wurde eine Apoptoserate von $5,5\% \pm 0,6\%$ ($p=0,005$) gemessen. Nach Behandlung mit 40 μM USBA-S lag die Apoptoserate bei $3,6\% \pm 2,2\%$ ($p=0,17$) und nach Behandlung mit 40 μM PSBA-S bei $4,1\% \pm 2,9$ ($p=0,17$) (Abb. 4). Inkubation mit 10 μM MSBA-S wies in dieser Zelllinie mit $22,1\% \pm 7,8\%$ ($p=0,003$) im Vergleich mit den anderen Substanzen eine ca. 2,7- bis 6,1-fach höhere Apoptoserate auf.

In der Zelllinie MDA-MB-231 zeigte die Inkubation mit BSBA-S bei einer Konzentration von 40 μM eine Apoptoserate von $2,43\% \pm 0,51\%$ ($p=0,46$). Die Inkubation mit 40 μM OSBA-S zeigte eine Apoptoserate von $10,5 \pm 3,04\%$ ($p=0,01$). Nach Behandlung mit 40 μM USBA-S zeigte sich eine Apoptoserate von $6,67\% \pm 1,44\%$ ($p=0,01$) und nach Behandlung mit 40 μM PSBA-S betrug die Apoptoserate $2,03\% \pm 1,78\%$ ($p=0,80$). Die Inkubation mit 10 μM MSBA-S induzierte neben 40 μM OSBA-S die stärkste Apoptoserate von $8,3\% \pm 0,11$ ($p=0,01$) in MDA-MB-231-Zellen (Abb. 5).

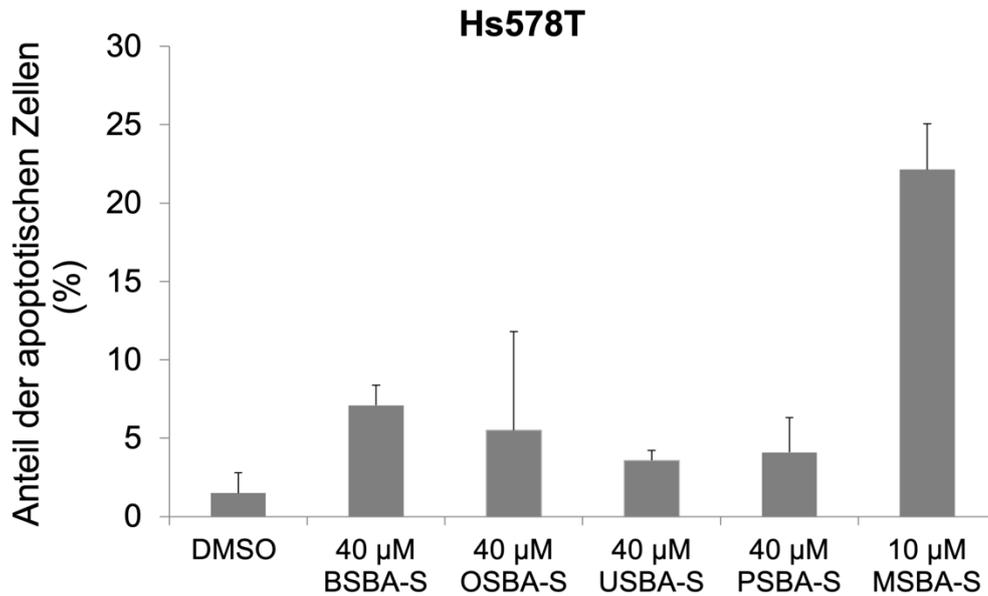


Abb. 4) Analyse der Apoptoserate mittels DAPI-Färbung nach 96h-Inkubation in der Zelllinien Hs578T. Dargestellt ist die Zelltodrate unter Normoxie (21 % O₂) durch manuelle Auszählung (n=3, Mittelwerte + SD).

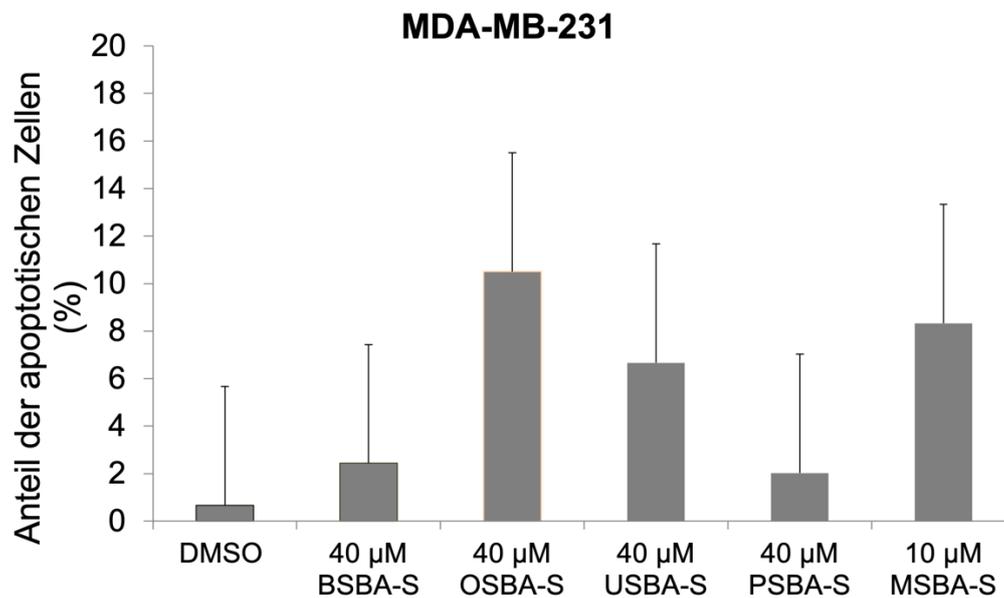
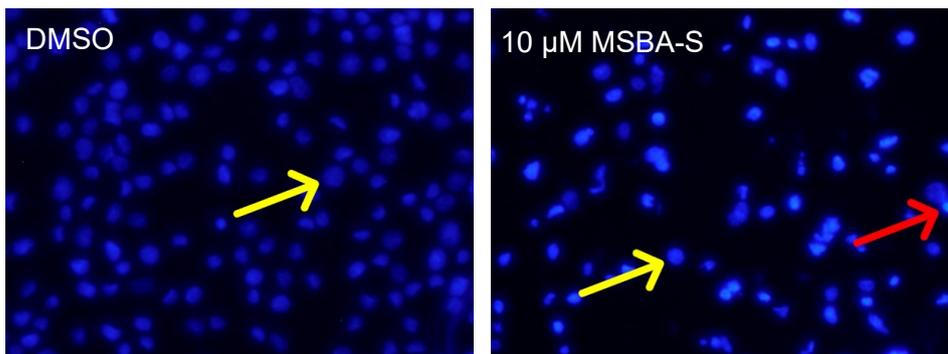


Abb. 5) Analyse der Apoptoserate mittels DAPI-Färbung nach 96h-Inkubation in der Zelllinie MDA-MB-231. Dargestellt ist die Zelltodrate unter Normoxie (21 % O₂) durch manuelle Auszählung (n=3, Mittelwerte + SD).

A Hs578T



B MDA-MB-231

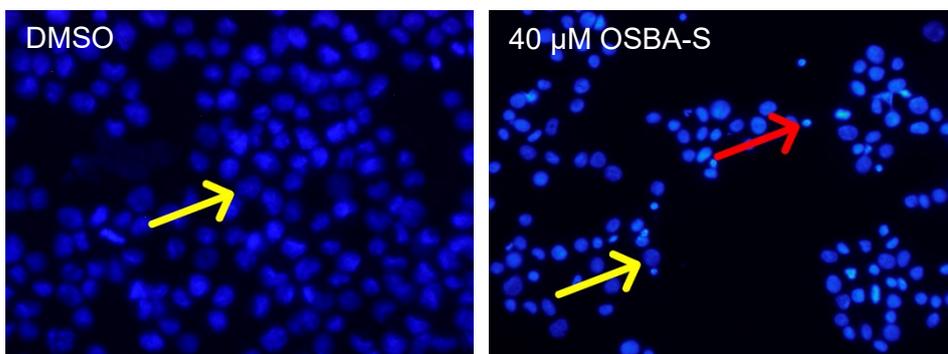


Abb. 6) Analyse der Zellkernmorphologie mittels DAPI-Färbung nach 72 h Inkubation mit MSBA-S bzw. OSBA-S. Dargestellt sind die mit DAPI gefärbten Zellkerne der Zelllinie (A) Hs778T und (B) MDA-MB-231 nach Inkubation der jeweiligen Substanz unter Normoxie (21 % O₂). Die Pfeile repräsentieren die typische Morphologie (gelb→) gesunder Zellkerne und (rot→) apoptotischer Zellkerne.

4.4 Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate auf die Zellmigration

Die Migration der Zelllinie MDA-MB-231 wurde nach Inkubation von 40 µM BSBA-S, OSBA-S, USBA-S bzw. PSBA-S und 10 µM MSBA-S mittels Wundheilungs-Assay untersucht (Abb. 7).

Die Migration der behandelten Zellen wurde in Relation zur Migration einer mit DMSO behandelten Kontrolle gesetzt und somit eine Migrationsrate ermittelt (Abb. 8). Die Behandlung mit OSBA-S und MSBA-S zeigte keinen Effekt auf die Migration. PSBA-S und USBA-S reduzierten die Migration auf 92 % ± 12,8 (p=0,87), bzw. 93 % ± 6,1% (p=0,14). BSBA-S konnte eine Reduktion der Migration auf 79% ± 11,9% (p=0,04), verglichen mit der Kontrolle, bewirken.

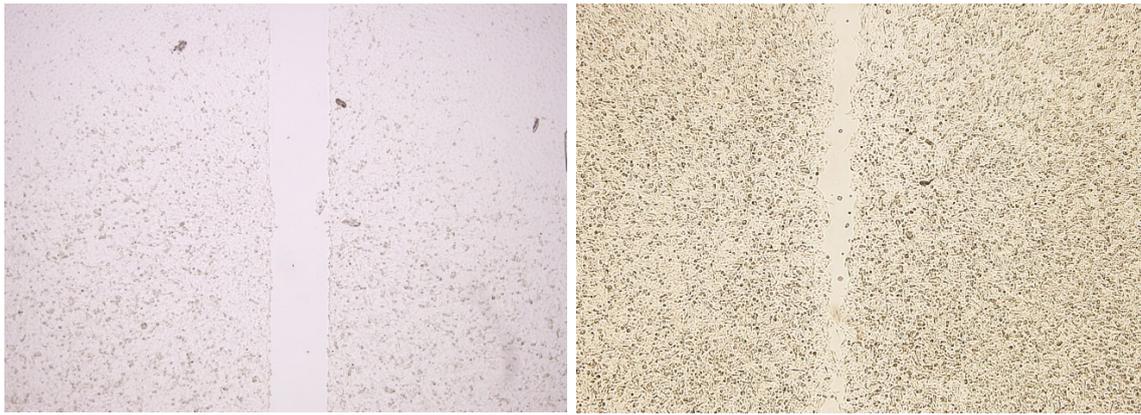


Abb. 7) Bildaufnahmen des DAPI-Assays nach Inkubation mit 40 µM BSBA-S. Dargestellt sind Bildaufnahmen der MDA-MB-231-Zellen links unmittelbar nach Entfernen des *inserts* und rechts nach 16 h.

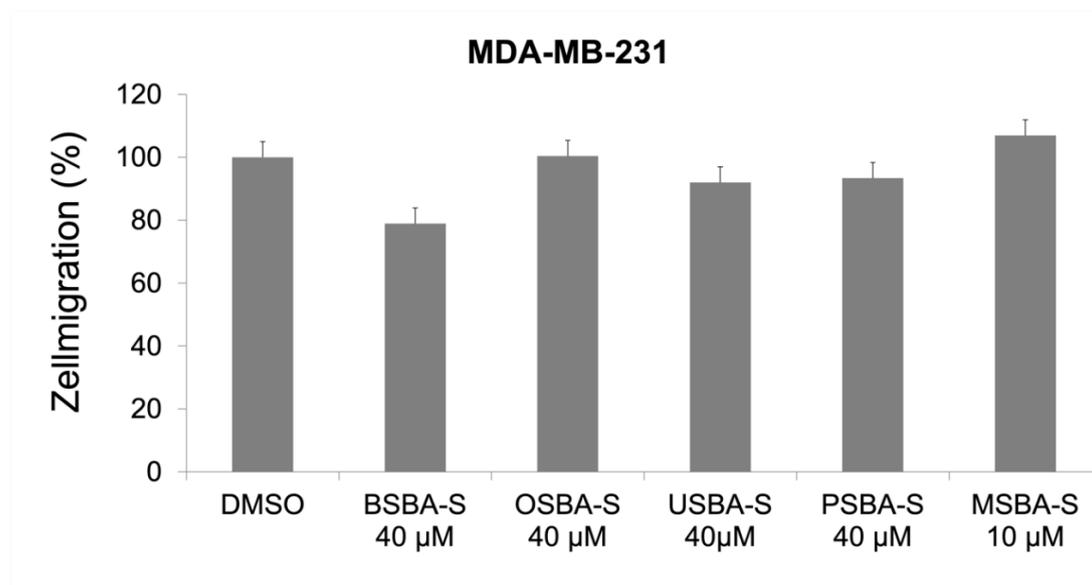


Abb. 8) Analyse des Effekts der Substanzen auf die Zellmigration mittels Wundheilungs-Assay. Dargestellt ist die Zellmigration unter Normoxie (21% O₂) nach Inkubation mit BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S (n=3, Mittelwerte + SD).

4.5 Effekte der pentazyklischen Triterpensulfamate auf die Radiosensitivität

Die Substanzen BSBA-S und MSBA-S wurden an der Zelllinie MDA-MB-231 hinsichtlich ihres radiosensitivierenden Effekts untersucht. Vorangegangene Analysen an der Zelllinie Hs578T erbrachten aufgrund erschwerter Koloniebildung keine verwertbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung erfolgte bei BSBA-S mit einer Konzentration von 40 μM und mit MSBA-S mit 5 μM . Zur Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen in gleicher Dichte eingestreut und mit gleicher Dosis bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit 6 Gy, 10 Gy und 14 Gy unter hypoxischen Bedingungen. Durch die Inkubation mit 40 μM BSBA-S ergab sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein DMF 10 von $1,15 \pm 0,02$ ($p=0,2$). Der DMF 10 nach Inkubation mit 5 μM MSBA-S lag bei $1,14 \pm 1,00$ ($p=0,13$) (Abb. 9). Somit konnte für beide Substanzen eine leichte Radiosensitivierung verzeichnet werden.

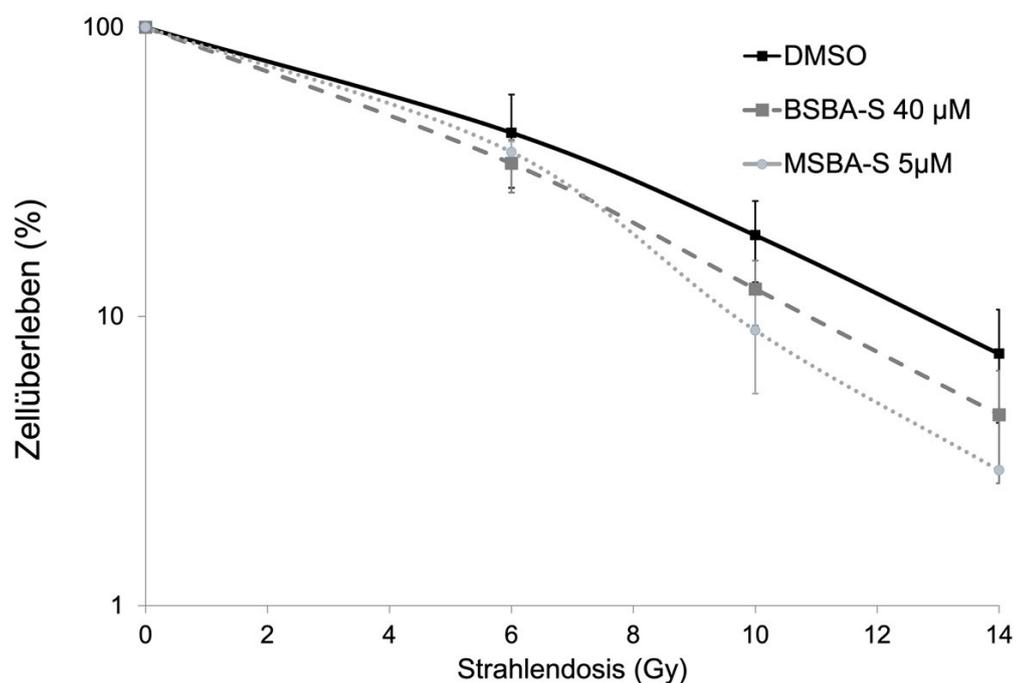


Abb. 9) Effekt der Inkubation mit 5 μM MSBA-S bzw. 40 μM BSBA-S auf das klonogene Zellüberleben der Zelllinie MDA-MB-231 in Abhängigkeit der Strahlendosis und Radiosensitivität. Versuche wurden unter hypoxischen Bedingungen (0,1 % O_2) und nach 24 h Inkubation der Substanzen durchgeführt ($n=3$).

5 Diskussion

5.1 Material und Methoden

Aufgrund der Anzahl an Substanzen, Zelllinien und Untersuchungen wurden pro Assay, Substanz und Zelllinie drei oder mehr unabhängige Replikate durchgeführt. Hierdurch war es möglich die Effekte der einzelnen Substanzen zu charakterisieren. Standardabweichung und p-Werte schwanken zwischen den einzelnen Substanzen und Versuchen. Hervorzuheben sind die Ergebnisse, bei denen bereits mit unabhängigen 3 Versuchen p-Werte $< 0,05$ ermittelt wurden.

Da die hier untersuchten Triterpensulfamate interessante Ergebnisse und Eigenschaften aufzeigten, sind weiterführende Untersuchungen empfehlenswert. Das Augenmerk sollte insbesondere auf MSBA-S und OSBA-S gelegt werden, da diese in den Untersuchungen die stärksten Effekte aufzeigten. Mit einer höheren Anzahl an unabhängigen Replikaten und der Einbeziehung weiterer Zelllinien, könnte die Aussagekraft der Ergebnisse weiter verbessert werden. Sollten weiterführende Untersuchungen die antitumorösen und radiosensitivierenden Eigenschaften bestätigen, könnten *in vivo* Untersuchungen am Maus-Modell weitere Aufschlüsse liefern.

5.2 Effekte auf Zytotoxizität und klonogenes Zellüberleben

Die pentazyklischen Triterpensulfamate BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S wurden hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber humanen Mammakarzinomzelllinien untersucht und ihre Wirkung charakterisiert. Alle fünf Substanzen zeigten eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität auf die Mammakarzinomzelllinien Hs578T, BT-20, MDA-MB-231 und MCF-7. Die Analyse der IC_{50} -Werte ergab Unterschiede in Abhängigkeit von der Zelllinie und der jeweiligen Substanz. Die Zelllinie MCF-7 reagierte unabhängig von der verwendeten Substanz am sensitivsten auf die Behandlung. Alle Substanzen erreichten bei dieser Zelllinie IC_{50} -Werte zwischen 3 μM und 9 μM , während die IC_{50} -Werte der Triterpensulfamate BSBA-S, OSBA-S, PSBA-S und USBA-S bei den Zelllinien Hs578T, BT-20 und MDA-MB-231 zwischen 16 μM und 32 μM lagen. Die stärkste Zytotoxizität ließ sich für die Substanz MSBA-S beobachten: Die IC_{50} -Werte von MSBA-S lagen für die Mammakarzinomzelllinien zwischen 2 μM und 6 μM .

Untersuchungen von Sommerwerk *et al.* an Methyl-Triterpensulfamaten von OS, US, BS, PS und MS an verschiedenen Tumorzelllinien bestätigen, dass MS-Derivate im Vergleich mit den anderen Triterpen-Derivaten die höchste Zytotoxizität aufweisen (75). Weber *et al.* untersuchten die Effekte der BS-Derivate Betulinyl-bis-sulfamat (BBS) und NVX-207 auf equine Hautkrebszellen. Beide Derivate zeigten eine moderate bis hohe Zytotoxizität. Während NVX-207 größere zytotoxische Effekte aufzeigte, war BBS besser verträglich gegenüber Normalzellen. Für beide Substanzen konnte die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden, wobei BBS eine größere Selektivität gegenüber den Karzinomzellen im Vergleich zu den behandelten Fibroblasten zeigte (76). Somit präsentierten sich auch in diesen Arbeiten Triterpensulfamate und insbesondere BBS als vielversprechende Kandidaten für die Tumorthapie.

Interessant ist die Tatsache, dass die Zelllinie MCF-7 auf alle verwendeten Substanzen am sensitivsten reagierte. Auch Güttler *et al.* identifizierten bei Untersuchungen mit Betulinsulfonamiden die luminal ER-positive Zelllinie MCF-7 als sensitiver im Vergleich mit den TNBC-Zelllinien Hs578T und MDA-MB-231 (65). Sie konnten in den TNBC-Zellen erhöhte CA IX-Level nachweisen, wohingegen sich in der luminal ER-positiven MCF-7 eine hohe Expression von CA XII fand. Ein hohes oder erhöhtes CA XII-Level könnte ein durch das niedrige oder absinkende CA IX-Level ausgelöster Rettungsmechanismus der Zelle sein. Güttler *et al.* empfehlen deshalb eine kombinierte Inhibierung von CA IX und CA XII, besonders in TNBC, um eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der beiden CA zu reduzieren und das Auslösen eines Rettungsmechanismus zu verhindern (65). Ob luminal ER-positive Zelllinien generell sensitiver auf die Therapie mit Triterpenen oder ihren Derivaten in Kombination mit CAI reagieren, lässt sich aktuell noch nicht beantworten und müsste an weiteren Zelllinien untersucht werden.

Unter Normoxie reduzierte 10 μ M MSBA-S das klonogene Zellüberleben der Zelllinie Hs578T auf 15% und das der Zelllinie MDA-MB-231 auf 42%. Die Behandlung mit 40 μ M der Substanzen BSBA-S, OSBA-S, USBA-S und PSBA-S hingegen führte zu eher geringen Effekten an beiden Zelllinien mit einer Reduktion auf zwischen 60 und 100%. Die zu beobachtenden Effekte deckten sich bei allen Substanzen mit den Ergebnissen der SRB-Assays.

Während die in dieser Arbeit verwendeten Triterpensulfamate noch nicht untersucht waren, wurden in einer AG-internen Studie bereits verschiedene Betulinyl-Sulfamate charakterisiert. Das effektivste Derivat Betulin-3-28-disulfamat (CA1) weist mit IC_{50} -Werten von 12,6 μ M in MCF-7 Zellen und 18,1 μ M in der Zelllinie MDA-MB-231 IC_{50} -Werte auf, die mit denen der neu synthetisierten Triterpensulfamaten vergleichbar sind (69).

Die Kombinationsbehandlung eines BS-Derivats mit einem CAI wurde bereits AG-intern untersucht. Hier konnte eine Steigerung der Zytotoxizität durch die Kombination von 3-AC und OCT belegt werden (77). Während die Behandlung mit 3-AC oder OCT allein nur eine moderate Reduktion des Zellüberlebens im SRB-Assay zur Folge hatte, konnte das Zellüberleben durch die Kombination von 40 μ M der beiden Substanzen signifikant auf 45% in MDA-MB-231-Zellen und 52% in MCF-7-Zellen reduziert werden (77). In der eigenen Studie reduzierte die Behandlung mit 40 μ M BSBA-S, auch einem BS-Derivat, jedoch schon gekoppelt mit einem CAI, das relative Zellüberleben im SRB-Assay auf 35% bei MDA-MB-231-Zellen und 21% in MCF-7-Zellen. Es konnte durch das gekoppelte Triterpensulfamat eine ähnliche, sogar leicht stärkere Reduktion des Zellüberlebens bewirkt werden als mit dem BS-Derivat 3-AC in Kombinationsbehandlung mit dem CAI OCT. Für Betulinsulfamate und BBS ließ sich bereits eine Inhibition von CA, wie unter anderem der Hypoxie-induzierten CA IX nachweisen (67,76).

Um zu untersuchen, ob sich der Effekt der neu synthetisierten Triterpenoide in Kombination mit der Sulfamatgruppe als CAI durch Anlage eines hypoxischen Milieus verstärken lässt, wurden an den zuvor schon verwendeten Zelllinien Hs578T und MDA-MB-231 ZKBT mit der gleichen Konzentration der behandelnden Substanz, jedoch bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,1% O_2 durchgeführt und mit den Effekten unter Normoxie verglichen. Bei Behandlung mit den Substanzen BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S unter Hypoxie ließ sich bei allen Substanzen eine Zunahme der Zytotoxizität im Vergleich zur Behandlung unter Normoxie feststellen. Dieser Effekt variierte je nach verwendeter Substanz und zu behandelnder Zelllinie.

BSBA-S wirkte unter Hypoxie auf beide Zelllinien 1,1-fach stärker. Bei den Substanzen OSBA-S, USBA-S und PSBA-S hatte das hypoxische Milieu nur auf

die Zelllinie Hs578T einen verstärkenden Effekt. Dieser lag bei einer 1,3- bis 1,6-fachen Verstärkung.

Der größte Unterschied zwischen der Behandlung unter Normoxie und der Behandlung unter Hypoxie ließ sich bei MSBA-S beobachten. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 konnte das klonogene Zellüberleben unter Hypoxie 2,1-fach stärker reduziert werden. Bei der Zelllinie Hs578T ließ sich ein starker Unterschied in Form einer 3,5-fach stärkeren Reduktion des klonogenen Zellüberlebens unter Normoxie im Vergleich zur Behandlung unter Hypoxie feststellen.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden auch Untersuchungen an Betulinsulfonamiden mit Substitution einer Sulfonamid-Gruppe als CAI durchgeführt. Im SRB-Assay an Mammakarzinomzelllinien konnten für die Betulinsulfonamide 13b und 15b IC_{50} -Werte zwischen 8 und 14 μ M ermittelt werden (65). Trotz des geringen IC_{50} -Wertes konnte die Behandlung mit 20 μ M 15b das klonogene Zellüberleben der Mammakarzinomzelllinie Hs578T unter hypoxischen Bedingungen auf lediglich auf 50 % senken. An diesem Derivat erfolgte die Substitution der Sulfonamid-Gruppe an Position C-28. Das Derivat 13b, bei welchem die Sulfonamid-Gruppe, wie bei den in der eigenen Arbeit verwendeten Triterpensulfamaten, an der C-3-Position substituiert wurde, reduzierte das klonogene Zellüberleben der Zelllinie Hs578T am stärksten auf 10% (65). Behandlung der Zellen mit 10 μ M erbrachten dagegen geringe bis keine Effekte. Im Vergleich dazu reduzierte die Behandlung mit 10 μ M MSBA-S unter Hypoxie das klonogene Zellüberleben der Zelllinie Hs578T auf 4%.

Auch BS, welche als Grundgerüst für das in dieser Arbeit verwendete BSBA-S fungiert, zeigte einen deutlichen Anstieg der Zytotoxizität auf Gliomzellen bei Inkubation unter hypoxischen Bedingungen (39). Bei diesen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass BS die Hypoxie induzierten Level des HIF-1 α -Proteins reduziert. Eine weitere arbeitsgruppeninterne Untersuchung zeigte, dass das *silencing* von HIF-1 α durch small-interfering RNA (siRNA) oder Chetomin zu einer verstärkten Zytotoxizität und Radiosensitivierung in Gliomzellen führt (78).

Im Gegensatz hierzu ließ sich bei Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zu den Betulinyll-Sulfamaten CAI 1 und CAI 3 an humanen Mammakarzinomzellen unter Normoxie zwar eine stärkere Zytotoxizität als für

BS nachweisen, die Zytotoxizität unter Hypoxie fiel jedoch ähnlich, in einigen Fällen auch geringer, aus (69). Auch die BS-Derivaten NVX-207 und B10 zeigten keine erhöhte Zytotoxizität unter Hypoxie (79). Für dieses geringere Ansprechen der Gliomzelllinien scheint die geringere Proliferation der hypoxischen Zellen verantwortlich zu sein. Weiterhin hatten NVX-207 und B10 keinen Einfluss auf die Hypoxie-induzierte Genexpression von HIF-1 α oder CA IX (79). Auch die von Güttler *et al.* untersuchten Betulinsulfonamide 13b und 15b, welche unter Hypoxie eine stärkere Zytotoxizität zeigten und für welche sich eine Reduktion der CA IX- und CA XII-Level nachweisen ließ, hatten keinen Effekt auf HIF-1 α (65). Somit scheint es mehrere Mechanismen zu geben, welche die Zytotoxizität einer Substanz unter Hypoxie verstärken. Um zu klären, was die stärkeren Effekte unter Hypoxie bei den in dieser Arbeit verwendeten Triterpensulfamaten bedingt, bedarf es in jedem Fall weiterführender Untersuchungen.

Ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor ist die Inhibitor-Konstante K_i . Anhand der K_i können somit Aussagen über die Effektivität eines CA-Inhibitors getroffen werden. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. René Csuk (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Organische Chemie) hat die Substanzen BSBA-S, OSBA-S, PSBA-S und MSBA-S hinsichtlich ihres K_i in Bezug auf CA I, CA II, CA Va und CA IX untersucht. Für die in dieser Studie untersuchten Triterpensulfamate wurden K_i -Werte zwischen 88 nM und 2.494 nM ermittelt. (Csuk *et al.* – unveröffentlicht). Ein vergleichsweise niedriger K_i -Wert von 88 nM und somit eine gute Effektivität als CAI konnte für BSBA-S an der CA Va festgestellt werden. Zum Vergleich: Die K_i von Acetazolamid (AAZ) liegt an der CA Va bei 63 nM. Carbonhydrase-IX-Inhibitoren wie CAI1, CAI3 und CAI6 haben K_i -Werte zwischen 1 und 4 nM (63). Bei den von Winum *et al.* untersuchten Bis-Sulfamaten lag der K_i zwischen 4 und 5.400 nM (62). Für die Substanzen MSBA-S, BSBA-S und PSBA-S konnten an der CA IX lediglich K_i -Werte im mikromolaren Bereich festgestellt werden. OSBA-S zeigte eine K_i von 95nM.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass die in dieser Studie verwendeten Substanzen als CAI fungieren und auch die CA IX hemmen. Die CAIX-Selektivität ist jedoch gering. Dies ließ sich auch für MSBA-S beobachten und stellt insofern einen interessanten Befund dar, als dass MSBA-S unter Hypoxie eine ungefähr dreifach stärkere Zytotoxizität zeigte als unter Normoxie.

Andererseits zeigten Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, dass der spezifische CA IX-Inhibitor U104 bei Behandlung von humanen Brustkrebszellen mit einem IC_{50} von 112 μ M bei der Zelllinie MDA-MB-231 und 307 μ M bei der Zelllinie MCF-7 nur schwach zytotoxisch wirkt (68), obgleich der K_i von U104 für CA IX bei 45 nM liegt, womit U104 eine starke Affinität zu CA IX aufweist (80).

Auch für den von Petrenko *et al.* in der Kombinationstherapie mit 3-AC verwendeten CA IX-Inhibitor OCT konnte von Winum *et al.* ein K_i von 4 nM für CA IX festgestellt werden (62). Dennoch wirkte die alleinige Behandlung mit OCT kaum zytotoxisch auf humane Mammakarzinomzellen (77). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine spezifische und effektive CA IX-Inhibition nicht grundsätzlich eine hohe Zytotoxizität hervorruft. Andererseits scheint die Kombination des Triterpen-Derivats mit dem CAI die Zytotoxizität additiv zu verstärken. Solche additiven Effekte wurden auch bei der Kombination von Triterpenen und Chemotherapeutika beobachtet.

Adenokarzinomzellen und Gliomzellen reagieren sensitiver auf die Behandlung mit Doxorubicin, wenn sie zusätzlich mit BS, OS oder US behandelt werden (81).

Die Kombinationstherapie von BS, gefolgt von 5-Fluorouracil, zeigt ebenfalls synergistische Effekte auf die Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen (82). Die Kombination von Triterpenen und ihren Derivaten mit bewährten Chemotherapeutika und CAIs ist somit ein vielversprechender Ansatz in der Tumorthherapie und sollte weiterhin untersucht werden.

Andere Studien haben andere Triterpen-Derivate untersucht. Derivate der OS aus anderen Studien zeigten an den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 ähnlich starke zytotoxische Effekte wie das in dieser Arbeit untersuchte OSBA-S. (45,83).

Auch Derivate der US wurden in Studien hinsichtlich ihrer Zytotoxizität auf verschiedene Tumorentitäten untersucht. Dar *et al.* synthetisierten eine Reihe von US-Benzylidine-Derivaten mit aromatischen Aldehyden. Die effektivste dieser neu designten Substanzen zeigte in der Zelllinie MCF-7 einen IC_{50} -Wert von 5,5 μ M und wirkte somit ähnlich zytotoxisch wie die in dieser Arbeit verwendeten Triterpensulfamate (84). Ganaie *et al.* charakterisierten verschiedene Arylenon-Kongenerer der PS in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen

und ermittelte mit IC₅₀-Werte zwischen 16 µM und 18 µM ähnliche Werte, wie in dieser Studie für PSBA-S zu beobachten war (85).

Analog zu den vielversprechenden Ergebnissen unseres MS-Derivats MSBA-S zeigten MS-Derivate schon zuvor eine höhere Zytotoxizität in Tumorzelllinien, verglichen mit anderen Triterpen-Derivaten (64,75). Ein 2,3-di-O-acetyl-Maslinsäure-Benzylamid (EM2) zeigte eine sehr starke Zytotoxizität nach Inkubation in humanen Ovarialkarzinomzellen mit einem IC₅₀-Wert von 0,5 µM (60). Sommerwerk *et al.* untersuchten EM2 an diversen Tumorentitäten. Ihre Versuche ergaben für die Brustkrebszelllinie MCF-7 einen IC₅₀-Wert von 7,7 µM. N-[2b,3b,17b)-2,3-Di-O-acetyl-17-amino-28-norolean-12-en-17-yl]phenyl-urea, ein weiteres MS-Derivat, welches von Sommerwerk *et al.* synthetisiert und hinsichtlich der Zytotoxizität analysiert wurde, erbrachte in MCF-7-Zellen einen IC₅₀-Wert von 2,8 µM. Weiterhin wurde eine sehr hohe Selektivität für Karzinomzellen festgestellt, da nicht-tumoröse Zellen wie Fibroblasten einen IC₅₀-Wert von >120 µM aufwiesen (60). In dieser Arbeit verglichen Sommerwerk *et al.* das MS-Derivat auch mit den Derivaten der OS und US und detektierten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie eine größere Zytotoxizität des MS-Derivates gegenüber den anderen Derivaten(60). Besonders effektiv war die Derivatisierung von MS zu ihrem Triterpen-Rhodaminderivat. Für dieses Derivat konnte eine 1.000-fach stärkere Zytotoxizität als für die zugrundeliegende MS ermittelt werden. Der IC₅₀ des Rhodaminderivats liegt im nanomolaren Bereich (86).

Somit sind MS-Derivate durch ihre starke Zytotoxizität, ihre Tumorselektivität und die Wirkungsverstärkung im hypoxischen Milieu vielversprechende Substanzen für die Tumorthherapie und insbesondere der Therapie hypoxischer Mammakarzinome. Weiterführend wäre es demnach von Interesse, auch die in dieser Arbeit charakterisierten Triterpensulfamate hinsichtlich ihrer Selektivität gegenüber Tumorzellen zu untersuchen.

Da die CA IX rein Hypoxie-induziert und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, bleibt sie weiterhin ein attraktives *target*, so dass weitere Möglichkeiten zur Steigerung der CA IX-Selektivität von Triterpenen-Derivaten untersucht werden sollten.

5.3 Einfluss auf die Apoptoserate

Die Apoptoserate (Anzahl apoptotischer Zellkerne an der Gesamtzahl der Zellkerne) wurde an den Zelllinien Hs578T und MDA-MB-231 nach Inkubation der Substanzen durch Färbung mit DAPI und anschließendem Auszählen der apoptotischen Zellkerne unter dem Mikroskop bestimmt. In der Zelllinie Hs578T zeigte die Inkubation mit 10 µM MSBA-S den größten Effekt mit einer Rate an apoptotischen Zellkernen von 22,1 %. Den zweitgrößten Effekt zeigte 40 µM BSBA-S mit 7,1%. Die Apoptoseraten von 40 µM OSBA-S; USBA-S und PSBA-S lagen zwischen 3,6 % und 5,5%. Somit zeigte MSBA-S mit $\frac{1}{4}$ der Konzentration von OSBA-S eine ca. dreimal so starke Apoptoseinduktion.

Auch das Auszählen der apoptotischen Zellkerne der Zelllinie MDA-MB-231 nach Färbung mit DAPI zeigte nach Inkubation mit 10 µM MSBA-S unter Normoxie den stärksten Effekt mit einer Apoptoserate von 8,33%. OSBA-S zeigte bei einer Konzentration von 40 µM eine Apoptoserate von 10,50%. 40 µM PSBA-S, USBA-S oder BSBA-S verursachten bei 2,03% bis 8,33% der gezählten Zellkerne eine Apoptose.

In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe quantifizierten Petrenko *et al.* vitale, nekrotische, spät apoptotische und apoptotische Zellen der Zelllinien Hs578T und MDA-MB-231 nach Behandlung mit den auch in dieser Arbeit verwendeten Triterpensulfamaten. Hierfür färbten sie die Zellen mittels Annexin V und Propidiumiodid (PI) und teilten sie anschließend mittels Durchflusszytometrie in die verschiedenen Kategorien ein. Auch hier ließen sich an der Zelllinie MDA-MB-231 nur moderate Effekte beobachten, während MSBA-S an der Zelllinie Hs578T hohe Zelltodraten mit 2,6% nekrotischen, 8,7% apoptotischen und 44,4% spät-apoptotischen Zellen verursachte (87). Somit decken sich die Ergebnisse dieser Arbeiten. In beiden wurde MSBA-S als stärkster Apoptoseinduktor unter den untersuchten Triterpensulfamaten identifiziert.

Auch die Beobachtungen bezüglich der Zelltodrate nach Behandlung mit BSBA-S mittels Annexin V-PI-Assay spiegeln die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen wider. Interessanterweise fiel die im DAPI-Assay beobachtete Apoptoseinduktion durch OSBA-S deutlich stärker aus als die von BSBA-S, obwohl für beide Substanzen IC₅₀-Werte in der gleichen Größenordnung ermittelt

wurden. Somit ist fraglich, ob die Behandlung mit BSBA-S noch weitere, bisher nicht untersuchte Zelltodformen induziert.

Auch die Triterpensäuren, die hier als Grundgerüste für die Triterpensulfamate verwendet wurde, wurden schon hinsichtlich ihrer Effekte auf die Zellapoptose und die zugrundeliegenden Mechanismen untersucht. So induziert beispielweise BS Apoptose über den mitochondrialen bzw. intrinsischen *pathway* über Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige Mechanismen (88). Die Apoptoseinduktion durch US erfolgt bei Behandlung von Brustkrebszellen über extrinsische sowie intrinsische *pathways* (46). Als Mechanismus für die Apoptoseinduktion durch MS konnte die Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax und die Inhibierung des antiapoptotischen BCL-2-Gens beobachtet werden. Zudem induziert MS die Freisetzung von Cytochrom C und trägt zur Aktivierung von Caspase 3 und 9 bei (55).

BS-Derivate wie die Betulinyl-Sulfamate CAI 1 und CAI 3 konnten nach 48 h Inkubation mit 5 μ M der Substanzen deutliche apoptotische Prozesse in MDA-MB-231-Zellen induzieren (69). Jedoch fiel die Apoptoseinduktion durch die Betulinyl-Sulfamate an den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 jeweils geringer aus als die Apoptoseinduktion durch BS, obwohl für CAI 3 eine höhere Zytotoxizität als für BS nachgewiesen wurde (63,69). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Apoptoseinduktion aufgrund der Unterschiede in der Geschwindigkeit der Membranpenetration der verschiedenen Substanzen als zeitlicher Prozess zu betrachten ist.

Güttler *et al.* untersuchten die zwei Betulin-Derivate 13 und 15 und die Betulin-Sulfonamide 13b und 15b mittels Annexin V-PI-Assay hinsichtlich der verursachten Zelltodformen. Während die Betulin-Derivate 13 und 15 fast keinen Einfluss auf die Zelllinien MDA-MB-231, Hs578T und MCF-7 hatten, verursachten die Betulin-Sulfonamide 13b und 15b insbesondere Apoptose und Nekrose (65). Der größte Effekt ließ sich bei Behandlung der MDA-MB-231-Zellen beobachten. Interessanterweise ließ sich sowohl bei den Untersuchungen an den Betulinyl-Sulfamaten als auch an den Betulin-Sulfonamiden an der Zelllinie MCF-7 nur eine geringe Apoptoseinduktion beobachten (65,69). Grund hierfür könnte die fehlende Expression von Caspase 3 bei dieser Zelllinie sein (89).

Weiterführend konnte auch für die OS-Derivate HIMOXOL und SZC015 eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (45,83). PS oder Derivate der PS wurden bislang noch nicht gesondert auf ihren Effekt hinsichtlich der Apoptoseinduktion an humanen Mammakarzinomzellen untersucht.

Für BS und OS konnte auch die Induktion von Autophagie nachgewiesen werden (90). So induziert OS die Autophagie bei MCF-7-Zellen, und OS führt über den PI3K-AKT-GSK *pathway* in T47D-Zellen ebenfalls zur Autophagie (90). Tian *et al.* konnten nachweisen, dass durch Behandlung mit MS die Expression von Proteinen wie beispielweise das Hitzeschockprotein HSPA8, welche mit Autophagie in Verbindung stehen, in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-28 beeinflusst werden (91) In dieser Arbeit erwies sich MSBA-S auch hinsichtlich der Apoptoseinduktion als stärkster Apoptose-Induktor unter den hier untersuchten Substanzen.

Aufgrund der Diskrepanz zwischen der stark zytotoxischen Wirkung von 10 μ M MSBA-S im SRB-Assay im Vergleich zu 40 μ M OSBA-S und der nach 24 h Inkubation beobachteten annähernd gleichen Apoptoseinduktion sind weiterführende Untersuchungen bezüglich weiterer Zelltodformen, wie beispielsweise Autophagie, und der Entwicklung der Apoptoseinduktion als zeitlicher Prozess nach längerer Inkubation nötig.

5.4 Einfluss auf die Zellmigration

Die Migration der Zelllinie MDA-MB-231 wurde nach Inkubation von 40 μ M OSBA-S, PSBA-S, USBA-S oder BSBA-S oder 10 μ M MSBA-S untersucht. Die Migration der so behandelten Zellen wurde in Relation mit der Migration einer mit DMSO behandelten Kontrolle gesetzt und somit eine Migrationsrate ermittelt. Die Behandlung mit OSBA-S und MSBA-S zeigte keinen Effekt auf die Migration. PSBA-S und USBA-S reduzierten die Migration auf 92%, bzw. 93%. BSBA-S konnte eine Reduktion der Migration auf 79%, verglichen mit der Kontrolle bewirken. Insgesamt zeigten die verwendeten Triterpensulfamate somit nur relativ geringe Effekte auf die Zellmigration der verwendeten Mammakarzinomzellen.

Für die bereits erwähnten Betulinyl-Sulfamate CAI 1 und CAI 3 konnte eine Hemmung der Migration in den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7, ähnlich der Migrationshemmung durch BS beobachtet werden (69).

Tang *et al.* untersuchten die Auswirkung des BS-Derivates SH-479 auf die Zellmigration humaner Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231. SH-479 induzierte ein signifikantes Absinken der Zellmigration in Abhängigkeit der Verwendeten Konzentration (92). Bereits 5 μM SH-479 reduzierten die Zellmigration um die Hälfte. Somit scheinen bezüglich der Migrationshemmung humaner Mammakarzinomzellen weitere Untersuchungen zur Detektion des zugrundeliegenden Mechanismus nötig, um im Folgenden diejenigen Triterpenderivate mit der effektivsten Migrationshemmung identifizieren und untersuchen zu können.

5.5 Effekte auf die Radiosensitivität

Strahlenresistenz stellt noch immer ein großes Problem dar; insbesondere in der Therapie hypoxischer solider Tumoren. Deshalb rücken *radiosensitizer* vermehrt in den Fokus der Forschung, und eine Vielzahl an potenziellen Kandidaten wird untersucht. BS und andere pentazyklische Triterpene zeigten zwar bisher Attribute eines *radiosensitizers*, jedoch ist es von Interesse, die unter anderem besser löslichen Derivate, wie beispielsweise Sulfamat-Derivate, zu untersuchen (93).

Die Untersuchung hinsichtlich radiosensitiverender Effekte von BSBA-S wurde analog zu den Zellkoloniebildungstests in einer Konzentration von 40 μM unter Hypoxie durchgeführt. Hieraus ergab sich ein DMF10 von 1,15. Die Behandlung mit 40 μM BSBA-S führte somit zu einer leichten Radiosensitivität der MDA-MB-231-Zellen.

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an den Betulinyl-Sulfamaten mit 20 μM CAI 1 und CAI 3 ergaben unter Hypoxie DMF 10-Werte von 1,47 und 1,75 (69). BSBA-S zeigte eine leichte Radiosensitivierung, der Effekt war jedoch geringer als der der Betulinyl-Sulfamate CAI 1 und CAI 3. Zudem wurde eine doppelt so hohe Konzentration an Substanz verwendet als bei den Untersuchungen an den Betulinyl-Sulfamaten. Auch die Kombinationstherapie des Betulin-Derivates 3-AC mit dem CAI SCL-0111 führte zu einer signifikanten

Radiosensitivierung von MDA-MB-231- Zellen mit einem DMF 10-Wert von 1,46 (77). Weiterhin untersuchte die eigene Arbeitsgruppe die Betulin-Sulfonamide 13b und 15b auf radiosensitivierende Eigenschaften. Obwohl 10 μM der Substanzen die Proteinlevel von CA IX und CA XII um ca. 50% reduzierten, hatte diese Konzentrationen keinen Einfluss auf die Radiosensitivität von MDA-MB-231-Zellen unter Hypoxie. Bei einer höheren Konzentration von 20 μM konnte für 13b ein DMF10 von 1,25 und für 15b ein DMF10 von 1,36 ermittelt werden (65). Die bisherigen Ergebnisse ermutigen somit dazu, weitere Triterpene mit BS-Gerüst und einer als CAI fungierenden Sulfamat- oder Sulfonamid-Gruppe hinsichtlich ihrer Eignung als *radiosensitizer* zu untersuchen.

Da sich MSBA-S in den Voruntersuchungen als stark zytotoxisch erwies, wurde für die Analyse radiosensitivierender Effekte eine Dosis von 5 μM verwendet. Die Untersuchung wurde ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Nach Einsatz der Konzentration von 5 μM zeigte MSBA-S einen vergleichbaren Effekt wie 40 μM BSBA-S, und es konnte ein DMF 10 von 1,14 ermittelt werden. Somit wurde auch hier eine leichte Radiosensitivierung festgestellt. Es gibt bislang keine Studien, die MS als potenziellen *radiosensitizer* untersucht haben, und auch ihre Derivate wurden noch nicht in Kombination mit Bestrahlung betrachtet. Im Vergleich mit CAI 1 und CAI 3, die einen DMF 10 von 1,47 bzw. 1,75 zeigten, ist der in dieser Arbeit ermittelte DMF 10 zwar geringer, jedoch wurde auch eine geringere Konzentration für die Untersuchung verwendet (69). Petrenko *et al.* konnten in MDA-MB-231-Zellen eine 5,7-fach erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach Behandlung mit MSBA-S nachweisen (87). Dies könnte ein möglicher Mechanismus des radiosensitivierenden Effektes von MSBA-S sein und zusätzlich einen Beitrag zu seiner zytotoxischen Wirkung leisten.

Weiterführende Untersuchungen an MSBA-S könnten Aufschluss über die genauen Mechanismen seiner Wirkungen auf Tumorzellen geben.

Auch die Inhibition von CA IX wurde schon hinsichtlich ihres Effekts auf die Radiosensitivität von humanen Mammakarzinomzellen untersucht. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe verglichen die Inhibierung von CA IX durch siRNA mit dem CAI U104. U104 zeigte stärkere Effekte auf die Radiosensitivität als die RNA-Interferenz (68). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Effekte der CA IX- Inhibierung durch siRNA durch CA XII kompensiert

werden (68). U104 hingegen unterdrückt die Aktivität beider Enzyme und zeigt somit auch stärkere Effekte auf die Radiosensitivität. Demnach könnten weitere, neu synthetisierte Triterpene mit einer gleichermaßen hohen Selektivität für CA IX als auch für CA XII starke *radiosensitizer* sein und sollten zukünftig weiter ins Interesse der Tumorforschung rücken.

5.6 Zusammenfassung

Naturstoffe, insbesondere pentazyklische Triterpene, haben vielversprechende gesundheitsfördernde und antitumoröse Eigenschaften. Die Konjugation von Triterpenen und einer Sulfamatgruppe als CAI stellt einen interessanten Ansatz dar, um neue Behandlungsmöglichkeiten für solide Tumoren zu finden, die die Hypoxie induzierte CA IX exprimieren und somit mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Triterpensulfamate mit einer hohen Selektivität für CA IX, aber auch für CA XII könnten somit die antitumorösen Eigenschaften der Triterpene mit den vielfältigen Effekten der CAI, wie unter anderem Hemmung der Proliferation, der Migration und vor allem Steigerung der Radiosensitivität durch zahlreiche *pathways* vereinen (94). Die aus den Triterpenen Betulinsäure, Oleanolsäure, Ursolsäure, Platansäure und Maslinsäure hergestellten Triterpensulfamate BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S zeigten in dieser Arbeit alle eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität auf humane Mammakarzinomzelllinien. Besonders auffällig war MSBA-S mit einer sehr hohen Zytotoxizität (IC_{50} -Werte zwischen 3,7 μ M und 5,8 μ M). Zudem ließ sich die Zytotoxizität unter Hypoxie verstärkt beobachten. Diese Ergebnisse korrelieren mit Untersuchungen an anderen MS-Derivaten an verschiedenen Tumorzelllinien, die den Derivaten ebenfalls eine hohe Zytotoxizität zuwiesen. Generell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Triterpen-Grundgerüst in den verwendeten Verbindungen für die Zytotoxizität verantwortlich ist, da den verschiedenen Substanzen mit jeweils einer Sulfamat-Gruppe unterschiedliche Zytotoxizitäten nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurde bereits durch Csuk *et al.* die Affinität der Triterpensulfamate gegenüber verschiedener CA untersucht. Für alle Derivate, auch MSBA-S, ließ sich eine Inhibierung der CA u.a. der CA XI nachweisen. Die Daten der Inhibierungsstudien (K_i -Werte) zeigen in Zusammenschau der in dieser Arbeit gesammelten Daten bezüglich der

Zytotoxizität der Substanzen, dass eine effektive CA XI-Hemmung nicht mit einer hohen Zytotoxizität korreliert.

Alle Substanzen bewirkten bei den Mammakarzinomzelllinien eine Induktion der Apoptose. Es ließ sich eine Diskrepanz zwischen Zytotoxizität und Apoptoseinduktion beobachten, welche bei MSBA-S besonders groß ausfiel. Dies lässt auf die Induktion weiterer Zelltodformen schließen. Weiterhin könnte die Apoptoseinduktion noch über den in dieser Arbeit beobachteten Zeitraum hinausgehen.

Den größten Effekt auf die Zellmigration ließ sich nach Behandlung mit BSBA-S beobachten. Auch BS und andere BS-Derivate rufen die Reduktion der Migration in Tumorzelllinien hervor. PSBA-S und USBA-S bewirkten ebenfalls eine geringe Reduktion der Migration. OSBA-S und MSBA-S zeigten dagegen keine Migrationshemmung bei Mammakarzinomzellen. Die Kombination der Derivate BSBA-S und MSBA-S mit Radiotherapie führt zu einer leichten Radiosensitivierung. Der stärkste Effekt wurde nach der Behandlung mit MSBA-S beobachtet, wobei aufgrund der hohen Zytotoxizität eine deutlich geringere Konzentration als bei BSBA-S eingesetzt wurde.

Insgesamt wurden fünf neue Triterpen-Derivate charakterisiert, welche für die Therapie von Mammakarzinomen interessante Eigenschaften aufweisen. Hervorzuheben ist MSBA-S, welches sich durch starke Zytotoxizität und Radiosensitivierung hervortat. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Möglichkeiten und Chancen für die Behandlung des humanen Mammakarzinoms aufzuklären. Von Interesse könnten hierbei der Einsatz von Triterpen-Derivaten sein, die selektiv die beiden tumorassoziierten Carboanhydrasen CA IX und CA XII inhibieren. Die Erhöhung der Selektivität der Triterpensulfamate auf hypoxische Tumorzellen könnte die Anwendbarkeit auch im Tiermodell und später in klinischen Studien verbessern. Der Einsatz von Triterpensulfamaten stellt somit einen vielversprechenden Ansatz für die Mammakarzinomtherapie dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Lebeau A, Denkert C. Aktualisierte WHO-Klassifikation der Tumoren der Mamma: Die wichtigsten Änderungen. *Der Pathologe*. 2021;42:270–80. <https://doi.org/10.1007/s00292-021-00934-9>
2. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018 Jan;27(1):95-120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>.
3. Jia WJ, Jia HX, Feng HY, Yang YP, Chen K, Su FX. HER2-enriched tumors have the highest risk of local recurrence in Chinese patients treated with breast conservation therapy. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(1):315–20. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.1.315>.
4. Li J, Chen Z, Su K, Zeng J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(7):8500–5.
5. Chaudhary L, Wilkinson K, Kong A. Triple-Negative Breast Cancer: Who Should Receive Neoadjuvant Chemotherapy? *Surg Oncol Clin N Am*. 2018 Jan 1;27(1):141–53. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.004>.
6. Zentrum für Krebsregisterdaten- Brustkrebs [Internet]. [cited 2021 Oct 18]. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html
7. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387–97. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>.
8. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016 Dec 1;59(4):651–72. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>.
9. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera E V., et al. American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan 1;62(1):30–67. <https://doi.org/10.3322/CAAC.20140>.
10. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. London, England: *Lancet*. 2003;362(9382):419–27. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14065-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14065-2).
11. Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int*. 2013, 2013:747318. <https://doi.org/10.1155/2013/747318>.
12. Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, Somali I, Altun Z, Aktas S, et al. BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *J BUON*. 2018 Jul 1;23(4):862–6.
13. Fuller MS, Lee CI, Elmore JG. Breast Cancer Screening: An Evidence-Based Update. *Med Clin North Am*. 2015 May 1;99(3):451–68.
14. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [Internet]. 2021. [cited 2021 Aug 07]. Available from: https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf.
15. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2016;57:9–16. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>.
16. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011 Nov 1;378(9804):1707–16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61629-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61629-2).
17. Anampa J, Makower D, Sparano JA. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Med*. 2015;13:195-208. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0439-8>.

18. Minniti G, Goldsmith C, Brada M. Radiotherapy. In: W. Grisold and R. Soffietti, Handbook of Clinical Neurology. 3. Elsevier B.V. 2012. 215–28.
19. Nicolay N. Biologische Grundlagen der Radioonkologie. In: F. Giordano and F. Wenz, Strahlentherapie kompakt. 3. Urban & Fischer; 2019. 337–47. <https://doi.org/10.1016/B978-3-437-23292-3.00035-0>.
20. Wouters BG, Brown JM. Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the “hypoxic fraction” in determining tumor response to fractionated radiotherapy. *Radiat Res.* 1997;147(5):541–50.
21. Vaupel P, Briest S, Höckel M. Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien Med Wochenschr.* 2002;152(13–14):334–42. <https://doi.org/10.1046/J.1563-258X.2002.02032.X>.
22. Svastova E, Hulikova A, Rafajova M, Zatovicova M, Gibadulinov A, Casini A, et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Letters.* 2004;577:439–45.
23. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature.* 2012;491:364–73. <https://doi.org/10.1038/nature11706>.
24. Tsai Y, Wu K. Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis. *J Biomed Sci.* 2012;19(1): 102–109. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-102>.
25. Dubois L, Peeters S, Lieuwes NG, Geusens N, Thiry A, Wigfield S, et al. Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother Oncol.* 2011 Jun 1;99(3):424–31.
26. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use. *Semin Cancer Biol.* 2015 Apr 1;31:52–64. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2014.08.002>.
27. Zamanova S, Shabana AM, Mondal UK, Ilies MA. Carbonic anhydrases as disease markers. *Expert Opin Ther Pat.* 2019;29(7):509–33. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1629419>
28. Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, Mornon JP, Zelnik V, Opavsky R, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene.* 1994;9(10):2877–88.
29. Karhumaa P, Kaunisto K, Parkkila S, Waheed A, Pastoreková S, Pastorek J, et al. Expression of the transmembrane carbonic anhydrases, CA IX and CA XII, in the human male excurrent ducts. *Mol Hum Reprod.* 2001;7(7):611–6.
30. Zheng Y, Xu B, Zhao Y, Gu H, Li C, Wang Y, et al. CA1 contributes to microcalcification and tumorigenesis in breast cancer. *BMC Cancer.* 2015;15(1):679–94. <https://doi.org/10.1186/s12885-0151707-x>.
31. Zhou Y, Mokhtari R, Pan J, Cutz E, Yeger H. Carbonic anhydrase II mediates malignant behavior of pulmonary neuroendocrine tumors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;52(2):183–92. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2014-0054OC>.
32. Parks SK, Cormerais Y, Pouysségur J. The Journal of Physiology Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology. *Physiol Soc.* 2017;595:2439–50.
33. Morris J, Chiche J, Grellier C, Lopez M, Bornaghi L, Maresca A, et al. Targeting hypoxic tumor cell viability with carbohydrate-based carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. *J Med Chem.* 2011 Oct 13;54(19):6905–18. <https://doi.org/10.1021/JM200892S>.

34. Dubois L, Peeters S, van Kuijk S, Yaromina A, Lieuwes N, Saraya R, et al. Targeting carbonic anhydrase IX by nitroimidazole based sulfamides enhances the therapeutic effect of tumor irradiation: a new concept of dual targeting drugs. *Radiother Oncol.* 2013 Sep;108(3):523–8. <https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2013.06.018>.
35. Duivenvoorden W, Hopmans S, Gallino D, Farrell T, Gerdes C, Glennie Di, et al. Inhibition of carbonic anhydrase IX (CA9) sensitizes renal cell carcinoma to ionizing radiation. *Oncol Rep.* 2015;34:1968–76. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4184>
36. Kessler JH, Mullauer FB, de Roo GM, Medema JP. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.* 2007 Jun 18;251(1):132–45. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2006.11.003>
37. Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 2002;175(1):17–25. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00718-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00718-2).
38. Bishayee A, Ahmed S, Brankov N, Perloff M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Bioscience.* 2011;16:980–96. <https://doi.org/10.1109/leoswt.2008.4444364>
39. Bache M, Zschornak M, Passin S, Kessler J, Wichmann H, Kappler M, et al. Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions. *Radiat Oncol.* 2011;6(1). <https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-111>
40. Jiang Q, Liu D, Sun S, Hu J, Tan L, Wang Y, et al. Critical role of connexin43 in zebrafish late primitive and definitive hematopoiesis. *Fish Physiol Biochem.* 2010;36(4):945–51. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9371-1>
41. Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B, et al. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2000;114(5):935–40. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2000.00972.X>
42. Žiberna L, Šamec D, Mocan A, Nabavi SF, Bishayee A, Farooqi AA, et al. Oleanolic Acid Alters Multiple Cell Signaling Pathways: Implication in Cancer Prevention and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18:643. <https://doi.org/10.3390/ijms18030643>.
43. Wang J, Yu M, Xiao L, Xu S, Yi Q, Jin W. Radiosensitizing effect of oleanolic acid on tumor cells through the inhibition of GSH synthesis in vitro. *Oncol Rep.* 2013;30(2):917–24. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2510>
44. Song X, Liu CC, Hong YR, Zhu XC. Anticancer activity of novel oleanolic acid methyl ester derivative in HeLa cervical cancer cells is mediated through apoptosis induction and reactive oxygen species production. *Bangladesh J Pharmacol.* 2015;10(4):896–902. <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i4.23709>.
45. Wu J, Yang C, Guo C, Li X, Yang N, Zhao L, et al. SZC015, a synthetic oleanolic acid derivative, induces both apoptosis and autophagy in MCF-7 breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2016 ;244:94–104. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2015.11.013>.
46. Yin R, Li T, Tian JX, Xi P, Liu RH. Ursolic acid, a potential anticancer compound for breast cancer therapy. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(4):568–74. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1203755>
47. Checker R, Sandur SK, Sharma D, Patwardhan RS, Jayakumar S, Kohli V, et al. Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF-κB, AP-1 and NF-AT. *PLoS One.* 2012;7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031318>

48. Wolska K, Grudniak A, Fiecek B, Kraczkiewicz-Dowjat A, Kurek A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Open Life Sci.* 2010;5(5):543–53. <https://doi.org/10.2478/s11535-010-0045-x>.
49. Castro AJG, Frederico MJS, Cazarolli LH, Mendes CP, Bretanha LC, Schmidt ÉC, et al. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2015 Jan 1;1850(1):51–61. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2014.10.001>
50. Eloy JO, Saraiva J, Albuquerque S de, Marchetti JM. Preparation, characterization and evaluation of the in vivo trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate. *Brazilian J Pharm Sci.* 2015;51(1):101–9. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000100011>
51. Hua SX, Huang RZ, Ye MY, Pan YM, Yao GY, Zhang Y, et al. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel ursolic acid derivatives as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2015;95:435–52. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2015.03.051>
52. Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB, et al. Anti-AIDS Agents, 11. Betulinic Acid and Platanic Acid as Anti-HIV Principles from *Syzygium claviflorum*, and the Anti-HIV Activity of Structurally Related Triterpenoids. *J Nat Prod.* 1994;57(2):243–7. <https://doi.org/10.1021/np50104a008>
53. Heller L, Kahnt M, Loesche A, Grabandt P, Schwarz S, Brandt W, et al. Amino derivatives of platanic acid act as selective and potent inhibitors of butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem.* 2017;126:652–68. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.11.056>.
54. Abdel Bar FM, Zaghloul AM, Bachawal S V, Sylvester PW, Ahmad KF, Sayed KA El. Antiproliferative Triterpenes from *Melaleuca ericifolia*. *J Nat Prod.* 2008;71:1787–90. <https://doi.org/10.1021/np800360a>
55. Reyes-Zurita FJ, Rufino-Palomares EE, Lupiáñez JA, Cascante M. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Lett.* 2009;273(1):44–54. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2008.07.033>
56. Thakor P, Song W, Subramanian RB, Thakkar VR, Vesey DA, Gobe GC. Maslinic Acid Inhibits Proliferation of Renal Cell Carcinoma Cell Lines and Suppresses Angiogenesis of Endothelial Cells. *J Kidney Cancer VHL.* 2017;4(1):16–24. <http://doi.org/10.15586/jkcvhl.2017.64>.
57. Liu Y, Lu H, Dong Q, Hao X, Qiao L. Maslinic acid induces anticancer effects in human neuroblastoma cells mediated via apoptosis induction and caspase activation, inhibition of cell migration and invasion and targeting MAPK/ERK signaling pathway. *AMB Express.* 2020;10(104). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01035-1>.
58. Huang L, Guan T, Qian Y, Huang M, Tang X, Li Y, et al. Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *Eur J Pharmacol.* 2011;672(1–3):169–74. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2011.09.175>
59. Parra A, Rivas F, Lopez PE, Garcia-Granados A, Martinez A, Albericio F, et al. Solution- and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(3):1139–45. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2008.12.041>.
60. Sommerwerk S, Heller L, Kuhfs J, Csuk RE. Urea derivatives of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines. *Eur J Med Chem.* 2016;119:1–16. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.051>.

61. Mukherjee R, Kumar V, Srivastava S, Agarwal S, Burman A. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: structure activity relationship. *Anticancer Agents Med Chem.* 2006;6(3):271–9. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2008.12.041>.
62. Winum JY, Pastorekova S, Jakubickova L, Montero JL, Scozzafava A, Pastorek J, et al. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with bis-sulfamates. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(3):579–84.
63. Vanchanagiri K, Emmerich D, Brusckke M, Bache M, Seifert F, Csuk R, et al. Synthesis and biological investigation of new carbonic anhydrase IX (CAIX) inhibitors. 2018; <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.014>.
64. Schwarz S, Sommerwerk S, Lucas SD, Heller L, Csuk R. Sulfamates of methyl triterpenoates are effective and competitive inhibitors of carbonic anhydrase II. *Eur J Med Chem.* 2014;86:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.051>.
65. Güttler A, Eiselt Y, Funtan A, Thiel A, Petrenko M, Keßler J, et al. Betulin Sulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors and Anticancer Agents in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci Artic.* 2021;22(16):8808–29. <https://doi.org/10.3390/ijms22168808>.
66. Bache M, Heise N V., Thiel A, Funtan A, Seifert F, Petrenko M, et al. Combination of Betulinic Acid Fragments and Carbonic Anhydrase Inhibitors—A New Drug Targeting Approach. *Pharmaceutics.* 2024;16(3):1–20. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030401>
67. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications. *Future Med Chem.* 2011;3(9):1165–80. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2004.11.058>
68. Güttler A, Theuerkorn K, Riemann A, Wichmann H, Kessler J, Thews O, et al. Cellular and radiobiological effects of carbonic anhydrase IX in human breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2019;41(4):2585–94. <https://doi.org/10.3892/OR.2019.7001>
69. Bache M, Münch C, Güttler A, Wichmann H, Theuerkorn K, Emmerich D, et al. Betulinyl Sulfamates as Anticancer Agents and Radiosensitizers in Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16:26249–62. <https://doi.org/10.3390/ijms161125953>
70. Hackett AJ, Smith HS, Springer EL, Owens RB, Nelson-Rees WA, Riggs JL, et al. Two syngeneic cell lines from human breast tissue: The aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 1977;58(6):1795–806. <https://doi.org/10.1093/jnci/58.6.1795>
71. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions 1,2. *Journal of the National Cancer Institute.* 1974;53:661–74.
72. Lasfargues EY, Ozzello L. Cultivation of Human Breast Carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1958;21:1131–47.
73. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma 1,2. *J he Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1409–16.
74. Sommerwerk S, Heller L, Kuhfs J, Csuk R. Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides - The substantial role of an aromatic moiety alignment. *Eur J Med Chem.* 2016 ;122:452–64. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.06.053>.
75. Sommerwerk S, Heller L, Csuk R. Synthesis and Cytotoxic Activity of Pentacyclic Triterpenoid Sulfamates. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 2015;348:46–52. <https://doi.org/10.1002/ardp.201400297>
76. Weber LA, Funtan A, Paschke R, Delarocque Id J, Kalbitz J, Meißner J, et al. In vitro assessment of triterpenoids NVX-207 and betulinyl-bis-sulfamate as a topical treatment for equine skin cancer. *PLoS ONE.* 2020;15(11):1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241448>.

77. Petrenko M, Güttler A, Funtan A, Keßler J, Emmerich D, Paschke R, et al. Combined 3-O-acetylbetulin treatment and carbonic anhydrase IX inhibition results in additive effects on human breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2021;333:23-32. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109326>
78. Kessler J, Hahnel A, Wichmann H, Rot S, Kappler M, Bache M, et al. HIF-1a inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *MBC Cancer.* 2010; 10:605-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-605>.
79. Bache M, Bernhardt S, Passin S, Wichmann H, Hein A, Zschornak M, et al. Betulinic Acid Derivatives NVX-207 and B10 for Treatment of Glioblastoma-An in Vitro Study of Cytotoxicity and Radiosensitization. *Int J Mol Sci.* 2014;15:19777-790. <https://doi.org/10.3390/ijms151119777>.
80. Pan J, Lau J, Mesak F, Hundal N, Pourghiasian M, Liu Z, et al. Synthesis and evaluation of 18 F-labeled carbonic anhydrase IX inhibitors for imaging with positron emission tomography. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2014;29(2):249–55. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.773994>.
81. Braciuliene A, Janulis V, Petrikaite V. The Chemo-Sensitizing Effect of Doxorubicin of Apple Extract-Enriched Triterpenic Complex on Human Colon Adenocarcinoma and Human Glioblastoma Cell Lines. *Pharmaceutics.* 2022;14:2593-615. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14122593/S1>.
82. Wang YJ, Liu JB, Dou YC. Sequential treatment with betulinic acid followed by 5-fluorouracil shows synergistic cytotoxic activity in ovarian cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(1):252-59.
83. Lisiak N, Paszel-Jaworska A, Bednarczyk-Cwynar B, Zaprutko L, Kaczmarek M, Rybczyńska M. Methyl 3-hydroxyimino-11-oxoolean-12-en-28-oate (HIMOXOL), a synthetic oleanolic acid derivative, induces both apoptosis and autophagy in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2014;208(1):47–57.
84. Dar BA, Lone AM, Shah WA, Qurishi MA. Synthesis and screening of ursolic acid-benzylidene derivatives as potential anti-cancer agents. *Eur J Med Chem.* 2016;111:26–32.
85. Ganaie BA, Shahid M, Rashid A, Ara T, Banday JA, Malik F, et al. Platanic Acid-Aryl Enones as Potential Anticancer Compounds: Synthesis and Biological Profiling against Breast, Prostate and Lung Cancer Cell Lines. *Chem Biodiversity.* 2021;18:1-8: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100292>
86. Sommerwerk S, Heller L, Kerzig C, Kramell AE, Csuk R. Rhodamine B conjugates of triterpenoic acids are cytotoxic mitocans even at nanomolar concentrations. *Eur J Med Chem.* 2017;127:1–9. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.12.040>
87. Petrenko M, Güttler A, Pflüger E, Serbian I, Kahnt M, Eiselt Y, et al. MSBA-S – A pentacyclic sulfamate as a new option for radiotherapy of human breast cancer cells. *Eur J Med Chem.* 2021;224:113721-32. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113721>.
88. Luo R, Fang D, Chu P, Wu H, Zhang Z, Tang Z. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:1321–30. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.018>.
89. Jänicke RU. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Sep 14;117(1):219–21. <https://doi.org/10.1007/S10549-008-0217-9/METRICS>.
90. El-Baba C, Amro Baassiri ·, Kiriako · Georges, Dia B, Fadlallah S, Moodad S, et al. Terpenoids' anti-cancer effects: focus on autophagy. *Apoptosis.* 2021;26:491–511. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01684-y>
91. Tian Y, Xu H, Farooq AA, Nie B, Chen X, Su S, et al. Maslinic acid induces autophagy by down-regulating HSPA8 in pancreatic cancer cells. *Phyther Res.* 2018;32(7):1320–31. <https://doi.org/10.1002/PTR.6064>.

92. Tang L, Lv SJ, Wu Z, Qian M, Xu Y, Gao X, et al. Role of betulinic acid derivative SH-479 in triple negative breast cancer and bone microenvironment. *Oncol Lett.* 2021;22:605-13. <https://doi.org/10.3892/OL.2021.12866>.
93. Eder-Czembirek C, Erovic BM, Czembirek C, Brunner M, Selzer E, Pötter R, et al. Betulinic Acid a Radiosensitizer in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Strahlentherapie und Onkol.* 2010;186(3):143–8. <https://doi.org/10.1007/s00066-010-2069-6>.
94. Ward C, Meehan J, Gray M, Kunkler IH, Langdon SP, Argyle DJ. Carbonic anhydrase IX (CAIX), cancer, and radiation responsiveness. *Metabolites.* 2018;8(1):1–18. <https://doi.org/10.3390/metabo8010013>.

7 Thesen

1. Die Triterpensulfamate BSBA-S, OSBA-S, USBA-S, PSBA-S und MSBA-S haben eine zytotoxische Wirkung gegenüber Mammakarzinomzellen.
2. Die Zytotoxizität der Triterpensulfamate steigt mit zunehmender Konzentration.
3. Behandlung mit den oben genannten Triterpensulfamaten verursacht eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens.
4. Hypoxie verstärkt die zytotoxische Wirkung der Triterpensulfamate.
5. Die Triterpensulfamate verursachen eine Apoptoseinduktion in humanen Mammakarzinomzellen.
6. BSBA-S, USBA-S und PSBA-S hemmen die Migration in der *triple*-negativen Zelllinie MDA-MB-231.
7. BSBA-S und MSBA-S wirken in der *triple*-negativen Zelllinie MDA-MB-231 als *radiosensitizer*.
8. MSBA-S ist ein vielversprechendes pentazyklisches Triterpensulfamat, welches in humanen Mammakarzinomzellen stark zytotoxisch, apoptoseinduzierend und radiosensitivierend wirkt.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Elena Anne Pflüger

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dirk Vordermark für das Ermöglichen dieser Dissertation.

Besonders danken möchte ich Dr. Matthias Bache für Bereitstellung der Forschungsräumlichkeiten, der Geräte als auch seiner Expertise und Erfahrung.

Mein Dank gilt des weiteren Marina Petrenko für die Einarbeitung und Betreuung während der Forschungsarbeit, als auch für die moralische Unterstützung.

Außerdem danke ich Dr. Antje Güttler, Gabriele Thomas und Jana Block für ihre Unterstützung und Zuarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Isabelle Pflüger und Andreas Pflüger, welche mir das Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben, meinen Brüdern und meinem Freund Jan Bartuschka für seine stets liebevolle Unterstützung.