

**Neue Carboanhydraseinhibitoren – Zell- und strahlenbiologische
Charakterisierung des Betulin-Acetazolamid-Konjugates 18 in
Mammakarzinomzelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Elisabeth Schacht

Betreuer: Prof. Dr. med. Dirk Vordermark

Gutachter: Prof. Alexander Eckert, Nürnberg

Prof. Luitpold Distel, Erlangen

Datum der Verteidigung: 28.01.2026

Referat

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebsart für Frauen. Besonders das schnelle, invasive Wachstum und die hypoxischen, therapieresistenten Tumorareale stellen zentrale Probleme für die operative Behandlung und die Radiochemotherapie dar.

Die tumorassoziierte Carboanhydrase IX (CA IX) wird vom Hypoxie-induzierenden-Faktor 1 (HIF-1) beeinflusst, welcher in hypoxischen Arealen nachweisbar ist. CA IX ist an der Regulation des extra- und intrazellulären pH-Wertes beteiligt. Somit spielt sie für das Überleben (hypoxischer) Tumorzellen eine wichtige Rolle. Sowohl HIF-1 als auch CA IX werden als Hypoxie-spezifische Tumormarker genutzt. Betulin und Betulinsäure (BS) gelten als entzündungshemmend, antineoplastisch und antiviral. Einzigartig ist, dass BS insbesondere gegen Tumorzellen wirkt, während untransformierte Zellen BS mehr tolerieren. Durch die Synthese von Derivaten kann die Anwendbarkeit der schlecht löslichen BS für die Tumorthherapie verbessert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Substanz 18, ein Konjugat von 3-O-Acetylbetulin (3AC) und Acetazolamid (einem Inhibitor der CA IX), auf die Behandlung von Mammakarzinomzellen unter Normoxie und Hypoxie hat.

Zytotoxizitätsanalysen (Sulforhodamin B (SRB)-Assay, Klonogenitätsassay) an den Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T ergaben, dass die Substanz 18 im Vergleich mit den beiden Ausgangssubstanzen eine erhöhte Zytotoxizität aufweist. Zelltoduntersuchungen (Annexin V-PI-Färbung, PARP-Spaltung) zeigen nach Behandlung mit Substanz 18 eine deutliche Apoptoseinduktion, insbesondere unter Hypoxie in den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7. Mittels Scratch-Assay konnte gezeigt werden, dass die Substanz 18 unter Normoxie die Migration in Mammakarzinomzellen inhibiert. Außerdem konnte mittels Zellkoloniebildungstest nach Behandlung mit der Substanz 18 eine deutliche Radiosensitivierung bei den untersuchten Mammakarzinomzelllinien unter Hypoxie nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen mit der Substanz 18 haben gezeigt, dass durch chemische Modifikation von Betulin eine neue, effektive Substanz synthetisiert wurde, die für die Behandlung von Mammakarzinomen interessante therapeutische Eigenschaften aufweist.

Schacht, Elisabeth: Neue Carboanhydraseinhibitoren - Zell- und strahlenbiologische Charakterisierung des Betulin-Acetazolamid-Konjugates 18 in Mammakarzinomzelllinien, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2025

Inhaltsverzeichnis

REFERAT	II
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DAS MAMMAKARZINOM.....	1
1.2 TUMORHYPOXIE UND BESTRAHLUNG	2
1.3 CARBOANHYDRASE IX	3
1.4 BETULINSÄURE UND BETULINSÄUREDERIVATE	6
2 ZIELSTELLUNG	8
3 MATERIAL UND METHODEN	9
3.1 MATERIAL	9
3.1.1 Zelllinien	9
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	9
3.1.3 Puffer, Medium, Lösungen.....	11
3.1.4 Zellkultivierung.....	11
3.1.5 Antikörper	13
3.1.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte	13
3.2 METHODEN	15
3.2.1 Zellkultivierung und Passagierung.....	15
3.2.2 Zellzahlbestimmung	15
3.2.3 Mykoplasmenachweis	15
3.2.4 Zellkultivierung unter hypoxischen Bedingungen.....	15
3.2.5 Bestrahlung.....	16
3.2.6 Behandlung der Zellen durch Inkubation der Substanzen.....	16
3.2.7 SRB-Assay.....	16
3.2.8 Zellkoloniebildungstest und Strahlensensitivität	17
3.2.9 Zellmigrationstest (Wundheilungsassay).....	18
3.2.10 Quantifizierung der Bildung von ROS (CM-H2DCF-DA-Assay).....	19
3.2.11 Annexin-PI-Färbung.....	20
3.2.12 Cell-Titer-Glo Assay.....	22
3.2.13 Proteinbiochemische Methoden.....	23

3.2.14	<i>Statistik</i>	25
4	ERGEBNISSE	26
4.1	EFFEKTE VON 18 UND 16+3AC AUF DEN PROTEINGEHALT VON HIF-1 α , CA IX UND CA XII MITTELS WESTERN BLOT.....	26
4.2	ZYTOTOXIZITÄTSANALYSE UND KOLONGENES ZELLÜBERLEBEN.....	28
4.2.1	<i>Zytotoxizitätsanalyse mittels SRB-Assay</i>	28
4.2.2	<i>Einfluss auf das klonogene Zellüberleben</i>	30
4.3	EINFLUSS AUF DIE ZELLMIGRATION.....	32
4.4	ZELLTODANALYSE.....	34
4.4.1	<i>PARP-Spaltung</i>	34
4.4.2	<i>Annexin-PI</i>	36
4.4.3	<i>Analyse von Zelltodarten durch Zelltodinhibitoren mittels CellTiter-Glo- Assay</i>	38
4.5	EINFLUSS AUF DIE ROS-INDUKTION	39
4.6	EINFLUSS AUF DIE RADIOSENSITIVITÄT	41
5	DISKUSSION	45
5.1	EINFLUSS VON 18 UND 16+3AC AUF DEN CA IX- UND CA XII-PROTEINGEHALT UND AKTIVITÄT	46
5.2	ZYTOTOXIZITÄTSANALYSE	47
5.2.1	<i>SRB</i>	47
5.2.2	<i>Einfluss auf das klonogene Zellüberleben</i>	48
5.3	EINFLUSS AUF DIE ZELLMIGRATION.....	49
5.4	ZELLTODANALYSE.....	51
5.5	EINFLUSS AUF DIE ROS-INDUKTION	52
5.6	EINFLUSS AUF DIE RADIOSENSITIVITÄT	54
5.7	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	56
6	LITERATURVERZEICHNIS	59
7	THESEN	72
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	XI
	DANKSAGUNG	XII

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

3AC	3-O-Acetylbetulin
α	Alpha
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> (antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität)
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i> (erworbenes Immundefekt-Syndrom)
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AK	Antikörper
ATG	<i>autophagy-related protein</i> (Autophagieprotein)
AZA	Acetazolamid
β	Beta
bidest.	bidestilliert
BRCA	<i>breast cancer gene</i> (Brustkrebsgen)
BS	Betulinsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Carboanhydrase
CA 9/CA IX	Carboanhydrase 9/Carboanhydrase IX
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAI	Carboanhydrase-Inhibitor
cm	Zentimeter
CM-DCF	5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein
CM-H ₂ DCF	5-(and 6)-chloromethyl-2',7'- dichlorodihydrofluorescein
CM-H ₂ DCF-DA	5-(and 6)-chloromethyl-2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetylerster
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DBS	<i>double strand break</i> (Doppelstrangbruch)
dest.	destilliert

DFO	Desferrioxamin
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMF 10	Dosis modifizierender Faktor bei 10 % Überleben
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DRAM	<i>damage-regulated autophagy modulator</i> (schadenregulierter Autophagie-Modulator)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure Erythropoietin
EPO	Erythropoietin
et al.	et alii (und andere)
FKS	fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
γ	Gamma
g	Gramm
GLUT1/3	Glukosetransporter 1/3
Gy	Gray
h	<i>hour</i> (Stunde)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)ethansulfonsäure
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i> (Hypoxie-induzierter Faktor)
HRE	<i>hypoxia response element</i> (Hypoxieantwort-Element)
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i> (Apoptose-Inhibitorprotein)
IC50	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (mittlere inhibitorische Konzentration)
IGF-2	<i>insulin-like growth factor 2</i> (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 2)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
OER	<i>oxygen enhancement ratio</i> (Sauerstoffverstärkungsfaktor)
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerasen
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SRB	Sulforhodamin B
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris-buffered saline</i> (Trisgepufferte Salzlösung)
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TP53	Tumorprotein 53
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan
Tris-HCl	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan-hydrochlorid
U	<i>unit</i> (Einheit)
U-104	((4-[[[(4-Fluorophenyl)amino]carbonyl]amino] benzenesulfonamide)
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VHL	Von Hippel-Lindau
vs.	versus
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Zelllinien	9
Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper.....	13
Tabelle 3: IC ₅₀ -Werte von 18, 16+3AC und 16 (n ≥ 3, Mittelwerte ± SD).....	29
Tabelle 4: Dosis modifizierender Faktor 10 (DMF 10).....	44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktion der Carboanhydrase IX.....	4
Abbildung 2: Strukturformeln	7
Abbildung 3: Chemische Reaktion beim ROS-Assay).....	19
Abbildung 4: Dot Plot der Annexin-PI Färbung.....	21
Abbildung 5: Luciferin/Luciferase-Reaktion.....	22
Abbildung 6: Western Blot-Analysen.....	27
Abbildung 7: SRB-Assay der Zelllinie MDA-MB-231.....	28
Abbildung 8: Klonogenes Zellüberleben.....	31
Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen zum Wundheilungsassay.....	33
Abbildung 10: Migration der Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T.....	33
Abbildung 11: Western Blot-Analyse des Protein PARP.....	35
Abbildung 12: Dot Plot der Annexin-PI Färbung.....	37
Abbildung 13: Relatives Zellüberleben der Zelllinie MDA-MB-231	38
Abbildung 14: CellTiter-Glo-Assay der Zelllinie MDA-MB-231	39
Abbildung 15: ROS-Induktion nach 24 h Inkubation.....	41
Abbildung 16: Einfluss der Substanzen 18, 16 bzw. der Kombination aus 16 und 3AC auf das klonogene Zellüberleben in Abhängigkeit von der Strahlendosis und der Radiosensitivität	43

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Brustkrebs ist die häufigste Krebsdiagnose und Krebstodesursache für Frauen weltweit. Statistisch gesehen erhält jede achte Frau diese Diagnose. Mehr als zwei Drittel der gestellten Diagnosen betreffen Frauen die 50 Jahre oder älter sind [1].

Die molekulargenetischen Subtypen werden anhand des HER2-Status, des Hormonrezeptorstatus (HR) und des Proliferationsmarkers Ki-67 vorgenommen. Diese Einteilung lässt Aussagen auf die Prognose des Tumors zu und ist an verschiedene Therapiekonzepte gekoppelt [2].

Zu den Risikofaktoren einer Brustkrebserkrankung zählt ein langer hormonell aktiver Zeitraum vieler Frauen. Das bedeutet frühe Menarche, späte Menopause, späte erste Schwangerschaft und Geburt, sowie Hormonersatztherapie (hormonelle Kontrazeptiva während der Menopause) [3, 4]. Aber auch genetische Faktoren, wie Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2, welche 15-20 % der familiär bedingten Mammakarzinome ausmachen [5], das Li-Fraumeni-Syndrom, eine autosomal dominant vererbte Mutation des p53-Tumorsuppressorgens, wie auch eine PTEN- Mutation (Cowden Syndrom) zählen darunter [6]. Weitere Risikofaktoren sind Adipositas, starker Alkohol- und Tabakabusus, ein Mangel der Vitamine A und E, sowie eine fettreiche Ernährung und Bewegungsmangel [7].

Für jede Frau stellt als Basisdiagnostik das Abtasten der Brust eine Grundlage dar, um Auffälligkeiten früh zu erkennen. Liegt ein auffälliger Tastbefund vor, wird zur genaueren Diagnostik eine Mammografie mittels Röntgenuntersuchung oder eine Sonografie durchgeführt [8]. Bei einem Karzinomverdacht wird eine sogenannte Mamma- oder eine Lymphknotenbiopsie (Stanz- oder Vakuumbiopsie) durchgeführt [9]. Bestätigt sich die Diagnose, wird mittels gängiger *Staging*-Verfahren, wie dem CT, der Skelettszintigrafie und bei unklarem Befund dem PET, das Karzinom mittels TNM-Klassifikation eingeteilt und mit dem Grading der Differenzierungsgrad definiert [10, 11]. In der Therapie des Mammakarzinoms wird unterschieden in kurativ (Behandlung der Ursache), welche operative Maßnahmen in Kombination mit einer Strahlentherapie und/oder Systemtherapie umfasst und palliativ (Milderung der Symptome) mit einer systemischen Therapie. Bei den operativen Verfahren unterscheidet man zwischen einer, heutzutage bevorzugten, brusterhaltenden OP (BET) und der radikalen Mastektomie (komplette Entfernung der Brustdrüse) [12]. Ziel beider Operationsmöglichkeiten, als

Haupttherapie in der Behandlung von Mammakarzinomen, ist die komplette Resektion des Tumors (R0). Als systemische Therapie gibt es die Chemotherapie, welche als Therapie der ersten Wahl Anthracyclin und Taxan empfiehlt. Dabei wird ein vollständiges Ansprechen der Behandlung bei 30 bis 45 % der Patienten erreicht [13]. Ziel der Bestrahlung ist die Reduktion von Rezidiven und Fernmetastasen. Eine Strahlentherapie ist bei allen invasiven Mammakarzinomen obligat. Nach einer Mastektomie wird die Bestrahlung genutzt um das Risiko eines Lokalrezidivs zu senken und um eine Verbesserung des Gesamtüberlebens zu erzielen [14].

1.2 Tumorhypoxie und Bestrahlung

Von Hypoxie spricht man, wenn im Gewebe der Sauerstoffpartialdruck weniger als 65 mmHg beträgt, wie es im gesunden und gut durchbluteten Gewebe der Fall ist [15, 16]. In Mammakarzinomen sinkt die Sauerstoffsättigung auf bis zu 30 mmHg, aufgrund der zum Teil fehlenden Blutversorgung in einigen Abschnitten des rasch wachsenden Tumors, weshalb eine gestörte Mikrozirkulation entsteht [17].

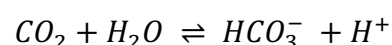
Tumorzellen gewinnen ihre Energie aus der Glykolyse, wobei sie Laktat durch die Vergärung von Glukose erhalten (Warburg-Effekt). Aufgrund dessen sind sie in der Lage sich auch in hypoxischen Bereichen zu teilen. Diese als anaerobe Glykolyse bezeichnete Reaktion läuft in Tumorzellen sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ab.

Der wichtigste Marker für Hypoxie im Tumorgewebe ist der Hypoxie-induzierende Faktor-1 (HIF-1). Ist ausreichend Sauerstoff im Gewebe vorhanden, wird HIF-1 α durch den von Hippel-Lindau Tumorsuppressor ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut. Kommt es zu hypoxischen Arealen wird die α -Untereinheit durch den fehlenden Cofaktor Sauerstoff nicht abgebaut, wandert in den Zellkern und bindet dort an die konstitutive β -Untereinheit. HIF-1 α kann daher als Marker für hypoxische Gewebeareale angesehen werden. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α bindet dieser an das *hypoxia response element* (HRE) und hypoxieassoziierte Gene werden transkribiert [18]. Dazu gehören unter anderem VEGF (Angiogenese), IGF2 und TGF- α (Wachstum), EPO (Erythropoese), die Glukosetransporter GLUT 1 und 3 (Glukosestoffwechsel), Transferrin (Eisenstoffwechsel) und MMP2 (Zellmigration und Invasion) [19]. Zusätzlich reguliert HIF-1 α über die Carboanhydrase IX (CA IX) den intrazellulären pH-Wert und fördert damit das Überleben der Tumorzelle [20]. So zeigt sich in vielen

Tumorentitäten, wie beispielsweise Lungenkarzinomen, Thymuskarzinomen oder Gebärmutterhalskrebs auch eine Überexpression der HIF-induzierten CA IX [21]. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass die Überexpression von HIF-1 α und CA IX in Tumoren für ein aggressiveres Verhalten und eine schlechtere Prognose spricht [21, 22]. Neben der operativen Behandlung und der Chemotherapie bietet die Bestrahlung eine wichtige Möglichkeit bei der Behandlung von Tumoren. Zur Bestrahlung von Tumorpatienten verwendet man ionisierende Strahlung. Aufgrund dieser Strahlung kommt es zu Schäden der DNA-Stränge in den Zellen, sodass sich diese nicht mehr teilen können und das Tumorwachstum gestoppt wird. Die Anwesenheit von Sauerstoff bei dieser Reaktion verstärkt die Peroxid- und Radikalbildung (durch die Ionisierung des Wassers in der Zelle, und die Fixierung des DNA-Schadens), sodass keine Reparatur mehr möglich ist [23]. Bestrahlungsschäden sind somit in den hypoxischen Tumorarealen geringer, da weniger Radikale gebildet und Strahlenschäden vermehrt repariert werden [24]. Der Sauerstoffverstärkungsfaktor (*oxygen enhancement ratio*, OER) definiert diesen radiosensitivierenden Effekt des Sauerstoffs: Unter hypoxischen Bedingungen wird eine zweifach bis dreifach höhere Strahlendosis benötigt, um denselben Effekt wie bei Zellen unter normoxischen Bedingungen zu erzielen [25]. Jedoch besitzen gesunde, gut mit Sauerstoff versorgte Zellen eine bessere Reparaturfähigkeit und können sich nach der Bestrahlung besser regenerieren [26]. Die Strahlentherapie wird daher nach neuesten Richtlinien mit einer Hypofraktionierung (Gesamtdosis von 40 Gy in 15-16 Fraktionen innerhalb von ca. 3-5 Wochen) oder mit einer konventionellen Fraktionierung (Gesamtdosis von 50 Gy in ca. 25-28 Fraktionen innerhalb von ca. 5-6 Wochen) durchgeführt [27].

1.3 Carboanhydrase IX

Carboanhydrasen (CA) kommen in praktisch jedem lebenden Organismus vor und sind an einer Vielzahl physiologischer und biochemischer Prozesse beteiligt [28]. Bei den Säugetieren existieren mindestens 14 verschiedene Isoformen der CA, wobei elf katalytisch aktiv und drei Isoformen inaktiv sind [29]. Die Funktion aller Carboanhydrasen ist die reversible Katalyse von Kohlenstoffdioxid und Wasser zu Kohlensäure, die in wässriger Lösung zu Hydrogencarbonat und einem Proton dissoziiert.



Daher sind CA maßgeblich am Ionentransport und an der pH-Regulation beteiligt. In der Niere spielen sie eine wichtige Rolle für den Säure-Base Haushalt, sind aber auch an der Knochenresorption, der Produktion von Cerebrospinalflüssigkeit, Magensäure, Pankreassekret und Kammerwasser des Auges beteiligt [30]. CA sind außerdem in malignen Tumoren überexprimiert [31].

Die Hypoxie-induzierte CA IX hat dabei die wichtigste Bedeutung. Sie gehört zur Familie der α -Carboanhydrasen und wird durch das Gen *CA 9* codiert [20]. Physiologisch kommt die CA IX in den Drüsenzellen der Magenschleimhaut und im Epithel von Leber, Gallenblase, Ileum, Dickdarm und Bauchspeicheldrüse vor. Maßgeblich ist sie dort am Ionentransport, an der intrazellulären Kommunikation und der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität beteiligt [31]. Jedoch hat die CA IX auch in malignen Tumoren eine wichtige Bedeutung. In der Niere, dem Gebärmutterhals, den Eierstöcken, der Lunge, Speiseröhre, Brust und Vulva ist CA IX physiologisch nicht nachweisbar [32]. In diesen Organen kann sie daher als diagnostischer Marker für eine Krebserkrankung genutzt werden [33].

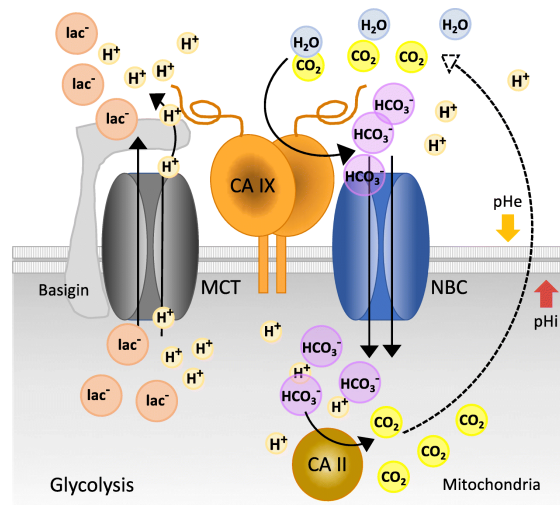


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktion der Carboanhydrase IX. Dargestellt ist die Funktion der Carboanhydrase IX bei der pH-Wert-Regulation. Rechts in der Abbildung dargestellt ist der Bicarbonattransport über den Bicarbonattransporter (NBC), an dem die CA IX extrazellulär die Umwandlung von CO₂ in Protonen (H⁺) und Bicarbonat-Ionen (HCO₃⁻) katalysiert. HCO₃⁻ werden über die NBC durch die Plasmamembran ins Zytoplasma transportiert. Intrazellulär katalysiert die CA II die Reaktion von HCO₃⁻ und H⁺ zu CO₂, welches die Zelle durch Diffusion verlässt. Der intrazelluläre pH-Wert bleibt dadurch neutral. Die extrazellulär gebildeten Protonen sorgen für eine Azidifizierung im Extrazellulärraum [34]. (Open-Access-Artikel, Springer Nature)

Die CA IX reguliert den intrazellulären und extrazellulären pH-Wert des Tumorgewebes (Abbildung 1). Der intrazelluläre pH-Wert wird dadurch aufrechterhalten, jedoch kommt

es extrazellulär zu einer Azidifizierung [21]. Dieser verringerte pH-Wert führt zu einer Hochregulierung angiogenetischer Faktoren, einer gesteigerten Tumorzelladhäsion, einer erhöhten Metastasierungstendenz und einem verminderten Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie [21].

Meist geht der Nachweis bzw. die Überexpression von CA IX in Tumorgewebe mit einer verstärkten Tumorpheriferation und Tumoraggressivität sowie einer schlechteren Prognose einher [22]. Die CA IX gilt deshalb auch als ein prognostischer Faktor in der Tumorthherapie. Außerdem nimmt sie eine wichtige Rolle als Hypoxiemarker ein.

Aufgrund der großen Bedeutung als prognostischer Marker, stellt CA IX einen interessanten Ansatzpunkt in der Krebstherapie dar. Derzeit gibt es verschiedene Herangehensweisen, die Wirkung der CA IX zu beeinflussen. Einen ersten Ansatzpunkt stellen gegen CA IX gerichtete Antikörper dar. Dafür wurde der monoklonale Antikörper cG250 (Girentuximab) entwickelt, welcher auch unter dem Handelsnamen RENCAREX der Firma Willex AG (München, Deutschland) bekannt ist [35]. Dieser bindet an das MN/CA IX-Antigen auf der Oberfläche von Tumorzellen. Dadurch kommt es zur Freisetzung natürlicher Killerzellen sowie weiterer Effektorzellen und das körpereigene Immunsystem des Patienten wird stimuliert. Dies kann zur Apoptose der Tumorzellen führen. Man spricht von einer Antikörper-vermittelten Zytotoxizität (ADCC = *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) [36].

Einen weiteren Ansatzpunkt in der Tumorthherapie stellt der Einsatz von Carboanhydraseinhibitoren (CAI) dar. Eingeteilt werden diese in Inhibitoren, die an das Zinkion im aktiven Zentrum der Carboanhydrase binden (Sulfonamide, Sulfamate, Dithiocarbamate, anorganische Anionen) und zum anderen Verbindungen, die keine Interaktion mit dem Metallion eingehen (Phenole, Polyamide, Cumarine) [37]. Durch glykolysierte Cumarine (*7-glykosyl coumarin inhibitors*) konnte eine spezifische Inhibierung der CA IX und CA XII nachgewiesen werden [38]. Ureido-Sulfonamid U104, ist ein Ureido-substituierter Benzolsulfonamid-Inhibitor der Carboanhydrase IX, welcher spezifisch gegen die extrazelluläre CA IX und CA XII gerichtet ist [39]. Schon in der eigenen AG konnten Effekte auf die Migration, das klonogene Überleben und die Radiosensitivität in Mammakarzinomen nachgewiesen werden [40]. Auch Nanopartikel, die mit CA IX-Inhibitoren derivatisiert sind, bilden eine interessante Option zur Hemmung von CA IX [37, 41].

1.4 Betulinsäure und Betulinsäurederivate

Betulin (3 β -lup-20(29)-en-3,28-diol) ist ein pentazyklisches Triterpen, welches eine Gruppe von Naturstoffen bildet und eine Untergruppe der Lupane ist [42, 43]. Die Betulinsäure (BS) ist die Carbonsäure von Betulin. In Reinform ist BS ein weißer, kristalliner Feststoff und kommt in Spuren in der Birkenrinde vor. Zumeist wird BS durch Oxidation von Betulin, das aus der Birkenrinde isoliert und in einem mehrstufigen Verfahren derivatisiert wird, hergestellt. [44].

BS gilt als entzündungshemmend, antineoplastisch und antiviral [45]. In Studien konnte gezeigt werden, dass BS eine Zytotoxizität gegen zahlreiche Tumorentitäten, wie Melanome [46], Gliome [47], Kopf-Hals-Tumoren [48] oder Kolonkarzinomen [49] aufweist und sogar in primären Tumoren wirkt, die auf herkömmliche Chemotherapeutika und Bestrahlung schlecht angesprochen haben [50]. Besonders ist dabei, dass sich BS gegen Tumorzellen richtet, während untransformierte Zellen BS besser tolerieren. Dies konnte in verschiedenen *in vitro* Versuchen an Fibroblasten, Lymphoblasten, Melanozyten und Astrozyten nachgewiesen werden [47, 51, 52].

BS permeabilisiert die äußere Mitochondrienmembran und verändert somit das Membranpotential des Mitochondriums. Dadurch wird der intrinsische Apoptoseweg induziert [53]. Im weiteren Verlauf kommt es zur Kernfragmentierung und Aktivierung von Proteasen. Nach Behandlung mit BS kommt es zur Spaltung des Enzyms PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerasen) durch die Caspase 3. Dies konnte in Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe sowohl an Glioblastomzellen, als auch an Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden [54, 55]. Durch die Freisetzung von *reactive oxygen species* (ROS) aus den Mitochondrien wird zusätzlich die Caspaseaktivierung verstärkt [47, 56], wie zum Beispiel über die SAP/JNK-Kinase oder den Proapoptosefaktor p38 [57]. BS wirkt direkt an den Mitochondrien der Zellen und hat den Vorteil, im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika, dass es unabhängig von p53 und CD95 Apoptose induziert und dementsprechend unabhängig von Mutationen in diesen Signalwegen ist [56].

Selzer und Kollegen wiesen eine gute Verträglichkeit von BS mit anderen zytotoxischen Stimuli in Melanomen nach. Durch eine Behandlung mit BS in Kombination mit Bestrahlung wurde das Zellüberleben verringert im Vergleich zu einer Behandlung ausschließlich mit BS [52].

Die Anwendbarkeit von Betulin bzw. BS ist aufgrund ihrer Lipophilie, und dadurch bedingten schlechten Löslichkeit in Wasser, aber auch in anderen Lösungsmitteln wie Ethanol, stark eingeschränkt [58]. Demzufolge ist eine Verbesserung des

Lösungsverhaltens durch Synthese von Betulin- bzw. BS-Derivaten nötig. Zudem lassen sich Chemotherapeutika mit neuen Eigenschaften entwickeln [43, 59].

Auch die eigene Arbeitsgruppe hat die Wirksamkeit von verschiedenen Betulin- und BS-Derivaten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 3-O-Acetylbetulin (3AC) eine erhöhte Zytotoxizität im Gegensatz zu BS aufweist. Außerdem führte 3AC in Kombination mit dem CAI U104 zu einer Radiosensitivierung von Mammakarzinomzellen [60].

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Betulin-Derivats Substanz 18 ((3 β)-3-(acetyloxy)lup-20(29)en-28-yl-4-([5-(aminosulfonyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]amino)-4-oxobutanoate). Die Substanz 18 enthält als Grundgerüst 3AC (Abbildung 2 A), an welches die Substanz 16 (4-([5-(aminosulfonyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]amino)-4-oxobutanoic acid), ein Azetazolamid (AZA), die einen Bernsteinsäure-Linker enthält (Abbildung 2 B), gekoppelt ist. AZA ist ein heterozyklisches primäres Sulfonamid, das die CA IX hemmen kann. Es ist ein etabliertes Medikament unter anderem zur Behandlung von Ödemen, Herzinsuffizienz, Höhenkrankheit und Morbus Menière [61]. Untersuchungen zur Inhibierung der CA IX-Aktivität durch die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen zeigten, dass sowohl Substanz 16 ($K_{iCAIX} = 0,129 \mu\text{M} \pm 0,05 \mu\text{M}$) als auch 18 ($K_{iCAIX} = 1,25 \mu\text{M} \pm 0,25 \mu\text{M}$) zu einer Inhibierung der CA IX-Aktivität führen und beide Substanzen als CA IX-Inhibitoren wirken [62].

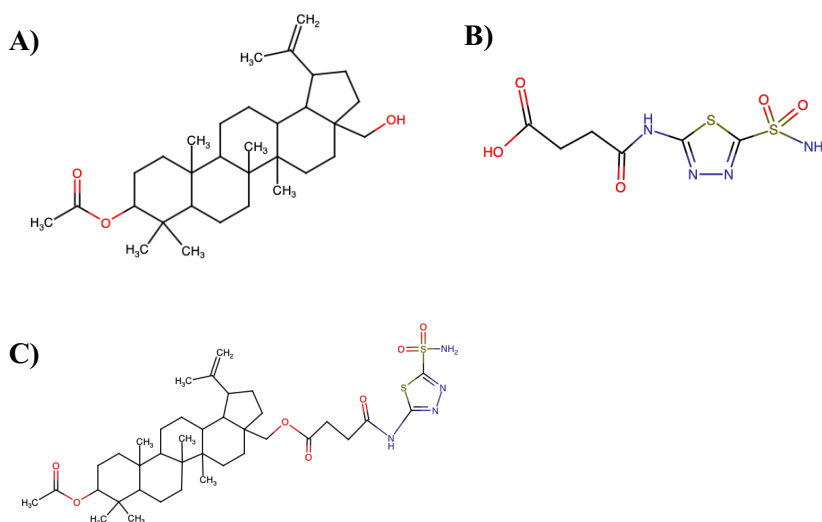


Abbildung 2: Strukturformeln. Dargestellt sind die untersuchten Verbindungen (A) 3-O-Acetylbetulin (3AC), (B) Substanz 16 (4-{[5-(aminosulfonyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]amino}-4-oxobutanoic acid) und (C) Substanz 18 ((3 β)-3-(acetyloxy)lup-20(29)en-28-yl-4-([5-(aminosulfonyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]amino)-4-oxobutanoate). (Abbildung selbst erstellt)

2 Zielstellung

Das Mammakarzinom ist ein weit verbreiteter, hochmaligner Tumor. Bei geringem Sauerstoffgehalt wird der Tumor radioresistenter, weshalb hypoxische Tumore den Erfolg der Radiotherapie verringern. Durch die Überexpression von CA IX haben Tumorzellen Mechanismen entwickelt, unter hypoxischem Stress den intrazellulären pH-Wert zu regulieren und durch extrazelluläre Azidifizierung die Tumorprogression weiter zu begünstigen.

Die Synthese von Betulinylsulfonamiden scheint eine vielversprechende Möglichkeit zu sein, insbesondere hypoxische Tumore anzugreifen. CAI mit Sulfamat- bzw. Sulfonamidgruppen sind in der Lage, das Zink-Ion im aktiven Zentrum des Enzyms zu binden und dadurch die Aktivität der CA zu hemmen.

Gegenstand dieser Doktorarbeit war die experimentelle Untersuchung der Effekte des BS-Azetazolamidkonjugats 18 bzw. der Kombination der beiden Vorläufersubstanzen 3AC und Substanz 16 auf verschiedene molekular-, zell- und strahlenbiologische Parameter in den humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, HS578T und MCF-7 zu untersuchen. Besonders der Vergleich der Substanz 18 mit der Kombination aus Substanz 16 und 3AC war von Interesse unter normoxischen und/oder hypoxischen Bedingungen.

Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit soll diskutiert werden, ob das neu synthetisierte BS-Azetazolamidkonjugat 18 für weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine angewandte Tumorthherapie geeignet ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die drei humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T untersucht. Die Kultivierung dieser erfolgte in den Laboren der Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Aufgrund der Arbeit in der Zellkultur ist kein Ethikvotum für diese Arbeit notwendig.

Tabelle 1: verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	ATCC®-Nr.	Referenz
MDA-MB-231	Humanes Mammakarzinom	HTB-26 TM	Cailleau et al., 1978 [63]
MCF-7	Humanes Mammakarzinom	HTB-22 TM	Soule et al., 1973[64]
HS578T	Humanes Mammakarzinom	HTB-126 TM	Hackett et al., 1977 [65]

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Accutase	BioWest (Nuaille, FRA)
APS (10 %)	Roth (Karlsruhe, DE)
3-Acetylbetulin-Bern-AZA (18) (20 mM)	Biosolutions (Halle GmbH, DE)
3-O-Acetybetulinsäure (3AC) (10 mM)	Biosolutions (Halle GmbH, DE)
Annexin V	BioLegend (Koblenz, DE)
Binding Buffer (1x)	BioLegend (Koblenz, DE)
Betulinsäure (20 mM)	Biosolutions (Halle GmbH, DE)
Bis-Acrylamid (30 %)	Serva (Heidelberg, DE)
BSA	Promega (Madison, USA)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega (Madison, USA)
CM-H2DCF-DA	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DMSO	Sigma (Steinheim, DE)
Essigsäure (100 % p.a.)	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol (70 %)	Universitätsapotheke (Halle, DE)
Ethanol (99,8 %)	Sigma (Steinheim, DE)
Ferostatin	Sigma (Steinheim, DE)

FKS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Formaldehyd (37 %)	Roth (Karlsruhe, DE)
Formaldehyd (7,4 %)	Roth (Karlsruhe, DE)
Giemsa-Lösung	Sigma (Steinheim, DE)
HEPES	Roth (Karlsruhe, DE)
Hydrochloroquin	Selleckchem (Houston, USA)
Lysepuffer (10x) für Proteinisolation	Cell Signaling (Danvers, USA)
Mitomycin	Universitätsapotheke (Halle, DE)
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt, DE)
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Necrosulfonamid	Selleckchem (Houston, USA)
PBS	Sigma (Steinheim, DE)
PBS (mit 1 mM MgCl ₂ und 1 mM CaCl ₂)	Sigma (Steinheim, DE)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin, DE)
Phosphataseinhibitor (100x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Propidiumiodid	Sigma (Steinheim, DE)
Proteaseinhibitor (100x)	Cell Signaling (Danvers, USA)
Protein-Assay-Reagenz	Bio-Rad, Richmond, USA
RPMI 1640 mit Phenolrot (mit 25 mM HEPES und L-Glutamin)	Lonza (Wakersville, USA)
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Lonza (Wakersville, USA)
SDS	Serva (Heidelberg, DE)
SRB	Sigma (Steinheim, DE)
Substanz 16	Biosolutions (Halle GmbH, DE)
Substanz 18	Biosolutions (Halle GmbH, DE)
TCA (10 %)	Roth (Karlsruhe, DE)
Tris (20 mM)	Roth (Karlsruhe, DE)
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom (Berlin, DE)
Wasserstoffperoxid (30 %)	Universitätsapotheke (Halle, DE)
Z-VAD-FMK	Selleckchem (Houston, USA)

3.1.3 Puffer, Medium, Lösungen

3.1.4 Zellkultivierung

Kulturmedium: 500 ml RPMI 1640 mit Phenolrot (mit 25 mM HEPES und L-Glutamin)
10 % FKS
2 % Penicillin/Streptomycin
1 % Natriumpyruvat

CM-H₂DCF-DA-Assay

Kulturmedium: 500 ml RPMI 1640 ohne Phenolrot
25 mM HEPES (frisch dazu)
10 % FKS
2 % Penicillin/Streptomycin

0,5 µM CM-H₂DCF-DA-Farbstoff: 1mM: 86,5 µl DMSO zu 50 µg Aliquot
100µM: 10 µl (1 mM) ad 100 µl PBS (mit 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂)
0,5µM: 65 µl (100 µM) ad 13 ml PBS

100 µM H₂O₂-Positivkontrolle: 10mM: 10,9 µl (30 % H₂O₂) ad 10 ml PBS
100µM: 100 µl (10 mM) ad 10 ml PBS

2 mM H₂O₂-Positivkontrolle: 2mM: 2,2 µl (30 % H₂O₂) ad 10 ml PBS

Annexin V- PI- Färbung

PI Working Solution 100 µg/ml: 1,5 µl 1 mg/ml PI-Stammlösung ad 13,5 µl PBS

Proteinisolation

1x Lysepuffer: 1:10 Lysepuffer (10x)
1:100 Proteaseinhibitor (100x)
1:100 Phosphataseinhibitor (100x)
ad Aqua bidest.

Western Blot

12 %ige Polyacrylamidgele

2x 12 %iges Trenngel	3,47 ml Aqua bidest. 4,2 ml Bis-Acrylamid (30 %) 2,63 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8) 105 µl SDS (10 %) 105 µl APS (10 %) 8,4 µl TEMED
2x 12 %iges Sammelgel	3,57 ml Aqua bidest. 889 µl ml Bis-Acrylamid (30 %) 656,25 µl Sammelgelpuffer (1 M Tris pH 6,8) 52,5 µl SDS (10 %) 52,5 µl APS (10 %) 5,25 µl TEMED
10x Laufpuffer	15,2 g Tris pH 8,3-8,8 (250 mM) 72,1 g Glyzin (1,92 M) 5,0 g SDS (1 % w/v) ad 500 ml Aqua bidest.
1x Laufpuffer:	100 ml Laufpuffer (10x) ad 1000 ml Aqua bidest.
10x Transferpuffer:	15,2 g Tris pH 8,0-10,5 (250 mM) 72,1 g Glyzin (1,92 M) ad 500 ml Aqua bidest.
1x Transferpuffer:	100 ml Transferpuffer (10x) 200 ml Methanol ad 1.000 ml Aqua bidest.

10x TBS: 5 M NaCl
1 M Tris (pH 8,0)
ad 1.000 ml Aqua bidest.

1x TBST: 50 ml TBS (10x)
500 µl Tween® 20
ad 1.000 ml Aqua bidest.

10 % Blockierungsreagenz: 100 ml TBST (1x)
10 g Magermilchpulver

3.1.5 Antikörper

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Ursprung	Klon	Verdünnung	Hersteller
β-Aktin	Maus	Ac15	1:10.000	Sigma (Steinheim, DE)
CA IX	Maus	M75	1:2000	BioScience (Bratislava, SK)
CA XII	Kaninchen	-	1:2000	Cell Signaling (Danvers, USA)
HIF-1α	Maus	54/ HIF-1α	1:1000	BD Biosciences (Heidelberg, DE)
PARP	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	-	1:2000	DAKO (Hamburg, DE)
Anti-Maus IgM	Kaninchen	-	1:600	DAKO (Hamburg, DE)

3.1.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Analysenwaage Mettler AM 100 Merck (Darmstadt, DE)
 Bechergläser Merck (Darmstadt, DE)
 Brutschrank HERACell 150i Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
 BZ-8000 Fluoreszenzmikroskop Keyence (Osaka, JP)
 Durchflusszytometer LSR II Fortessa BD Biosciences, Heidelberg, DE
 Gas Pak EZ BD Biosciences (Heidelberg, DE)
 GelCount Thermo Scientific (Dreieich, DE)
 Labor-Handschuhe Ansell (München, DE)
 Linearbeschleuniger Synergy Elekta (Stockholm, SWE)

Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen, DE)
Magnetrührstäbchen	Merck (Darmstadt, DE)
Messzylinder	Merck (Darmstadt, DE)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg, DE)
Mikroskop Axio Vert 25	Carl Zeiss (Jena, DE)
Mini-Zentrifuge Sprout®	Biozym Scientific (Hess. Oldendorf, DE)
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific (Dreieich, DE)
Parafilm	Merck (Darmstadt, DE)
pH Meter	WTW inoLab (Weilheim, DE)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen, DE)
Pipettierhelfer Pipetboy®	Integra Biosciences (Biebertal, DE)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, DE)
Rollenmischer Stuart™ digital SRT6D	Stuart (Stone, UK)
Spark Plattenreader	Tecan Trading AG (Männedorf, CH)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, DE)
Ultraschall Sonopuls HD 2070	BANDELIN (Berlin, DE)
Vortex-Schüttler Genie 2	Scientific Industries Inc. (Staufen, DE)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, DE)
Zentrifuge 32R	Hettich Lab Technology (Tuttlingen, DE)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Zellkulturplatten (6-well)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Zellkulturplatten (24-well)	TPP (Trasadingen, CH)
Zellkulturplatten (96-well)	TPP (Trasadingen, CH)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, CH)
CASY (Zellzählgerät)	OMNI Life Science GmbH (Bremen, DE)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung und Passagierung

Die Kultivierung der humanen Mammakarzinomzellen erfolgte in RPMI 1640 komplettiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 1 % Natriumpyruvat und 185 U/ml Penicillin und 185 µg/ml Streptomycin als adhärenzte Monolayer in sterilen Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂).

Zur Passagierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen gewaschen mit 1x PBS. Anschließend wurden die Zellen mit 1 %iger Trypsinlösung abgelöst. Dafür wurden die Zellen 5 min im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Dann wurde die Trypsinreaktion mit Kompletmedium abgestoppt und die Zellsuspension 4 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit neuem Kompletmedium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit dem CASY-Zellzähler durchgeführt und eine definierte Zellzahl wurde in sterile Zellkulturflaschen eingestreut.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des CASY-Zellzählers bestimmt. Dazu wurden 100 µl einer Zellsuspensionsprobe 1:100 mit CASYton verdünnt. Diese Verdünnung wurde über eine Messpore in eine Messkapillare gepumpt, an der ein elektrisches Feld anlag. Jeder Zellpartikel der Probe induzierte einen elektrischen Impuls während der Passage und wurde als ein „Count“ registriert.

3.2.3 Mykoplasmenachweis

Alle 14 Tage wurde ein Nachweis auf Mykoplasmen mittels PCR durchgeführt. Somit konnte eine Kontamination der kultivierten Zelllinien ausgeschlossen werden.

3.2.4 Zellkultivierung unter hypoxischen Bedingungen

Um die Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultivieren zu können, wurden die Zellen in einem Gas-Generator-System (Gas Pak EZ, BD, USA) inkubiert. Dieses System besteht aus einem Bebrütungsbeutel, einem Reaktionsbeutel und Wasser. Der Reaktionsbeutel setzt sich zusammen aus anorganischem Carbonat, aktiviertem Kohlenstoff und Ascorbinsäure. Erreicht wird dabei ein Sauerstoffgehalt von ca. 0,1 % durch die sauerstoffverbrauchende Produktion von CO₂ aus anorganischem Carbonat.

Die *well*-Platten wurden nach entsprechender Behandlung zusammen mit einem feuchten Zellstoff in den Plastikbeutel gelegt, um ein feuchtes Milieu zu erzeugen. Der Reaktionsbeutel wurde nach dem Öffnen durch Luftsauerstoff aktiviert und in den Bebrütungsbeutel gelegt. Anschließend wurde das System zügig verschlossen. Die weitere Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen im Brutschrank.

3.2.5 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T erfolgte mit 2 Gy, 8 Gy und 14 Gy (MDA-MB-231 und MCF-7) bzw. 4 Gy, 10 Gy und 16 Gy (HS578T) 24 h nach der Behandlung unter Hypoxie in den entsprechenden Zellkultivierungsplatten mit 6 MV Photonen an einem Linearbeschleuniger (Synergy, Elekta, Stockholm, SWE) in der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

3.2.6 Behandlung der Zellen durch Inkubation der Substanzen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Wirksamkeit des Betulin-Derivates Substanz 18 bzw. 3-O-Acetylbetulin (3AC) in Kombination mit Substanz 16 auf die humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, HS578T und MCF-7 untersucht.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden von der AG Prof. Paschke (Biozentrum, Halle, DE) und AG Prof. Czuk (Chemie, Halle, DE) synthetisiert und lagen in Pulverform vor. Dieses Pulver wurde im Lösungsmittel DMSO zu der Stammkonzentration von 20 mM für die Substanz 18 bzw. 16 und 10 mM für die Substanz 3AC gelöst. Beide Substanzen wurden bei 4 °C gelagert. Die Stammlösungen wurden vor Beginn der Behandlungen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

3.2.7 SRB-Assay

Seit seiner Entwicklung 1990 ist das Sulforhodamin B-Zytotoxizitätsassay eine schnelle und kostengünstige Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität [66]. Der Farbstoff Sulforhodamin B (SRB) bindet unter milden sauren Bedingungen an Zellproteine. Die Menge des gebundenen Farbstoffes ist direkt proportional zur Zellzahl und wird bei 540 nm Absorption photometrisch gemessen.

Zunächst wurde in Abhängigkeit der Zelllinie eine definierte Zellzahl in eine 96-*well* Platte eingestreut. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit den Substanzen. Stets wurden

eine unbehandelte Kontrolle und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) mitgeführt. Nach einem Inkubationszeitraum von 96 h unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen wurde der jeweilige Versuch abgestoppt. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mindestens 1 h mit 200 μ l eiskalter Trichloressigsäure bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die 96-well Platte fünfmal mit eiskaltem H₂O gewaschen und abschließend ausgeklopft. Dann wurden die Zellen 10 min mit 100 μ l 4,4 %iger SRB-Lösung bei RT gefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen mehrmals mit 1 %iger Essigsäure gewaschen, um nicht-gebundenen Farbstoff zu entfernen und über Nacht an der Luft getrocknet. Abschließend wurde der SRB-Farbstoff mit 300 μ l Tris-Lösung 30 min auf einem Schüttelinkubator bei RT inkubiert und die Absorption bei 540 nm am Spark Plattenreader (Tecan, Männedorf, CH) gemessen. Die IC₅₀-Werte wurden mit Hilfe einer Dosis-Wirkungskurve mittels des Softwareprogramms Origin (Version 8) ermittelt.

3.2.8 Zellkoloniebildungstest und Strahlensensitivität

Ein Klon ist eine Population von Zellen, die aus der mitotischen Teilung einer Einzelzelle hervorgegangen sind. Die Klonierungseffizienz ist die Fähigkeit von Zellen Kolonien zu bilden. Der Zellkoloniebildungstest dient also der Analyse des klonogenen Überlebens. Dabei wird die Teilungsfähigkeit von Zellen untersucht, also welche Zellen auch nach einer Behandlung mit Substanzen oder Bestrahlung dazu in der Lage sind und eine Kolonie bilden können.

Die Zelllinien MDA-MB-231, HS578T und MCF-7 wurden zunächst in 6-well Platten eingestreut. Nach 24 h Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte die Behandlung mit den Substanzen 18 und 16+3AC in den Konzentrationen von 10 μ M (MDA-MB-231, MCF-7, HS578T), 15 μ M (MDA-MB-231, MCF-7) bzw. 20 μ M (HS578T) sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen für 24 h.

Zusätzlich sollte ein Einfluss der Substanzen auf die Radiosensitivität ermittelt werden. Dazu wurden die drei untersuchten Zelllinien 24 h nach Behandlung unter hypoxischen Bedingungen bestrahlt mit den Strahlendosen 2 Gy, 8 Gy und 14 Gy (MDA-MB-231 und MCF-7) bzw. 4 Gy, 10 Gy und 16 Gy (HS578T).

24 h nach der Behandlung bzw. 1 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen abtrypsiniert und je nach Behandlung und Strahlendosis mit einer definierten Zellzahl in 25 cm²-Zellkulturflaschen mit Deckel ohne Filter eingestreut. Die Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T wurden 12 Tage kultiviert, die Zelllinie MCF-7 14 Tage, bis ausreichend große Kolonien (\geq 50 Zellen) gewachsen waren.

Abschließend wurden die Zellkolonien mit 3,7 %iger (HS578T, MCF-7) bzw. 7,4 %iger (MDA-MB-231) Formaldehydlösung mindestens 20 min lang fixiert, mit Aqua bidest. gewaschen und mindestens 20 min mit einer 10 % Giemsa-Lösung gefärbt. Zuletzt wurden die gefärbten Kolonien gewaschen, bei RT getrocknet und am GelCount (Oxford Optronix, Milton, UK) ausgezählt.

Um den Einfluss der Substanzen auf die Bestrahlungssensitivität beurteilen zu können, wurde der Dosis modifizierende Faktor (DMF) 10 ermittelt. Dieser ist der Quotient der Strahlendosen, die aufgewendet werden müssen, um das klonogene Überleben der Kontrollzellen und der behandelten Zellen auf 10 % zu reduzieren. Der DMF 10 wird mit Hilfe eines linear-quadratischen Modells berechnet, wofür die Software Origin genutzt wurde. Bei einem $DMF_{10} > 1$ liegt eine Radiosensitivierung vor und bei $DMF_{10} < 1$ eine Radioprotektion. Keinen Einfluss auf Radiosensitivität gibt der $DMF_{10} = 1$ an.

3.2.9 Zellmigrationstest (Wundheilungsassay)

Zur Untersuchung der Migration der Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T mit den jeweiligen Substanzen wurde ein Wundheilungsassay (*scratch-assay*) durchgeführt. Dabei wird einem konfluenten Zellrasen eine Wunde (*scratch*) zugefügt. Das Einwandern der Zellen in diese mechanisch erzeugte Wunde zeigt das Migrationsverhalten der Zelllinie und wird durch die Vermessung der zellfreien Flächen zum Zeitpunkt des *scratches* in einer definierten Zeit ermittelt.

Dazu wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl in eine 24-well Platte eingestreut. Nach 24 h Kultivierung war das Ziel einen zu 100 % konfluenten Zellrasen im well zu erzeugen und unter dem Mikroskop zu überprüfen.

Daraufhin wurde der Zellrasen 2 h mit Mitomycin, einem Proliferationshemmer, mit einer Konzentration von 20 μ M unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde mit einer 200 μ l (MDA-MB-231) bzw. 1000 μ l (HS578T) Pipettenspitze ein *scratch* gesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (MDA-MB-231) bzw. 1 % FKS-haltigen Medium (HS578T) erfolgte die Behandlung mit den Substanzen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.

Am Mikroskop BZ-8000 (Keyence, Osaka, JP) wurden Bilder zu Beginn (0 h, unmittelbar nach dem *scratch*) und nach 16 h (HS578T) bzw. 24 h (MDA-MB-231) gemacht.

Um den Einfluss der Substanzen 18, 16 und der Kombination aus 16+3AC auf die Zellmigration unter hypoxischen Bedingungen zu überprüfen, wurde Desferroxamin (DFO) mit einer Konzentration von 100 μ M auf die wells gegeben 24 h nach dem

Einstreuen der Zellen. DFO ruft eine Erhöhung des HIF-1 α -Levels hervor, das posttranskriptional die CA IX hochreguliert. Die Zellen wurden 24 h mit dem DFO inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen behandelt.

3.2.10 Quantifizierung der Bildung von ROS (CM-H2DCF-DA-Assay)

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes CM-H2DCF-DA kann oxidative Zellschädigung durch freie Sauerstoffradikale in vitalen Zellen nachgewiesen werden.

Der unpolare Farbstoff *5-(and 6)-chloromethyl-2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester* (CM-H2DCF-DA) (Abbildung 3) diffundiert durch die Zellmembran und wird durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert. Befinden sich im Zellinneren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wird der Farbstoff oxidiert. Aufgrund der Reaktionen wird der Farbstoff polarisiert und fluoreszierend. Durch die Polarisation verbleibt der Farbstoff im Zellinneren und die Fluoreszenz kann mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen werden.

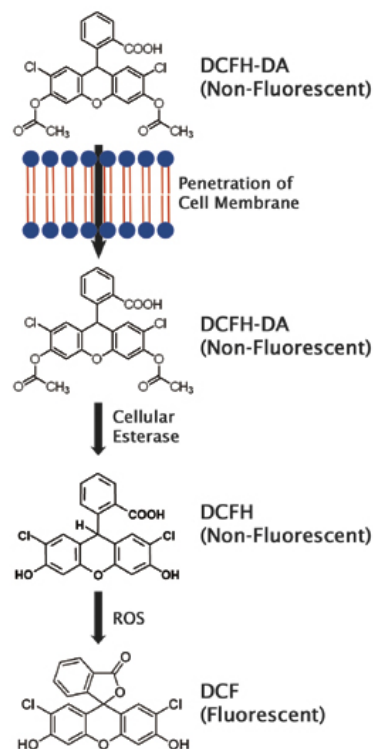


Abbildung 3: Chemische Reaktion beim ROS-Assay. Dargestellt ist die Reaktion von DCFH-DA, welches nicht fluoreszierend ist, zur fluoreszierenden Form DCF [67]. (Reproduziert mit Genehmigung von Cell Biolabs, Inc.)

Für die Versuche wurden die Zelllinien MDA-MB-231, HS578T und MCF-7 mit einer definierten Zellzahl in 6 *well*-Platten in phenolrotfreiem RPMI 1640 Kulturmedium eingestreut und 24 h kultiviert. Dann erfolgte die Behandlung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit den Substanzen in frischem phenolrotfreiem Kulturmedium. Dabei wurde eine Negativkontrolle (unbehandelte und später ungefärbte Kontrollzellen) und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO), sowie eine Positivkontrolle (Zellen, behandelt mit H₂O₂) mitgeführt.

Nach 24 h wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 0,5 µM CM-H₂DCF-DA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 37 °C im Brutschrank. Um den Erfolg der Färbung beurteilen zu können, wurden als Positivkontrolle Zellen 30 min vor Beginn der Färbung mit 100 µM H₂O₂ bei den Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T bzw. 2 mM H₂O₂ bei der Zelllinie MCF-7 behandelt. Zum Entfernen des überschüssigen Farbstoffes wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen 3 min mit 1 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS gelöst und in FACS-Röhrchen überführt.

Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (Anregungsmaximum: 493 nm; Emissionsmaximum 519 nm) am Durchflusszytometer LSR II Fortessa (BD Biosciences, Heidelberg, DE) der AG Core Facility Zellanalyse und Zellsortierung (bei Dr. Navarrete Santos, ZMG).

3.2.11 Annexin-PI-Färbung

Die Annexin-PI-Färbung differenziert zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen. Bei lebenden Zellen befindet sich Phosphatidylserin (PS) an der Innenseite der Zellmembran. Stirbt die Zelle einen apoptotischen "programmierten" Zelltod, wird dieses Bindungsmolekül an die Außenseite der Zelle transloziert. So können Makrophagen PS erkennen und durch Phagozytose die apoptotischen Zellen für den Organismus unschädlich machen. Annexin V, ein Ca²⁺ abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, bindet an PS und macht so apoptotische Zellen kenntlich. Wird eine Zelle nekrotisch, wird ihre Zellmembran durchlässig. Der DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) kann dann in die Zelle eindringen und diese kenntlich machen.

Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde in dieser Arbeit mit 100.000 Zellen in 6-*well* Platten eingestreut und 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 18 und 16+3AC in den Konzentrationen 10 µM, 15 µM und 20 µM. Als

Kontrolle wurden unbehandelte Zellen, eine Lösungsmittelkontrolle und eine Positivkontrolle (0,1 μM Staurosporine) mitgeführt. Daran schloss sich eine weitere Kultivierung sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen für 24 h an. Abschließend wurden die Zellen für die Färbung geerntet. Dazu wurde zunächst der Zellüberstand in Zentrifugationsröhrchen überführt, die Zellen mit PBS gewaschen und dieses ebenfalls überführt. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Accutase für 10 min im Brutschrank.

Die gelösten Zellen wurden zusammen mit dem Zellüberstand 10 min bei 500 rpm und 4 °C zentrifugiert und danach mit kaltem PBS gewaschen. Dann erfolgte das erneute Zentrifugieren bei 500 rpm und 4 °C für 10 min. Für die Färbung sollte eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml mit dem 1x Binding Buffer eingestellt werden. Im Anschluss wurden die Zellen mit 5 μl Annexin V-FITC (90 $\mu\text{g/ml}$) und 1 μl PI Working Solution (100 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt.

Nach 15 min Inkubation im Dunklen wurden die Zellen mit 400 μl 1x Binding Buffer resuspendiert und am Durchflusszytometer LSR II Fortessa (BD Biosciences, Heidelberg, DE) innerhalb einer Stunde gemessen. Annexin V wird bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt und bei 518 nm gemessen. PI wird bei 535 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 617 nm gemessen.

Die gemessenen Werte werden als *Dot plots* dargestellt (Abbildung 4). Diese werden in vier Quadranten unterteilt, in denen die nekrotischen Zellen (Q1), Zellen in der späten Apoptose (Q2), vitale Zellen (Q3) und Zellen in der frühen Apoptose (Q4) voneinander unterschieden werden können.

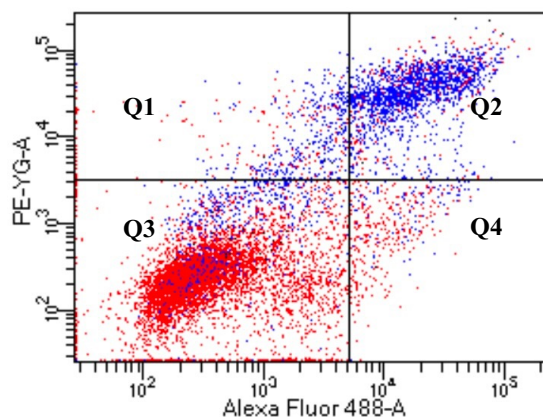


Abbildung 4: Dot Plot der Annexin-PI Färbung. Dargestellt ist ein repräsentativer Dot Plot der Zelllinie MDA-MB-231 nach Behandlung mit 20 μM der Substanz 18 unter Normoxie (0,1 % O_2).

An der x-Achse ist die Intensität der Annexin-Färbung in der Zelle dargestellt und auf der y-Achse der PI-Gehalt (Abbildung 4). Wird wenig Annexin V detektiert und ein hoher Gehalt an PI, liegt die Zelle im ersten Quadranten und ist nekrotisch. Wird ein hoher Gehalt sowohl von Annexin V und PI detektiert liegt die Zelle im zweiten Quadranten und befindet sich in der späten Apoptose. Wird ein hoher Gehalt an Annexin V, jedoch ein geringer Gehalt an PI, so liegt das Messergebnis im vierten Quadranten und die Zelle befindet sich im Stadium der frühen Apoptose. Wird ein geringer Gehalt an PI wie auch Annexin V ermittelt, ist die Zelle vital und die Zelle liegt im dritten Quadranten.

3.2.12 Cell-Titer-Glo Assay

Das Cell-Titer-Glo Assay ist eine schnelle und sensitive Methode, die Anzahl lebender Zellen in einer Kultur zu bestimmen. Grundlage dafür ist das vorhandene ATP in metabolisch-aktiven Zellen, welches für die Luciferin/Luciferase- Reaktion benötigt wird. Diese Reaktion verläuft über mehrere Zwischenstufen und es kommt zu einer Lichtemission. Die Menge des in der Zelle vorhandenen ATPs, welches in der Luciferin/Luciferase-Reaktion verbraucht wird, ist direkt proportional zur ausgesendeten Lumineszenz. Das Produkt der Reaktion ist Oxyluciferin, welches durch oxidative Carboxylierung von Luciferin entsteht (Abbildung 5).

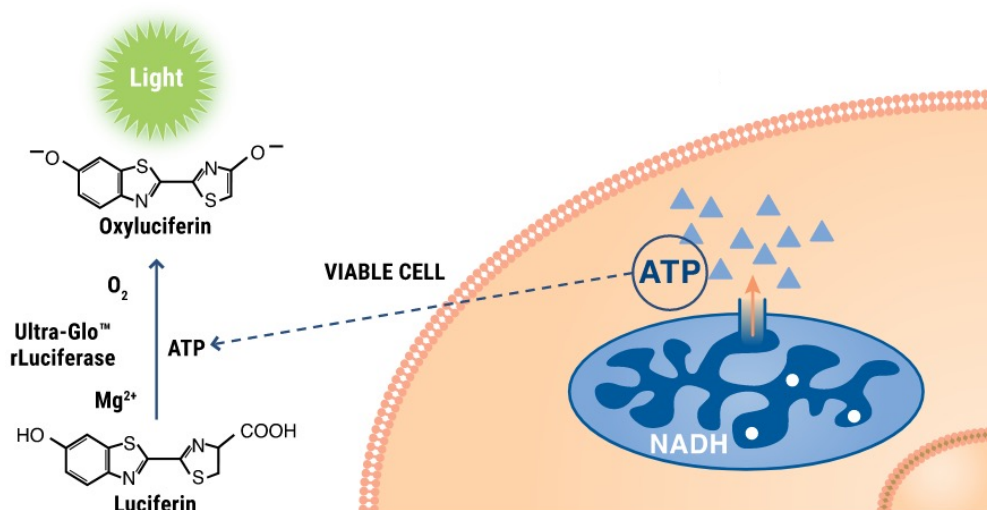


Abbildung 5: Luciferin/Luciferase-Reaktion. Dargestellt ist die Carboxylierung von Luciferin unter Verbrauch von ATP zu Oxyluciferin [68]. (Mit freundlicher Genehmigung der Promega GmbH)

Der CellTiterGlo-Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um durch den Einsatz von verschiedenen Zelltodinhhibitoren in Kombination mit der Substanz 18, die Zelltodart bestimmen zu können. Dafür wurde die Zelllinie MDA-MB-231 mit einer definierten Zellzahl in 96-*well* Platten eingestreut und 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Dann erfolgte die Behandlung mit der Substanz 18 (20 μM). Zusätzlich zu dieser Behandlung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Zelltodinhhibitoren behandelt: 1 μM Ferrostatin (Ferroptose), 1 μM Necrosulfonamid (Nekrose), 100 μM Z-VAD-FMK (Apoptose) und 20 μM Hydroxychloroquin (Autophagie). Unbehandelte Kontrollzellen und eine Lösungsmittelkontrolle wurden mitgeführt.

Nach 24-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen wurden 50 μl CellTiter-Glo Reagens in jedes *well* gegeben und 2 min geschüttelt. Anschließend wurden die 96-*well* Platten 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert, damit sich das Lumineszenzsignal stabilisiert. Abschließend wurde das Lumineszenzsignal am Spark Plattenreader (Tecan, Männedorf, CH) gemessen.

3.2.13 Proteinbiochemische Methoden

Proteinisolation aus der Zellkultur

Für die Isolation von Proteinen wurden zunächst Zellen in 6-*well*-Platten eingestreut und 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit den Substanzen 18 und der Kombination 16+3AC mit einer Konzentration von 5 μM , 10 μM und 15 μM behandelt und unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen 24 h inkubiert. Dann wurde das Medium dekantiert, die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und das überschüssige PBS abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μl Lysepuffer in das jeweilige *well* und mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgekratzt. Das Zelllysate wurde in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Mittels Ultraschalls (Sonopuls, BANDELIN, Berlin, DE) für 6 s bei 4 °C erfolgte der Zellaufschluss. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13.000 rpm, 8 min) entfernt, der Überstand mit den Proteinen in ein 0,5 ml *protein-low-binding* Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Zuerst wurde das Protein-Assay-Reagenz (Bio-Rad, Richmond, USA) im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. 2 µl der einzelnen Zelllysatsproben wurden mit 998 µl Färbelösung (20 % Bradford-Reagenz, 80 % Aqua bidest.) für 20 min bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 595 nm am NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Dreieich, DE). Um die Proteinkonzentration der Proteinproben quantifizieren zu können, wurde eine Eichkurve aus den gemessenen Absorptionswerten ermittelt.

Western Blot-Analyse

Die qualitative und quantitative Bestimmung der spezifischen Proteine wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse durchgeführt. Zunächst erfolgt dazu eine Proteinauftrennung nach der Proteingröße, eine Übertragung des Proteinmusters auf eine Membran und abschließend eine immunologische Detektion durch die entsprechenden Antikörper.

SDS-Page

6 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (1x) und 2 µl NuPAGE® Sample Reducing Agent (1x) wurden zu 50 µg Gesamtprotein hinzugefügt. Anschließend wurden die Proteinproben 6 min bei 95 °C denaturiert.

Die Proben wurden dann mit 12 %igen Polyacrylamidgelen in einer Gelkammer elektrophoretisch nach ihrer Größe in 1x Laufpuffer 80 min bei 150 V, 120 mA im Kühlschrank bei 4 °C aufgetrennt. Um die Größe der Proteine zu bestimmen wurden 4 µl des Proteinmolekulargewichtstandards PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mitgeführt.

Transfer (Blotting)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit dem Tank-Blot-Verfahren in einer „Mini Trans-Blot Cell“ Kammer (Bio-Rad), welche mit 1x Transferpuffer gefüllt war, auf eine 0,45 µM PVDF-Membran (Immobilon®-P, Millipore, Massachusetts, USA) übertragen. Die Membran wurde zunächst 20 s in Methanol aktiviert und zusammen mit den Schwämmen und Filterpapieren in Transferpuffer getränkt. Nachdem das Sammelgel abgetrennt wurde, wurde die Blotapparatur nach folgendem Schema zusammengesetzt: Minuspol, Schwamm, Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-

Sammelgel, Filterpapier, Schwamm, Pluspol. Das Blotting erfolgte unter einer Spannung von 150 V und mit einer Stromstärke von 260 mA für 2 h bei 4 °C im Kühlschrank unter konstantem Rühren eines Magnetrührers.

Immundetektion

Die Membran wurde 1 h bei RT in 10 % Milchpulver (in TBST) blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer mit den entsprechenden primären Antikörpern (Tabelle 1) im zuvor verwendeten Blockpuffer inkubiert. Danach wurde die Membran in TBST in drei Waschsritten gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Dann wurde die Membran für 1-1,5 h bei RT auf dem Rollenmischer mit den entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Darauf folgten drei weitere Waschschrirte für 10 min in TBST. Zur Detektion wurde ECL (*enhanced chemiluminescence*) verwendet, welches das Substrat der Peroxidase enthält. Die Detektion des entstehenden Lichtsignals (Chemilumineszenz) erfolgte mit Hilfe des ChemiDoc MP-Imaging-Systems (Biorad).

3.2.14 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von Excel (Microsoft, Redmont, USA) und Origin 8.0 durchgeführt. Der ungepaarte Student's t-Test diente zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen dem Mittelwert einer Behandlung und dem Mittelwert einer Kontrolle. Dabei gilt eine Wahrscheinlichkeit von $\leq 95\%$ (p-Wert $\leq 0,05$) als signifikant.

Die mit DMSO behandelten Kontrollen sind mit 100 % festgesetzt worden und die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil darauf bezogen. Die DMSO-Kontrollen wurden als Referenz ausgewählt, um einen direkten Vergleich der Behandlungen zu ermöglichen.

4 Ergebnisse

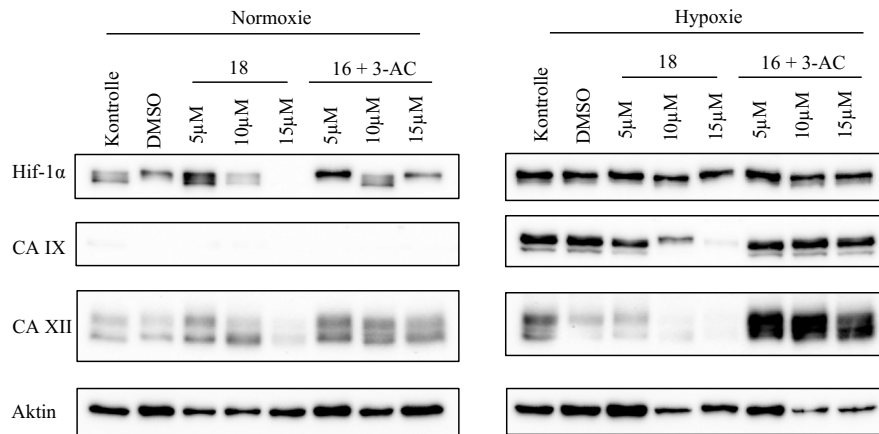
4.1 Effekte von 18 und 16+3AC auf den Proteingehalt von HIF-1 α , CA IX und CA XII mittels Western Blot

Zunächst wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, um den Einfluss der Substanzen 18 (3AC-Carboanhydraseinhibitor-Konjugat) und 16+3AC (Kombination der Ausgangssubstanzen) auf den Proteingehalt von Hif-1 α , CA IX und CA XII unter Normoxie und Hypoxie zu bestimmen. Dies wurde mit den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 h mit 5 μ M, 10 μ M und 15 μ M 18 bzw. 16+3AC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert. Hif-1 α war in allen untersuchten Zelllinien unter Hypoxie stärker nachweisbar als unter Normoxie. In den MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen nahm der Proteingehalt von Hif-1 α bei einer Behandlung mit der Substanz 18 leicht ab (Abbildung 6 A+B). Unter Hypoxie blieb das Proteinlevel jedoch annähernd gleich. In der Zelllinie HS578T konnte kein Effekt der Behandlung mit der Substanz 18 auf den Proteingehalt von Hif-1 α nachgewiesen werden. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit 16 und 3AC hatte in allen drei Zelllinien weder unter Normoxie noch unter Hypoxie einen Einfluss auf das HIF-1 α -Proteinlevel.

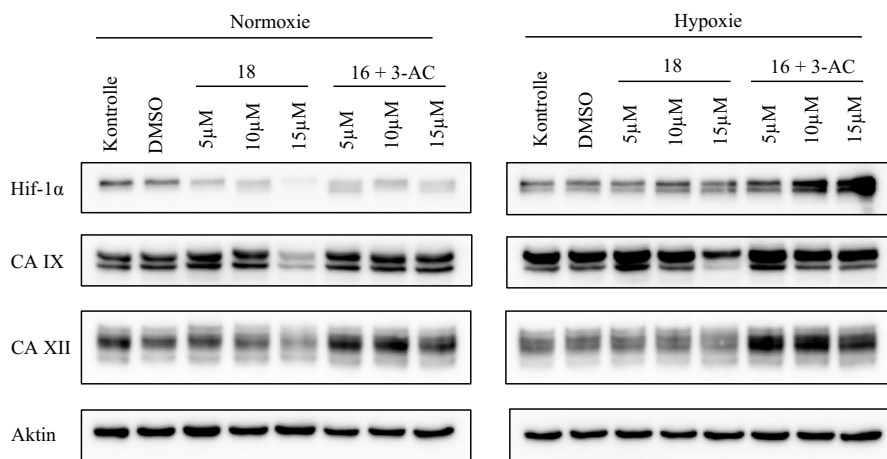
In der Zelllinie MDA-MB-231 war CA IX unter Normoxie nicht nachweisbar, jedoch in den beiden anderen Zelllinien MCF-7 und HS578T (Abbildung 6). In allen drei Zelllinien zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen eine Zunahme der CA IX-Level im Vergleich zur Normoxie. Die Behandlung der Zellen mit der Substanz 18 führte vor allem in den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 mit ansteigender Konzentration zu einer Verringerung des CA IX-Proteingehalts. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit 16 und 3AC hatte im gleichen Konzentrationsbereich unabhängig von der Sauerstoffkonzentration keinen Einfluss auf den CA IX-Proteingehalt.

Der Proteingehalt der CA XII sank mit steigender Konzentration der Substanz 18 in allen drei untersuchten Zelllinien unter normoxischen wie auch hypoxischen Bedingungen, wobei die Zelllinie HS578T die geringsten Effekte zeigte (Abbildung 6 C). Nach einer Behandlung mit 16+3AC war keine signifikante Veränderung des CA XII-Proteingehalts erkennbar.

A) MDA-MB-231



B) MCF-7



C) HS578T

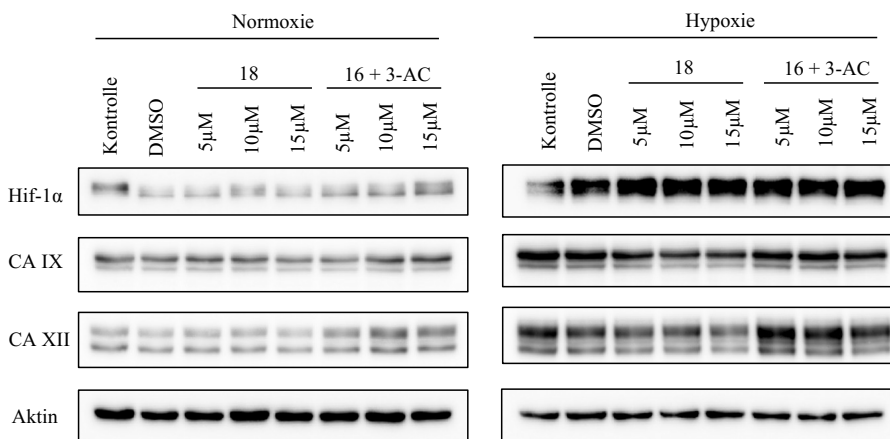


Abbildung 6: Western Blot-Analysen. Dargestellt ist der Proteingehalt von Hif-1α, PARP, CA IX, CA XII und Aktin der Zelllinien MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) und HS578T (C) unter Normoxie (21 % O₂) sowie Hypoxie (0,1 % O₂). Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Aktin diente als Ladekontrolle. Es wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei hier ein repräsentativer Blot dargestellt ist.

Zusammenfassend konnten Effekte auf den Proteingehalt von CA IX und CA XII nach einer Behandlung mit der Substanz 18, aber nicht durch die kombinierte Behandlung mit den beiden Einzelsubstanzen 16 und 3AC nachgewiesen werden.

4.2 Zytotoxizitätsanalyse und kolongenes Zellüberleben

4.2.1 Zytotoxizitätsanalyse mittels SRB-Assay

Die zelllinienspezifische Zytotoxizität der Substanzen 18, 16 und die der Kombination aus 16 und 3AC wurde mittels SRB-Assay bestimmt. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde in vorangegangenen Versuchen bereits die Zytotoxizität der Substanz 3AC untersucht [60].

In der vorliegenden Arbeit konnte bei allen drei untersuchten Zelllinien festgestellt werden, dass die Substanz 18 im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit der Substanz 16 bzw. der Kombination aus 16 und 3AC die stärkste Zytotoxizität aufweist (Abbildung 7). Die Substanz 16 wies mit einem IC_{50} -Wert $> 250 \mu\text{M}$ sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie die schwächsten Effekte auf (Tabelle 3).

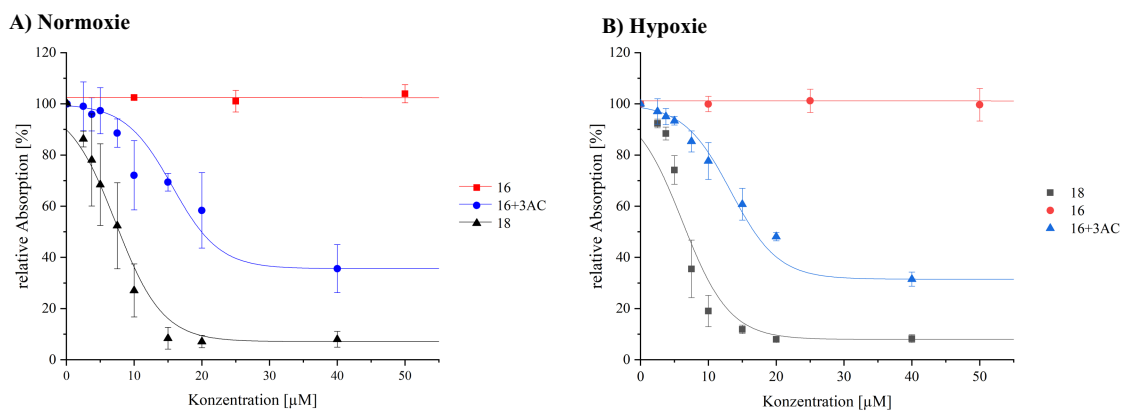


Abbildung 7: SRB-Assay der Zelllinie MDA-MB-231. Dargestellt sind die relativen Absorptionswerte ($n \geq 3$, Mittelwerte) der Zelllinie MDA-MB-231 nach 96 h Inkubation mit den Substanzen 16, 18 und 16+3AC unter (A) normoxischen (21 % O_2) bzw. (B) hypoxischen (0,1 % O_2) Bedingungen.

In der Zelllinie MDA-MB-231 war die Inkubation mit dem BS-Derivat 18 sowohl unter Normoxie ($IC_{50} = 6,5 \mu\text{M}$, $p = 0,008$) als auch unter Hypoxie ($IC_{50} = 6,7 \mu\text{M}$, $p \leq 0,001$) deutlich zytotoxischer im Vergleich zur Kombination 16+3AC (Tabelle 3). Diese wirkte unabhängig von der Sauerstoffkonzentration ähnlich zytotoxisch und erreichte unter Normoxie einen IC_{50} -Wert von $21,0 \mu\text{M}$ und unter Hypoxie $21,8 \mu\text{M}$.

Die Zelllinie MCF-7 wies gegenüber den Substanzen ähnliche Effekte auf wie die Zelllinie MDA-MB-231, jedoch reagierte die MCF-7 unter Normoxie sensitiver. Mit einem $IC_{50} = 5,0 \mu\text{M}$ wirkte die Substanz 18 bei der MCF-7 unter Normoxie am stärksten zytotoxisch. Auch die Kombination aus 16+3AC wirkte unter normoxischen Bedingungen am sensitivsten ($IC_{50} = 9,1 \mu\text{M}$) im Vergleich mit den Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T. Unter Hypoxie wirkten die Substanz 18 und die Kombination aus 16 und 3AC jedoch bei der Zelllinie MCF-7 im Vergleich zur Normoxie weniger zytotoxisch.

Die Zelllinie HS578T wies die höchste Resistenz gegenüber den Substanzen auf. Die IC_{50} -Werte unter Normoxie und Hypoxie waren in allen drei untersuchten Substanzen $> 10 \mu\text{M}$. Auch in der HS578T war die Substanz 18 (IC_{50} -Wert Normoxie = $10,1 \mu\text{M}$) signifikant ($p = 0,008$ Normoxie, $p \leq 0,001$ Hypoxie) sensitiver als die Kombination aus 16+3AC (IC_{50} -Wert Normoxie = $17,0 \mu\text{M}$).

Tabelle 3: IC_{50} -Werte von 18, 16+3AC und 16 ($n \geq 3$, Mittelwerte \pm SD)

Zelllinie	Substanz	Normoxie	Hypoxie
MDA-MB-231	18	$6,5 \mu\text{M} \pm 1,70$	$6,7 \mu\text{M} \pm 0,62$
	16+3AC	$21,0 \mu\text{M} \pm 7,29$	$18,7 \mu\text{M} \pm 1,40$
	16	$> 250 \mu\text{M}$	$> 250 \mu\text{M}$
MCF-7	18	$5,0 \mu\text{M} \pm 0,69$	$11,2 \mu\text{M} \pm 1,05$
	16+3AC	$9,1 \mu\text{M} \pm 1,96$	$> 40 \mu\text{M}$
	16	$> 250 \mu\text{M}$	$> 250 \mu\text{M}$
HS578T	18	$10,1 \mu\text{M} \pm 2,03$	$13,6 \mu\text{M} \pm 2,50$
	16+3AC	$17,0 \mu\text{M} \pm 5,50$	$21,8 \mu\text{M} \pm 2,66$
	16	$> 250 \mu\text{M}$	$> 250 \mu\text{M}$

Zusammenfassend zeigte die Substanz 18 im Vergleich zu der Kombination aus 16 und 3AC bei allen drei untersuchten Mammakarzinomzelllinien die höchste Zytotoxizität. Auch war unter Normoxie eine höhere Zytotoxizität festzustellen als unter Hypoxie.

Die Substanz 16 wirkte in allen drei untersuchten Zelllinien kaum zytotoxisch ($IC_{50} > 250 \mu\text{M}$).

Die Mammakarzinomzelllinie HS578T reagierte am resistentesten auf die Behandlung mit den getesteten Substanzen.

4.2.2 Einfluss auf das klonogene Zellüberleben

Mit Hilfe des Zellkoloniebildungstests wurden in den drei Zelllinien die Effekte der Inkubation mit der Substanz 18 und der Kombination 16+3AC auf das klonogene Überleben untersucht. Für diesen Versuch wurden die Zellen 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Substanzen unter Normoxie als auch unter Hypoxie behandelt.

Die absoluten Plattiereffizienzen waren unter Normoxie und Hypoxie bei den beiden triple-negativen Zelllinien MDA-MB-231 (Normoxie 62,7 %, Hypoxie 53,9 %) und HS578T (Normoxie 32,3 %, Hypoxie 31,1 %) in ähnlichen Bereichen. Bei der Zelllinie MCF-7 war die absolute Plattiereffizienz unter Hypoxie (21,9 %) im Vergleich zur Normoxie (39,7 %) signifikant reduziert ($p = 0,02$).

Die Untersuchung des klonogenen Zellüberlebens zeigte bei allen drei verwendeten Zelllinien nach der Inkubation mit Substanz 18 unabhängig vom Sauerstoffgehalt eine konzentrationsabhängige Reduktion (Abbildung 8). Bei der Zelllinie MDA-MB-231 sank die klonogene Überlebensrate sowohl unter Normoxie (61,8 %; $p = 0,01$) als auch unter Hypoxie (54,7 %; $p = 0,001$) bei einer Konzentration von 10 μM der Substanz ähnlich stark. Bei einer verwendeten Konzentration von 15 μM konnte eine Reduktion der klonogenen Überlebensrate auf 14 % ($p \leq 0,001$) bei normoxischen Bedingungen und bei Hypoxie auf 2,8 % festgestellt werden ($p \leq 0,001$) (Abbildung 8 A).

Ähnlich reagierten die Zellen der MCF-7. Unter Normoxie kam es sowohl bei einer Behandlung mit 10 μM (75 %) als auch bei einer eingesetzten Konzentration von 15 μM (6,4 %; $p = 0,001$) zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens (Abbildung 8 B). Unter hypoxischen Bedingungen sank das klonogene Überleben bei einer Behandlung mit 10 μM auf 34,2 % ($p = 0,002$) und bei 15 μM auf 4,9 % ($p = 0,0002$).

Die Zelllinie HS578T reagierte am resistentesten auf die in dieser Arbeit durchgeführten Behandlungen. Unter Normoxie wurde erst bei einer Konzentration von 20 μM der Substanz 18 eine Reduktion des klonogenen Überlebens auf 54,5 % erzielt. Unter hypoxischen Bedingungen sank bei gleicher Konzentration die klonogene Überlebensrate auf 16,9 % ($p = 0,002$) ab (Abbildung 8 C).

Die Behandlung mit der Kombination 16+3AC zeigte in allen drei untersuchten Zelllinien einen deutlich geringeren Einfluss auf das klonogene Überleben als die Substanz 18. In den Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T zeigte sich bei einer Konzentration von 10 μM 16+3AC kein bzw. nur ein geringer Einfluss auf das klonogene Überleben (Abbildung 8 A+C).

Unter normoxischen Bedingungen zeigte sich bei der MCF-7 durch die Behandlung mit 16+3AC ebenfalls kein Einfluss auf das klonogene Überleben. Unter Hypoxie reagierte sie jedoch deutlich sensibler: das klonogene Überleben sank bei 10 μM auf 64,4 % ($p = 0,04$) und bei 15 μM auf 54,9 % ($p = 0,01$) (Abbildung 8 B).

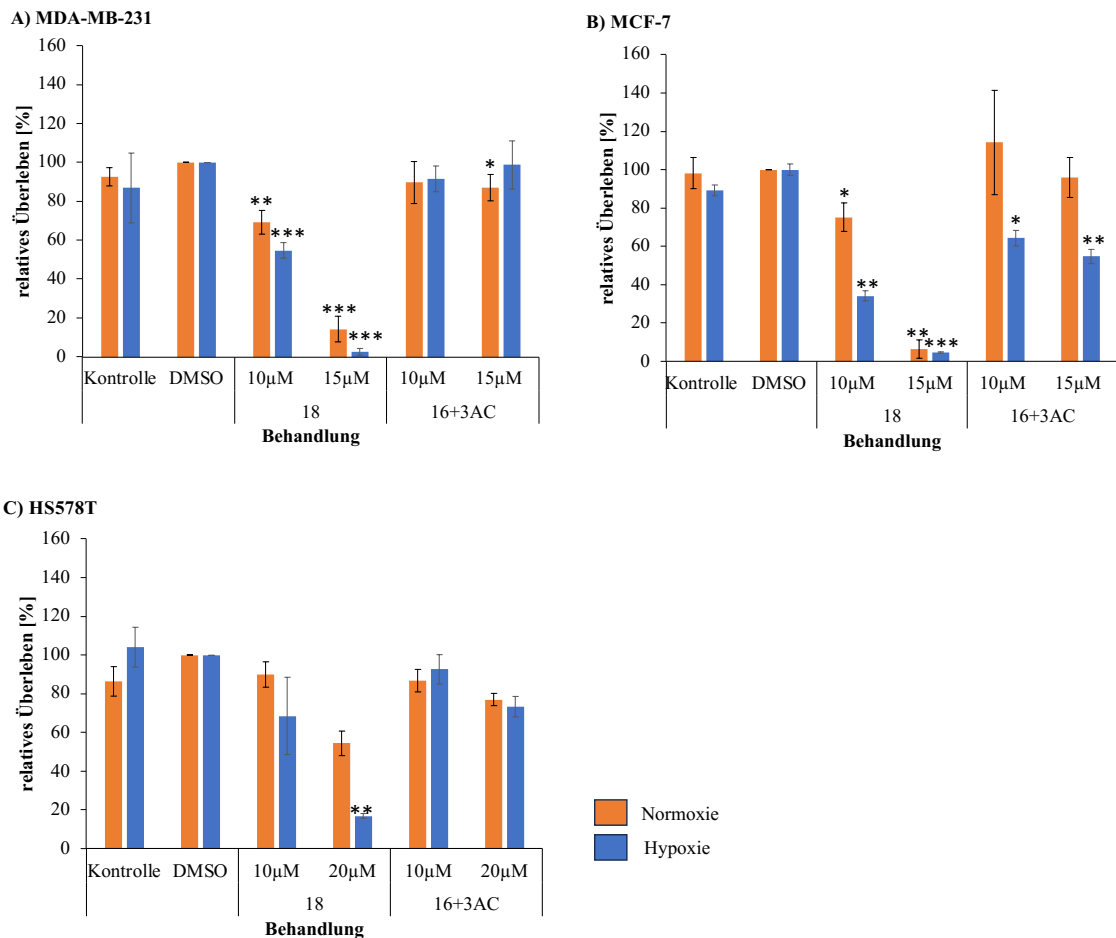


Abbildung 8: Klonogenes Zellüberleben. Dargestellt ist das relative klonogene Zellüberleben der Zelllinien MDA-MB-231 (A), MCF-7 (B) und HS578T (C) unter normoxischen (21 % O_2) und hypoxischen (0,1 % O_2) Bedingungen ($n \geq 3$ Mittelwerte \pm SD). Es wurden sowohl unbehandelte Zellen (Kontrolle), als auch eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) mitgeführt. Der p -Wert wird gekennzeichnet durch * ($p \leq 0,05$) bzw. ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$).

Insgesamt konnte nach Inkubation der jeweiligen Substanzen eine konzentrationsabhängige Reduktion auf das klonogene Überleben beobachtet werden. Bei allen drei untersuchten Zelllinien war nach Behandlung mit der Substanz 18 eine stärkere Reduktion des klonogenen Zellüberlebens zu erkennen als bei einer kombinierten Behandlung mit den Substanzen 16 und 3AC. Zusätzlich wurden die Effekte bei einer

Inkubation unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich mit normoxischen Bedingungen insbesondere durch die Substanz 18 in allen drei Zelllinien verstärkt.

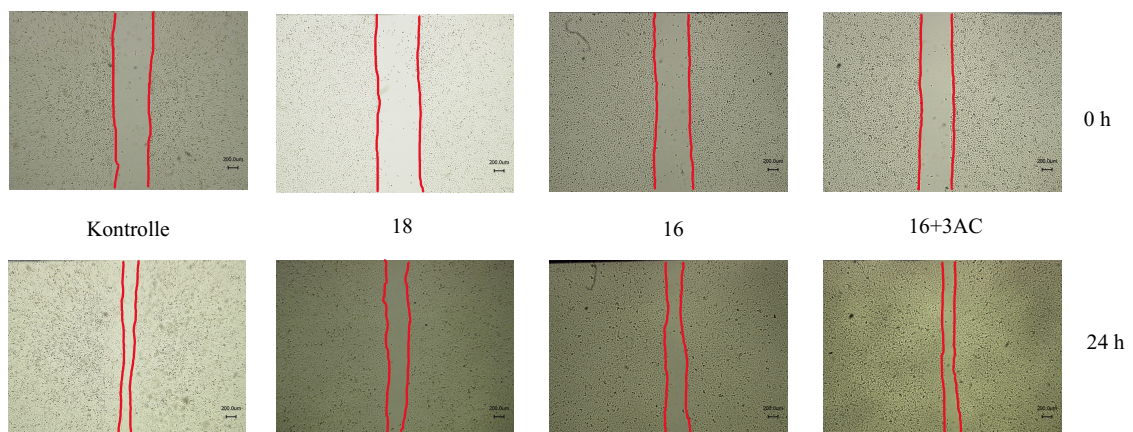
4.3 Einfluss auf die Zellmigration

Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten in der Zelllinie MDA-MB-231 eine geringe Reduktion der Migration nach 16 h Inkubation mit 3AC. Nach einer Behandlung mit der äquimolaren Kombination der Substanzen 3AC (BS-Derivat) und OCT (CAI) kam es zu einer Hemmung der Migrationsrate mit 20 μM um 38 % [60].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Substanzen 18, 16 bzw. der Kombination 16+3AC auf die Zellmigration mit Hilfe des Wundheilungsassay untersucht. Dazu wurde einem konfluenten Zellrasen eine Wunde mit Hilfe einer Pipettenspitze zugefügt, sodass ein zellfreier Bereich entsteht (0 h). Die Zelllinien MDA-MB-231 bzw. HS578T wurden anschließend mit den Substanzen 18, 16 und der Kombination 16+3AC für 24 h bzw. 16 h inkubiert.

In der Zelllinie MDA-MB-231 konnte nach Behandlung mit der Substanz 18 ein inhibierender Effekt auf die Migration gezeigt werden (Abbildung 9 A). Mit einer Konzentration von 10 μM kam es zu einer Reduktion der Migration auf 89 %. Während die Behandlung mit 10 μM der Substanz 16 keinen Einfluss auf die Migration hatte, war nach der Behandlung mit 10 μM 16+3AC eine Reduktion auf 84 % nachweisbar (Abbildung 10).

A) MDA-MB-231



B) HS578T

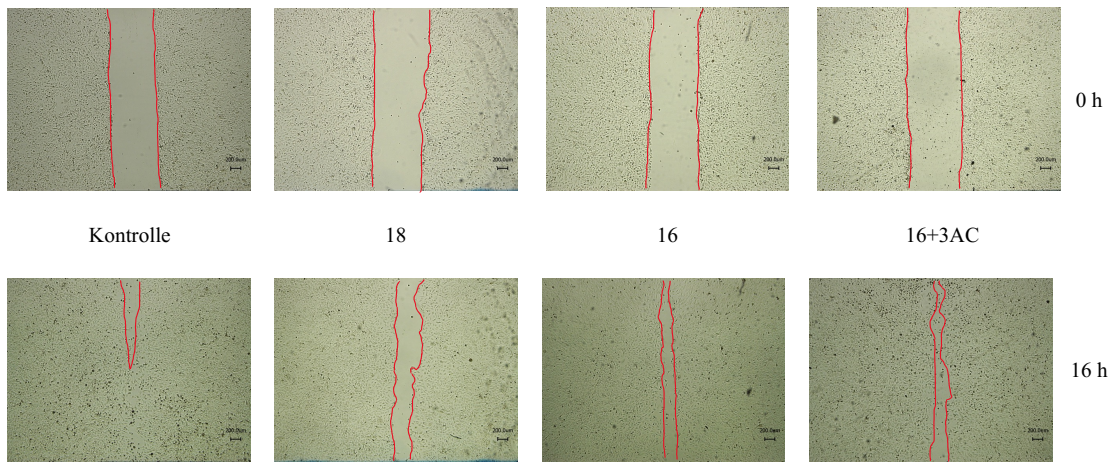


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen zum Wundheilungsassay. Dargestellt ist die repräsentative Durchführung des Wundheilungsassays. Mittels einer Pipettenspitze wurde dem konfluenten Zellrasen der Zelllinie MDA-MB-231(A) bzw. HS578T (B) zum Zeitpunkt 0 h eine definierte Wunde zugefügt. Nach 24 h bzw. 16 h unter normoxischen (21 % O₂) Bedingungen wurde das Wiedereinwandern der Zellen ermittelt.

Die Zelllinie HS578T reagierte stärker auf die Behandlung mit 10 µM der Substanzen 18 und 16 (Abbildung 9 B). Dabei kam es zu einer Reduktion der Migration auf 78 % (Substanz 18, $p = 0,02$) und 75 % (Substanz 16). Die Behandlung mit 10 µM 16+3AC hatte keinen Einfluss auf die Migration der HS578T-Zellen (Abbildung 10).

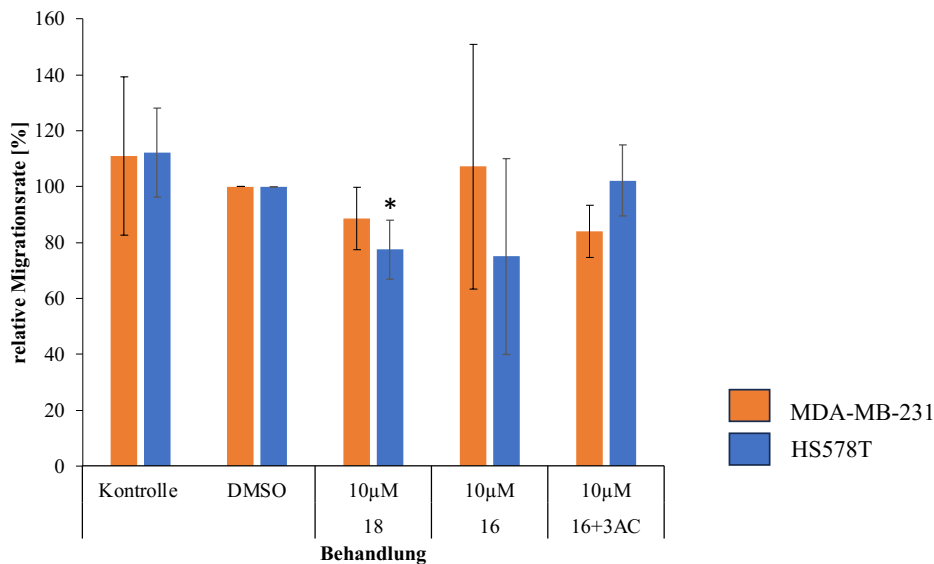


Abbildung 10: Migration der Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T nach Inkubation mit 18, 16 bzw. 16+3AC. Dargestellt ist die relative Migrationsrate ($n \geq 3$, Mittelwerte + SD) in Abhängigkeit von der Behandlung der Zellen unter Normoxie (21 % O₂). Es wurden sowohl unbehandelte Zellen (Kontrolle), als auch eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) mitgeführt. Der p -Wert wird gekennzeichnet durch * ($p \leq 0,05$).

In zusätzlichen Untersuchungen wurde die Auswirkung auf die Migrationsfähigkeit der Zellen der MDA-MB-231 und HS578T unter Hypoxie untersucht. Durch die Behandlung der Zellen mit DFO 24 h vor dem *scratch*-Test, wurde eine CA IX-Induktion, ähnlich wie unter hypoxischen Bedingungen induziert. Jedoch konnten unter diesen Bedingungen keine Effekte auf die Zellmigration durch die Substanzen 18, 16 und der Kombination 16+3AC festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Substanzen 18, 16 und die Kombination aus 16+3AC unter Normoxie eine geringe Migrationshemmung in Mammakarzinomzellen hervorrufen. Nach Induktion von CA IX durch DFO sind dagegen keine Effekte nachweisbar.

4.4 Zelltodanalyse

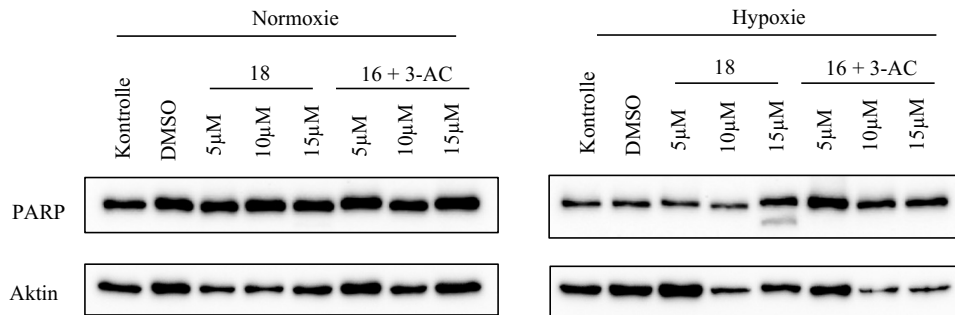
4.4.1 PARP-Spaltung

Das Enzym PARP wird zur Reparatur von Einzelstrangbrüchen der DNA benötigt. Wird PARP durch die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 gespalten, kommt es zur Blockade der DNA-Reparatur und die Apoptose wird eingeleitet [69]. Deshalb kann die gespaltene Form (89 kDa) zur Identifikation von Apoptose genutzt werden.

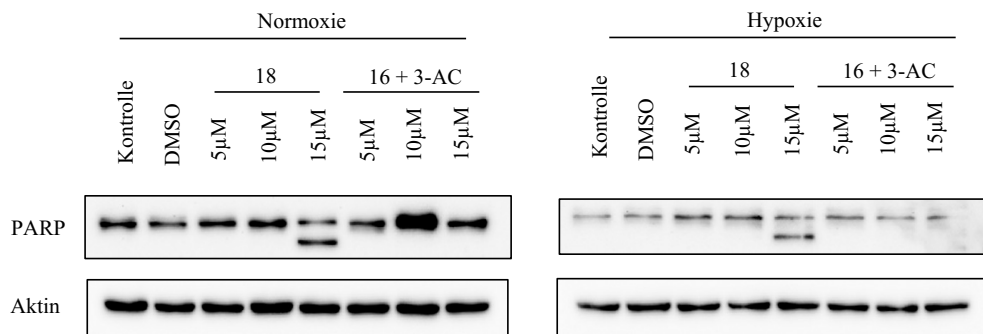
Die Spaltung des Apoptosemarkers PARP wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen nach 24 h Inkubation mit den Substanzen 18 und 16+3AC mit den Konzentrationen 5 μ M, 10 μ M und 15 μ M in den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen untersucht (Abbildung 11).

In den Western Blot-Analysen zur Apoptose konnte in der Zelllinie HS578T weder unter Normoxie noch unter Hypoxie durch Inkubation mit den eingesetzten Konzentrationen (bis 15 μ M 18 bzw. 16+3AC) gespaltenes PARP nachgewiesen werden (Abbildung 11 C.). Die Zellen der MDA-MB-231 zeigten unter Normoxie nach Behandlung mit den jeweiligen Substanzen keine PARP-Spaltung. Nach der Behandlung mit 15 μ M der Substanz 18 wurde unter hypoxischen Bedingungen eine Spaltung des Apoptosemarkers nachgewiesen (Abbildung 11 A). In der Zelllinie MCF-7 konnte unter Normoxie und Hypoxie eine Spaltung des Proteins PARP nach der Behandlung mit 15 μ M 18 detektiert werden (Abbildung 11 B). In allen drei Zelllinien wurde, anders als nach der Inkubation mit der Substanz 18, durch die kombinierte Behandlung aus 16 und 3AC bis 15 μ M weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen eine Apoptoseinduktion nachgewiesen (Abbildung 11).

A) MDA-MB-231



B) MCF-7



C) HS578T

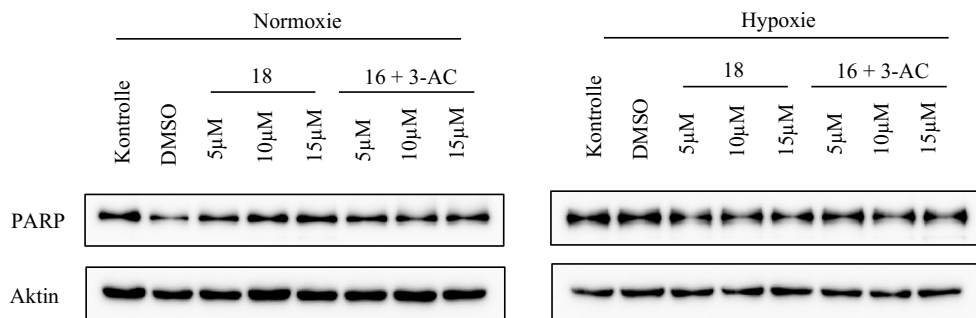


Abbildung 11: Western Blot-Analyse des Protein PARP. Dargestellt ist der Proteingehalt von PARP in den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T unter Normoxie (21 % O₂) sowie Hypoxie (0,1 % O₂). Es wurden jeweils 50 μg Gesamtprotein aufgetragen. Aktin diente als Ladekontrolle. Es wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei hier ein repräsentativer Blot dargestellt ist.

Insgesamt zeigt sich in den untersuchten Mammakarzinomzelllinien, dass die Substanz 18 deutlich stärker pro-apoptotisch wirkt als die Kombination aus 16 und 3AC.

4.4.2 Annexin-PI

Mit Hilfe der Annexin-PI Färbung wurde der Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit der Substanz 18 und der Kombination 16+3AC für die Zelllinie MDA-MB-231 bestimmt.

Die Messungen wurden am Durchflusszytometer LSR II Fortessa (BD Biosciences, Heidelberg, DE) durchgeführt. In Abbildung 12 sind repräsentative *Dot plots* dargestellt. Diese werden in vier Quadranten unterteilt, in denen die nekrotischen Zellen (Q1), Zellen in der späten Apoptose (Q2), vitale Zellen (Q3) und Zellen in der frühen Apoptose (Q4) voneinander unterschieden werden können.

Die Kombination aus 16+3AC zeigte bei 10 und 20 μM unter Normoxie und Hypoxie keine Zelltodinduktion (Abbildung 13).

Die Substanz 18 zeigte unter normoxischen Bedingungen bei 10 und 15 μM ebenfalls keine Effekte (Abbildung 13 A). Die Behandlung der MDA-MB231-Zellen mit 20 μM 18 führte zu einem Anstieg der nekrotischen Zellen auf 4,5 % ($p < 0,001$) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (0,3 %). Bei den spätapoptotischen Zellen war eine Verdreifachung von 7,4 % (DMSO) auf 21,2 % ($p = 0,001$) zu verzeichnen. Bei den Zellen der frühen Apoptose kam es nach Behandlung mit 20 μM kaum zu einem Anstieg bei 1,8 % im Vergleich zu 1,2 % DMSO (Abbildung 13 A). Unter Hypoxie war bereits bei 15 μM eine deutliche Zunahme an nekrotischen Zellen (auf 4,8 % ($p = 0,01$)) und spätapoptotischen Zellen (19,8 % ($p \leq 0,001$)) nachweisbar (Abbildung 13 B). Der Anteil der nekrotischen Zellen stieg von 0,3 % bei den DMSO-behandelten Zellen auf 21,8 % bei Behandlung der Zellen mit 20 μM Substanz 18 ($p = 0,05$). Die Zellen in der späten Apoptose machten bei einer Behandlung mit 20 μM 18 55,3 % ($p = 0,015$) aus. Der Anteil der Zellen in der frühen Apoptose sank von 0,8 % (DMSO) auf 0,2 % ($p = 0,006$).

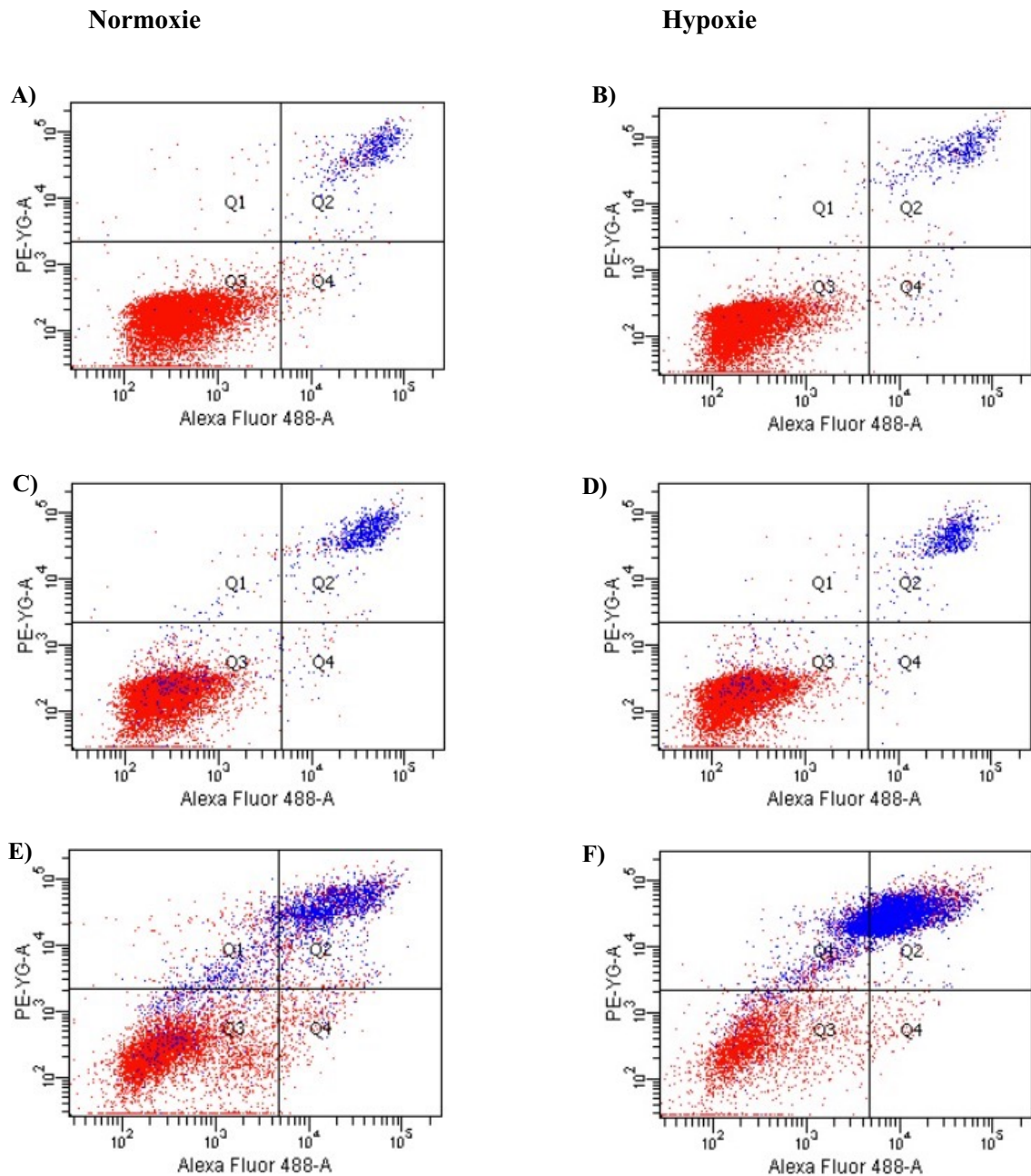


Abbildung 12: Dot Plot der Annexin-PI Färbung. Dargestellt sind repräsentative Dot Plots der Zelllinie MDA-MB-231 der jeweiligen Behandlung mit DMSO (A, B), 20 μM der Substanzkombination 16+3AC (C, D) und 20 μM der Substanz 18 (E, F) unter Normoxie (21 % O₂) bzw. Hypoxie (0,1 % O₂). Dabei wird im Dot Plot auf der vertikalen Achse die Fluoreszenzintensität der Propidiumiodid-Färbung und auf der horizontalen Achse die Fluoreszenzintensität der Annexin-Färbung definiert. Die Quadranten stellen jeweils die nekrotischen Zellen (Q1), Zellen in der späten Apoptose (Q2), vitale Zellen (Q3) und Zellen in der frühen Apoptose (Q4) dar. Das Gating der Annexin-PI Messung erfolgte auf Grundlage einer Negativ- (unbehandelte, ungefärbte Zellen) und Positivkontrolle (0,1 μM Staurosporine).

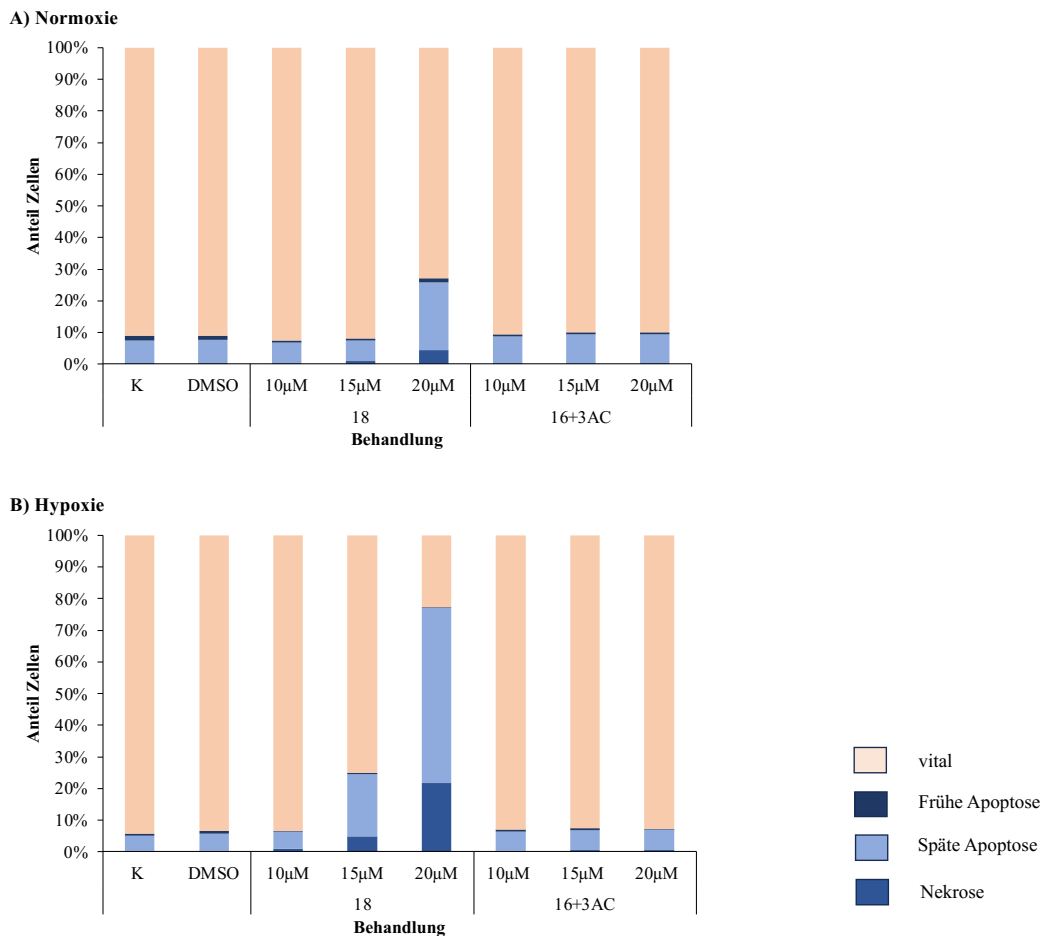


Abbildung 13: Relatives Zellüberleben der Zelllinie MDA-MB-231. Dargestellt ist das Zellüberleben der Zelllinie MDA-MB-231 unter (A) Normoxie (21 % O₂) und (B) Hypoxie (0,1 % O₂) (n ≥ 3, Mittelwerte). Es wurden sowohl unbehandelte Zellen (Kontrolle), als auch eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) mitgeführt.

Die Färbung mittels Annexin-PI zeigte nur nach Behandlung mit der Substanz 18 einen Anstieg der Zellen im Stadium der späten Apoptose jedoch kaum in der frühen Apoptose. Unter normoxischen Bedingungen war dieser Anstieg nach einer Behandlung mit 20 µM zu verzeichnen und unter hypoxischen Bedingungen schon ab einer verwendeten Konzentration von 15 µM.

4.4.3 Analyse von Zelltodarten durch Zelltodinhibitoren mittels CellTiter-Glo-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo-Assay in der Zelllinie MDA-MB-231 die Menge der viablen Zellen nach Inkubation mit 20 µM 18 in Kombination mit verschiedenen Zelltodinhibitoren unter normoxischen Bedingungen bestimmt (Abbildung 14). Die gemessene relative Absorption ist dabei proportional zur Menge der lebenden Zellen.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit der Substanz 18 konnte eine Reduktion der Zellviabilität auf 67,7 % nachgewiesen werden.

Durch die Kombination der Substanz 18 mit dem Ferroptose-Inhibitor Ferrostatin, dem Nekrose-Inhibitor Necrosulfonamid bzw. dem Autophagie-Inhibitor Hydrochloroquin sank die Vitalität auf circa 60 %. Die Zugabe der Inhibitoren hatte keinen Effekt auf die Zellviabilität. Allerdings zeigten die MDA-MB-231-Zellen nach Inkubation der Substanz 18 mit dem Apoptose-Inhibitor Z-VAD-FMK in Kombination mit der Substanz 18 eine Viabilität von 98,5 %. Diese lag auf dem Niveau der Kontrollzellen (DMSO) (Abbildung 14). Dies bestätigen die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchungen. Es handelt sich bei dem durch die Substanz 18 induzierten Zelltod hauptsächlich um Apoptose, während andere Zelltodformen ausgeschlossen werden konnten, da diese Inhibitoren keinen Effekt auf die Zellviabilität zeigen konnten.

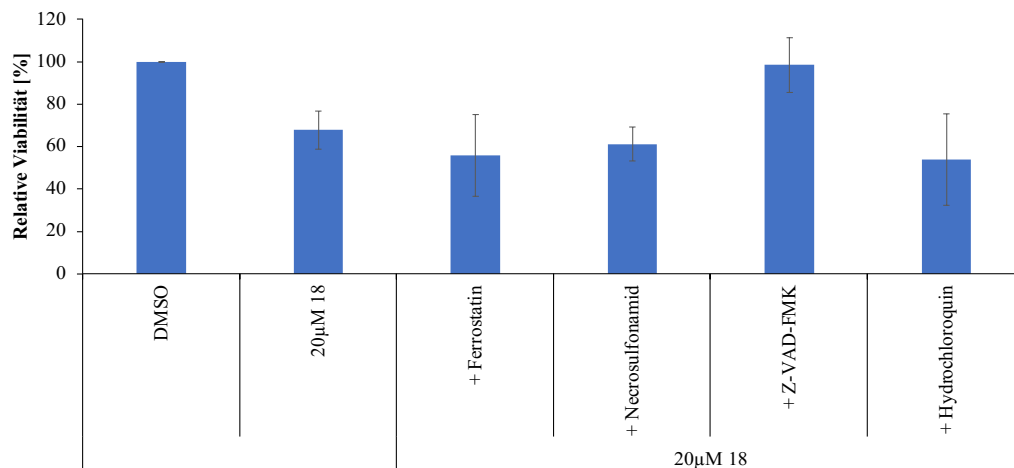


Abbildung 14: CellTiter-Glo-Assay der Zelllinie MDA-MB-231. Dargestellt ist die relative Viabilität ($n \geq 3$, Mittelwerte \pm SD) der Zelllinie MDA-MB-231 nach 24 h Inkubation mit der Substanz 18 bzw. in Kombination dieser mit verschiedenen Zelltodinhibitoren unter normoxischen Bedingungen (21 % O_2).

4.5 Einfluss auf die ROS-Induktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Substanzen 18 bzw. der Kombination 16+3AC auf die ROS-Induktion mit Hilfe des CM-H₂DCF-DA-Assay untersucht. Dazu wurden die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, HS578T und MCF-7 24 h mit der Substanz 18 bzw. der Kombination 16+3AC unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen behandelt. Danach erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff CM-H₂DCF-DA.

In allen drei untersuchten Zelllinien führte die Behandlung mit der Substanz 18 unabhängig von den Kultivierungsbedingungen zu einer konzentrationsabhängigen ROS-

Induktion, während nach kombinierter Behandlung der Zellen mit 16 und 3AC im gleichen Konzentrationsbereich ein geringerer Einfluss auf die ROS-Bildung nachgewiesen werden konnte. Die Zelllinie MDA-MB-231 wies unter normoxischen Bedingungen den höchsten Anstieg einer ROS-Induktion auf. Nach Inkubation mit 15 μ M 18 war eine signifikante Zunahme der CM-DCF-Fluoreszenzintensität auf das 50-fache ($p = 0,03$) zu verzeichnen (Abbildung 15 A). Die Zellen der MCF-7 zeigten bei gleicher Behandlung und normoxischer Inkubation eine Zunahme des ROS-Level auf das 35-fache ($p = 0,01$) (Abbildung 15 B). Die geringste ROS-Induktion wurde bei der Zelllinie HS578T ermittelt. Unter Normoxie kam es zu einem Anstieg auf das 17-fache ($p = 0,0002$) im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 15 C).

Bei der Behandlung mit 15 μ M der Substanzkombination 16+3AC war unter normoxischen Bedingungen lediglich bei der Zelllinie MDA-MB-231 ein CM-DCF-Fluoreszenzanstieg auf das 5-fache nachweisbar. In den beiden anderen Zelllinien MCF-7 und HS578T hatte die Inkubation mit 16+3AC im Konzentrationsbereich bis 15 μ M keinen Einfluss auf die ROS-Bildung.

Unter Hypoxie inkubierte Kontrollzellen zeigten, im Vergleich zu normoxisch inkubierten Zellen, einen erhöhten ROS-Anteil, weshalb diese Zellen im *Dot Plot* eine Verschiebung nach rechts aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Unter Hypoxie konnte in der Zelllinie MDA-MB-231 nach einer Behandlung mit 15 μ M der Substanz 18 eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität auf das 3-fache ($p = 0,02$) bzw. 35-fache ($p = 0,02$) in der Zelllinie MCF-7 und 30-fache bei der HS578T ($p = 0,006$) festgestellt werden.

Die Behandlung mit der Kombination 16+3AC bewirkte unter hypoxischen Bedingungen bei den Zellen der MDA-MB-231 bzw. MCF-7 lediglich einen schwachen Anstieg der CM-DCF-Fluoreszenzintensität auf das 2-fache bzw. 1,4-fache (Abbildung 15). Bei der Zelllinie HS578T konnte kein Effekt auf die ROS-Bildung nachgewiesen werden.

Zusammenfassend war eine starke dosisabhängig gesteigerte ROS-Produktion sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen in allen drei Zelllinien nach Behandlung mit der Substanz 18 zu verzeichnen. Die Behandlung mit 16+3AC bewirkte nur eine geringe Zunahme der ROS-Produktion.

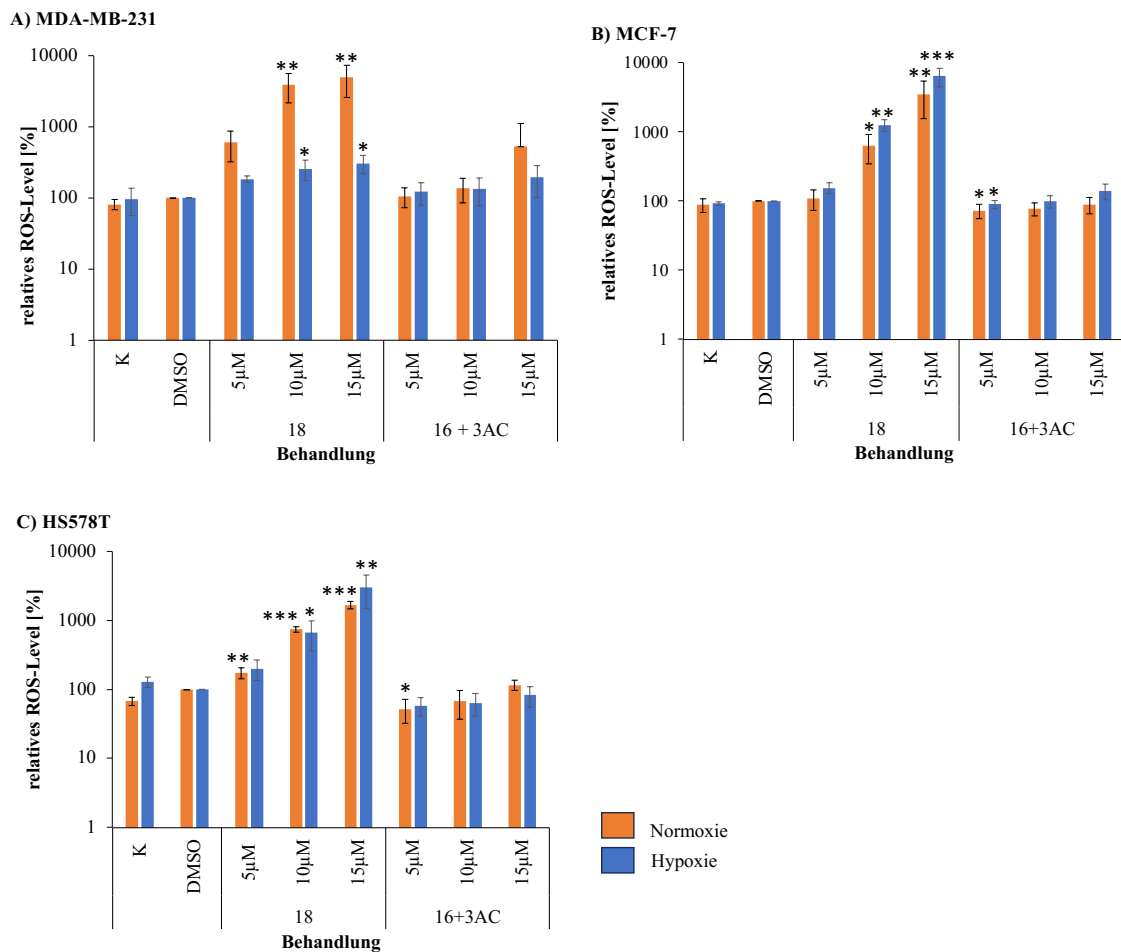


Abbildung 15: ROS-Induktion nach 24 h Inkubation. Dargestellt ist die mittels Durchflusszytometrie bestimmte ROS-Produktion nach Inkubation mit der jeweiligen Substanz unter Normoxie (21% O₂) bzw. Hypoxie (0,1% O₂) (n ≥ 3, Mittelwerte ± SD) in den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231(A) und MCF-7 (B) bzw. HS578T (C). Der p-Wert ist gekennzeichnet durch * (p ≤ 0,05) bzw. ** (p ≤ 0,01) und *** (p ≤ 0,001).

4.6 Einfluss auf die Radiosensitivität

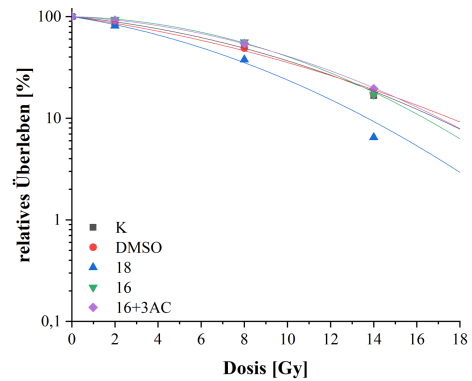
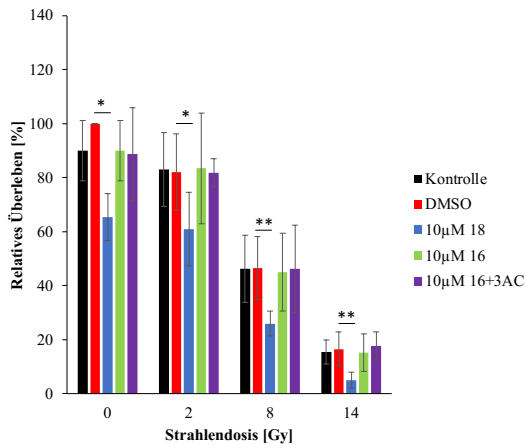
Der Einfluss der Substanz 18 bzw. der Kombination von 16+3AC auf die Radiosensitivität der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T bei Hypoxie wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht. In den Versuchen zum klonogenen Überleben zeigte sich, dass es bei 24-stündiger Inkubation mit 10 µM der Substanz 18 unter Hypoxie zu einer Reduktion auf 50 % (MDA-MB-231) bzw. 30 % (MCF-7) kam (Abbildung 8 A+B). Die Zelllinie HS578T reagierte deutlich resistenter. Hier zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen bei 20 µM eine Reduktion des klonogenen Überlebens auf 15,6 % (Abbildung 8 C). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Einfluss auf die Radiosensitivität unter hypoxischen Bedingungen für die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 nach 24-stündiger Inkubation mit 10 µM der Substanzen 18, 16 und der

Kombination 16+3AC und zusätzlicher Bestrahlung mit 2 Gy, 8 Gy und 14 Gy untersucht. Die Zellen der HS578T wurden mit 20 µM der drei getesteten Substanzen ebenfalls 24 h inkubiert und anschließend mit 4 Gy, 10 Gy und 16 Gy bestrahlt. Um den Gesamteffekt zu bewerten, wurden die Messwerte der Kontrolle aller drei untersuchten Zelllinien ohne Behandlung und Bestrahlung auf 100 % gesetzt und die Messwerte nach Substanzbehandlung und Bestrahlung dazu ins relative Verhältnis gesetzt (Abbildung 16 links). Das klonogene Zellüberleben der Zelllinie MDA-MB-231 (DMSO) betrug nach Kultivierung unter Hypoxie nach Bestrahlung mit 2 Gy 82,1 %, nach 8 Gy 46,6 % und nach 14 Gy 16,6 % (Abbildung 16 A). Die Behandlung mit der Substanz 16 bzw. der Kombination aus 16+3AC zeigten auch in Kombination mit Bestrahlung keine Effekte auf das klonogene Überleben. Das klonogene Überleben betrug bei Bestrahlung mit 2 Gy 83,5 % bei der Substanz 16 und 81,8 % bei der Kombination. Bei 8 Gy lag das klonogene Zellüberleben bei 44,9 % (16) und 46,3 % (16+3AC) und bei 14 Gy bei 15,2 % (16) und 17,6 % (16+3AC). Einen Einfluss auf das klonogene Überleben zeigte die Behandlung mit der Substanz 18 in Kombination mit Bestrahlung: So betrug das klonogene Überleben der unbestrahlten Zellen 65,8 %. Nach Bestrahlung mit 2 Gy sank das klonogene Überleben auf 60,9 % ($p = 0,02$) ab, bei 8 Gy auf 25,9 % ($p = 0,002$) und bei 14 Gy auf 5,1 % ($p = 0,01$).

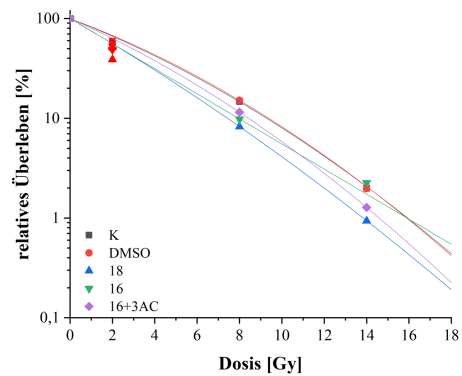
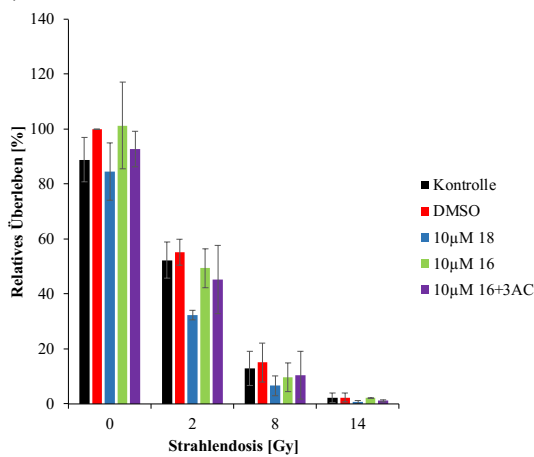
Die Zelllinie MCF-7 reagierte nach Behandlung mit 10 µM der Substanzen 18, 16 und der Kombination aus 16+3AC ähnlich, wie die Zelllinie MDA-MB-231. Das klonogene Überleben betrug nach Kultivierung unter Hypoxie nach Bestrahlung mit 2 Gy 65,4 %, nach 8 Gy 11,4 % und nach 14 Gy 1,5 % (Abbildung 16 B). Nach Behandlung der Zellen mit 10 µM der Substanz 18 betrug das klonogene Überleben bei 2 Gy 41,1 % ($p = 0,16$), bei 8 Gy 5,0 % und 14 Gy 0,6 %. Bei den Behandlungen mit 10 µM der Substanz 16 und der Kombination 16+3AC wurde eine klonogene Überlebensrate nach Bestrahlung mit 2 Gy von 44,1 % (16) bzw. 53,4 % (16+3AC), mit 8 Gy 7,4 % (16) bzw. 7,9 % (16+3AC) und bei 14 Gy mit 1,7 % (16) und 0,9 % (16+3AC) gemessen.

Das klonogene Zellüberleben der Zelllinie HS578T betrug nach Kultivierung unter Hypoxie nach Bestrahlung mit 4 Gy 76,1 %, nach 10 Gy 41,4 % und nach 16 Gy 11,2 % (Abbildung 16 C). Bei Bestrahlung mit 4 Gy lag das klonogene Überleben in ähnlichen Bereichen (18: 14,0 % ($p = 0,01$), 16: 56,6 %, 16+3AC: 64,2 %). Erst nach Bestrahlung mit 16 Gy zeigten sich deutliche Unterschiede im klonogenen Überleben. So betrug die klonogene Überlebensrate nach Behandlung mit 20 µM 18 1,6 % ($p = 0,001$), mit der Substanz 16 8,9 % und mit der Kombination aus 16+3AC 10,0 %.

A) MDA-MB-231



B) MCF-7



C) HS578T

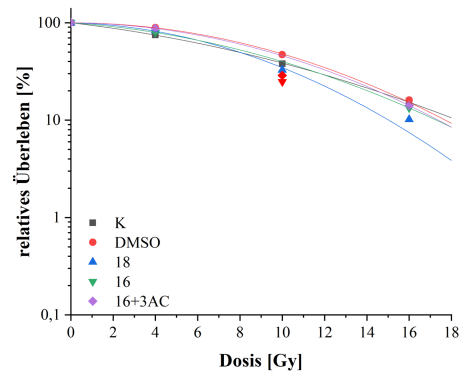
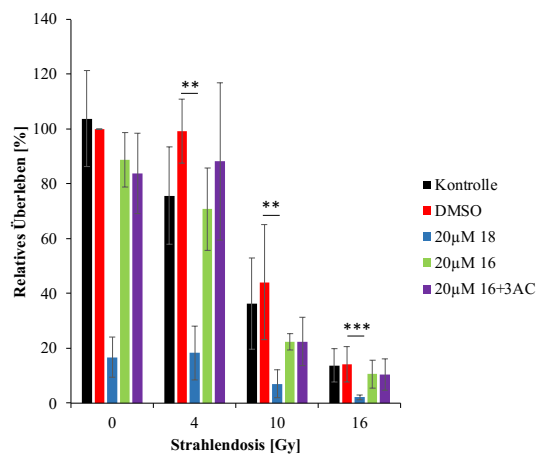


Abbildung 16: Einfluss der Substanzen 18, 16 bzw. der Kombination aus 16 und 3AC auf das klonogene Zellüberleben in Abhängigkeit von der Strahlendosis und der Radiosensitivität der Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T unter Hypoxie. Dargestellt ist das klonogene Zellüberleben ($n \geq 3$, Mittelwerte + SD) nach 24 h-Inkubation mit den Substanzen in Abhängigkeit von der Strahlendosis nach 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 14 Gy und/oder 16 Gy der Zelllinien (A) MDA-MB-231, (B) MCF-7 und (C) HS578T im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (auf der linken Seite dargestellt) sowie der Einfluss auf die Radiosensitivität (rechts dargestellt). Der p-Wert zwischen Behandlung und der DMSO-Kontrolle bei 0 Gy, 2 Gy, 8 Gy bzw. 10 Gy und 14 Gy bzw. 16 Gy wird durch * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) bzw. *** ($p \leq 0,001$) dargestellt.

Für die Beurteilung des Einflusses der Behandlung der Zellen auf die Radiosensitivität wurden die Proben der jeweiligen Behandlung bei 0 Gy auf 100 % gesetzt und der DMF10 ermittelt. Die Kombination aus Bestrahlung und Inkubation mit der Substanz 18 führte unter hypoxischen Bedingungen bei allen drei Mammakarzinomzelllinien zu einer Radiosensitivierung (Tabelle 4). Der DMF 10 betrug dabei 1,40 (MDA-MB-231), 1,19 (MCF-7) bzw. 1,45 (HS578T). Dagegen hatte die alleinige Inkubation mit der Substanz 16, sowie die Kombination aus 16+3AC in der Zelllinie MDA-MB-231 keinen Einfluss auf die Radiosensitivität. Jedoch führte in der Zelllinie MCF-7 sowohl die Substanz 16 als auch die Kombination 16+3AC zu einer erhöhten Radiosensitivität (DMF 10 = 1,17 bzw. DMF 10 = 1,20). In der Mammakarzinomzelllinie HS578T zeigten sich ebenfalls moderate Effekte nach einer Behandlung mit 16 oder 16+3AC auf die Radiosensitivität (Tabelle 4). Dies Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

Tabelle 4: Dosis modifizierender Faktor 10 (DMF 10)

Bezeichnung	MDA-MB-231	MCF-7	HS578T
18	1,40 ± 0,13 (p = 0,1)	1,19 ± 0,04 (p = 0,3)	1,45 ± 0,56 (p = 0,2)
16+3AC	1,05 ± 0,04 (p = 0,9)	1,20 ± 0,17 (p = 0,4)	1,17 ± 0,26 (p = 0,4)
16	0,98 ± 0,05 (p = 0,8)	1,17 ± 0,06 (p = 0,4)	1,15 ± 0,29 (p = 0,6)

Abschließend kann gesagt werden, dass die Behandlung mit der Substanz 18 in allen drei untersuchten Zelllinien zu einer deutlichen Radiosensitivierung führte im Vergleich zur Behandlung mit den Substanzen 16 und 16+3AC.

5 Diskussion

In malignen Tumoren kommt es aufgrund des rasanten Tumorwachstums zu schlecht perfundierten Tumorarealen. Daraus entsteht eine intra- und extrazelluläre Azidose bedingt durch hypoxische Bereiche. Tumorzellen haben Mechanismen entwickelt, um den pH-Wert unter diesem hypoxischen Stress zu regulieren. Diese Aufgabe übernimmt in vielen Tumorzellen u. a. die CA IX, welche durch HIF-1 induziert wird. Die CA IX ist in Tumorzellen stärker exprimiert als im Normalgewebe. Dieses vermehrte Vorhandensein der CA IX ist mit einer größeren Tumoraggressivität, einer stärkeren Tumorprogression und einer schlechteren Prognose für betroffene Patienten assoziiert. Tumorhypoxie und die damit verbundene CA IX-Induktion bewirken eine Strahlenresistenz und ein aggressiveres Verhalten des Tumors [70].

In der Literatur finden sich vielversprechende Ansätze, um die CA IX zu inhibieren und somit die Tumoraggressivität zu senken und die Prognose für Betroffene dadurch zu verbessern. Calcinotto und Kollegen zeigten, dass ein weniger saures Milieu die Invasivität eines Tumors hemmt und die Metastasierungstendenz mindert [71].

In aktuellen Forschungen steht BS aufgrund seiner tumorselektiven, hohen hypoxischen Zytotoxizität und radiosensitivierenden Wirkung im Fokus. In Untersuchungen in Glioblastomzellen zur Wirkung der BS wurde eine radiosensitivierende Wirkung festgestellt [54]. In Mammakarzinomen zeigte BS eine additive Wirkung [55]. Ein Problem für die gute Anwendbarkeit als Tumorthapeutikum stellt vor allem die schlechte Löslichkeit der BS dar. Zur Verbesserung dieser Eigenschaft werden neue Derivate entwickelt, die eine bessere Löslichkeit als BS aufweisen. Neueste Untersuchungen beschäftigen sich zudem damit funktionelle Gruppen wie Sulfamate und Sulfonamide an die BS anzukoppeln, die in der Lage sind, die tumorrelevanten CAs CA IX und CA XII zu inhibieren. Lou und Kollegen konnten zeigen, dass Sulfonamid-basierte CA-Inhibitoren eine effiziente Inhibierung des Tumorwachstums und der Metastasenbildung bewirken [72]. Winum und Kollegen beschrieben erstmals ein BS-Derivat, das mit einer Sulfamat-Gruppe substituiert war und als CAI eingesetzt werden kann [73].

Ziel dieser Doktorarbeit war es, das BS-CAI-Konjugat 18 an Mammakarzinomzellen auszutesten und ihre Wirksamkeit bezüglich Zellvitalität, Apoptose, Migration, ROS-Bildung und Radiosensitivität mit der Kombination der Vorläufersubstanzen, dem CAI 16 und dem Betulinderivat 3AC, zu vergleichen.

5.1 Einfluss von 18 und 16+3AC auf den CA IX- und CA XII-Proteingehalt und Aktivität

Mittels Western Blot-Analyse wurde der Einfluss der Substanz 18 und der Kombination aus 16+3AC auf den Hif-1 α -, CA IX- und CA XII-Proteingehalt untersucht.

Der Proteinlevel von Hif-1 α nach Behandlung mit der Substanz 18 nach 24 h Inkubation unter Hypoxie nahm in den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 ab. In Zellen der HS578T konnte kein Effekt der Substanz 18 auf den Proteingehalt von Hif-1 α nachgewiesen werden (Abbildung 6).

Vorangegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten eine Reduktion von Hif-1 α durch BS-Inkubation in U251MG und U343MG unter Hypoxie [54]. Shin und Kollegen wiesen in Prostatakarzinomzellen ebenfalls eine Inhibierung von HIF-1 α und dessen Phosphorylierung nach BS-Behandlung nach [74]. Die AG um Kim und Kollegen untersuchte den Wirkmechanismus, der zur Regulierung der Hypoxie-vermittelten Reaktion in HeLa-Zellen nach Gabe von BS führt. Dabei stellten sie fest, dass BS zwar HIF-1 α hemmte, jedoch ohne dabei den HIF-1 α -mRNA-Spiegel zu senken oder die Expression von Zielgenen zu beeinflussen. BS steigerte aber die Aktivität der Proteasomen, was zu einer Verringerung an ubiquitinierten Proteinen HIF-1 α -Protein in HeLa-Zellen führte. Deshalb vermuten Kim und Kollegen, dass es durch die Aktivierung des Proteasoms zu einer Hemmung der HIF-1 α -Akkumulation kommt und der Hif-Signalweg darüber reguliert wird [75].

Unter Einfluss der Substanz 18 nahm der CA IX Proteingehalt unter Normoxie und Hypoxie ab. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigten dies und zeigten, dass bei Inkubation mit den Betulinsulfamaten CAI 1 und CAI 3 eine Reduktion des CA IX- und Hif-Proteinlevel unter Hypoxie nachgewiesen werden konnte [55]. Außerdem konnte in Mammakarzinomzellen nach Inkubation mit Betulin-Sulfonamiden unter Hypoxie ebenfalls eine Reduktion des CA IX- und CA XII-Proteingehalts in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden [76]. In anderen Publikationen wird deutlich, dass es trotz fehlender CA IX-Proteinreduktion, zu einer CA IX-Aktivitätshemmung durch ein Sulfamat bzw. Sulfonamid und ein daraus resultiertes vermindertes Tumervolumen nach Inkubation mit einem CAI kommt [77]. Said und Kollegen konnten zudem nachweisen, dass der CAI AZA ab einer Konzentration von 5 μ M den CA IX-mRNA und -Proteingehalt in Glioblastomzelllinien effektiv reduzieren kann [78].

Weiterführende Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass sowohl Substanz 16 ($K_i = 0,129 \mu\text{M} \pm 0,05 \mu\text{M}$) als auch 18 ($K_i = 1,25 \mu\text{M} \pm 0,25 \mu\text{M}$) zu einer Inhibierung der CA IX-Aktivität führen [62, 79].

Zusammenfassend konnte belegt werden, dass sowohl die Behandlung mit BS als auch mit CAI zur Hemmung des Hypoxie-induzierten Hif-1-CA IX- Pathways führt. Auch das in dieser Arbeit untersuchte Betulin-CAI-Konjugat 18 führt zur Abnahme der Proteinlevel von Hif-1 α , CAIX und CAXII und hemmt darüber hinaus die CAIX-Aktivität effektiv.

5.2 Zytotoxizitätsanalyse

5.2.1 SRB

Der CAI, Substanz 16, zeigte unter Normoxie und Hypoxie keine Zytotoxizität in den drei untersuchten Zelllinien ($IC_{50} > 250 \mu\text{M}$). Dagegen führte die Kombination mit dem Betulinderivat 3AC zu einer deutlichen Zytotoxizität ($IC_{50} = 21,0 \mu\text{M}$ (MDA-MB-231), $IC_{50} = 9,1 \mu\text{M}$ (MCF-7) und $IC_{50} = 17,0 \mu\text{M}$ (HS578T)). Das Betulin-CAI-Konjugat 18 wies jedoch die höchste Zytotoxizität auf ($IC_{50} = 6,5 \mu\text{M}$ (MDA-MB-231), $IC_{50} = 5,0 \mu\text{M}$ (MCF-7) und $IC_{50} = 10,1 \mu\text{M}$ (HS578T)) (Tabelle 3).

In Glioblastomzellen konnten in der eigenen Arbeitsgruppe mit dem Betulinderivat B10 bzw. dem BS-Derivat NVX-207 beobachtet werden, dass die untersuchten Derivate eine 2,9-fach höhere Zytotoxizität aufwiesen im Vergleich zu BS [80]. Ozawa und Kollegen zeigten in anderen Tumorentitäten eine konzentrationspezifische und zelllinienspezifische Zytotoxizität des Benzensulfonamids E7070 nach 72 h unter Normoxie mittels MTT-Tests [81].

Die AG um Vanchanagiri und Kollegen untersuchte die Zytotoxizität von BS im Vergleich zu verschiedenen Betulinsulfamaten CAI 1 bis CAI 6 in verschiedenen Tumorzelllinien. Dabei stellte sich heraus, dass BS mit einem durchschnittlichen IC_{50} -Wert von 9-15 μM geringer zytotoxisch reagierte als die effektivsten Betulinsulfamate mit IC_{50} -Werten von 5-10 μM (CAI 3) und 8-13 μM (CAI 1 und CAI 2) [82]. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Zelllinien abhängige Zytotoxizität. Die Zelllinie MCF-7 reagierte am sensitivsten auf die Behandlung mit 18 bzw. 16+3AC, mit IC_{50} -Werten von 5,0 μM nach Behandlung mit Substanz 18 und $IC_{50} = 9,1 \mu\text{M}$ nach Behandlung mit 16+3AC reagierte sie unter Normoxie sensitiver als Zellen der MDA-MB-231 mit $IC_{50} = 6,5 \mu\text{M}$ (18) und $IC_{50} = 21,0 \mu\text{M}$ (16+3AC).

Die Arbeitsgruppe um Winum und Kollegen wies bei Ureido-substituierten Sulfamaten unter Normoxie nach 120 h Inkubationszeit einen moderat zytotoxischen Effekt nach [83]. Weitere Arbeiten der eigenen AG zeigen ebenfalls, dass die CAI U104 und AZA nur eine geringe Zytotoxizität in Tumorzellen aufweisen [62]. Eine vorangegangene Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt zudem für den CAI Octyldisulfamat (OCT) kaum Zytotoxizität in den untersuchten Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7. Die Kombination des CAI mit 3AC bewirkt eine deutliche Erhöhung der Zytotoxizität [60]. Dies belegen auch die eigenen Ergebnisse: Die kombinierte Behandlung der Mammakarzinomzellen mit dem CAI 16 und dem Betulinderivat 3AC bewirkte eine höhere Zytotoxizität im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit dem CAI 16. Die höchste Zytotoxizität in allen drei untersuchten Zelllinien wies jedoch das Betulin-CAI 18 auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass vor allem die Betulinkomponente für die Zytotoxizität in Tumorzelllinien entscheidend ist, während die alleinige CA IX-Inhibierung für die Zytotoxizität nur eine untergeordnete Rolle spielt. Insofern scheinen sowohl die Kopplung von CAI mit Betulinderivaten, als auch die Kombination von CAI mit Betulinderivaten die Effekte einer Tumorthherapie zu verbessern.

5.2.2 Einfluss auf das klonogene Zellüberleben

Der Einfluss auf das klonogene Zellüberleben wurde mittels Zellkoloniebildungstest in den drei Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T untersucht.

Die Substanz 18 zeigte deutliche Effekte auf das klonogene Zellüberleben, wobei dieses in den Zelllinien bei einer Behandlung mit 15 μM (MDA-MB-231 und MCF-7) bzw. 20 μM (HS578T) auf $< 20\%$ bzw. $< 60\%$ unter Normoxie sank. Unter Hypoxie waren nach Behandlung mit der Substanz 18 bei allen drei untersuchten Zelllinien die Effekte auf die Reduktion des klonogenen Überlebens stärker als unter normoxischen Bedingungen. Die Kombination aus 16 und 3AC zeigte im Vergleich mit Substanz 18 bei den eingesetzten Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte und nur in MCF-7 Zellen einen Einfluss bezüglich des O_2 -Gehalts (Abbildung 8).

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe mit der Substanz 3AC und dem CAI OCT zeigen eine moderate Abnahme der Viabilität bei einer Konzentration von 20 μM und 40 μM in MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen unter Normoxie [60].

Untersuchungen mit den Betulinsulfamaten CAI 1 und CAI 3 zeigten auch eine erhöhte Reduktion des klonogenen Überlebens in den Mammakarzinomzellen der MDA-MB-231 unter hypoxischen Bedingungen [55].

Untersuchungen mit nicht Triterpen-gekoppelten CAI bestätigen diese Beobachtung der geringen Zytotoxizität in Mammakarzinomen auch für das klonogene Überleben. So zeigte der CAI U104 nach Gabe von 100 μM keinen Einfluss auf das klonogene Überleben von MDA-MB-231-Zellen bzw. wurde das klonogene Überleben von MCF-7-Zellen um 55 % reduziert [40].

Mishra und Kollegen arbeiteten mit dem CAI BSM-0004 in Mammakarzinomzellen. Zusätzlich zu ihren *in vitro* Ergebnissen, in denen die klonogene Aktivität in MCF-7-Zellen nach Langzeitbehandlung mit 20 μM des CAI gehemmt wurde, konnten sie allerdings auch *in vivo* eine antitumorale Aktivität feststellen. Das Tumorgewicht sank nach Behandlung der Nacktmäuse mit BSM-0004 um fast 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe [84].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Wirksamkeit eines CAI bzw. CAI-Konjugats von dessen Grundstruktur abhängt. Zudem kann festgestellt werden, dass die Analyse des klonogenen Zellüberlebens die Zytotoxizitätsanalysen ergänzen. So konnte gezeigt werden, dass das Konjugat Substanz 18 aus BS-Derivat und CAI einen stärkeren Effekt auf das klonogene Überleben der untersuchten Zelllinien hatte als die Kombination beider Einzelsubstanzen 16+3AC.

5.3 Einfluss auf die Zellmigration

Die Migration von Zellen beschreibt eine aktive Ortsveränderung der einzelnen Zellen. Dies gelingt den Zellen durch Kontraktion und Streckung des Zellkörpers. Tumorzellen nutzen dies für aggressive Zellprogression und Zellinvasion. Mit Hilfe des Wundheilungsassay wurde das Migrationsverhalten der beiden Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und HS578T untersucht (Abbildung 9). Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Inkubation mit der Substanz 18 als auch mit der Substanz 16 und die Kombination aus 16+3AC in Abhängigkeit von der Zelllinie zu einer Reduktion der Migrationsrate um ca. 20 % führt.

Zuvor konnten bereits Arbeiten der eigenen AG zeigen, dass durch die Behandlung mit BS bzw. den BS-Derivaten B10 und NVX-207 die Migrationsfähigkeit der Glioblastomzelllinien U251MG und U343MG reduziert werden konnte [54, 80]. Auch für weitere Tumorentitäten konnte belegt werden, dass BS eine migrationsinhibierende Funktion hat. So zeigten Rzeski und Kollegen eine verringerte Migrationsrate der

Glioblastomzelllinie C6, der Lungenkarzinomzelllinie A549 und der Medulloblastomzelllinie TE671 nach Inkubation mit BS [85].

Neben der migrationshemmenden Wirkung von BS, Betulin bzw. deren Derivaten hat auch CA IX eine Bedeutung für die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen [86]. Shin und Kollegen konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von CA IX eine erhöhte Zellmigration und Zellinvasion in Zervixkarzinomzellen nach sich zieht [87]. In Übereinstimmung dazu konnte von Bache und Kollegen belegt werden, dass die Behandlung mit CA IX-Inhibitoren wie CAI 3 in MDA-MB-231 und MCF-7-Zellen zu einer Reduktion der Migration führte [55]. Weiterhin konnten Li und Kollegen an Mesotheliomzellen, welche mit den CAI U104 und S4 behandelt wurden, auch eine dosisabhängige Verringerung der Migrationsfähigkeit unter Hypoxie feststellen [88].

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Aktivität der CA IX ebenfalls bedeutsam für die Zellmigration ist. Daher könnte neben der Inhibierung der CA IX-Aktivität als weiterer Ansatz der Gen-knockdown der CA IX in Frage kommen. Durch eine verminderte CA IX-Expression könnte die Migration der Tumorzellen reduziert werden. Eine Studie der eigenen AG zeigt den Einfluss des CA IX-Gen-Knockdown mittels siRNA-Transfektion auf die Zellmigration. Die Migration in der MDA-MB-231 wurde um 50 % und in der Zelllinie MCF-7 um 20 % reduziert [40]. Weiterführend untersuchten Lou und Kollegen den CA IX Gen-Knockdown in Mausversuchen. Dazu wurden Mäuse mit CA IX-positiven Mammakarzinomen mit einer shRNA bzw. CA IX-Inhibitoren gegen CA IX behandelt. Dieser *in vivo* Versuch führte zudem zu einer Hemmung des Tumorwachstums und zu einer Verringerung der Metastasenbildung [72].

Shin und Kollegen zeigen, dass eine Korrelation zwischen der Überexpression von CA IX und der Transkription einiger Gene, die in Verbindung mit dem Rho/Rho-Kinase-Signaltransduktionsweg stehen, besteht und es dadurch zu einer veränderten Signaltransduktion in Zusammenhang mit der Zelladhäsion und der Organisation des Zytoskeletts kommt. CA IX bindet dabei direkt an das sekretierte Protein DKK1 ein transkriptionelles Zielgen. Diese Interaktion könnte eine Konformationsänderung von CA IX induzieren und unterbricht damit den GDP-Rho-Signaltransduktionsweg. Die Migration und das Ausbilden von Zelladhäsionskontakten wird damit gehemmt [87].

Zudem gibt es Studien, die die Hemmung der CA XII untersuchten. Dabei führte in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 der Gen-Knockdown der CA XII zu einer verringerten Invasion und Migration der Tumorzellen durch Störung des p38-MAPK-Signalwegs. Darüber hinaus wurde der Einfluss des CAXII-Knockdowns auf Invasion,

Migration und Zellwachstum durch die Auswirkungen auf die Tumorgröße und Metastasierung in MDA-MB-231-Zellen *in vivo* weiter belegt [89].

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass sowohl die Betulinkomponente als auch die CAI-Komponente die Migration von Tumorzellen hemmt. Die Kombination der beiden Komponenten bzw. die Synthese eines bifunktionellen Wirkstoffs aus Betulin- und CAI-Komponente beeinflusst die Migrationshemmung jedoch nicht wesentlich stärker.

5.4 Zelltodanalyse

Um eine Beurteilung des Zelltods vorzunehmen, wurde für den Nachweis von Apoptose zum einen die Spaltung des Enzyms PARP mittels Western Blot analysiert und zum anderen die Annexin V-PI Färbung durchgeführt. Durch den Einsatz verschiedener Zelltodinhibitoren im Cell-Titer-Glo wurde ein Rückschluss auf die Art des Zelltods getroffen.

Mittels Western Blot konnte festgestellt werden, dass das Enzym PARP nach einer Behandlung mit der Substanz 18 in allen drei untersuchten Zelllinien gespalten wurde (Abbildung 11). Die Induktion von Apoptose nach Behandlung mit Substanz 18 bestätigte sich auch in den Zelltoduntersuchungen mittels Annexin-PI-Färbung (Abbildung 13). Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen ebenfalls eine PARP-Spaltung in Glioblastomzellen sowohl nach BS-Behandlung, wie auch nach Behandlung mit Derivaten der BS [80].

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei Fulda und Kollegen, welche einen Anstieg von PARP im Western Blot nachweisen konnten nach einer Behandlung mit BS in Glioblastomzellen. Dabei kam es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien während des intrinsischen Apoptose-Signalwegs [90].

Pyo et. al. konnten mittels Annexin V Test nachweisen, dass auch Betulin in Lungenkarzinomzellen (A549) Apoptose induziert [91].

Studien von Goswami und Kollegen zeigen, dass es nach der Behandlung mit BS zur Apoptoseinduktion in SiHa-Zellen (Zervixkarzinom) kam. Die AG konnte weiterhin nachweisen, dass die induzierte Apoptose gekoppelt war an DNA-Strangbrüche, morphologische Veränderungen und die ROS-Bildung [92].

Untersuchungen mit den CAI U104 und S4 von Li und Kollegen zeigten ebenfalls eine Apoptoseinduktion. So konnte in behandelten Mesotheliomzellen im Annexin V Assay einen Anstieg an spätapoptotischen Zellen unter Hypoxie verzeichnet werden. Außerdem zeigte der CAI U104 eine Zunahme an frühapoptotischen Zellen [88].

Untersuchungen von BS, Betulinderivaten und Carboanhydraseinhibitoren zeigen, dass auch andere Zelltodarten induziert werden. Bache und Kollegen zeigten mittels LDH-Assay eine Induktion von Nekrose nach Behandlung mit Betulin- bzw. BS-Derivaten NVX und B10 in Glioblastomzelllinien [80].

Andere Studien konnten bei der Untersuchung von CAIs die Beteiligung weiterer Zelltodarten nachweisen: Li und Kollegen detektierten mittels ferroptotischer (Fer-1) und apoptotischer (Z-VAD) Zelltodinhibitoren sowie einem Eisenchelator (DFO) in Kombination mit den CAI S4 bzw. U104 in ACC-Meso-1-Zellen unter Hypoxie die Induktion von Ferroptose und Apoptose [88].

In den eigenen durchgeführten Versuchen konnte keine Zelltodinduktion mit der Kombination aus einem BS-Derivat (3AC) und einem CAI (16) nachgewiesen werden. Jedoch zeigte das Konjugat 18 eine deutliche Apoptoseinduktion bei gleichen eingesetzten Konzentrationen. Nach Einsatz der Substanz 18 wurden jedoch hauptsächlich spätapoptotische Zellen detektiert.

Zudem konnte in den Zellen der MDA-MB-231 gezeigt werden, dass unter Hypoxie bei der Substanz 18 deutlich mehr apoptotische Zellen nachweisbar waren als unter Normoxie. Eigene Untersuchungen mit verschiedenen Zelltodinhibitoren unterstützen das Ergebnis, dass das BS-CAI-Konjugat 18 Apoptose induziert und andere Zelltodarten wie Nekroptose, Autophagie und Ferroptose eine untergeordnete Rolle spielen (Abbildung 14).

So zeigte die Behandlung der Substanz 18 eine deutliche Reduktion der Vitalität auf 67,7 %, während durch die zusätzliche Inkubation mit dem Apoptoseinhibitor Z-VAD-FMK eine Vitalität der Zellen von 98,5 % wiederhergestellt werden konnte. Dagegen hatten Nekrose-, Ferroptose- bzw. Autophagie-Inhibitoren keinen Einfluss auf die durch Substanz 18 induzierte Wachstumshemmung (Abbildung 14).

Abschließend kann gesagt werden, dass die Substanz 18, als Konjugat aus einem BS-Derivat und klassischen CAI, hauptsächlich Apoptose induziert.

5.5 Einfluss auf die ROS-Induktion

Die Tumorgenese wird häufig in Zusammenhang mit der Bildung von ROS beschrieben. Dabei schädigt ROS nicht nur die DNA, sondern beeinflusst auch die Proliferation der Zellen, die Signaltransduktion und den Zelltod [93, 94]. Wick und Kollegen konnten

belegen, dass BS eine konzentrationsabhängige Freisetzung von ROS in Zellen bewirkt [47].

In den eigenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem Betulin-CAI-Konjugat Substanz 18 mit steigender Konzentration eine erhöhte ROS-Bildung in allen drei untersuchten Zelllinien einherging (Abbildung 15).

Obwohl die Kombination des CAI (16) und des Betulin-Derivates (3AC) in den untersuchten Zelllinien kaum eine ROS-Induktion zeigte, konnten verschiedene Studien belegen, dass auch Derivate der BS eine ROS-Bildung in verschiedenen Tumorentitäten induzieren, wie z.B. Kolon-, Prostata- und Leberzellkarzinomen [95-97].

Auch durch die Inhibierung der CA IX kann es zu einer ROS-Induktion kommen: Koyuncu und Kollegen konnten in Hela-Zellen (Zervixkarzinom) einen dosisabhängigen Anstieg von ROS nach Behandlung mit einem CAI-Sulfonamid feststellen [98]. Zusätzlich zeigten Voruntersuchungen, dass auch CAIs ROS-Bildung induzieren. So konnte in Zellen der MDA-MB-231 und MCF-7 nach Behandlung mit dem CAI OCT unter normoxischen Bedingungen ein Anstieg von ROS ermittelt werden [60].

Die Bildung von ROS führt zu Schäden der DNA, was eine Erhöhung der Expression des Tumorsuppressorgen p53 nach sich zieht [99]. Durch die Aktivierung von p53 nach einer DNA-Schädigung kann es zur Einleitung des intrinsischen Apoptosewegs kommen, indem die innere Mitochondrienmembran permeabel wird. Der Zellzyklus wird angehalten [100]. Das pro-apoptotische Gen Bax und das anti-apoptotische Gen Bcl-2 werden freigesetzt und leiten den apoptotischen Zelltod ein [101]. In dieser Arbeit wurde mit den Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T (mutierter p53-Typ) und MCF-7 (p53-Wildtyp) gearbeitet. In den eigenen Ergebnissen zeigt sich also, dass die Wirkung von 18 effektiv in der p53-Wildtyp Zelllinie und auch in den mutierten p53-Typ Zelllinien wirkt. In weiterführenden Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe war zudem eine erhöhte ROS-Produktion unter Hypoxie nach Behandlung mit dem BS-Derivat 3AC in den Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 nachweisbar [60]. Aus den eigenen Ergebnissen geht außerdem hervor, dass auch unter Hypoxie nach Behandlung mit Substanz 18 erhöhte ROS-Level in den Zelllinien MCF-7 und HS578T feststellbar sind.

Der durch 18 induzierte ROS-Anteil kann insbesondere für die Bestrahlung von hypoxischen Zellen von Bedeutung sein, aufgrund einer geringeren strahleninduzierten Radikalbildung unter hypoxischen Bedingungen. Dieser Mechanismus ist von Vorteil für die Behandlung von Tumorpatienten, denn die nicht reparierten DNA-Schäden in den

Tumorzellen erhöhen die Radiosensitivität und bieten daher einen positiven Effekt für die Bestrahlungstherapie.

5.6 Einfluss auf die Radiosensitivität

Eine wichtige Therapieoption für die Behandlung von Mammakarzinomen stellt die Radiotherapie dar. Bartelink und Kollegen konnten belegen, dass bei Frauen, die sich einer brusterhaltenden Operation und zusätzlich einer Bestrahlung unterzogen, das Risiko für ein Rezidiv deutlich gesenkt werden konnte, im Vergleich zu Frauen, die keine Bestrahlung erhielten [102]. Die Überexpression von CA IX und Azidifizierung der extrazellulären Matrix im Tumorgewebe geht mit einer geringeren Sensitivität für Radiotherapie einher [20, 103].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Betulin-CAI-Konjugates Substanz 18 im Vergleich zum CAI, Substanz 16, und der Kombination der Einzelsubstanzen 16+3AC auf die Radiosensitivität in Zellen der MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T unter hypoxischen Bedingungen untersucht.

Vorangegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zur Substanz 3AC zeigten in Kombination mit dem CAI U104 einen geringen radiosensitivierenden Effekt [60]. Aus den eigenen Ergebnissen geht hervor, dass das Betulin-CAI-Konjugat Substanz 18 eine Radiosensitivierung in allen drei untersuchten Zelllinien bewirkt, während durch den CAI, Substanz 16, bzw. die Kombination der beiden Einzelsubstanzen 16+3AC in einer Konzentration von 10 μ M bzw. 20 μ M keine bzw. geringere Effekte auf die Strahlensensitivität erzielt wurden (Abbildung 16).

Auch BS und dessen Derivate haben nach ihrer Gabe einen radiosensitivierenden Effekt auf Tumorzellen und dies konnte schon in der eigenen Arbeitsgruppe festgestellt werden. Dazu beobachteten Bache und Kollegen in der Zelllinie U251MG nach Inkubation mit BS unter Hypoxie eine radiosensitivierende Wirkung und auch die Derivate NVX-207 und B10 zeigten in Glioblastomzellen eine schwache Radiosensitivierung [54, 80].

Initiale Studien mit Betulin-CAI-Konjugaten zeigten auch in Mammakarzinomen eine Radiosensitivierung. Die beiden Betulinylsulfamate (CAI 1 und CAI 3) hatten leicht erhöhte Auswirkungen auf die Strahlenempfindlichkeit von MDA-MB231-Zellen unter Normoxie. Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer deutlichen Strahlensensitivierung [55].

Auch klassische CAIs besitzen ein hohes Potential, um die strahlentherapeutische Behandlung von Tumoren zu verbessern. Dubois und Kollegen zeigten in ihren Versuchen mit Sulfonamid-basierten-CAI eine Veränderung der Mikroumgebung des Tumorgewebes, was den Tumor empfindlicher gegenüber der Bestrahlung werden ließ. Außerdem konnte nach einer Hemmung der CA IX-Aktivität durch die Behandlung mit dem Sulfonamid-CAI *in vitro* die Zellproliferation gehemmt werden, was eine signifikante antitumoröse Wirkung zeigte [104]. Lou und Kollegen bewiesen anhand ihrer Versuche mit dem CAI U104 als Inhibitor für die CA IX, dass es zu einer Abnahme des Tumorwachstums in Mammakarzinomzellen nach Bestrahlung kommt [72]. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde nach Gabe des CAI U104 ebenfalls eine Radiosensitivierung nachgewiesen [40]. Auch Doyen und Kollegen zeigten, dass die Inhibierung von CA IX und CA XII und Bestrahlung zu einer dauerhaften Verlangsamung des Tumorwachstums *in vivo* führt [105]. Van Duivenvoorden und Kollegen konnten nach einer CA IX-Hemmung in Nierenkarzinomen eine Strahlensensitivierung belegen [106].

Insgesamt zeigt sich, dass Betulin bzw. Betulinderivate, klassische CAI, die Kombination beider Wirkstoffe und auch Betulin-CAI-Konjugate in Kombination mit Bestrahlung ein hohes Potential für die Therapierbarkeit von Karzinompatienten besitzen. Insbesondere das Betulin-CAI-Konjugat 18 könnte für zukünftige Mammakarzinomforschungen aufgrund hoher Zytotoxizität und radiosensitivierender Wirkung von besonderer Bedeutung sein.

5.7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Betulin-CAI-Konjugat Substanz 18 und die Kombination des CAI, Substanz 16, und des Betulinderivats 3AC hinsichtlich ihrer Wirkung auf Zellvitalität, klonogenes Zellüberleben, Zellmigration, Zelltodinduktion, ROS-Bildung und Radiosensitivität in den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass das Betulin-CAI-Konjugat 18 unter Normoxie und Hypoxie im Vergleich zu der Kombination der Einzelsubstanzen 16 und 3AC eine gesteigerte Zytotoxizität aufweist (MDA-MB-231: Normoxie: IC_{50} -Wert 18 = 6,5 μ M, IC_{50} -Wert 16+3AC = 21,0 μ M; Hypoxie: IC_{50} -Wert 18 = 6,7 μ M, IC_{50} -Wert 16+3AC = 18,7 μ M). Die Untersuchungen zur Langzeitzytotoxizität mittels Klonogenitätstest zeigten in allen drei untersuchten Zelllinien eine deutliche Reduktion des klonogenen Überlebens nach Behandlung mit 15 μ M Substanz 18. In der Zelllinie MDA-MB-231 sank das klonogene Überleben auf 14 %, in den Zellen der MCF-7 auf 6,4 % und bei 20 μ M 18 in der Zelllinie HS578T auf 54,5 %. Zudem waren stärkere Effekte unter Hypoxie zu beobachten. So kam es zu einer Reduktion des klonogenen Überlebens auf 2,8 % (MDA-MB-231) und 4,9 % (MCF-7) nach Behandlung mit 15 μ M 18 und 16,9 % (HS578T) nach Behandlung mit 20 μ M 18.

Mit dem Wundheilungsassay konnte unter normoxischen Bedingungen in Zellen der MDA-MB-231 eine Hemmung der Migration nach Inkubation mit 10 μ M der Substanz 18 auf 89 %, und mit der Kombination 16 und 3AC auf 84 % beobachtet werden.

Um die Zelltodmechanismen zu analysieren, wurden verschiedene Methoden herangezogen. Im Western Blot konnte nach Behandlung mit Substanz 18, im Gegensatz zur Kombination 16+3AC, eine PARP-Spaltung nachgewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen mittels CellTiterGlo-Assay bestätigten durch den Einsatz verschiedener Zelltodinhibitoren, dass die Substanz 18 Apoptose induziert, während Nekrose, Ferroptose und Autophagie keine Rolle spielten. Die Annexin V-PI-Färbung zeigte in den Mammakarzinomzellen der MDA-MB-231 nach Behandlung mit der Substanz 18 unter normoxischen Bedingungen ab 20 μ M und unter hypoxischen Bedingungen ab 15 μ M einen deutlichen Anstieg des Zelltods auf 4,5 % (Apoptose) und 4,8 % (Nekrose).

Die Untersuchung der Bildung von ROS zeigte nach Behandlung mit der Substanz 18 unter normoxischen Bedingungen eine ROS-Induktion auf das 50-fache (MDA-MB-231), 35-fache (MCF-7) und 17-fache (HS578T). Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einem Anstieg auf das 3-fache (MDA-MB-231), 6,4-fache (MCF-7) und 30-fache

(HS578T). Die Behandlung mit der Kombination 16+3AC ergab sowohl unter Normoxie wie auch Hypoxie einen schwächeren Einfluss auf die ROS-Bildung in den drei untersuchten Zelllinien.

Dagegen zeigte die Analyse der Radiosensitivierung des neuen Betulin-CAI-Konjugates Substanz 18 strahlensensitivierende Effekte in Zellen der MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T. Mit der Inkubation der Substanz 16 bzw. der Kombination aus 16+3AC konnte keine Radiosensitivierung festgestellt werden.

Während die Vorläufersubstanzen 16 und 3AC bzw. deren Kombination lediglich moderate Effekte aufwiesen, zeigte die Substanz 18 im Vergleich dazu stärkere Effekte hinsichtlich gesteigerter Zytotoxizität, PARP-Spaltung, Zelltodrate, ROS-Induktion und eine Reduktion der Migrationsrate und des CA IX-Proteingehalts. Auch die radiosensitivierenden Eigenschaften der Substanz 18 sind vielversprechend für die Weiterentwicklung in der Radiotherapie. Insgesamt kann gesagt werden, dass die Substanz 18 ein hohes Potential besitzt, um die Behandlung von hypoxischen Mammakarzinomen zu verbessern.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit bieten verschiedene Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen. Die Kombination der beiden Substanzen 16 und 3AC wies eine moderate Zytotoxizität auf. Im Vergleich dazu zeigte die Substanz 18 eine stark erhöhte Zytotoxizität in den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T.

Weitere Experimente können an anderen Mammakarzinomzelllinien sowie Zelllinien anderer Tumorentitäten hinsichtlich des Wirkspektrums des neuen Betulin-CAI-Konjugates Substanz 18 stattfinden.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse im Zellkulturmodell, wäre es denkbar die Wirksamkeit der Substanz 18 im Sphäroidmodell, auch und vor allem in Kombination mit Bestrahlung zu untersuchen. Aktuell wird die Substanz 18 unter anderem im Mausmodell getestet, da die substanzindizierten Effekte *in vivo* von Interesse sind. Einzelne Studien zur Wirkung von BS gibt es dazu schon. So wurde die Wirkung von BS in MCF-7 Brustkrebstumoren in Nacktmäusen beobachtet. Es kam dabei zu einer Reduktion der Tumorgröße um 52 % nach Gabe von 50 mg/kg KG von BS bzw. 77 % nach 100 mg/kg KG BS [107].

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Substanz 18 erstmalig auf zellulärer Ebene charakterisiert. Es könnten auch andere neue Konjugate aus einem CAI und einem Betulin-Derivat untersucht werden. Außerdem könnten weitere Modifikationen der Substanz 18 verbesserte Wirkeigenschaften zeigen. Um Betulin einfacher herstellen zu

können und für Derivate und Modifikationen nutzbarer zu machen, haben Kaverin und Kollegen eine neue Methode zur Isolation entwickelt. Diese beinhaltet drei Reinigungsstufen, wobei in der ersten Stufe Reinigung mit 20 %iger NaOH erfolgt, anschließend in der zweiten Stufe harzige, leicht gefärbte Verunreinigungen mittels Kieselgelchromatographie entfernt werden. Abschließend wird in der dritten Stufe Verunreinigungen von Lupeol und anderen in Hexan-löslichen Verbindungen durch Extraktion mit kochendem Hexan entfernt. Dies soll einen effizienteren Ansatz bieten und besser in Laboren umsetzbar sein [108]. Ein neuer Weg um Betulin- und BS-Derivate schneller synthetisieren zu können, testete die AG um Shi und Kollegen. Sie entwarfen mittels *click chemistry* eine Reihe von Triazol-substituierten Betulin- und Betulinsäurederivaten, welche an C-30 Position substituiert wurden. Dabei entstanden 18 Verbindungen, welche *in vitro* an HL-60 (Leukämie) getestet wurden. Alle Derivate zeigten eine höhere Zytotoxizität im Vergleich zum Ausgangsprodukt BS [109].

Erste mechanistische Untersuchungen wurden zur BS schon vorgenommen. Dazhi und Kollegen führten mit 23-Hydroxybetulinsäure (23-HBA) in hepatozellulären Karzinomen (HCC) erste Pathwayanalysen durch. Dabei bewiesen sie die Inaktivierung des Signalwegs der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) nach Behandlung mit 23-HBA sowie eine verminderte Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen 1 und 2 als auch der extrazellulären signalregulierten Kinase 1 und 2 [110]. Weiterhin konnten Guerra et. al. in einer Metabolomstudie zu BS in MDA-MB-231-Zellen eine Veränderung des Metaboloms nach Behandlung mit BS beobachten und eine noch ausgeprägtere metabolische Anpassung in den Zellen der MCF-10A [111].

Die Kenntnis der Stoffwechselveränderungen kann für einen besseren Schutz der Nichtkrebszellen sorgen und eine gleichzeitige Zerstörung der Karzinomzellen gewähren. Weiterhin könnten mechanistische Studien der Substanz 18 bzw. zu einem BS-CAI-Konjugat in Mammakarzinomzellen vorgenommen werden, um einzelne Enzym- und Stoffwechselwege besser nachvollziehen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Forouzanfar, M.H., K.J. Foreman, A.M. Delossantos, R. Lozano, A.D. Lopez, C.J. Murray, and M. Naghavi, *Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis*. Lancet, 2011. **378**(9801): p. 1461-84.
2. Roulot, A., D. Hequet, J.M. Guinebretiere, A. Vincent-Salomon, F. Lerebours, C. Dubot, and R. Rouzier, *Tumoral heterogeneity of breast cancer*. Ann Biol Clin (Paris), 2016. **74**(6): p. 653-660.
3. Calle, E.E., H.S. Feigelson, J.S. Hildebrand, L.R. Teras, M.J. Thun, and C. Rodriguez, *Postmenopausal hormone use and breast cancer associations differ by hormone regimen and histologic subtype*. Cancer, 2009. **115**(5): p. 936-45.
4. Reeves, G.K., V. Beral, J. Green, T. Gathani, D. Bull, and C. Million Women Study, *Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis*. Lancet Oncol, 2006. **7**(11): p. 910-8.
5. Turnbull, C. and N. Rahman, *Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 321-45.
6. Mavaddat, N., A.C. Antoniou, D.F. Easton, and M. Garcia-Closas, *Genetic susceptibility to breast cancer*. Mol Oncol, 2010. **4**(3): p. 174-91.
7. Institut, R.K., *Zentrum für Krebsregisterdaten, Brustkrebs (Mammakarzinom)(2022) [online]*
URL:https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brust_krebs_node.html#:~:text=Ebenso%20steigt%20das%20Brustkrebsrisiko%20nach,Rauchen%20das%20Risiko%20geringf. (abgerufen am 30.10.2022)
8. Siu, A.L. and U.S.P.S.T. Force, *Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement*. Ann Intern Med, 2016. **164**(4): p. 279-96.
9. Rautiainen, S., A. Masarwah, M. Sudah, A. Sutela, O. Pelkonen, S. Joukainen, R. Sironen, V. Karja, and R. Vanninen, *Axillary lymph node biopsy in newly diagnosed invasive breast cancer: comparative accuracy of fine-needle aspiration biopsy versus core-needle biopsy*. Radiology, 2013. **269**(1): p. 54-60.
10. Department of Health, N.C.G., *Diagnosis, staging and treatment of patients with Breast Cancer*. National Clinical Guideline 2015. **7**.

11. Marinovich, M.L., L. Azizi, P. Macaskill, L. Irwig, M. Morrow, L.J. Solin, and N. Houssami, *The Association of Surgical Margins and Local Recurrence in Women with Ductal Carcinoma In Situ Treated with Breast-Conserving Therapy: A Meta-Analysis*. *Ann Surg Oncol*, 2016. **23**(12): p. 3811-3821.
12. Brackstone, M., G.G. Fletcher, I.S. Dayes, Y. Madarnas, S.K. SenGupta, S. Verma, and G. Members of the Breast Cancer Disease Site, *Locoregional therapy of locally advanced breast cancer: a clinical practice guideline*. *Curr Oncol*, 2015. **22**(Suppl 1): p. S54-66.
13. Masuda, H., K.A. Baggerly, Y. Wang, Y. Zhang, A.M. Gonzalez-Angulo, F. Meric-Bernstam, V. Valero, B.D. Lehmann, J.A. Pietenpol, G.N. Hortobagyi, W.F. Symmans, and N.T. Ueno, *Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(19): p. 5533-40.
14. Ebtctg, P. McGale, C. Taylor, C. Correa, D. Cutter, F. Duane, M. Ewertz, R. Gray, G. Mannu, R. Peto, T. Whelan, Y. Wang, Z. Wang, and S. Darby, *Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials*. *Lancet*, 2014. **383**(9935): p. 2127-35.
15. Vaupel, P., D.K. Kelleher, and M. Hockel, *Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy*. *Semin Oncol*, 2001. **28**(2 Suppl 8): p. 29-35.
16. Vaupel, P., *The role of hypoxia-induced factors in tumor progression*. *Oncologist*, 2004. **9 Suppl 5**: p. 10-7.
17. Vaupel, P., K. Schlenger, C. Knoop, and M. Hockel, *Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements*. *Cancer Res*, 1991. **51**(12): p. 3316-22.
18. Supuran, C.T., *Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(2): p. 168-81.
19. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(10): p. 721-32.
20. Sedlakova, O., E. Svastova, M. Takacova, J. Kopacek, J. Pastorek, and S. Pastorekova, *Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors*. *Front Physiol*, 2014. **4**: p. 400.

21. Pastorek, J. and S. Pastorekova, *Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: from biology to clinical use*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **31**: p. 52-64.
22. van Kuijk, S.J., A. Yaromina, R. Houben, R. Niemans, P. Lambin, and L.J. Dubois, *Prognostic Significance of Carbonic Anhydrase IX Expression in Cancer Patients: A Meta-Analysis*. *Front Oncol*, 2016. **6**: p. 69.
23. Wang, H., H. Jiang, M. Van De Gucht, and M. De Ridder, *Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It?* *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(1).
24. Gray, L.H., A.D. Conger, M. Ebert, S. Hornsey, and O.C. Scott, *The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy*. *Br J Radiol*, 1953. **26**(312): p. 638-48.
25. Wenzl, T. and J.J. Wilkens, *Theoretical analysis of the dose dependence of the oxygen enhancement ratio and its relevance for clinical applications*. *Radiat Oncol*, 2011. **6**: p. 171.
26. Brown, J.M., *Tumor hypoxia in cancer therapy*. *Methods Enzymol*, 2007. **435**: p. 297-321.
27. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Juni 2021. **AWMF-Registernummer: 032-0450L**(Langversion 4.4): p. 145-170.
28. Potter, C.P. and A.L. Harris, *Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(1): p. 2-7.
29. Wingo, T., C. Tu, P.J. Laipis, and D.N. Silverman, *The catalytic properties of human carbonic anhydrase IX*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **288**(3): p. 666-9.
30. Sly, W.S. and P.Y. Hu, *Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies*. *Annu Rev Biochem*, 1995. **64**: p. 375-401.
31. Pastorekova, S., S. Parkkila, A.K. Parkkila, R. Opavsky, V. Zelnik, J. Saarnio, and J. Pastorek, *Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(2): p. 398-408.
32. Zavada, J., Z. Zavadova, S. Pastorekova, F. Ciampor, J. Pastorek, and V. Zelnik, *Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens*. *Int J Cancer*, 1993. **54**(2): p. 268-74.

33. Luong-Player, A., H. Liu, H.L. Wang, and F. Lin, *Immunohistochemical reevaluation of carbonic anhydrase IX (CA IX) expression in tumors and normal tissues*. Am J Clin Pathol, 2014. **141**(2): p. 219-25.
34. Pastorekova, S. and R.J. Gillies, *The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond*. Cancer Metastasis Rev, 2019. **38**(1-2): p. 65-77.
35. Oosterwijk, E., D.J. Ruiter, P.J. Hoedemaeker, E.K. Pauwels, U. Jonas, J. Zwartendijk, and S.O. Warnaar, *Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney*. Int J Cancer, 1986. **38**(4): p. 489-94.
36. Chamie, K., N.M. Donin, P. Klopfer, P. Bevan, B. Fall, O. Wilhelm, S. Storkel, J. Said, M. Gambla, R.E. Hawkins, G. Jankilevich, A. Kapoor, E. Kopyltsov, M. Staehler, K. Taari, A.J.A. Wainstein, A.J. Pantuck, and A.S. Belldegrun, *Adjuvant Weekly Girentuximab Following Nephrectomy for High-Risk Renal Cell Carcinoma: The ARISER Randomized Clinical Trial*. JAMA Oncol, 2017. **3**(7): p. 913-920.
37. Supuran, C.T. and J.Y. Winum, *Carbonic anhydrase IX inhibitors in cancer therapy: an update*. Future Med Chem, 2015. **7**(11): p. 1407-14.
38. Davis, R.A., D. Vullo, A. Maresca, C.T. Supuran, and S.A. Poulsen, *Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases*. Bioorg Med Chem, 2013. **21**(6): p. 1539-43.
39. Neri, D. and C.T. Supuran, *Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(10): p. 767-77.
40. Guttler, A., K. Theuerkorn, A. Riemann, H. Wichmann, J. Kessler, O. Thews, M. Bache, and D. Vordermark, *Cellular and radiobiological effects of carbonic anhydrase IX in human breast cancer cells*. Oncol Rep, 2019. **41**(4): p. 2585-2594.
41. Stiti, M., A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, V. Barragan-Montero, A. Scozzafava, Y. Guari, J.Y. Winum, and C.T. Supuran, *Carbonic anhydrase inhibitor coated gold nanoparticles selectively inhibit the tumor-associated isoform IX over the cytosolic isozymes I and II*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(48): p. 16130-1.

42. Alakurtti, S., T. Makela, S. Koskimies, and J. Yli-Kauhaluoma, *Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin*. Eur J Pharm Sci, 2006. **29**(1): p. 1-13.
43. Mullauer, F.B., J.H. Kessler, and J.P. Medema, *Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects*. Anticancer Drugs, 2010. **21**(3): p. 215-27.
44. Ali-Seyed, M., I. Jantan, K. Vijayaraghavan, and S.N. Bukhari, *Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms of a Promising Anticancer Therapy*. Chem Biol Drug Des, 2016. **87**(4): p. 517-36.
45. Fulda, S., *Betulinic acid: a natural product with anticancer activity*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53**(1): p. 140-6.
46. Pisha, E., H. Chai, I.S. Lee, T.E. Chagwedera, N.R. Farnsworth, G.A. Cordell, C.W. Beecher, H.H. Fong, A.D. Kinghorn, D.M. Brown, and et al., *Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis*. Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1046-51.
47. Wick, W., C. Grimmel, B. Wagenknecht, J. Dichgans, and M. Weller, *Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(3): p. 1306-12.
48. Thurnher, D., D. Turhani, M. Pelzmann, B. Wannemacher, B. Knerer, M. Formanek, V. Wacheck, and E. Selzer, *Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells*. Head Neck, 2003. **25**(9): p. 732-40.
49. Kessler, J.H., F.B. Mullauer, G.M. de Roo, and J.P. Medema, *Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types*. Cancer Lett, 2007. **251**(1): p. 132-45.
50. Jeremias, I., H.H. Steiner, A. Benner, K.M. Debatin, and C. Herold-Mende, *Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells*. Acta Neurochir (Wien), 2004. **146**(7): p. 721-9.
51. Zuco, V., R. Supino, S.C. Righetti, L. Cleris, E. Marchesi, C. Gambacorti-Passerini, and F. Formelli, *Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells*. Cancer Lett, 2002. **175**(1): p. 17-25.

52. Selzer, E., E. Pimentel, V. Wacheck, W. Schlegel, H. Pehamberger, B. Jansen, and R. Kodym, *Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(5): p. 935-40.
53. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. Science, 2004. **305**(5684): p. 626-9.
54. Bache, M., M.P. Zschornak, S. Passin, J. Kessler, H. Wichmann, M. Kappler, R. Paschke, G.N. Kaluderovic, H. Kommera, H. Taubert, and D. Vordermark, *Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions*. Radiat Oncol, 2011. **6**: p. 111.
55. Bache, M., C. Munch, A. Guttler, H. Wichmann, K. Theuerkorn, D. Emmerich, R. Paschke, and D. Vordermark, *Betulinylnyl Sulfamates as Anticancer Agents and Radiosensitizers in Human Breast Cancer Cells*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(11): p. 26249-62.
56. Fulda, S., C. Friesen, M. Los, C. Scaffidi, W. Mier, M. Benedict, G. Nunez, P.H. Kramer, M.E. Peter, and K.M. Debatin, *Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors*. Cancer Res, 1997. **57**(21): p. 4956-64.
57. Tan, Y., R. Yu, and J.M. Pezzuto, *Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2866-75.
58. Jager, S., K. Winkler, U. Pfuller, and A. Scheffler, *Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album L.** Planta Med, 2007. **73**(2): p. 157-62.
59. Bar, F.M., M.A. Khanfar, A.Y. Elnagar, H. Liu, A.M. Zaghloul, F.A. Badria, P.W. Sylvester, K.F. Ahmad, K.P. Raisch, and K.A. El Sayed, *Rational design and semisynthesis of betulinic acid analogues as potent topoisomerase inhibitors*. J Nat Prod, 2009. **72**(9): p. 1643-50.
60. Petrenko, M., A. Guttler, A. Funtan, J. Kessler, D. Emmerich, R. Paschke, D. Vordermark, and M. Bache, *Combined 3-O-acetylbetulin treatment and carbonic anhydrase IX inhibition results in additive effects on human breast cancer cells*. Chem Biol Interact, 2021. **333**: p. 109326.
61. Cianchi, F., M.C. Vinci, C.T. Supuran, B. Peruzzi, P. De Giuli, G. Fasolis, G. Perigli, S. Pastorekova, L. Papucci, A. Pini, E. Masini, and L. Puccetti, *Selective*

- inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. J Pharmacol Exp Ther, 2010. 334(3): p. 710-9.*
62. Bache, M., N.V. Heise, A. Thiel, A. Funtan, F. Seifert, M. Petrenko, A. Guttler, S. Brandt, T. Mueller, D. Vordermark, I. Thondorf, R. Csuk, and R. Paschke, *Combination of Betulinic Acid Fragments and Carbonic Anhydrase Inhibitors-A New Drug Targeting Approach. Pharmaceutics, 2024. 16(3).*
 63. Cailleau, R., M. Olive, and Q.V. Cruciger, *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. In Vitro, 1978. 14(11): p. 911-5.*
 64. Brooks, S.C., E.R. Locke, and H.D. Soule, *Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. J Biol Chem, 1973. 248(17): p. 6251-3.*
 65. Hackett, A.J., H.S. Smith, E.L. Springer, R.B. Owens, W.A. Nelson-Rees, J.L. Riggs, and M.B. Gardner, *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): p. 1795-806.*
 66. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, and M.R. Boyd, *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst, 1990. 82(13): p. 1107-12.*
 67. Cell Biolabs, I., *Intracellular ROS Assay (2023) [online]*
URL: <https://www.cellbiolabs.com/reactive-oxygen-species-ros-assay>.
 (abgerufen am 23.07.2023)
 68. Mohns, J.L.a.M., *How to Choose a Cell Viability or Cytotoxicity Assay (2019) [online]*
URL: <https://www.promega.de/resources/guides/cell-biology/cell-viability/>.
 (abgerufen am 20.07.2023)
 69. Kaufmann, S.H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N.E. Davidson, and G.G. Poirier, *Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res, 1993. 53(17): p. 3976-85.*
 70. Patel, A. and S. Sant, *Hypoxic tumor microenvironment: Opportunities to develop targeted therapies. Biotechnol Adv, 2016. 34(5): p. 803-812.*
 71. Calcinotto, A., P. Filipazzi, M. Grioni, M. Iero, A. De Milito, A. Ricupito, A. Cova, R. Canese, E. Jachetti, M. Rossetti, V. Huber, G. Parmiani, L. Generoso,

- M. Santinami, M. Borghi, S. Fais, M. Bellone, and L. Rivoltini, *Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes*. *Cancer Res*, 2012. **72**(11): p. 2746-56.
72. Lou, Y., P.C. McDonald, A. Oloumi, S. Chia, C. Ostlund, A. Ahmadi, A. Kyle, U. Auf dem Keller, S. Leung, D. Huntsman, B. Clarke, B.W. Sutherland, D. Waterhouse, M. Bally, C. Roskelley, C.M. Overall, A. Minchinton, F. Pacchiano, F. Carta, A. Scozzafava, N. Touisni, J.Y. Winum, C.T. Supuran, and S. Dedhar, *Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors*. *Cancer Res*, 2011. **71**(9): p. 3364-76.
73. Winum, J.Y., S. Pastorekova, L. Jakubickova, J.L. Montero, A. Scozzafava, J. Pastorek, D. Vullo, A. Innocenti, and C.T. Supuran, *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): p. 579-84.
74. Shin, J., H.J. Lee, D.B. Jung, J.H. Jung, H.J. Lee, E.O. Lee, S.G. Lee, B.S. Shim, S.H. Choi, S.G. Ko, K.S. Ahn, S.J. Jeong, and S.H. Kim, *Suppression of STAT3 and HIF-1 alpha mediates anti-angiogenic activity of betulinic acid in hypoxic PC-3 prostate cancer cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21492.
75. Kim, H.J., H.S. Cho, H.S. Ban, and H. Nakamura, *Suppression of HIF-1alpha accumulation by betulinic acid through proteasome activation in hypoxic cervical cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020. **523**(3): p. 726-732.
76. Guttler, A., Y. Eiselt, A. Funtan, A. Thiel, M. Petrenko, J. Kessler, I. Thondorf, R. Paschke, D. Vordermark, and M. Bache, *Betulin Sulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors and Anticancer Agents in Breast Cancer Cells*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(16).
77. Li, Y., C. Tu, H. Wang, D.N. Silverman, and S.C. Frost, *Catalysis and pH control by membrane-associated carbonic anhydrase IX in MDA-MB-231 breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(18): p. 15789-96.
78. Said, H.M., C. Hagemann, F. Carta, A. Katzer, B. Polat, A. Staab, A. Scozzafava, J. Anacker, G.H. Vince, M. Flentje, and C.T. Supuran, *Hypoxia induced CA9 inhibitory targeting by two different sulfonamide derivatives including acetazolamide in human glioblastoma*. *Bioorg Med Chem*, 2013. **21**(13): p. 3949-57.

79. Funtan, A., *Neue Strategien für den Einsatz von Betulinsäurederivaten in zwei unterschiedlichen Tumorentitäten*. 2022.
80. Bache, M., S. Bernhardt, S. Passin, H. Wichmann, A. Hein, M. Zschornak, M. Kappler, H. Taubert, R. Paschke, and D. Vordermark, *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**(11): p. 19777-90.
81. Ozawa, Y., N.H. Sugi, T. Nagasu, T. Owa, T. Watanabe, N. Koyanagi, H. Yoshino, K. Kitoh, and K. Yoshimatsu, *E7070, a novel sulphonamide agent with potent antitumour activity in vitro and in vivo*. *Eur J Cancer*, 2001. **37**(17): p. 2275-82.
82. Vanchanagiri, K., D. Emmerich, M. Brusckke, M. Bache, F. Seifert, R. Csuk, D. Vordermark, and R. Paschke, *Synthesis and biological investigation of new carbonic anhydrase IX (CAIX) inhibitors*. *Chem Biol Interact*, 2018. **284**: p. 12-23.
83. Winum, J.Y., F. Carta, C. Ward, P. Mullen, D. Harrison, S.P. Langdon, A. Cecchi, A. Scozzafava, I. Kunkler, and C.T. Supuran, *Ureido-substituted sulfamates show potent carbonic anhydrase IX inhibitory and antiproliferative activities against breast cancer cell lines*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012. **22**(14): p. 4681-5.
84. Mishra, C.B., R.K. Mongre, A. Prakash, R. Jeon, C.T. Supuran, and M.S. Lee, *Anti-breast cancer action of carbonic anhydrase IX inhibitor 4-[4-(4-Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl-piperazin-1-yl)-benzylidene-hydrazinocarbonyl]-benzenesulfonamide (BSM-0004): in vitro and in vivo studies*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021. **36**(1): p. 954-963.
85. Rzeski, W., A. Stepulak, M. Szymanski, M. Sifringer, J. Kaczor, K. Wejksza, B. Zdzisinska, and M. Kandefer-Szerszen, *Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2006. **374**(1): p. 11-20.
86. McDonald, P.C., M. Swayampakula, and S. Dedhar, *Coordinated Regulation of Metabolic Transporters and Migration/Invasion by Carbonic Anhydrase IX*. *Metabolites*, 2018. **8**(1).
87. Shin, H.J., S.B. Rho, D.C. Jung, I.O. Han, E.S. Oh, and J.Y. Kim, *Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 7): p. 1077-87.

88. Li, Z., L. Jiang, S.H. Chew, T. Hirayama, Y. Sekido, and S. Toyokuni, *Carbonic anhydrase 9 confers resistance to ferroptosis/apoptosis in malignant mesothelioma under hypoxia*. Redox Biol, 2019. **26**: p. 101297.
89. Hsieh, M.J., K.S. Chen, H.L. Chiou, and Y.S. Hsieh, *Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway*. Eur J Cell Biol, 2010. **89**(8): p. 598-606.
90. Fulda, S., I. Jeremias, T. Pietsch, and K.M. Debatin, *Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors*. Klin Padiatr, 1999. **211**(4): p. 319-22.
91. Pyo, J.S., S.H. Roh, D.K. Kim, J.G. Lee, Y.Y. Lee, S.S. Hong, S.W. Kwon, and J.H. Park, *Anti-cancer effect of Betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem Mass Spectrometry*. Planta Med, 2009. **75**(2): p. 127-31.
92. Goswami, P., S. Paul, R. Banerjee, R. Kundu, and A. Mukherjee, *Betulinic acid induces DNA damage and apoptosis in SiHa cells*. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2018. **828**: p. 1-9.
93. Klaunig, J.E., Y. Xu, J.S. Isenberg, S. Bachowski, K.L. Kolaja, J. Jiang, D.E. Stevenson, and E.F. Walborg, Jr., *The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1998. **106 Suppl 1**(Suppl 1): p. 289-95.
94. Rios-Arrabal, S., F. Artacho-Cordon, J. Leon, E. Roman-Marinetto, M. Del Mar Salinas-Asensio, I. Calvente, and M.I. Nunez, *Involvement of free radicals in breast cancer*. Springerplus, 2013. **2**: p. 404.
95. Ganguly, A., B. Das, A. Roy, N. Sen, S.B. Dasgupta, S. Mukhopadhyay, and H.K. Majumder, *Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death*. Cancer Res, 2007. **67**(24): p. 11848-58.
96. Yao, N., Y.J. Li, Y.H. Lei, N. Hu, W.M. Chen, Z. Yao, M. Yu, J.S. Liu, W.C. Ye, and D.M. Zhang, *A piperazine derivative of 23-hydroxy betulinic acid induces a mitochondria-derived ROS burst to trigger apoptotic cell death in hepatocellular carcinoma cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**(1): p. 192.

97. Chakraborty, B., D. Dutta, S. Mukherjee, S. Das, N.C. Maiti, P. Das, and C. Chowdhury, *Synthesis and biological evaluation of a novel betulinic acid derivative as an inducer of apoptosis in human colon carcinoma cells (HT-29)*. Eur J Med Chem, 2015. **102**: p. 93-105.
98. Koyuncu, I., A. Gonel, A. Kocyigit, E. Temiz, M. Durgun, and C.T. Supuran, *Selective inhibition of carbonic anhydrase-IX by sulphonamide derivatives induces pH and reactive oxygen species-mediated apoptosis in cervical cancer HeLa cells*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2018. **33**(1): p. 1137-1149.
99. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.
100. Bargonetti, J. and J.J. Manfredi, *Multiple roles of the tumor suppressor p53*. Curr Opin Oncol, 2002. **14**(1): p. 86-91.
101. Bertoli, C., J.M. Skotheim, and R.A. de Bruin, *Control of cell cycle transcription during G1 and S phases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(8): p. 518-28.
102. Bartelink, H., J.C. Horiot, P. Poortmans, H. Struikmans, W. Van den Bogaert, I. Barillot, A. Fourquet, J. Borger, J. Jager, W. Hoogenraad, L. Collette, M. Pierart, R. European Organization for, R. Treatment of Cancer, and G. Breast Cancer, *Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1378-87.
103. Thews, O., D.K. Kelleher, and P. Vaupel, *Changes in perfusion pattern of experimental tumors due to reduction in arterial oxygen partial pressure*. Adv Exp Med Biol, 2006. **578**: p. 363-8.
104. Dubois, L., S. Peeters, N.G. Lieuwes, N. Geusens, A. Thiry, S. Wigfield, F. Carta, A. McIntyre, A. Scozzafava, J.M. Dogne, C.T. Supuran, A.L. Harris, B. Masereel, and P. Lambin, *Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation*. Radiother Oncol, 2011. **99**(3): p. 424-31.
105. Doyen, J., S.K. Parks, S. Marcie, J. Pouyssegur, and J. Chiche, *Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 199.
106. Duivenvoorden, W.C., S.N. Hopmans, D. Gallino, T. Farrell, C. Gerdes, D. Glennie, H. Lukka, and J.H. Pinthus, *Inhibition of carbonic anhydrase IX (CA9)*

- sensitizes renal cell carcinoma to ionizing radiation.* Oncol Rep, 2015. **34**(4): p. 1968-76.
107. Damle, A.A., Y.P. Pawar, and A.A. Narkar, *Anticancer activity of betulinic acid on MCF-7 tumors in nude mice.* Indian J Exp Biol, 2013. **51**(7): p. 485-91.
108. Kaverin, M.V., P.A. Morozova, and L.V. Snegur, *Betulin, betulonic acid, 3-aminobetulinic acid. Improved extraction and preparative syntheses of derivatives.* Russ Chem Bull, 2022. **71**(10): p. 2236-2240.
109. Shi, W., N. Tang, and W.D. Yan, *Synthesis and cytotoxicity of triterpenoids derived from betulin and betulinic acid via click chemistry.* J Asian Nat Prod Res, 2015. **17**(2): p. 159-69.
110. Tian, D., Y. Yu, L. Zhang, J. Sun, and W. Jiang, *23-hydroxybetulinic acid reduces tumorigenesis, metastasis and immunosuppression in a mouse model of hepatocellular carcinoma via disruption of the MAPK signaling pathway.* Anticancer Drugs, 2022. **33**(9): p. 815-825.
111. Guerra, A.R., A.F. Paulino, M.M. Castro, H. Oliveira, M.F. Duarte, and I.F. Duarte, *Triple Negative Breast Cancer and Breast Epithelial Cells Differentially Reprogram Glucose and Lipid Metabolism upon Treatment with Triterpenic Acids.* Biomolecules, 2020. **10**(8).

7 Thesen

1. Das Betulin-CAI-Derivat 18 zeigt die stärkste zytotoxische Wirkung auf die untersuchten Mammakarzinomzelllinien. Die Kombination der beiden Vorläufersubstanzen 16+3AC ist weniger effektiv. Der CAI Substanz 16 zeigt die geringste Zytotoxizität.
2. Die Substanz 18 zeigte die stärkste Reduktion des klonogenen Überlebens im Vergleich zur Behandlung mit der Kombination 16+3AC. Unter Hypoxie waren die Effekte stärker als unter Normoxie.
3. Die Behandlung mit Substanz 18 beeinflusst die Proteinlevel von HIF-1 α nicht und führt zur Reduktion des Proteingehalts von CA IX und CA XII.
4. Substanz 18 induziert den Zelltodmechanismus der Apoptose in Zellen der MDA-MB-231 unter Normoxie und Hypoxie.
5. Das Betulin-CAI-Konjugat 18 löst in der Zelllinie MDA-MB-231 unter Normoxie Apoptose und Nekrose erst bei einer höheren Konzentration aus als unter Hypoxie.
6. Die Substanz 18 induziert in den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und HS578T die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale unter Normoxie wie auch Hypoxie. Unter Normoxie zeigt die MDA-MB-231 den höchsten Anstieg des ROS-Levels.
7. Die Behandlung mit Substanz 18 führt zur Reduktion der Migration in den Zelllinien MDA-MB-231 und HS578T.
8. Substanz 18 beeinflusst die Radiosensitivität von Mammakarzinomzellen, eine Behandlung der Zellen der MCF-7 führt zu der höchsten Radiosensitivierung.

Eidesstattliche Erklärung

(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.

Datum, Unterschrift

Danksagung

Ich danke all denen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit begleitet, unterstützt und diese auf unterschiedlichste Art und Weise ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Vordermark für die Überlassung des Themas, sowie der sehr guten Betreuung.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Matthias Bache möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie für die Durchsicht und konstruktiven Anregungen bei der Anfertigung der Dissertation bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Paschke für die freundliche Bereitstellung der Substanzen, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte durchführen können.

Der gesamten AG Molekulare Strahlenbiologie, die mich intensiv über die gesamte Zeit begleitet hat, möchte ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die Motivation danken. Besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Antje Güttler, die bei den praktischen Arbeiten stets mit wertvollem Rat zur Seite stand. Ihr gründlichen und durchdachten Rückmeldungen waren dabei unerlässlich.

Herzlichen Dank an Gabriele Thomas und Jana Block für die Einführung in die Methodik und außerordentliche Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Meiner Eltern danke ich für ihre Geduld, Ermutigung und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation. Meinen Freunden danke ich außerdem für das sorgfältige Fehlerlesen.