

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Dirk Vordermark

Arbeitsgruppe Molekulare Strahlenbiologie  
Leiter: Dr. rer. nat. Matthias Bache

# **Molekulare und strahlenbiologische Untersuchungen der Bedeutung von Abkömmlingen der Betulinsäure in Glioblastom-Zelllinien**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
für das Fachgebiet  
Humanmedizin  
vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anja Hein

geboren am 26.01.1990 in Gera

Gutachter:   1.    Prof. Dr. D. Vordermark  
              2.    Prof. Dr. R. Paschke  
              3.    Prof. Dr. R. Schobert (Bayreuth)

12.12.2017

10.08.2018

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, die mich immer unterstützt hat.

# Referat

Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und aggressivste Hirntumor im Erwachsenenalter. Die Prognose für GBM-Patienten ist trotz multimodaler Therapiekonzepte sehr schlecht. Besonders das schnelle, invasive Wachstum und die hypoxischen, therapieresistenten Tumorareale stellen zentrale Probleme für die operative Behandlung und die Radiochemotherapie dar.

Betulinsäure (BA), ein Naturstoff der Platanengewächse, ist ein neuer therapeutischer Wirkstoff für die Behandlung von Tumoren. BA wirkt in einer Vielzahl von Tumorzelllinien selektiv zytotoxisch, inhibiert die Migration und kann die Radiosensitivität insbesondere unter Hypoxie beeinflussen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit ist der therapeutische Einsatz von BA jedoch stark eingeschränkt. Durch chemische Modifikation können BA-Derivate mit verbesserter Löslichkeit und veränderten antitumoralen Eigenschaften synthetisiert werden. In dieser Arbeit wurden die zell- und strahlenbiologischen Effekte des BA-Derivats 3-O-Acetyl-28-betulinsäure(2-(2-aminoethyl)aminoethyl)amid (DE9B) und des BA-Cisplatin-Derivats  $\kappa$ N',N''-(3-O-Acetyl-28-betulinsäure(2-(2-aminoethyl)amino-ethyl)-amid) (APC) im Vergleich mit BA und Cisplatin (DDP) in GBM-Zelllinien unter Normoxie und Hypoxie untersucht.

Zytotoxizitätsanalysen (Sulforhodamin B (SRB)-Assay, Klonogenitätsassay) ergaben, dass APC ähnlich wie BA mit einer erhöhten Zytotoxizität und Radiosensitivierung unter Hypoxie reagiert. DE9B ist die Substanz mit der höchsten Zytotoxizität. Unter Hypoxie war jedoch keine verbesserte Wirkung bzw. kein Einfluss auf die Radiosensitivität zu beobachten. Zellzyklus- und Zelltoduntersuchungen (FACS-Analyse, Caspase-3/7-Assay, Trypanblau-Assay, Acridineorange-Färbung) zeigten, dass weder APC noch DE9B den Zellzyklus beeinflussten bzw. in dem hohen Maß wie BA und DDP Apoptose in den GBM-Zelllinien auslösen. Beide Derivate induzierten in Abhängigkeit von der Zelllinie und dem Sauerstoffgehalt in unterschiedlichem Maß Apoptose, Nekrose und Autophagie. Mittels Scratch-Assay konnte gezeigt werden, dass APC und DE9B sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie die Migration der GBM-Zellen inhibieren.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen gezeigt, dass mit DE9B und APC durch chemische Modifikation von BA zwei neue, effektive Substanzen synthetisiert wurden, die für die Behandlung von GBM interessante, therapeutische Eigenschaften aufweisen.

Hein, Anja: Molekulare und strahlenbiologische Untersuchungen der Bedeutung von Abkömmlingen der Betulinsäure in Glioblastom-Zelllinien, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 80 Seiten, 2017

## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis.....   | IV  |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | VII |
| 1 Einleitung.....   | 1   |
| 1.1 Glioblastoma multiforme .....   | 1   |
| 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Einteilung .....                         | 1   |
| 1.1.2 Diagnostik und Therapie .....   | 3   |
| 1.1.3 Therapeutische Probleme, Lösungsansätze und aktuelle Forschung.....   | 4   |
| 1.2 Tumorhypoxie .....  | 5   |
| 1.3 Bestrahlung.....  | 7   |
| 1.4 Cisplatin.....  | 8   |
| 1.5 Betulinsäure und Betulinsäure-Derivate .....                            | 10  |
| 1.5.1 Gewinnung von Betulin und BA.....                                     | 10  |
| 1.5.2 Bedeutung von Betulin und BA .....                                    | 11  |
| 1.5.3 Wirkmechanismen von BA .....  | 12  |
| 1.5.4 Herausforderungen der Anwendbarkeit von BA in der Tumorthherapie..... | 13  |
| 2 Zielstellung.....   | 16  |
| 3 Material und Methodik.....  | 17  |
| 3.1 Material.....   | 17  |
| 3.1.1 Zelllinien .....  | 17  |
| 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....                                      | 17  |
| 3.1.3 Kits .....  | 19  |
| 3.1.4 Antikörper .....  | 20  |
| 3.1.5 Puffer, Lösungen und Medien .....                                     | 20  |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.1.6  | Geräte und Verbrauchsmaterialien .....                                       | 23 |
| 3.2    | Methodik .....   | 25 |
| 3.2.1  | Pharmakologische Behandlung.....   | 25 |
| 3.2.2  | Zellkultivierung.....  | 25 |
| 3.2.3  | Zytotoxizitätsassay.....   | 26 |
| 3.2.4  | Zellzyklusanalyse.....   | 27 |
| 3.2.5  | Proliferations- und Nekroseanalyse .....                                     | 27 |
| 3.2.6  | Apoptoseanalyse .....  | 28 |
| 3.2.7  | Migrations-Analyse .....   | 28 |
| 3.2.8  | Bestrahlungsexperimente .....  | 29 |
| 3.2.9  | Westernblotanalyse .....   | 30 |
| 3.2.10 | Statistik .....  | 31 |
| 4      | Ergebnisse.....  | 32 |
| 4.1    | Zytotoxizitätsanalyse.....   | 32 |
| 4.2    | Proliferationsanalyse.....   | 35 |
| 4.3    | Analyse des Zellzyklus mittels Propidiumiodid-Färbung.....                   | 37 |
| 4.4    | Zelltodmechanismen.....  | 38 |
| 4.4.1  | Nekroseanalyse mittels Trypanblau-Assay.....                                 | 38 |
| 4.4.2  | Apoptoseanalysen mittels Caspase-3/7-Assay und morphologischer Analyse ..... | 40 |
| 4.5    | Migrationsanalyse .....  | 43 |
| 4.6    | Analyse des klonogenen Zellüberlebens und der Strahlen-sensitivität .....    | 44 |
| 5      | Diskussion .....   | 48 |
| 5.1    | Effekte auf Zytotoxizität, klonogenes Zellüberleben und Proliferation.....   | 48 |
| 5.1.1  | BA.....  | 48 |
| 5.1.2  | DDP .....  | 50 |
| 5.1.3  | DE9B .....   | 53 |
| 5.1.4  | APC .....  | 55 |
| 5.2    | Effekte auf den Zellzyklus und Induktion von Zelltod.....                    | 57 |
| 5.2.1  | BA.....  | 57 |
| 5.2.2  | DDP .....  | 61 |

|       |   |      |
|-------|---|------|
| 5.2.3 | DE9B .....                                      | 62   |
| 5.2.4 | APC .....                                       | 64   |
| 5.3   | Einfluss auf die Migration .....                | 65   |
| 5.4   | Einfluss auf die Strahlensensitivität .....     | 67   |
| 6     | Zusammenfassung .....                           | 69   |
| 7     | Literaturverzeichnis .....                      | 70   |
| 8     | Thesen.....                                     | 80   |
|       | Selbstständigkeitserklärung.....                | VIII |
|       | Erklärung über frühere Promotionsversuche ..... | IX   |
|       | Lebenslauf .....                                | X    |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |   |
|-------------------|---|
| A                 | Ampere  |
| Abb.              | Abbildung   |
| Amax              | Absorptionsmaximum  |
| ADP               | Adenosindiphosphat  |
| AIF               | Apoptose-induzierenden Faktor   |
| Apaf-1            | Apoptose-auslösenden Faktor-1   |
| APC               | (κN',N''-(3-O-Acetyl-28-betulinsäure(2-(2-aminoethyl)aminoethyl)amid)dichlorido-platin(II)) |
| ATP               | Adenosintriphosphat   |
| ATCC              | American Type Culture Collection  |
| B10               | 28-O-acetylbetulin-3-yl-β-D-glucopyranosid  |
| BA                | <i>betulinic acid</i> (Betulinsäure)  |
| bidest.           | bidestilliert   |
| bspw.             | beispielsweise  |
| bzw.              | beziehungsweise   |
| ca.               | circa   |
| CA IX             | <i>carbonic anhydrase IX</i> (Carboanhydrase IX)  |
| CAI               | <i>carbonic anhydrase inhibitors</i> (Carboanhydrasehemmer)                                 |
| CaCl <sub>2</sub> | Calciumchlorid  |
| CAD               | <i>caspase-activated DNase</i> (Caspase aktivierte DNase)                                   |
| cm                | Zentimeter  |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlenstoffdioxid   |
| DAPI              | 4,6-diamidino-2-phenylindoldihydrochloride  |
| DDP               | Cisplatin   |
| DE9B              | (3-O-Acetyl-28-betulinsäure(2-(2-aminoethyl)aminoethyl)amid))                               |
| dest.             | destilliert   |
| DMF               | Dimethylformamid  |
| DMF 10            | Dosis modifizierender Faktor 10   |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid  |
| DNA               | <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)                                       |
| EC50              | <i>half maximal effective concentration</i> (mittlere effektive Konzentration)              |
| ECL               | <i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)                             |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure  |

|                |   |
|----------------|---|
| EGTA           | Ethylenglykoltetraessigsäure  |
| EGF            | <i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)                  |
| EGFR           | <i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor) |
| etc.           | <i>et cetera</i>  |
| EtOH           | Ethanol   |
| FACS           | <i>fluorescence activated cell sorting</i> (Fluss-Sortierer)                  |
| FKS            | fetales Kälberserum   |
| g              | Gramm   |
| GBM            | Glioblastoma multiforme   |
| ggf.           | gegebenenfalls  |
| GSH            | Glutathion  |
| Gy             | Gray  |
| h              | Stunde  |
| HC-7           | 3-Ethylcarbamate(methyl)betulinate  |
| HCL            | Chlorwasserstoff  |
| HEPES          | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                         |
| HIF-1 $\alpha$ | Hypoxie-induzierter Faktor 1-Alpha  |
| IDH            | <i>Isocitrate Dehydrogenase</i> (Isocitrat-Dehydrogenase)                     |
| <i>IGF 2</i>   | <i>insulin-like growth factor 2</i> (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2)      |
| kDa            | kilo Dalton   |
| Ko             | unbehandelte Kontrolle  |
| L              | Liter   |
| LDH            | Lactatdehydrogenase   |
| LDS            | Lithium dodecyl sulfate   |
| M              | molar   |
| MeOH           | Methanol  |
| MES            | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure  |
| mg             | Milligramm  |
| MGMT           | O6-Methylguanin–DNA-Methyltransferase   |
| $\mu$          | Mikro   |
| min            | Minute  |
| ml             | Milliliter  |
| $\mu$ L        | Mikroliter  |
| mM             | Millimolar  |
| $\mu$ M        | Mikromolar  |
| $\mu$ m        | Mikrometer  |

|          |   |
|----------|---|
| mmHg     | Millimeter Quecksilbersäule   |
| NaCl     | Natriumchlorid  |
| nM       | Nanomolar   |
| nm       | Nanometer   |
| NO       | Stickstoffmonoxid   |
| Nr.      | Nummer  |
| NVX-207  | 3-Acetyl-betulinicacid-2-amino-3-hydroxy-2-hydroxymethyl-propanoate |
| OER      | <i>oxygen enhancement ratio</i>                                     |
| OD       | optische Dichte   |
| PARP     | Poly-(ADP-ribose)-polymerase  |
| PBS      | <i>phosphate buffered saline</i>                                    |
| PCR      | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)         |
| PI       | Propidiumiodid  |
| PS       | Phosphatidylserin   |
| PVDF     | Polyvinylidendifluorid  |
| RIPA     | <i>radioimmunoprecipitation assay</i>                               |
| RNA      | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)                          |
| RNase    | Ribonuklease  |
| ROS      | <i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)         |
| rpm      | rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)                       |
| RPMI     | Zellkulturmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute  |
| RT       | Raumtemperatur  |
| s. o.    | siehe oben  |
| sog.     | sogenannte  |
| s. u.    | siehe unten   |
| SDS      | Sodiumdodecylsulfat   |
| SDS-Page | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese                                  |
| sek      | Sekunde   |
| SF       | <i>survival fraction</i> (Überlebensfraktion)                       |
| S/P      | Streptomycin/Penicillin   |
| SRB      | Sulforhodamin B   |
| Tab.     | Tabelle   |
| TBS      | TRIS-buffered saline  |
| TBST     | TBS mit Tween® 20   |
| TMZ      | Temozolomid   |
| TRIS     | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                     |

|       |   |
|-------|---|
| u. a. | unter anderem   |
| UV    | ultraviolett  |
| V     | Volt  |
| v. a. | vor allem   |
| VEGF  | <i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor)                  |
| VEGFR | <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> (vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktorrezeptor) |
| WHO   | <i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)                                      |
| z. B. | zum Beispiel  |
| ZNS   | Zentralnervensystem   |

# 1 Einleitung

## 1.1 Glioblastoma multiforme

### 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Einteilung

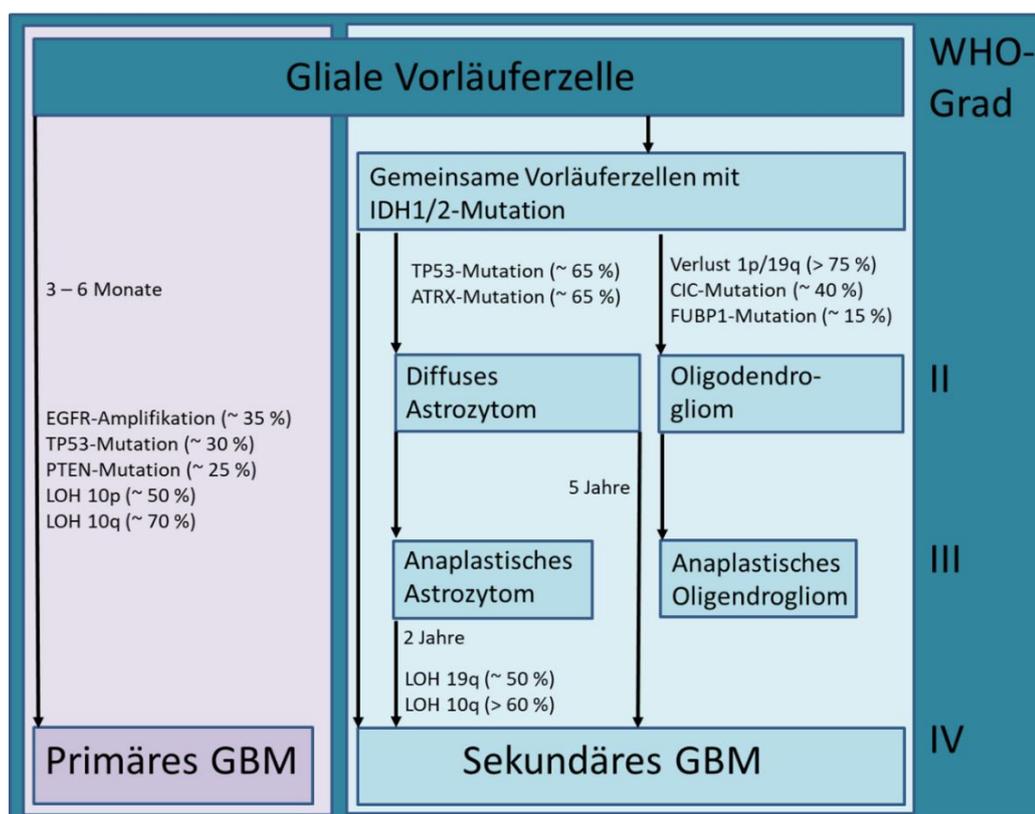
Die Inzidenz von Tumorerkrankungen nimmt stetig zu und wird prognostisch auch in Zukunft weiter steigen [1]. So erkranken 51 % der Männer und 43 % der Frauen im Laufe ihres Lebens an Krebs. Jeder vierte Mann bzw. jede fünfte Frau stirbt aufgrund einer Tumorerkrankung. 2,6 % dieser Sterbefälle werden durch Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) verursacht, obwohl deren Inzidenz einen geringeren prozentualen Anteil aller Tumorerkrankungen einnimmt [2]. Gliome werden von der *World Health Organisation* (WHO) entsprechend ihrer Malignität in Grad I-IV eingeteilt. Grad I und II stehen für niedrigmaligne und Grad III und IV für hochmaligne Tumoren (Tab. 1) [3, 4].

**Tabelle 1 WHO-Einteilung der Gliome**

|                          |                                     |              |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------|
| Astrozytäre Gliome       | Pilozytisches Astrozytom            | WHO-Grad I   |
|                          | Subependymales Riesenzellastrozytom | WHO-Grad I   |
|                          | Pilomyxoides Astrozytom             | WHO-Grad II  |
|                          | Diffuses Astrozytom                 | WHO-Grad II  |
|                          | Pleomorphes Xanthoastrozytom        | WHO-Grad II  |
|                          | Anaplastisches Astrozytom           | WHO-Grad III |
|                          | Glioblastoma multiforme             | WHO-Grad IV  |
| Oligodendrogliale Tumore | Oligodendrogliom                    | WHO-Grad II  |
|                          | Anaplastisches Oligodendrogliom     | WHO-Grad III |
| Mischgliome              | Oligoastrozytom                     | WHO-Grad II  |

GBM sind die bei Erwachsenen am häufigsten vorkommenden und gleichzeitig aggressivsten Hirntumore [4, 5]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 5,5 %. Sie stellen mit 55,4 % den größten Anteil aller malignen Gliome dar. Maligne Gliome treten wesentlich häufiger bei Männern als bei Frauen auf und die Inzidenz in der weißen Bevölkerung ist doppelt so hoch wie in der schwarzen Bevölkerung [5]. Bisher wurden abgesehen von

ionisierender Strahlung für Hirntumore keine Risikofaktoren identifiziert [6, 7]. 5 % aller Fälle weisen eine positive Familienanamnese bezüglich der Krankheitsgeschichte auf, von denen einige mit genetischen Syndromen wie Neurofibromatose Typ 1 und 2, Tuberosöse Sklerose sowie Li-Fraumeni-, Cowden-, Turcot's-, Lynch-, Gorlin-Goltz- und von Hippel-Lindau-Syndrom assoziiert sind [6, 8]. GBM werden in einen primären und einen sekundären Subtyp unterteilt (Abb.1). Primäre GBM treten wesentlich häufiger (95 %) auf, entstehen *de novo* aus differenzierten Gliazellen, Stamm- oder Progenitorzellen und sind durch eine schnelle Progression und eine kürzere Überlebenszeit gekennzeichnet. Das durchschnittliche Manifestationsalter liegt bei 62 Jahren. Charakteristisch für diesen Subtyp ist eine Amplifikation des *epidermal growth factor receptor* (EGFR), eine Deletion von *p16*, eine *PTEN*-Mutation sowie der Verlust des langen Arms (*loss of heterozygosity* (LOH)) des Chromosoms 10p (Abb. 1) [9].



**Abbildung 1 Einteilung und Entwicklung maligner Gliome, modifiziert nach [9]**

Sekundäre GBM entwickeln sich hingegen über mehrere Jahre durch Progression aus niedrigmalignen oder anaplastischen Astrozytomen und treten typischerweise bei jüngeren Patienten (durchschnittliches Manifestationsalter: 45 Jahre) auf. Diese sind durch LOH 19q und eine Mutation der Isocitrat-Dehydrogenase 1 (*IDH1*) charakterisiert (Abb. 1). Die *TP53*-Mutation und LOH 10q kann sowohl bei primären als auch bei sekundären GBM auftreten (Abb. 1). Das mittlere Überleben von Patienten mit sekundären

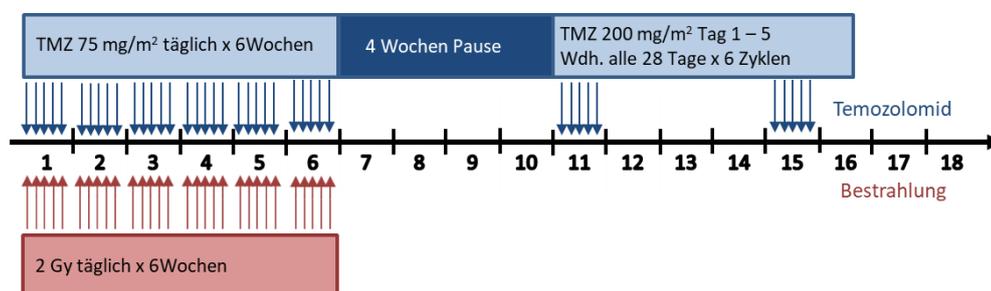
GBM (7,8 Monate) unterscheidet sich signifikant von denen mit primären GBM (4,7 Monate). Dies ist jedoch nur auf das jüngere Alter der Patienten mit sekundären GBM zurückzuführen [10, 9].

Diese Heterogenität der GBM und der GBM-Patienten stellt eine Herausforderung für die Therapie dar. Die Einteilung in primäre und sekundäre GBM wurde bereits 1940 von dem Neuropathologen Scherer eingeführt und bis heute genutzt. Seit der letzten Aktualisierung der WHO-Klassifikation 2016 wurde diese Unterscheidung in primäre und sekundäre GBM jedoch weitestgehend abgelegt, da es sich lediglich um eine klinische, aber weder therapeutisch noch prognostisch relevante Einteilung handelt. Der Fokus liegt aktuell auf den molekulargenetischen Veränderungen, welche neben der histopathologischen Befundung in die Klassifizierung der Gliome mit einbezogen werden [11].

### 1.1.2 Diagnostik und Therapie

Aufgrund der schnellen, invasiven Ausbreitung des Tumors kommt es meist frühzeitig zu einer klinischen Manifestation. Neben einem unspezifischen Krankheitsbild mit Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen oder Krampfanfällen, treten ebenso je nach Lokalisation des Tumors schwerwiegende neurologische Erscheinungen wie Persönlichkeitsstörungen oder Beeinträchtigung der motorischen und sprachlichen Fähigkeiten auf [12]. Laut Leitlinie ist bei klinischem Verdacht auf einen Hirntumor neben der Durchführung einer Magnetresonanztomographie mit und ohne Kontrastmittel ebenso eine mikroskopische, morphologische Diagnostik mittels Biopsie die Methode der Wahl. Ergänzend kann, v. a. bei der Operations- sowie Biopsieplanung und in der Rezidivdiagnostik, eine Aminosäure-Positronenemissionstomographie mit dem Tracer C11-Methionin durchgeführt werden. In der Bildgebung stellen sich GBM meist als inhomogene, kontrastmittelaufnehmende, raumfordernde Prozesse mit perifokalen Ödem dar [12]. Histologisch erscheint das GBM als heterogenes, invasives Gewebe mit hoher Zelldichte, atypischen Mitosen und nukleären Pleomorphien, mikrovaskulären Proliferationen sowie Nekrosearealen [6]. So kann entsprechend der Klassifikation der Gliome nach WHO das GBM Grad IV von den Astrozytomen Grad I-III und Oligodendrogliomen Grad II-III abgegrenzt und entsprechend therapiert werden [3]. Nach einer fluoreszenzgestützten radikalen Resektion erfolgt eine Strahlentherapie mit 60 Gy und einer simultanen Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ), welche nach der Bestrahlung nochmals in sechs weiteren Zyklen durchgeführt wird (Abb. 2) [13]. TMZ ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches durch die Bildung von O6-Methylguanin zu Störungen der DNA-Replikation und somit

zum Zelltod führt [13]. Der Nutzen der Chemotherapie v. a. in Bezug auf das optimale Einsetzen im zeitlichen Ablauf der Therapie ist jedoch noch nicht nachgewiesen [12].



**Abbildung 2** Therapieschema des GBM, modifiziert nach [14]

Laut Leitlinie ist für Rezidive keine Standardtherapie definiert [6, 12, 15]. Die Indikation für Reoperation, erneute Chemo- und/oder Radiotherapie muss individuell geprüft werden. TMZ zeigt eine verminderte Wirksamkeit in rezidivierenden GBM. Eingesetzt werden neben den Chemotherapeutika erster Wahl (Nitrosoharnstoffe und TMZ) [12], auch Carboplatin, Procarbazine, Irinotecan, und Etoposide [6, 15].

Zusätzliche Probleme des Krankheitsbildes sind Krampfanfälle, Ödeme und venöse Thromboembolien. Diese müssen entsprechend mit antiepileptischen Medikamenten, Kortikosteroiden bzw. Antikoagulanzen behandelt werden [12].

### 1.1.3 Therapeutische Probleme, Lösungsansätze und aktuelle Forschung

Trotz der intensiven multidisziplinären Therapie beträgt das mediane Überleben von GBM-Patienten nur 15 Monate [7]. Dies ist auf eine Vielzahl von Problemen zurückzuführen. Zum einen ist aufgrund des schnellen, invasiven Wachstums eine komplette Resektion (R0-Resektion) praktisch nicht möglich und es bleibt Tumorgewebe zurück [12]. Weiterhin begrenzt die Heterogenität des genetischen Profils (Abb. 1) die konventionelle Therapie deutlich. So führen die in der malignen Progression angereicherten Mutationen, chromosomalen Aberrationen und Dysregulationen bestimmter Signalwege zu sehr unterschiedlichen Therapiesensitivitäten und vielfältigen Resistenzmechanismen. Auch die Effektivität von TMZ ist maßgeblich von dem Expressionslevel des DNA-Reparaturenzyms O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*) abhängig. Eine Hypermethylierung von *MGMT* geht mit einer deutlich günstigeren Prognose und mit einem besseren Ansprechen auf die TMZ-Therapie einher [16]. Somit wird bei älteren Patienten (ab 65-70 Jahre) in Abhängigkeit vom *MGMT*-Status entschieden, ob eine primäre Strahlentherapie oder eine primäre Chemotherapie mit oder ohne Strahlentherapie durchgeführt werden soll [17, 18]. Die Mutation des *IDH1*-Gens stellt einen wichtigen,

prognostischen Marker dar und hat Einfluss auf die Tumorklassifikation. *IDH1*-Wildtyp entspricht weitestgehend dem klinisch definierten primären GBM, während die *IDH1*-mutierten den sekundären GBM gleichkommen (Abb. 1) [11]. Weitere Defekte in GBM betreffen den EGF-Rezeptor, welcher die Aktivierung von Transkriptionsprogrammen bezüglich Überleben, Proliferation und Invasion, aber auch eine durch VEGF-Überexpression gesteigerte Angiogenese vermittelt. Die Entwicklung von effektiven Inhibitoren der Tyrosinkinase EGFR und VEGFR sowie Angiogenesehemmern stellen einen bedeutenden Anteil aktueller Forschungen und klinischer Studien dar [6, 12]. Durch das rapide Wachstum des soliden Tumors mangelt es an umliegenden Gefäßen und es entstehen hypoxische, azidotische Areale im Inneren des Tumors. Diese schlechte Blutversorgung führt zum einen dazu, dass die Chemotherapeutika diese Areale nicht erreichen und zum anderen, dass die Zellen in einen inaktiven Zustand mit verringerter Zellteilungsrate übergehen und somit resistent gegenüber zahlreicher Chemotherapeutika sind, da diese gegen schnell proliferierende Zellen gerichtet sind [19, 20].

Die Prognose für GBM-Patienten ist aufgrund der beschriebenen Heterogenität der genetischen und epigenetischen Veränderungen sehr schlecht [10]. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt wurden, sind noch viele Fragen zur Tumorbiologie offen und es ist trotz intensiver Forschungen bisher nicht gelungen effektivere, individuelle Therapiestrategien zu entwickeln.

## 1.2 Tumorhypoxie

Sauerstoff stellt die zentrale Rolle bei der aeroben Energiegewinnung zum Erhalt zellulärer Strukturen und Funktionen dar. Entsteht eine Dysbalance zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot, resultiert ein Sauerstoffmangel. Je nach Dauer dieses Zustandes unterscheidet man akute und chronische Hypoxie [21]. Diese hypoxischen Zustände kommen sowohl bei physiologischen Vorgängen, z. B. bei Aufenthalt in großen Höhen, als auch im Rahmen von pathologischen Prozessen vor. Die Ursachen für letzteres sind vielfältig. So kann ein verringerter Sauerstoffpartialdruck im Rahmen von Gefäßerkrankungen, pulmonalen Erkrankungen sowie Anämien oder auch in Tumoren auftreten. Es ist bekannt, dass in den meisten soliden Tumoren bspw. im Gehirn, in der Brust und im Weichgewebe geringere Sauerstoffpartialdrücke bestehen als im Normalgewebe [22–26]. Diese unzureichende Sauerstoffversorgung entsteht v. a. durch rasches Tumorwachstum und daraus resultierenden funktionellen und strukturellen Störungen der Mikrozirkulation sowie erschwerten Diffusionsbedingungen [26].

Da Sauerstoffmangel sowohl für Normal- als auch für Tumorgewebe toxisch ist, bestehen verschiedene Möglichkeiten auf systemischer, lokaler und zellulärer Ebene auf diesen Zustand zu reagieren. So kann bspw. eine Anpassung des Herz-Kreislauf-Systems, der Atmung und der Erythropoese stattfinden oder auch eine Gefäßneubildung aktiviert werden [26]. Bei der Anpassung auf zellulärer Ebene steht die Familie der Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) im Mittelpunkt [27]. Der bedeutendste Vertreter ist HIF-1, welcher aus einer sauerstoffabhängigen  $\alpha$ - und einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit besteht. HIF-1 $\alpha$  wird bei normalen Sauerstoffpartialdrücken durch den von Hippel-Lindau Tumorsuppressor für den proteosomalen Abbau ubiquitinyliert. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck, wird HIF-1 $\alpha$  stabilisiert und in den Kern transloziert. Hier bindet es zusammen mit HIF-1 $\beta$  als Heterodimer an *hypoxia responsive elements* (HRE), welche in den Promotorbereichen von ca. 70 hypoxieassoziierten Targetgenen liegen. So führt HIF-1 zur verstärkten Transkription von Genen, die u. a. Glukoseaufnahme (z. B. Glukosetransporter *GLUT 1* und *3*), Angiogenese (z. B. *VEGF*), Zellproliferation und -überleben (z. B. *insulin-like growth factor 2 (IGF 2)*), Invasion bzw. Metastasierung sowie pH-Regulation (z. B. Carboanhydrase IX (*CA IX*)) beeinflussen [27, 28].

Diese zelluläre Anpassungskaskade wird in allen Zellen bereits bei leicht verminderten Sauerstoffpartialdrücken aktiviert, um die Beeinflussung physiologischer Prozesse zu verhindern. Tumorzellen jedoch können durch genetische Veränderungen weitere adaptive Prozesse durchlaufen, die mit einer Überexpression von HIF-1 $\alpha$  und einer damit gesteigerten Neoangiogenese, erhöhten Proliferation und einer verstärkten Invasivität einhergehen. Ebenso ist bekannt, dass die durch Hypoxie verursachte genomische Instabilität sowie die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  in Tumorzellen mit einem aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose assoziiert sind [25, 26]. Ein weiteres Problem besteht in der Resistenz hypoxischer Tumorareale gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie (siehe 1.1.3 und 1.3) [19, 20, 29].

Therapieoptionen mit einer guten Effektivität in hypoxischen Arealen sind somit Gegenstand aktueller Forschungen. Die Suppression der HIF-1 $\alpha$ -Genexpression, welche wie bereits erwähnt in vielen Tumoren überexprimiert ist und Therapieresistenzen erzeugt, führt zu einer erhöhten Zytotoxizität [30, 31]. Eine andere Option ist die Gabe von Medikamenten, die unter Sauerstoffmangel aktiviert werden. So hat Tirapazamin, welches unter Hypoxie die DNA-Reparatur hemmt, in Kombination mit Cisplatin einen deutlich positiven Effekt auf die Prognose von Lungenkarzinompatienten gezeigt [32, 33]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass auch die Gabe von EPO auch die Oxygenierung des

Tumorgewebes und somit dessen Sensitivität gegenüber einer Chemo- und/oder Strahlentherapie steigert [21, 34].

### 1.3 Bestrahlung

Die Bestrahlung stellt neben der Operation und Chemotherapie die dritte große Säule der multimodalen Tumorthherapie dar. Auch bei der GBM-Behandlung spielt die Strahlentherapie eine wichtige Rolle (Abb. 2) [13].

In der Strahlentherapie wird hauptsächlich ionisierende Strahlung verwendet, welche zu DNA-Schäden in der Zelle führt. Dies geschieht auf zwei Wegen - der direkten oder indirekten Strahlenwirkung. Zum einen kann die Strahlung die DNA direkt ionisieren. Zum anderen werden durch die Ionisierung von Wasser freie Radikale und Peroxide gebildet. Diese freien Radikale sind in der Lage die DNA zu schädigen. Es entstehen Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Basenmodifikationen und -verluste, Veränderungen der Zuckermoleküle, DNA-DNA- bzw. DNA-Protein-Vernetzungen oder auch sogenannte *bulky lesions*, bei denen es zu einem kombinierten Auftreten mehrerer und somit meist irreparabler Schäden kommt [21]. Bereits kleinste Dosen von 0,1-2 Gy verursachen diese DNA-Schäden, obwohl erst deutlich höhere Dosen letal für eine Zelle sind.

Die Bestrahlung löst eine physiologische Stressantwort aus, die es der Zelle ermöglicht durch Reparaturmechanismen die DNA-Schäden zu beheben. Die DNA-Reparatur ist meist nach 6-8 h abgeschlossen. Ist die Zelle jedoch nicht in der Lage die Schäden zu beseitigen, wird eine Signalkaskade aktiviert, die in der Apoptose endet. Normalzellen haben im Vergleich zu Tumorzellen eine bessere Reparaturfähigkeit. Dies macht man sich bei der fraktionierten Bestrahlung zu Nutze. Hierbei verteilt man die geplante Gesamtstrahlendosis (meist 50-60 Gy) auf mehrere, meist täglich verabreichende Teildosen von 1,8-2,5 Gy. Die fraktionierte Bestrahlung erlaubt den Normalzellen eine effiziente Reparatur, während Tumorzellen ausreichend geschädigt werden. Somit können Tumore effizienter bestrahlt und gleichzeitig das umliegende Normalgewebe geschont werden [35]. Dementsprechend wird laut Leitlinie den GBM-Patienten die Gesamtdosis von 60 Gy fraktioniert über 6 Wochen täglich 2 Gy verabreicht (Abb. 2) [12, 13].

Strahlenresistenz stellt ein zentrales Problem bei der Therapie vieler Tumore, auch von GBM, dar. Durch die Anwesenheit von Sauerstoff wird die wie bereits erwähnte Peroxid- und Radikalbildung begünstigt und der DNA-Schaden fixiert, so dass er nicht mehr repariert werden kann (Sauerstoffeffekt). Je geringer der Sauerstoffpartialdruck, desto

weniger Radikale und Peroxide werden gebildet und desto mehr Strahlenschäden werden anteilig repariert [21, 36]. Somit ist die durch Bestrahlung hervorgerufene Schädigung der DNA in den hypoxischen Arealen solider Tumore mit Sauerstoffpartialdrücken unter 25-30 mmHg deutlich geringer [29]. Es ist bekannt, dass bei Anwesenheit von Sauerstoff alle Gewebe doppelt bis dreifach strahlensensibler sind als unter Anoxie [35]. Die *oxygen enhancement ratio* (OER) beschreibt genau diesen Verstärkungsfaktor, der eingesetzt werden muss, um bei der Bestrahlung von hypoxischen Zellen, den gleichen Effekt zu erreichen wie in Zellen unter aeroben Bedingungen. Ein weiteres Problem besteht darin, dass schnellproliferierende Gewebe wie hämatopoetische und epidermale Zellen eine deutlich höhere Sensibilität auf Bestrahlung aufweisen als langsam wachsende, solide Tumore mit hypoxischen Arealen [21]. Ebenso ist die fehlende selektive Wirkung der ionisierenden Strahlung auf Normal- und Tumorzellen eine therapeutische Herausforderung.

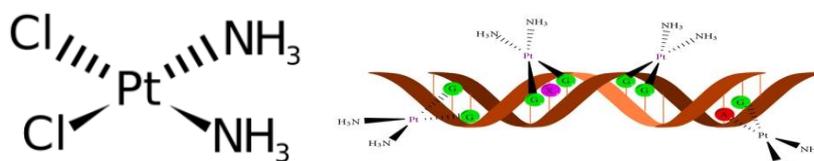
Um diesen Problemen der Bestrahlung zu entgegnen und die therapeutische Effizienz zu erhöhen, stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Zum einen kann das Tumolvolumen durch eine vorgeschaltete Operation und/oder Chemotherapie verkleinert werden und zum anderen kann die Strahlendosis lokal erhöht oder die Fraktionierung optimiert werden [21]. Möglichkeiten zur Verbesserung der Therapieeffekte auf hypoxische Tumorareale sind außerdem die Behandlung mit hypoxischen Radiosensitizern, die selektiv hypoxische Zellen schädigen sowie die Suppression von HIF-1 $\alpha$  [30, 31, 37].

## 1.4 Cisplatin

Cisplatin (DDP) ist ein seit den 1970er Jahren eingesetztes und auch heute noch eines der am häufigsten angewendeten Chemotherapeutika [38, 39]. DDP zeigt in einer Vielzahl von Tumoren v. a. in Form von Kombinationstherapien gute Therapieerfolge [39–41].

DDP gehört zu der Gruppe der alkylierenden Chemotherapeutika. Es gelangt als neutrales Molekül (Abb. 3 links) mittels Diffusion oder durch aktiven Transport in die Zelle, wird hydrolytisch gespalten und liegt als Kation vor [41]. Durch Interkalieren in die negativ geladene DNA entstehen Verbindungen zwischen zwei Nukleotiden eines oder beider DNA-Stränge [41]. Die sog. *intrastrand crosslinks* treten häufiger auf als die *interstrand crosslinks* [42], beide jedoch entwinden die DNA. Aber auch DNA-Protein-Verbindungen entstehen [43]. Erwähnenswert ist, dass nur ein geringer Anteil mit der

nukleären DNA interkaliert. Ein wesentlich größerer Teil interagiert mit der mitochondrialen DNA sowie mit Membran- bzw. intrazellulären Proteinen und behindert auf diese Weise die Funktion von bspw. Phosphatidylserinen, Phospholipiden, Mikrofilamenten, Hitze-Shock-Proteinen und Ubiquitin [41]. Besonders Proteine mit einer Thiol-Funktion sind potentielle Reaktionspartner für DDP wie bspw. Glutathion (GSH) [41]. Die DNA-Schäden werden durch eine Vielzahl verschiedener Protein- und Reparatursysteme erkannt, wobei jedoch nur eine Nukleotidexzisionsreparatur die DNA-Addukte effektiv entfernen kann [40, 43].



**Abbildung 3 Strukturformel DDP (links) und *intra-* sowie *interstrand*-DDP-Addukte (rechts) [44]**

Somit bewirkt DDP über die Blockade der DNA-Replikation bzw. Transkription eine Beeinträchtigung der Zellteilung und führt somit zu einem Zellzyklusarrest. Ebenso werden durch die Veränderung der Genexpression viele zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Adhäsion, Apoptose, Proliferation und DNA-Reparatur beeinflusst [42]. Weiterhin löst DDP Apoptose aus. Das Ausmaß ist abhängig von der Anzahl an *DNA-protein* bzw. *intrastrand crosslinks* einerseits und der Anzahl an Reparaturmechanismen andererseits. Zu beachten ist, dass Mitochondrien keine Reparaturmechanismen besitzen, die diese DDP-DNA-Addukte beseitigen können [43]. Durch DDP induzierte Zelltodmechanismen sind neben Apoptose auch seltener Nekrose oder eine Kombination aus beiden Zelltodformen [43].

Eine deutliche Einschränkung in der klinischen Anwendung besteht v. a. durch die Nebenwirkungen. Eine der häufigsten unerwünschten Wirkungen sind Übelkeit und Erbrechen. Besonders limitierende Nebenwirkungen stellen die Nephro-, Oto- und Neurotoxizität sowie die Myelodepression dar [45]. Weiterhin schränken Resistenzen gegenüber DDP die klinische Anwendung ein. Sowohl klinische Erfahrungen als auch die *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass eine Resistenz gegen DDP multifaktoriell ist und in Abhängigkeit vom Tumor bzw. der Zelllinie generell besteht (primäre Resistenz) oder sich im Laufe der Behandlung entwickelt (sekundäre Resistenz) [42, 43]. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine verminderte Aufnahme oder ein erhöhter Efflux aufgrund von bestimmten *ATP-binding cassette*-Transportern führen zu einer verringerten intrazellulären Anreicherung von DDP [41].

Weiterhin kann die Konzentration des freien wirksamen DDPs durch die kovalente Bindung an die Cysteinreste in Glutathion (GSH) und Metallothioneinen oder andere Thiolgruppen enthaltene Proteine gesenkt und energieabhängig der Exozytose zugeführt werden [26, 41]. Somit führt eine Überexpression von GSH zu einer verminderten DDP-Wirkung. Aber auch Veränderungen der Expression bestimmter Gene ermöglichen der Zelle selbst bei hohen Konzentrationen zu überleben. Beispiele hierfür sind die verminderte Expression von Caspasen und PARP sowie die Aktivierung von Reparaturgenen [26, 46]. Ebenso das Verschieben des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiapoptischen Proteinen oder eine *TP53*-Mutation können ebenfalls ein Teil der Resistenzmechanismen sein. In hypoxischen Tumorarealen erschwert eine mangelnde Durchblutung den Zugang der Chemotherapeutika zu den Zellen und ein verminderter Stoffwechsel reduziert dessen Wirkung (siehe 1.2) [26].

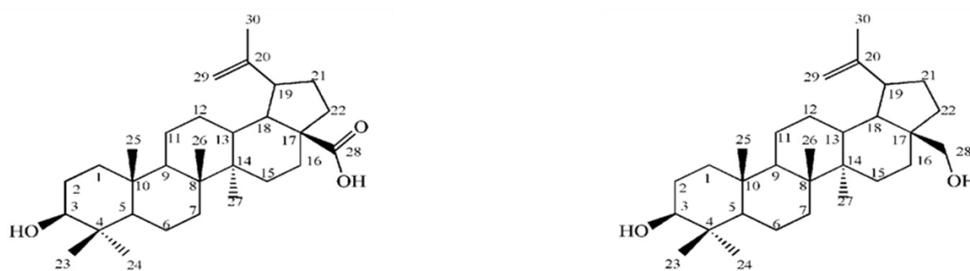
In den letzten Jahren wurde versucht mit verschiedenen Methoden diese Resistenzen zu durchbrechen. Es wurden DDP-Derivate mit einer abgewandelten Struktur entwickelt, wie Carboplatin, welches einfacher durch die Membran penetriert und andere DNA-Addukte bildet [40, 43]. Weiterhin wurde versucht durch die Kombination von zwei oder mehr zytotoxischen bzw. zytostatischen Substanzen mit unterschiedlichem Nebenwirkungsspektrum die zwei unerwünschten Hauptprobleme der Resistenzentwicklung und der limitierenden Wirkungen zu überwinden. Die Zellschädigung durch ein Chemotherapeutikum bzw. durch ionisierende Strahlung kann durch die Reparatursysteme in der Zelle behoben werden. Die Kombination verschiedener Chemotherapeutika bzw. eines Chemotherapeutikums mit einer Strahlentherapie geht mit einer geringeren Reparaturwahrscheinlichkeit einher und führt somit eher zum Zelltod [21, 47].

## 1.5 Betulinsäure und Betulinsäure-Derivate

### 1.5.1 Gewinnung von Betulin und BA

Triterpene stellen eine Gruppe von Naturstoffen dar und können aus einer Vielzahl von pflanzlichen Quellen gewonnen werden. Viele dieser verschiedenen Triterpene und deren Derivate werden auf ihre biologische Aktivität und medizinischen Nutzen geprüft [48]. Betulin, ein pentazyklisches Triterpen, besitzt einen „C-30-Körper“, basierend auf vier Sechsringen und einem Fünfring und gehört somit der Unterklasse der Lupane an (Abb. 4 links). Bereits 1788 entdeckte der Chemiker Johann Tobias Lowitz den Naturheilstoff Betulin und führte dessen Isolierung aus der Rinde der weißen Birke mittels

Sublimierung durch [49, 48]. Betulinsäure (BA) stellt das Carbonsäurederivat von Betulin dar und kann entweder durch die Oxidation des C-28 oder durch Extraktion und Umkristallisation direkt aus den pflanzlichen Materialien der Platanengewächse gewonnen werden. Aufgrund des hohen Betulingehaltes (5-22 %) der Rinde der weißen Birke (*Betula alba*) [50] und der einfachen, kostengünstigen Oxidation, ist dies der bevorzugte Prozess der BA-Gewinnung [49]. Die reine BA ist ein weißer, kristalliner Feststoff mit einer molaren Masse von 456,71 g/mol (Abb. 4 rechts).



**Abbildung 4 Chemische Struktur von Betulin (links) und Betulinsäure (rechts)**  
 Dargestellt sind die chemischen Strukturformeln von Betulin (3 $\beta$ -Lup-20(29)-en-3,28-diol); MW: 442,72g/mol und Betulinsäure (3 $\beta$ -Hydroxyl-lup-20(29)-en-28-säure); MW: 456,72 g/mol

### 1.5.2 Bedeutung von Betulin und BA

Bioaktive Stoffe wie Betulin oder BA wurden bereits vor Jahrtausenden in der Volksmedizin therapeutisch verwendet. So wurde die heilende Wirkung der Birkenrinde u. a. zur Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen von den amerikanischen Ureinwohnern und in Russland eingesetzt [48]. BA ist pharmakologisch aktiver als Betulin und besitzt ein vielfältiges Wirkungsspektrum. BA weist eine antivirale (HAV-1, HIV, Influenza A), antibakterielle (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), anthelmintische sowie eine Antimalaria-Aktivität auf. Außerdem moduliert BA die Immunreaktion und wirkt anti-inflammatorisch [49, 48]. Aufgrund der hemmenden Wirkung auf die Acetyl-CoA-Acetyltransferase, wird BA als aussichtsreiche Alternative für die Therapie von Arteriosklerose und Hypercholesterinämie untersucht [51]. Neben diesem breiten Spektrum an biologischen Aktivitäten, wurde auch eine antitumorale Wirkung nachgewiesen [49]. In zahlreichen *in vitro* Studien konnten zytotoxische Effekte von BA in verschiedenen Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten, wie bspw. Melanomen [52–54], Leukämien [55, 56], Kopf-Hals-Tumoren [57–59], Gliomen [60–64] sowie Bronchial- [53, 62, 56], Ovarial- [53], Cervix- [53], Mamma- [65, 56], Kolon- [56], Nierenzell- [62] und Prostatakarzinomen [56] nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung dabei ist,

dass die zytotoxische Aktivität von BA selektiv gegen Tumorzellen und nicht gegen untransformierte Normalzellen gerichtet ist. Dies wurde *in vitro* u. a. an Endothelzellen [51], neuronalen Zellen [61], Fibroblasten [53], Astrozyten [64], Melanozyten [54, 66] sowie peripheren Blutzellen [56, 53] untersucht. *In vivo* wurde am Mausmodell gezeigt, dass BA trotz seiner antitumoralen Wirkung keine systemische Toxizität auf den Organismus hat [50, 52, 53, 67–69]. Der zu Grunde liegende Mechanismus dieses therapeutischen Fensters wurde bisher noch nicht aufgedeckt [49]. BA scheint in der gleichen Art und Weise auf Normal- und Tumorzellen zu wirken, jedoch weisen Normalzellen eine wesentlich höhere Toleranz auf [66]. Ebenso bedeutsam ist, dass BA zytotoxisch in Tumorzelllinien und primären Tumorproben wirkt, welche Resistenzen gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika oder Bestrahlung aufweisen [60, 70].

### 1.5.3 Wirkmechanismen von BA

In den letzten Jahren wurde intensiv an der Aufklärung des genauen Wirkungsmechanismus von BA gearbeitet, jedoch sind immer noch viele Inhalte und Zusammenhänge ungeklärt bzw. umstritten. Bisher ist bekannt, dass BA die Permeabilität der Mitochondrienmembran verändert und somit den Verlust des Mitochondrienmembranpotentials bewirkt [62]. Durch die Öffnung der Poren in der Mitochondrienmembran wird die Freisetzung von Cytochrom c und des Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) ausgelöst. Cytochrom c bindet im Zytosol den Apoptose-auslösenden Faktor-1. Dieser Komplex sowie AIF aktivieren die Procaspase-9, welche wiederum mit der Aktivierung von Procaspase-3 den irreversiblen Part der Apoptosekaskade in Gang setzt. Die Caspasen führen zum einen über die Aktivierung von Endonukleasen wie bspw. die caspaseaktivierte DNAase CAD zu einer DNA-Degradation und zum anderen schneiden sie Intermediärfilamente und erleichtern so die Kernfragmentierung [58, 62, 71]. Die aus den Mitochondrien freigesetzten *reactive oxygen species* (ROS) verstärken die Caspaseaktivierung und somit die Apoptosekaskade [62, 64]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass BA in GBM-Zelllinien zu einer Spaltung des Apoptosemarkers PARP führt [30, 72]. Diese Apoptoseinduktion wurde in einer Vielzahl verschiedener Tumorzelllinien nachgewiesen [62–64, 52, 53]. Da BA im Gegensatz zu den meisten Chemotherapeutika direkt an den Mitochondrien angreift und somit unabhängig vom p53- und CD95-Status Apoptose induziert, wirkt BA unabhängig von Mutationen in den vorgeschalteten Signalwegen [62]. Diese sind häufig die Ursache für die Therapieresistenz gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika und der Grund weshalb Substanzen, die direkt auf Mitochondrien wirken als potentielle Wirkstoffe

gegen apoptoseresistente Tumore gelten. Aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen scheinen keine Kreuzresistenzen zwischen BA und anderen Chemotherapeutika zu bestehen [52, 62, 70, 73]. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination aus BA und einem Chemotherapeutikum nicht nur Resistenzen überwunden, sondern auch synergistische oder additive Effekte erzeugt wurden. So ist es auch möglich, dass die therapeutisch nötigen Dosen herabgesetzt und die Nebenwirkungen reduziert wurden. Bspw. ruft eine Kombination aus BA und den Chemotherapeutika Doxorubicin, VP16, Taxol, Actinomycin D bzw. Cisplatin (DDP) in verschiedenen neuroektodermalen Tumoren eine verstärkte Apoptoseinduktion sowie Inhibierung des klonogenen Zellüberlebens hervor. Diese sensitivierenden Effekte waren nicht bei untransformierten Zellen zu beobachten [74]. Neben der Apoptoseinduktion zeigt BA zahlreiche weitere Wirkungen. BA hemmt bspw. die Topoisomerase I indem es die Interaktion des Enzyms mit der DNA und somit die Transkription und Replikation verhindert [75]. Allerdings ist der Einfluss von BA auf den Zellzyklus umstritten und scheint abhängig von der Zelllinie zu sein [48]. Weiterhin konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass BA die Migration in GBM-, Pankreas- und Melanomzelllinien hemmt [30, 54, 76]. Erwähnenswert ist ebenso die Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalts unter Hypoxie [30, 77]. Dies ist von besonderem Interesse, da in soliden Tumoren oft hypoxische Areale auftreten, die eine verstärkte Therapieresistenz aufweisen (siehe 1.2). Zusätzlich wurde gezeigt, dass BA effektiver in saurem Milieu wirkt, welches im Gegensatz zu normalem Gewebe vorwiegend in soliden, hypoxischen Tumoren vorkommt und dass BA im Gegensatz zu vielen herkömmlichen Chemotherapeutika zytotoxisch auf ruhende, nicht-proliferierende Tumorzellen wirkt [78]. Durch die (reversible) Wirkung auf die Funktion der Mitochondrien in Endothelzellen, beeinflusst BA deren metabolische Aktivität und Differenzierung. Somit hat BA einen Effekt auf die Angiogenese, was wiederum bedeutsam für die Tumorthherapie bezüglich des Tumorumfanges, dessen Versorgung und Ausbreitung ist [51]. Weiterhin konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass BA in Melanom- [54], GBM- [30] sowie Kopf- und Halstumorzelllinien [59] radiosensitivierend wirkt. Man vermutet, dass die additiven Effekte durch die Aktivierung verschiedener Signalwege zustande kommen [59].

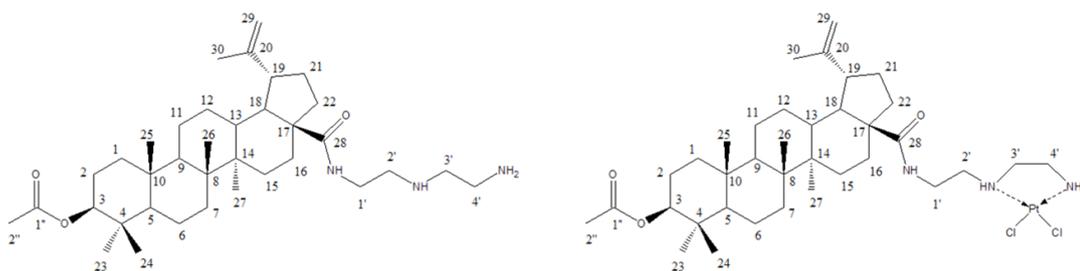
#### 1.5.4 Herausforderungen der Anwendbarkeit von BA in der Tumorthherapie

BA ist somit aufgrund seiner biologischen Aktivität ein potentieller Wirkstoff für eine künftige Tumorthherapie. Diese wird jedoch deutlich durch seine chemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften eingeschränkt. BA ist aufgrund seiner Lipophilie

schlecht löslich in Wasser (0,02 µg/ml bei RT). Ebenso weist es eine begrenzte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wie DMSO, DMF, Petrolether und Benzol sowie eine geringe Membranpermeabilität auf. Dies geht mit einer geringen Bioverfügbarkeit und Substratpräzipitation einher. Weiterhin besitzt BA eine unzureichende metabolische Stabilität und sehr hohe Plasmaproteinbindungsfähigkeit [79–81]. Ein weiterer Forschungsschwerpunkt liegt deshalb auf der Entwicklung geeigneter chemischer Formulierungsstrategien. So konnte mittels Polyvinylpyrrolidon als Trägersubstanz erreicht werden, dass BA nach einer intraperitonealen Injektion im Mausmodell schnell absorbiert wird und eine lange Eliminationszeit sowie ein hohes Verteilungsvolumen aufweist [50]. Ebenso können Liposomen als Trägersubstanz im Mausmodell zur intravenösen und oralen Applikation dienen [69]. Außerdem wurden Karbon-Nanoröhrchen als Trägermaterial für BA untersucht, um die Löslichkeit und Bioverfügbarkeit von BA zu verbessern [82]. Weiterhin versuchten mehrere Arbeitsgruppen den limitierenden Faktor der Applizierbarkeit durch chemische Modifikationen zu umgehen. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl verschiedener BA-Derivate mit verbesserter Löslichkeit und veränderten antitumoralen Eigenschaften synthetisiert. Diese Veränderungen im Molekül sind grundsätzlich an C-3, C-20 und C-28 sowie dem A-Ring möglich (Abb. 4), jedoch wiesen nur Derivate basierend auf chemischen Modifikationen an C-3 und C-28 eine erhöhte Zytotoxizität auf [48]. Die C-3-Hydroxylgruppe im Ring A ist eine der Hauptlokalisationen für chemische Modifikationen wie Acetylierung, Glykosylierung und Kopplung von Amin- oder Carbamatgruppen, aromatischer Hydrazine bzw. Bildung von Anhydriden zur Verbesserung der Löslichkeit und Zytotoxizität. Die Carbonsäure am C-28 erscheint essentiell für die zytotoxische Wirkung zu sein. Die Kopplung von Aminosäuren oder polaren Gruppen wie Amine, Carbonsäuren, Hydroxylgruppen an C-28 oder ebenfalls die Bildung von Anhydriden erhöhten die Löslichkeit und Zytotoxizität. Die antitumorale Aktivität und Selektivität der jeweils an C-3 oder C-28 veränderten Derivate schwankt stark in Abhängigkeit von den chemischen Veränderungen. Generell wurde beobachtet, dass eine erhöhte Löslichkeit oder verbesserte Aufnahme in die Zelle zu einer erhöhten Zytotoxizität führt, während zu große Anhänge an C-3 oder C-28 zu einer Abnahme der Zytotoxizität führen [67, 81, 83–96].

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten BA-Derivat DE9B wurde BA am C-28 mittels eines Ethylendiamin mit zwei freien hydrophilen Aminogruppen modifiziert, welche dieses BA-Derivat als einen geeigneten Chelatliganden zur Koordination eines Platinions charakterisieren (Abb. 5 links). Beim BA-Derivat APC wurde zusätzlich an das Ethylendiamin durch die Umsetzung mit Kaliumtetrachloridoplatinat(II) zusätzlich das weit verbreitete

Chemotherapeutikum DDP gekoppelt (Abb. 5 rechts). So sind zwei bioaktive Moleküle in einer Substanz verbunden [97].



**Abbildung 5 Chemische Struktur von DE9B (rechts) und APC (links)**

Dargestellt sind die chemischen Strukturformeln von DE9B (3-O-Acetyl-28-betulinsäure(2-(2-aminoethyl)aminoethyl)amid); MW: 583,90 g/mol und APC ( $\kappa N', N''$ -(3-O-Acetyl-28-betulinsäure(2-(2-aminoethyl)aminoethyl)-amid) dichlorido-platin(II));

Kombinationstherapien gehören zu den typischen Strategien in der heutigen Tumorthherapie. Mehrere Chemotherapeutika mit verschiedenen Wirkmechanismen oder Chemo- und Strahlentherapie werden gleichzeitig oder kurz hintereinander verabreicht, um synergistische bzw. additive Effekte zu erzielen oder Resistenzen bzw. Resistenzentstehung zu vermeiden [21]. Allerdings müssen die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Einzelsubstanzen beachtet werden. So spielen bspw. die Halbwertszeit und Eliminationszeit, aber auch das Verteilungsvolumen und die metabolische Stabilität eine wichtige Rolle. Ebenso ist zu berücksichtigen welche Wirkstoffmenge nach welcher Zeit über welchen Weg in die Zelle gelangt [97]. Die Synthese von Medikamenten, die zwei Wirkstoffe kovalent miteinander verbinden, verändern also nicht nur die Wirkung, sondern auch die pharmakologischen Eigenschaften der Einzelsubstanzen [98]. BA und DDP sind bekannte Apoptoseauslöser, die über unterschiedliche Mechanismen wirken. BA löst den mitochondrialen Signalweg über die direkte Veränderung des Mitochondrienmembranpotentials aus (siehe 1.5.3). DDP hingegen bildet DNA-Addukte, die zu einer Inhibierung der DNA-Replikation führen (siehe 1.4). Sowohl BA als auch DDP besitzen negative Eigenschaften, die limitierend für eine klinische Anwendung sind. Durch die schlechte Löslichkeit von BA ergeben sich Probleme bezüglich der Applizier- und Bioverfügbarkeit. DDP als Schwermetallkomplex verursacht bei einer Therapie eine Reihe von schwerwiegenden Nebenwirkungen. Außerdem ist bekannt, dass einige Tumorentitäten resistent gegenüber einer DDP-Behandlung sind [44]. Durch die Kopplung beider Substanzen in einem Molekül soll die Löslichkeit der BA verbessert, die DDP-Resistenz durchbrochen und durch die Selektivität der zytotoxischen Wirkungen die unerwünschten Nebenwirkungen umgangen werden.

## 2 Zielstellung

GBM ist ein hochmaligner, stark invasiv wachsender Tumor mit häufig auftretenden hypoxischen Tumorarealen aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität und Proliferation. Auf der Suche nach einer effizienten und nebenwirkungsarmen Therapiestrategie für GBM wurde der natürlich vorkommende Apoptoseauslöser und *hypoxic sensitizer* BA modifiziert bzw. mit dem bewährten Chemotherapeutikum DDP gekoppelt, um einerseits die vorteilhaften Effekte von BA und DDP auszunutzen und gleichzeitig deren nachteiligen Eigenschaften, wie die begrenzte Löslichkeit von BA und die geringe Effektivität von DDP unter Hypoxie, zu verbessern. Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Wirksamkeit dieser synthetisierten BA-Derivate APC und DE9B.

Dabei wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Analyse der Zytotoxizität der Substanzen BA, DDP, APC und DE9B in den GBM-Zelllinien U251MG, LN229, U343MG mittels SRB-Assay unter Normoxie und Hypoxie.
2. Proliferations- und Zellzyklusanalysen nach Inkubation mit den Substanzen BA, DDP, APC und DE9B in den Zelllinien U251MG und LN229 unter Normoxie und Hypoxie.
3. Analyse der Apoptose- und Nekroserate nach Inkubation mit den Substanzen BA, DDP, APC und DE9B in den Zelllinien U251MG und LN229 unter Normoxie und Hypoxie.
4. Analyse der Effekte auf den Proteingehalt von PARP und HIF-1 $\alpha$ , die Migration, das klonogene Zellüberleben und die Strahlensensitivität nach Inkubation mit den Substanzen APC und DE9B in der Zelllinien U251MG unter Normoxie und Hypoxie.

Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit soll diskutiert werden, ob die neu synthetisierten BA-Derivate APC und DE9B für weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine angewandte Tumortherapie geeignet sind.

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden drei humane GBM-Zelllinien (Tab. 2) verwendet. Die Kultivierung der Zelllinien sowie die Durchführung der Experimente erfolgten in den Zellkulturlaboren der Arbeitsgruppe „Molekulare Strahlenbiologie“ der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Die Zelllinie LN229 stammt von Annie-Claire Diserens aus dem Labor für Tumorbilogie und Genetik (Lausanne, Schweiz). Die Zelllinie U251MG wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, USA) bezogen. Die Zelllinie U343MG stammt vom CLS-Cell Lines Service (Eppelheim, Deutschland).

**Tabelle 2 verwendete Zelllinien**

| Name   | Ursprung                  | Kennzeichnung       |
|--------|---------------------------|---------------------|
| LN229  | <i>Homo sapiens</i> , GBM | ATCC® Nr. CRL-2611™ |
| U251MG | <i>Homo sapiens</i> , GBM | ATCC® Nr. HTB-17™   |
| U343MG | <i>Homo sapiens</i> , GBM | DSMZ Nr. ACC 408    |

#### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

|                    |                         |
|--------------------|-------------------------|
| 2-Mecaptoethanol   | Roth (Karlsruhe)        |
| Ampicillin         | Roth (Karlsruhe)        |
| APC                | BioSolutions Halle GmbH |
| BA                 | BioSolutions Halle GmbH |
| BD Clean™ Solution | BD (California, USA)    |
| BD Flow™ Solution  | BD (California, USA)    |
| BD Rinse™ Solution | BD (California, USA)    |
| CaCl <sub>2</sub>  | Roth (Karlsruhe)        |

|   |  |
|---|--|
| Cisplatin (DDP)                             | BioSolutions Halle GmbH                    |
| DAPI  | Serva (Heidelberg)                         |
| DE9B  | BioSolutions Halle GmbH                    |
| Desoxycholat                                | Sigma (Steinheim)                          |
| DMF   | Sigma (Steinheim)                          |
| EDTA  | Roth (Karlsruhe)                           |
| EGTA  | Roth (Karlsruhe)                           |
| Entwickler                                  | Nordenta (Hamburg)                         |
| Essigsäure (99 %)                           | Merck (Darmstadt)                          |
| Ethanol (99,8 %)                            | Sigma (Steinheim)                          |
| Fetales Kälberserum                         | PAA (Cölbe)                                |
| Fixierer                                    | Nordenta (Hamburg)                         |
| Formaldehyd                                 | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| Giemsa-Lösung                               | Sigma (Steinheim)                          |
| Halt™ Phosphatase Inhibitor <i>Cocktail</i> | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| LDS-Probenpuffer                            | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| Magermilchpulver                            | Saliter (Obergünzburg)                     |
| MES <i>Running Buffer</i> (20x)             | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| Methanol (100 % p.a.)                       | Sigma (Steinheim)                          |
| NaCl  | Roth (Karlsruhe)                           |
| Natriumpyruvat                              | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |

|  |  |
|--|--|
| PageRuler™ <i>Prestained Protein Ladder Plus</i> | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| PBS  | Lonza (Walkersville, USA)                  |
| Penicillin/Streptomycin                          | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| Propidiumiodid                                   | Sigma (Steinheim)                          |
| Protease-Inhibitor-Cocktail                      | Sigma (Steinheim)                          |
| RNase  | Sigma (Steinheim)                          |
| RPMI 1640 (mit 25 nM HEPES und L-Glutamin)       | Lonza (Walkersville, USA)                  |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS)                        | Serva (Heidelberg)                         |
| Sulforhodamin B (SRB)                            | Sigma (Steinheim)                          |
| Transferpuffer 20x                               | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| Trichloressigsäure                               | Roth (Karlsruhe)                           |
| TRIS (20 M)                                      | Roth (Karlsruhe)                           |
| TRIS-HCL (50 mM)                                 | Roth (Karlsruhe)                           |
| Triton® X-100                                    | Serva (Heidelberg)                         |
| Trypanblau                                       | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| Trypsin-EDTA                                     | Thermo Fisher Scientific<br>(Waltham, USA) |
| Tween® 20  | Serva (Heidelberg)                         |
| <br>   |  |
| 3.1.3 Kits                                       |  |
| Bio-Rad Protein-Assay (Bradford Reagenz)         | Biorad (Richmond, USA)                     |
| Caspase-Glo® 3/7-Assay System                    | Promega (Heidelberg)                       |

|                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| ECL™ Western Blotting Reagenz       | GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) |
| ECL Plus™ Westen Blotting Reagenz   | GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) |
| ECL Prime™ Westen Blotting Reagenz  | GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) |
| Venor GeM Mykoplasmen-Detektionskit | Minerva Biolabs GmbH (Berlin)       |

### 3.1.4 Antikörper

**Tabelle 3 Primär- und Sekundärantikörper**

| Antigen            | Verdünnung    | Ursprungsspezies | Hersteller           |
|--------------------|---------------|------------------|----------------------|
| β-Aktin            | 1:5000        | Maus             | Sigma                |
| Gespaltene PARP    | 1:1000        | Kaninchen        | Cell Signaling       |
| HIF-1α             | 1:2000        | Maus             | BD Transduktion Lab. |
| Anti-Kaninchen IgG | 1:1000-1:2000 | Ziege            | DAKO                 |
| Anti-Maus IgM      | 1:1000-1:5000 | Kaninchen        | DAKO                 |

### 3.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

#### *Zellkultivierung*

|                            |                               |
|----------------------------|-------------------------------|
| Kulturmedium RPMI komplett | 500 ml RPMI 1640              |
|                            | 50 ml FKS                     |
|                            | 10 ml Penicillin/Streptomycin |
|                            | 5 ml Natriumpyruvat           |
| Gefriermedium              | 50 ml RPMI komplett           |
|                            | 30 ml FKS                     |
|                            | 20 % DMF (frisch hinzugeben)  |

*SRB-Assay*

|                  |                            |
|------------------|----------------------------|
| Fixierungslösung | 10 %ige Trichloressigsäure |
| Färbelösung      | 0,23 g Sulforhodamin B     |
|                  | 50 ml 1 %ige Essigsäure    |
| Waschlösung      | 1 %ige Essigsäure          |
| TRIS             | 20 mM TRIS 1,21 g          |
|                  | → add. 500 ml Aqua bidest. |

*Proteinisolation*

|                  |                             |
|------------------|-----------------------------|
| RIPA-Stammlösung | 50 mM (pH 7,4) TRIS-HCL     |
|                  | 200 mM NaCl                 |
|                  | 1 mM EDTA                   |
|                  | 1 mM EGTA                   |
|                  | 1 % Triton X-100            |
|                  | 0,25 % Desoxycholat         |
| RIPA-Lysepuffer  | 1:10 RIPA-Stammlösung       |
|                  | 1:100 Phosphatase-Inhibitor |
|                  | 1:100 Proteinase-Inhibitor  |

*Westernblot*

|                   |                            |
|-------------------|----------------------------|
| 1x MES-Laufpuffer | 50 ml MES Puffer (20x)     |
|                   | 950 µl Aqua bidest.        |
| 1x Transferpuffer | 50 ml Transferpuffer (20x) |
|                   | 100 ml Methanol            |
|                   | 850 ml Aqua bidest.        |
| 10x TBS           | 100 ml 5 M NaCl            |
|                   | 300 ml 1 M TRIS (pH 8,0)   |

|                                   |                           |
|-----------------------------------|---------------------------|
|                                   | 600 ml Aqua bidest.       |
| 1x TBS                            | 50 ml 10x TBS             |
|                                   | 450 ml Aqua bidest.       |
| 1x TBST                           | 50 ml 10x TBS             |
|                                   | 450 ml Aqua bidest.       |
|                                   | 500 µl Tween® 20          |
| Blockierungsreagenz               | 1x TBST                   |
|                                   | 10 % Magermilchpulver     |
| Entwicklerlösung                  | 80 g Entwickler           |
|                                   | 500 ml Aqua bidest.       |
| Fixierlösung                      | 100 ml Fixiererkonzentrat |
|                                   | 300 ml Aqua bidest.       |
| Strippingpuffer                   | 2 ml SDS (20 %)           |
|                                   | 2 ml TRIS-HCL             |
|                                   | 16 ml Aqua bidest.        |
|                                   | 150 µl 2-Mecaptoethanol   |
| <i>Zellzyklusanalyse</i>          |                           |
| Propidiumiodid-Puffer (PI-Puffer) | 1 µg/ml Natrium-Citrat    |
|                                   | 10 µl 500 mM Natrium-EDTA |
|                                   | 50 µg/ml Propidiumiodid   |
|                                   | 40-100 µg/ml RNase        |
|                                   | → add. 50 ml PBS          |

*Morphologische Analyse*

|                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| Propidiumiodid-Färbelösung | 6 µl 0,1 % Triton X-100    |
|                            | 1,2 µl 0,1 mM Natrium-EDTA |
|                            | 50 µg/ml Propidiumiodid    |
|                            | 50 µg/ml RNase             |
|                            | → add. 5675 µl PBS         |

## 3.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

|   |  |
|---|--|
| Adventurer™ (Analysenwaage)   | Ohaus (Parsippany, USA)                |
| Aeroclip®   | Merck (Darmstadt)                      |
| Anaerocult® P (Gaspacks)  | Merck (Darmstadt)                      |
| Anaerotest®   | Merck (Darmstadt)                      |
| BD FACS-Calibur flow cytometer  | BD (California, USA)                   |
| BZ-8000 Fluoreszenzmikroskop  | Keyence (Osaka, Japan)                 |
| Coulter Z2 Zell und Partikelzähler  | Beckman Coulter (Brea, USA)            |
| Countness™ Automated Cell Counter   | Invitrogen (Carlsbad)                  |
| Einweghandschuhe  | Meditrade (Kiefersfelden)              |
| Einwegartikel für Zellkultur<br>(Gewebekulturflaschen, Well-Platten,<br>Pipettenspitzen, Zentrifugationsröhrchen) | Greiner (Frickenhausen)                |
| FACScan Durchflusszytometer   | Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) |
| Gefrierbehälter   | Nalgene (Hereford, UK)                 |
| Inverses Fluoreszenzmikroskop HBO50/AC  | Zeiss (Jena)                           |
| Inverses Labormikroskop Axiovert 25   | Carl Zeiss AG (Oberkochen)             |
| Inkubator Heracell 150i   | Heraeus (Hanau)                        |
| Isoton II (Puffer für Z2)   | Beckman Coulter (Krefeld)              |

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Labsonic 2000U                         | B. Braun (Melsungen)                 |
| Laminarbox                             | Heraeus (Hanau)                      |
| Linearbeschleuniger ONCOR™             | Siemens (Erlangen)                   |
| Magnetrührer                           | IKA-Labortechnik (Staufen)           |
| Magnetrührstäbchen                     | Merck (Darmstadt)                    |
| Messzylinder                           | Merck (Darmstadt)                    |
| Mikropipetten                          | Eppendorf (Hamburg)                  |
| Pipetboy                               | Bioscience (Fernwald)                |
| Polyacrylamid-Gradientengel (4-12 %)   | Invitrogen (Karlsruhe)               |
| PVDF-Membran (0,45 µm)                 | Millipore (Schwalbach)               |
| Reaktionsgefäße                        | Eppendorf (Hamburg)                  |
| Rollenmischgerät RM 5                  | Karl Hecht KG (Sondheim)             |
| Röntgenfilm Biomax MR                  | Kodak (Stuttgart)                    |
| Röntgenfilmentwickler                  | Kodak (Stuttgart)                    |
| Röntgenfilmfixierer                    | Kodak (Stuttgart)                    |
| Smart Spec™ 300 (Photometer)           | Biorad (Richmond, USA)               |
| Sterile Syringe Filter                 | VWR (San Francisco, USA)             |
| Sterile Syringe 5 ml Spritze           | BD (New Jersey, USA)                 |
| Sterilcan® einmal Injektionskanüle     | BRAUN (Melsungen)                    |
| Tecan GENios Plattenreader             | TECAN (Männedorf, Schweiz)           |
| Thermomixer MR3001                     | Heidolph (Schwabach)                 |
| Trans-Blot® Cell                       | Biorad (Richmond, USA)               |
| Vortex-Genie® 2                        | Scientific industries inc. (Staufen) |
| Wasserbad                              | GFL (Burgwedel)                      |
| XCell Sure lock™ (Elektrophoresegerät) | Invitrogen (Karlsruhe)               |

Zentrifuge 5415R

Eppendorf (Hamburg)

Zentrifuge Universal 32R

Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Pharmakologische Behandlung

Die Substanzen BA, APC, DE9B sowie DDP wurden von Herr Prof. Paschke (Bio Solutions Halle GmbH) als kristallines Pulver zur Verfügung gestellt. Die Substanzen wurden für die Anwendung abgewogen, mittels DMF in Lösung gebracht und anschließend mit 0,2 µm Sterilfilter (VWR, USA) filtriert. Diese Stammlösungen mit einer Konzentration von jeweils 10 mM wurden bei 4 °C gelagert.

### 3.2.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung der adhärent wachsenden GBM-Zelllinien LN229, U251MG und U343MG erfolgte bei 37 °C, 3 % CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchte im RPMI 1640 Kulturmedium mit 10 % FKS, 1 % Pyruvat, 185 U/ml Penicillin und 185 µg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden in sterilen Kulturflaschen kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde in Abhängigkeit von der Zelldichte der adhärennten Monolayer alle 1-3 Tage vorgenommen. Die Passagierung erfolgte bei Erreichen einer 80 %igen Konfluenz durch Absaugen des Mediums, Waschen der Zellen mit PBS und anschließenden Ablösen mit 2 ml 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung. Diese Reaktion wurde nach einer Inkubation von 5 min bei 37 °C durch Zugabe von 5 ml FKS-haltigem Kulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Abhängigkeit von dessen Größe in 3-6 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt und eine definierte Zellzahl inokuliert.

Zur Kryokonservierung wurde das Zellpellet in 2 ml Gefriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend erfolgte für 24 h eine Lagerung bei -80 °C. Für die Langzeitlagerung wurde flüssiger Stickstoff verwendet.

Für das Auftauen der Zellen wurden die Gefrieröhrchen im Wasserbad bei 37 °C kurzzeitig erwärmt, um die Zellen in 4 ml Kulturmedium zu überführen und für 5 min bei

800 rpm zu zentrifugieren. Das entstandene Zellpellet wurde mit 5 ml Medium gewaschen, erneut zentrifugiert für 5 min bei 800 rpm und die Zellen mit frischem Medium in sterile Kulturflaschen inokuliert.

Zur hypoxischen Kultivierung wurden die Zellen 24 h in geeigneten Kulturgefäßen unter Normoxie kultiviert und anschließend mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Das Anlegen von Hypoxie erfolgte nach der Zugabe der Substanzen mittels eines Gasgeneratorsystems (Anaerocult® P, Merck), welches ein hypoxisches Milieu von 0,1 % O<sub>2</sub> erzeugt. Dazu wurden die Kulturgefäße in einen Spezialinkubationsbeutel eingesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 8 ml Aqua dest. eingeleitet. Zur Kontrolle wurde ein methylenblauer Indikatorstreifen mit Wasser befeuchtet und zusätzlich in den Hypoxiebeutel gegeben, welcher anschließend durch einen Anaeroclip® luftdicht verschlossen worden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 24 h, 48 h bzw. 72 h bei 37 °C, 3 % CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchte.

Die Zellzahl wurde mittels des Zellzählgerätes *Z2 Beckman-Coulter* ermittelt. Dazu wurde aus der Zellsuspension ein 100 µl Aliquot entnommen und 1:100 mit TBST verdünnt. In diese Lösung wurde anschließend die Glaskapillare des Gerätes herabgesenkt und der Messvorgang gestartet. Dabei wurden alle Partikel zwischen 10-37 µm Durchmesser detektiert. Die Bestimmung der Zellzahl der Ausgangssuspension erfolgte mit Hilfe eines programmierten Verdünnungsfaktors.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig mittels Venor GeM Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva Biolabs GmbH) einer PCR-Analyse unterzogen. Beim Nachweis einer Mykoplasmeninfektion wurden die Zellen verworfen.

### 3.2.3 Zytotoxizitätsassay

Die Zytotoxizität wurde mittels SRB-Assay bestimmt. Sulforhodamin B ist ein anionischer Farbstoff, der in Abhängigkeit des pH-Wertes an zelluläre Proteine bindet. Der Gesamtproteingehalt korreliert mit der Zellzahl.

Es wurde eine zuvor experimentell ermittelte optimale Zellzahl in die 96-Well-Platte inokuliert und in 200 µl Medium für 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit den jeweiligen Substanzen (BA, APC, DE9B, DDP). Zusätzlich wurden auf jeder 96-Well-Platte Zellen mit Kulturmedium sowie mit dem Lösungsmittel DMF versetzt und dienten als Kontrollen. Nach einer Inkubationsphase von 72 h wurde der Assay abgestoppt. Dabei wurden die Zellen nach Verwerfen des Mediums mit 200 µl eiskalter

10 %iger Trichloressigsäure für 1 h bei 4 °C fixiert. Im Anschluss wurden die Platten fünfmal in eiskaltes Wasser getaucht und ausgeklopft. Das Anfärben der Zellproteine erfolgte mit 100 µl einer 4,4 %igen SRB-Lösung pro Well für 10 min bei RT. Nachdem die Zellen mit einer 1 %igen Essigsäure gewaschen wurden, trockneten die 96-Well-Platten über Nacht bei RT. Für die anschließende Messung wurde der proteingebundene Farbstoff in 300 µl 10 mM TRIS-Base-Lösung gelöst und die Absorption bei 540 nm mit Hilfe eines Plattenreaders bestimmt.

### 3.2.4 Zellzyklusanalyse

Es wurde eine definierte Zellzahl inokuliert und nach 24 h Kultivierung mit den jeweiligen Substanzen (BA, APC, DE9B, DDP) versetzt. Nach einer 48 h Inkubation wurden die trypsinierten Zellen zentrifugiert, in PBS resuspendiert und mit 95 % Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden zentrifugiert (1300 rpm, 5 min) und das entstandene Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Nach drei Wiederholungen dieser Arbeitsschritte wurden die Zellkerne durch Inkubation mit Propidiumiodid-(PI)-Puffer (10 min, 37 °C) gefärbt. Die Analyse des DNA-Gehalts der PI-gefärbten Zellen wurde mit einem *Becton Dickinson FACScan* Durchflusszytometer durchgeführt. Anhand der erhaltenen Daten wurde mit Hilfe des Programms *ModFit* (Verity Software) die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen analysiert.

### 3.2.5 Proliferations- und Nekroseanalyse

Es wurde eine definierte Zellzahl inokuliert und nach 24 h Kultivierung mit den jeweiligen Substanzen (BA, APC, DE9B, DDP) versetzt. Nach einer 24 h, 48 h bzw. 72 h Inkubation wurden der Kulturüberstand zusammen mit den abtrypsinierten Zellen zentrifugiert und das entstandene Pellet in Medium resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl Trypanblau zu jeweils 10 µl Aliquot der Zellsuspension pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Der polyanionische Azofarbstoff dringt in tote, perforierte Zellen ein und färbt diese dunkelblau. Vitale Zellen mit einer intakten Zellmembran nehmen den Farbstoff nicht auf. Aufgrund der Zytotoxizität des Farbstoffes wurde darauf geachtet, dass bis zur Analyse nur eine kurze Einwirkzeit verging. Mittels des Zellzählgerätes *Countess™ Automated Cell Counter* wurden Zellzahl (Lebend-, Tot- und Gesamtzahl) und Zellviabilität gemessen. Dabei wurden alle Zellen zwischen 5 – 60 µm Durchmesser detektiert. Die Bestimmung der Zellzahl der Ausgangssuspension erfolgte mit Hilfe eines programmierten

Verdünnungsfaktors. Anhand der Lebendzellzahl über die Inkubationsdauer konnten zudem Rückschlüsse auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen unter der Behandlung mit den jeweiligen Substanzen gezogen werden.

### 3.2.6 Apoptoseanalyse

#### *Caspase-3/7-Assay*

Es wurde eine definierte Zellzahl inokuliert und nach 24 h Kultivierung mit den jeweiligen Substanzen (BA, APC, DE9B, DDP) versetzt. Nach einer 24 h, 48 h bzw. 72 h Inkubation wurden der Zellkulturüberstand zusammen mit den trypsinierten Zellen zentrifugiert, das entstandene Pellet in Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde von jeder Probe eine Verdünnung hergestellt, sodass jeweils 100 µl mit 20.000 Zellen in eine 96-Well-Platte überführt und nachfolgend mit 100 µl *Caspase-Glo®-3/7-Reagent* versetzt werden konnte. Als Negativkontrolle diente ein mit 100 µl RPMI und 100 µl *Caspase-Glo®-3/7-Reagent* befülltes Well. Nach Mischen beider Lösungen in der 96-Well-Platte (30 sek, 600 rpm) und einer Inkubationszeit von 1,5 h bei RT im Dunklen, erfolgte die Bestimmung der Lumineszenz mit Hilfe eines Tecan-Plattenreaders. Der Wert der Negativkontrolle wurde von den Messwerten aller Proben subtrahiert.

#### *Propidiumiodid Färbung*

Es wurde eine definierte Zellzahl in die Kammern von *chamber slides* inokuliert und nach 24 h Kultivierung mit den jeweiligen Substanzen (BA, APC, DE9B, DDP) versetzt. Nach einer 48 h bzw. 72 h Inkubation erfolgte ein Waschschritt mit PBS, die Fixierung mittels Formaldehyd (15 min bei RT) und erneutes Waschen mit PBS (2x). Anschließend wurden die Zellen in frischem PBS bei 4 °C über Nacht gelagert. Nach der Inkubation mit der PI-Färbelösung für 2 min, wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, die Kammern auf den Objektträgern entfernt und mit Hilfe von Glycerol durch ein Deckgläschen ersetzt. Die morphologische Analyse der Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

### 3.2.7 Migrations-Analyse

Für die Bestimmung der Migration der GBM-Zellen mittels *Scratch-Assay* (Wundheilungssassay) wurde eine definierte Zellzahl in eine 24-Well-Platte inokuliert, um nach 24 h Kultivierung eine ca. 90 %ige Konfluenz zu erreichen. Mit einer 200 µl Pipettenspitze

wurde horizontal und vertikal in Form eines Kreuzes ein zellfreier Raum geschaffen. Abgeschwommene Zellen wurden durch Waschschr tte mit PBS entfernt. Direkt nach der Inkubation mit den Substanzen APC und DE9B erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-8000 eine Bildaufnahme des zellfreien Rasens. 18 h später wurde die Bilddokumentation wiederholt und die Gr o e der abgebildeten Flächen mit Hilfe der Software Adobe Photoshop CS5 ermittelt. Die relative Migrationsrate wurde aus der Änderung der Fläche des initialen (t=0 h) und des finalen (t=18 h) zellfreien Rasens errechnet.

### 3.2.8 Bestrahlungsexperimente

Es wurde eine definierte Zellzahl der Zelllinie U251MG in Zellkulturflaschen inokuliert und nach 24 h Kultivierung mit den Substanzen APC und DE9B versetzt. Nach einer 24 h Inkubation wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen mit Dosen von 2 Gy, 6 Gy bzw. 15 Gy an einem Linearbeschleuniger (Oncor Impression IMPRT+; 6-15 MV Dosisleistung; 2 Gy/min, Siemens) bestrahlt. Nach einer einstündigen Kultivierung bei 37  C, 3 % CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchte, wurden die Zellen trypsiniert, zusammen mit dem Kulturüberstand zentrifugiert und für die Zellzahlbestimmung resuspendiert. Anschließend wurde eine zuvor experimentell bestimmte optimale Zellzahl in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen inokuliert und in Abhängigkeit von der Proliferationsrate der Zelllinie für 10-14 Tage bei 37  C, 3 % CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchte kultiviert. Das Abstoppen des Tests erfolgte, wenn sich makroskopisch sichtbare Kolonien gebildet hatten. Hierbei wurde das Medium verworfen und die Zellen mittels 3,7 %iger Formaldehydlösung für 20 min fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Aqua dest. gespült und für 20 min mit 10 %iger Giemsa-Lösung gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit Aqua dest. entfernt und die Zellkolonien luftgetrocknet. Es wurden alle Kolonien bestehend aus mindestens 50 Zellen ausgezählt und die Anzahl der behandelten bzw. bestrahlten Proben im Bezug zur mitgeführten DMF-Kontrolle ausgewertet. Dieser Quotient aus Kolonieanzahl nach Behandlung bzw. Bestrahlung und Kolonieanzahl ohne Behandlung bzw. Bestrahlung ergibt die relative Plattiereffizienz, die den Einfluss der Behandlung bzw. Bestrahlung auf das Langzeitüberleben der Zellen darstellt. Jeder Klonogenitätsassay erfolgte als Doppelbestimmung.

Aus den Dosis-Überlebens-Kurven lässt sich mittels des Dosis-modifizierenden Faktors 10 (DMF 10) eine Modulation der Bestrahlung durch die Behandlung ermitteln. Der DMF 10 zeigt an, wie stark eine Behandlung die Radiosensitivität beeinflusst, um die relative Plattiereffizienz einer Zelllinie auf 10 % abzusenken. Die Bestimmung des

DMF 10 aus den relativen Überlebensfraktionen erfolgte mit Hilfe eines linear quadratischen-Modells [ $SF = \exp(-(\alpha D + \beta D^2))$ ]. Dabei spricht ein DMF > 1 für eine Radiosensitivierung und ein DMF < 1 hingegen für eine Radioprotektion. Kein Einfluss auf die Radiosensitivität liegt bei einem DMF = 1 vor.

### 3.2.9 Westernblotanalyse

#### *Proteinisolation aus Zellkulturen mittels RIPA-Lysepuffer*

Es wurde eine definierte Zellzahl in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen inokuliert und nach 24 h Kultivierung mit den jeweiligen Substanzen (BA, APC, DE9B, DDP) versetzt. Nach einer 48 h Inkubation wurden der Kulturüberstand in 15 ml Zentrifugationsröhrchen auf Eis überführt, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gespült und in den Kulturflaschen ebenfalls auf Eis gelagert. Anschließend wurde ein drittes Mal eiskaltes PBS in die Kulturflaschen gegeben und die adhärennten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und zu dem Kulturüberstand in das 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min), wurde der Überstand sorgfältig abgesaugt und die Proben bis zur Proteinisolation bei -20 °C aufbewahrt. Zur Aufarbeitung wurde 50-100 µL RIPA-Lysepuffer hinzugegeben, das Pellet durch kräftiges Mischen gelöst und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall (Labsonic 2000 U) für 10 sek bei 4 °C homogenisiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10.000 rpm, 8 min, 4 °C) abgetrennt. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### *Quantifizierung des Proteingehaltes und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese*

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradfordmethode wurden 2 µl der einzelnen Zelllysatsproben mit 998 µl der Färbelösung (20 % Bradford-Reagenz, 80 % Aqua bidest.) für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion photometrisch bei 595 nm bestimmt und gegen einen Blindwert (Bradford-Reagenz) abgeglichen. Die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte mittels einer Eichkurve aus den gemessenen Absorptionswerten. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden 4-12 %igen Bis-TRIS-Gradientengele (Invitrogen) verwendet. Von jeder Probe wurden 60 µg Protein mit 2 µL Denaturierungspuffer und 6 µL Laufpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und in die Gelladetaschen aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MES-Puffer. Zusätzlich wurden 5 µl des Proteinmolekulargewichtsstandards

*PageRuler™ Prestained Protein Ladder* zur Größenbestimmung mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 180 V, 120 mA und 4 °C für 75 min.

#### *Transfer und Immundetektion*

Anschließend erfolgte die Übertragung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran via Tank-Blot-Verfahren mittels einer Mini Trans-Blot® Cell (Bio-rad). Die Membran wurde zuvor durch kurzes Schwenken in Methanol aktiviert. Anschließend wurde die Membran, die Schwämme und Filterpapiere in 1x Transferpuffer eingelegt und dann blasenfrei in die Tank-Blot-Kassette eingebaut. Der Transfer erfolgte in 1x Transferpuffer für 2,5 h bei 150 V, 260 mA und 4 °C. Nachfolgend wurde die Membran in 10 %igen Magermilchpulver/TBST Puffer inkubiert (1 h, RT), um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Nachdem die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde, folgten drei Waschschrte mit TBST, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem in 10 ml 10 %iger Milchpulver-TBST-Lösung verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1 h, RT). Anschließend erfolgte erneut das Entfernen ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST. Die Visualisierung erfolgte unter Anwendung der ECL- bzw. ECL-Plus/Prime-Lösung eines photoempfindlichen Röntgenfilms und Röntgenentwickler in der Dunkelkammer. Zur Normalisierung des Proteingehalts der gemessenen Marker diente der  $\beta$ -Aktin-Gehalt.

#### 3.2.10 Statistik

Mittels Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) und Origin 8.0 wurde die statistische Analyse durchgeführt. Um statistische signifikante Unterschiede zwischen dem Mittelwert einer Behandlung und dem Mittelwert der Kontrolle zu bestimmen, wurde der ungepaarte Student's t-Test genutzt. Eine Wahrscheinlichkeit von  $\geq 95\%$  ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ) wurde dabei als signifikant angesehen. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der DMF behandelten Kontrollen angegeben, deren Wert willkürlich auf 100 % festgesetzt wurde. Die DMF-Kontrolle wurde als Referenzkontrolle ausgewählt, um einen direkten Vergleich der Behandlungen zu ermöglichen.

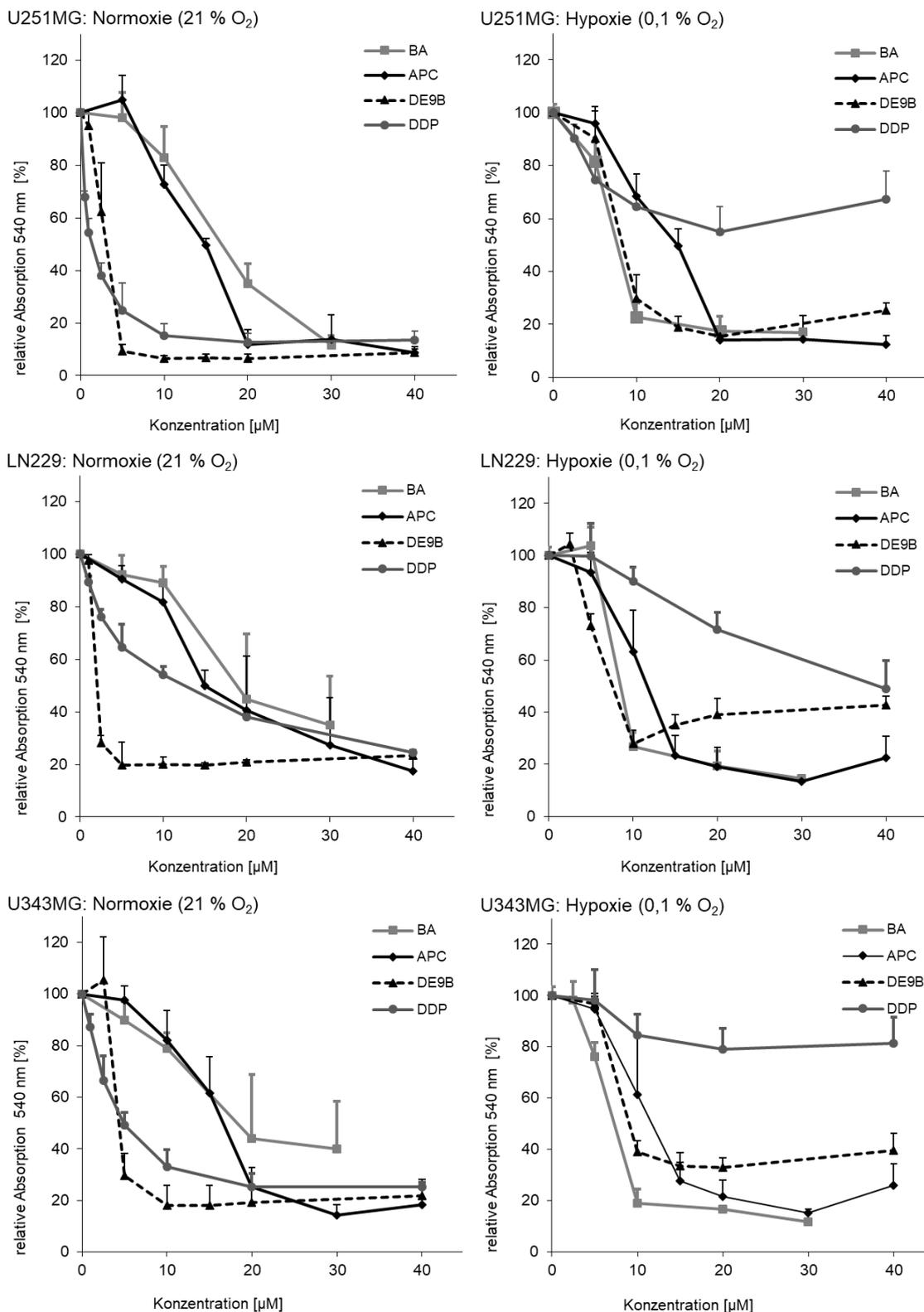
## 4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der zell-, strahlen- und molekularbiologischen Effekte der BA-Derivate APC und DE9B im Vergleich zu BA und DDP in GBM-Zelllinien. Es erfolgte eine Gegenüberstellung der Effekte unter Normoxie und Hypoxie, da BA eine verstärkte Zytotoxizität und Radiosensitivierung unter Hypoxie zeigt [30]. Das Lösungsmittel DMF hatte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen keinen Einfluss auf die GBM-Zellen. Deshalb wurde auf die Darstellung der unbehandelten Kontrollen verzichtet.

### 4.1 Zytotoxizitätsanalyse

Im ersten Teil der Arbeit wurden die zytotoxischen Effekte von BA, APC, DE9B sowie DDP nach einer 72 h Inkubation unter Normoxie und Hypoxie mittels SRB-Assay analysiert (Abb. 6). Die mittleren effektiven Konzentrationen (EC50) wurden ermittelt, um im Hinblick auf die Untersuchungen der Proliferation, der Zellzyklusphasen, der Zelltodmechanismen sowie des Proteingehalt von PARP und HIF-1 $\alpha$  die Wirkmechanismen dieser vier Substanzen vergleichen zu können.

Die zytotoxischen Effekte nach einer 72 h Inkubation sind abhängig von der Konzentration der Substanzen und dem Sauerstoffgehalt während der Inkubation. Die drei untersuchten GBM-Zelllinien reagieren ähnlich auf die Inkubation mit BA bzw. den beiden BA-Derivaten DE9B und APC. Dabei zeigt das Derivat DE9B unter Normoxie die stärksten Effekte und wirkt deutlich effektiver als BA bzw. DDP (EC50: 2,0  $\mu$ M-4,3  $\mu$ M). Auch das Derivat APC (EC50: 15,1  $\mu$ M-17,4  $\mu$ M) wirkt unter Normoxie etwas effektiver als BA (EC50: 6,8  $\mu$ M-20,0  $\mu$ M), jedoch nicht als DDP. Im Gegensatz zu BA und den BA-Derivaten sind nach der DDP-Inkubation unter Normoxie voneinander abweichende EC50 von 1,4  $\mu$ M (U251MG), 4,9  $\mu$ M (U343MG) und 13,6  $\mu$ M (LN229) in den drei untersuchten GBM-Zelllinien zu beobachten (Abb. 6). Unter Hypoxie zeigen die GBM-Zelllinien das sensitivste Ansprechen auf die Behandlung mit BA bzw. DE9B (beide EC50: 6,8  $\mu$ M-9,0  $\mu$ M). Die Zytotoxizität von BA ist unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie um den Faktor 2,2-2,9 verstärkt. Dagegen ist die Zytotoxizität von DE9B unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie geringer (Faktor: 0,3-0,5). Die zytotoxischen Effekte von APC steigen unter Hypoxie ähnlich wie bei BA (EC50: 11,7  $\mu$ M-13,7  $\mu$ M) im Vergleich zu



**Abbildung 6** Relative Absorption der Zelllinien U251MG, LN229 bzw. U343MG nach 72 h-Inkubation mit BA, APC, DE9B bzw. DDP

Dargestellt sind die relativen Absorptionswerte des SRB-Assays in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der jeweiligen Substanzen nach einer Kultivierung unter 21 % bzw. 0,1 % Sauerstoff. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % im Bezug zur DMF-Kontrolle. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und die Standardabweichung berechnet.

Normoxie an (Faktor: 1,1-1,4). DDP dagegen wirkt unter Hypoxie selbst bei hohen Konzentrationen nur schwach zytotoxisch ( $EC_{50} \geq 40 \mu\text{M}$ ) (Abb. 6).

**Tabelle 4  $EC_{50}$  der Zelllinien U251MG, LN229, U343MG nach 72 h Inkubation mit APC, BA, DE9B bzw. DDP**

| <b>EC<sub>50</sub> [<math>\mu\text{M}</math>]</b> | U251MG     |            | LN229      |            | U343MG     |            |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|   | Normoxie   | Hypoxie    | Normoxie   | Hypoxie    | Normoxie   | Hypoxie    |
| APC   | 15,1 ± 3,2 | 13,7 ± 1,5 | 17,4 ± 4,8 | 12,1 ± 1,9 | 16,8 ± 3,9 | 11,7 ± 3,5 |
| BA  | 16,8 ± 1,2 | 7,7 ± 0,5  | 20,0 ± 6,6 | 9,0 ± 3,2  | 19,5 ± 5,7 | 6,8 ± 1,2  |
| DE9B  | 3,2 ± 0,7  | 7,8 ± 0,6  | 2,0 ± 0,0  | 6,8 ± 0,6  | 4,3 ± 0,3  | 9,0 ± 0,5  |
| DDP   | 1,4 ± 0,5  | > 40       | 13,6 ± 0,8 | > 40       | 4,9 ± 1,1  | > 40       |

Mittels dieser Untersuchung wurde analysiert, wie zytotoxisch die jeweiligen Substanzen für die untersuchten GBM-Zelllinien sind. In den folgenden zell- und molekularbiologischen Untersuchungen wurden die  $EC_{50}$  der jeweiligen Substanzen eingesetzt (Tab. 4), um die Auswirkungen von BA, APC, DE9B und DDP auf die Proliferation, Zellzyklusverteilung, Proteingehalt von PARP und HIF-1 $\alpha$  sowie die induzierten Zelltodmechanismen zu untersuchen. Insgesamt weisen APC und BA ähnliche Zytotoxizitäten im SRB-Assay auf, weshalb die weiteren Untersuchungen mit Konzentrationen von 15  $\mu\text{M}$  (Normoxie) bzw. 10  $\mu\text{M}$  (Hypoxie) durchgeführt wurden. Als wirksamste Substanz liegt die  $EC_{50}$  von DE9B im SRB-Assay unter Normoxie bei ca. 3  $\mu\text{M}$ . Initiale Untersuchungen zeigen jedoch kaum quantifizierbare Effekte in den Klonogenitäts-, Proliferations- und Zelltodanalysen (siehe 5.1.3) nach Inkubation mit 3  $\mu\text{M}$  DE9B (Daten nicht gezeigt). In nachfolgend durchgeführter Proliferationsuntersuchung (Daten nicht gezeigt) reduziert DE9B die Proliferation unter Normoxie [5  $\mu\text{M}$ ; 72 h] auf 70,0 % ± 20,2 % bzw. [10  $\mu\text{M}$ ; 72 h] auf 36,9 % ± 14,4 %. Unter Hypoxie reduziert DE9B die Proliferation [5  $\mu\text{M}$ ; 72 h] auf 85,2 % ± 11,4 % bzw. deutlich und vergleichbar zur Normoxie [10  $\mu\text{M}$ ; 72 h] auf 41,4 % ± 5,9 %. Beruhend auf dieser Proliferationsanalyse wurde für DE9B eine Behandlungskonzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  gewählt. Für DDP wurden aufgrund des unterschiedlichen Ansprechens der Zelllinien unter Normoxie (1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) und der Resistenz unter Hypoxie (40  $\mu\text{M}$ ) entsprechend unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt (Tab. 5).

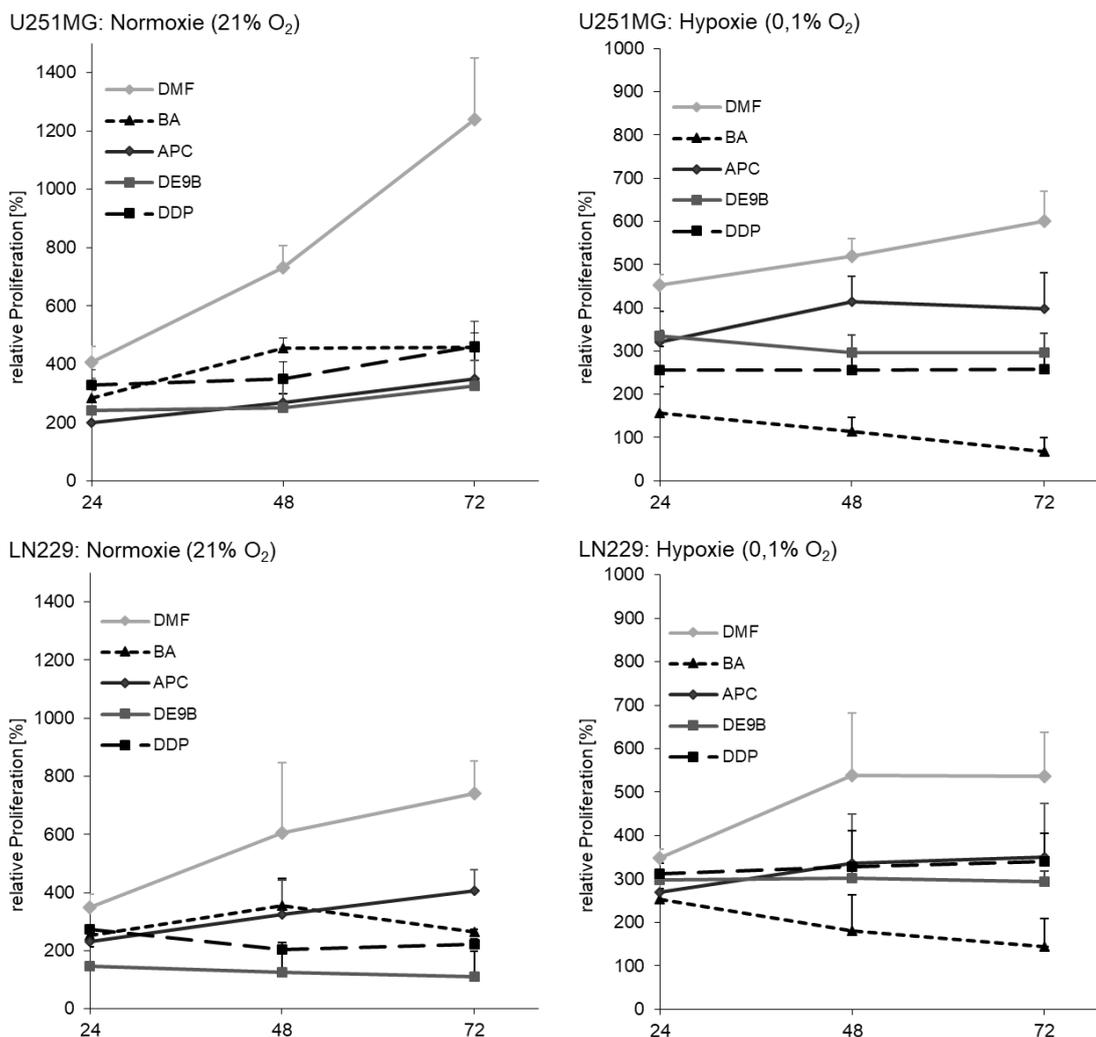
**Tabelle 5 eingesetzte Konzentrationen für die Analyse der Wirkung von APC, BA, DE9B und DDP auf die Zelllinien U251MG bzw. LN229**

| Zelllinie   | U251MG   |         | LN229    |         |
|-------------|----------|---------|----------|---------|
|             | Normoxie | Hypoxie | Normoxie | Hypoxie |
| <b>APC</b>  | 15 µM    | 10 µM   | 15 µM    | 10 µM   |
| <b>BA</b>   | 15 µM    | 10 µM   | 15 µM    | 10 µM   |
| <b>DE9B</b> | 7,5 µM   | 7,5 µM  | 7,5 µM   | 7,5 µM  |
| <b>DDP</b>  | 1 µM     | 40 µM   | 10 µM    | 40 µM   |

## 4.2 Proliferationsanalyse

Um die Auswirkungen von BA, APC, DE9B und DDP in Abhängigkeit von der Zeit und der Sauerstoffkonzentration auf die Proliferation zu bestimmen, wurde die Zahl der vitalen Zellen nach einer Inkubationsdauer von 24 h, 48 h sowie 72 h mit den jeweiligen Substanzen bestimmt (Tab. 5). Dargestellt ist die relative Anzahl der vitalen Zellen bezogen auf die inokulierte Zellzahl (Abb. 7). Unter Normoxie zeigt der steilere Anstieg der Proliferationskurven der DMF behandelten Kontrollzellen, dass die Verdopplungszeit der Zelllinie U251MG deutlich kürzer ist als die der Zelllinie LN229. Unter Hypoxie verlängert sich die Verdopplungszeit in beiden Zelllinien mit steigender Kultivierungsdauer (Gompertz-Kurve), da Hypoxie die Proliferation der Zellen *in vitro* deutlich oder sogar komplett inhibieren kann [26, 20]. Da die Kontrollzellen weniger stark proliferieren als unter Normoxie, fallen die Effekte der Proliferationshemmung unter Hypoxie im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen weniger deutlich aus (Abb. 7).

Die Untersuchung ergab, dass die vier Substanzen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und der Sauerstoffkonzentration die Proliferation der Zellen im Vergleich zu den DMF behandelten Zellen deutlich inhibieren. Bei allen Substanzen ist in den ersten 24 h ein Anstieg der Zellzahl und anschließend (48 h bzw. 72 h) eine reduzierte Proliferationsrate, ein Arrest bzw. eine Abnahme der Zellzahl sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu beobachten (Abb. 7).



**Abbildung 7 relative Zellproliferation der Zelllinien U251MG und LN229 nach 24 h, 48 h, bzw. 72 h Inkubation mit BA, APC, DE9B bzw. DDP**

Dargestellt ist die relative Zellproliferation nach einer Kultivierung unter 21 % bzw. 0,1 % Sauerstoff. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % im Bezug zur inokulierten Zellzahl. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und die Standardabweichung berechnet.

Die Inkubation mit APC führt im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen zu einer deutlichen Proliferationshemmung unter Normoxie in der Zelllinie LN229 (72 h Inkubation: 54,6 % ± 5,7 %) und stärker noch in der Zelllinie U251MG (72 h Inkubation: 28,2 % ± 12,6 %). Unter Hypoxie stagniert die Zellzahl nach 48 h APC-Inkubation in den Zelllinien U251MG und LN229. Verglichen mit BA zeigt APC unter Normoxie eine geringfügig bessere Hemmung der Proliferation in der Zelllinie U251MG und eine schwächere Hemmung in der Zelllinie LN229 sowie eine deutlich geringere Proliferationsinhibierung unter Hypoxie in beiden Zelllinien. Denn die BA-Behandlung bewirkt bis 48 h unter Normoxie eine deutliche Proliferationsverzögerung und anschließend (72 h) einen Arrest (U251MG) bzw. eine Abnahme (LN229) der Zellzahl. Unter Hypoxie inhibiert BA verglichen mit den anderen Substanzen APC, DE9B und DDP die Proliferation am

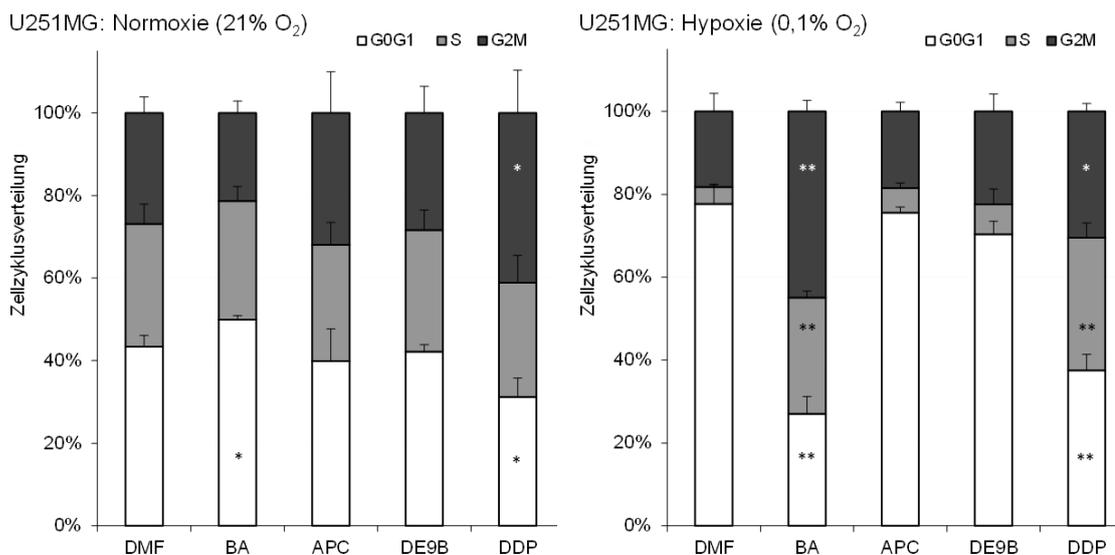
effektivsten und führt bereits nach 48 h Behandlung zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl im Vergleich zum 24 h-Wert (Abb. 7). Auffällig ist, dass BA unter Hypoxie nicht nur effektiver, sondern auch frühzeitiger wirkt. Ähnlich dem SRB-Assay zeigen die Zelllinien U251MG und LN229 nach BA-Inkubation ein stärkeres Ansprechen unter Hypoxie verglichen mit den anderen Substanzen APC, DE9B und DDP. Die Inkubation mit DE9B führt besonders unter Normoxie zu einer starken Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen (72 h Inkubation: 26,3 %  $\pm$  10,4 % [U251MG] bzw. 72 h Inkubation: 15,1 %  $\pm$  9,1 % [LN229]), aber auch unter Hypoxie zeigt DE9B deutliche Effekte und führt zu einem Stagnieren der Zellzahl nach 24 h. DE9B bewirkt unter Normoxie eine stärkere Proliferationshemmung als BA, unter Hypoxie jedoch wirkt BA effektiver. DDP zeigt unter Normoxie und Hypoxie starke Effekte auf beide Zelllinien und führt bereits nach 24 h zu einem Stagnieren der Zellzahl.

### 4.3 Analyse des Zellzyklus mittels Propidiumiodid-Färbung

Da sowohl BA und DDP als auch die Derivate APC und DE9B die Zahl der vitalen Zellen im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen deutlich reduzieren (Abb. 7), wurde mittels Zellzyklusanalyse untersucht, ob ein zellzyklusphasenabhängiger Proliferationsstopp vorliegt (Abb. 8).

Die Zelllinie U251MG wurde mit den Substanzen inkubiert (Tab. 5) und für 48 h unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PI gefärbt, der DNA-Gehalt am Becton Dickinson FACScan Durchflusszytometer gemessen und mit ModFit (Verity Software House, Inc., Topsham, ME) ausgewertet.

Die Untersuchung zeigt, dass Hypoxie im Vergleich zu Normoxie zu einer Akkumulation der DMF behandelten Kontrollzellen in der G1/G0-Phase führt (Abb. 8). Eine 48 h Inkubation mit BA bewirkt unter Normoxie im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen einen geringen Anstieg der Zellen in der G1/G0-Phase (6,6 %  $\pm$  2,6 %). Unter Hypoxie bewirkt BA eine Akkumulation der Zellen in der G2/M- (27,5 %  $\pm$  2,4 %) und S-Phase (24,3 %  $\pm$  1,5 %) im Vergleich zur DMF-Kontrolle. Die Derivate APC und DE9B bewirken weder unter Normoxie noch unter Hypoxie Veränderungen in der Verteilung der Zellen im Zellzyklus. DDP führt unter Normoxie zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase (14,1 %  $\pm$  7,5 %) und unter Hypoxie zu einem Anstieg der Zellen in der G2/M- (13,5 %  $\pm$  3,8 %) und S-Phase (28,0 %  $\pm$  2,9 %) im Vergleich zur DMF-Kontrolle (Abb. 8).



**Abbildung 8 Zellzyklusverteilung der Zelllinie U251MG nach 48 h Inkubation mit BA, APC, DE9B bzw. DDP**

Dargestellt ist der relative Anteil der Zellen in den Zellzyklusphasen bei einer Kultivierung unter 21 % bzw. 0,1 % Sauerstoff. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und die Standardabweichung berechnet. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,001)

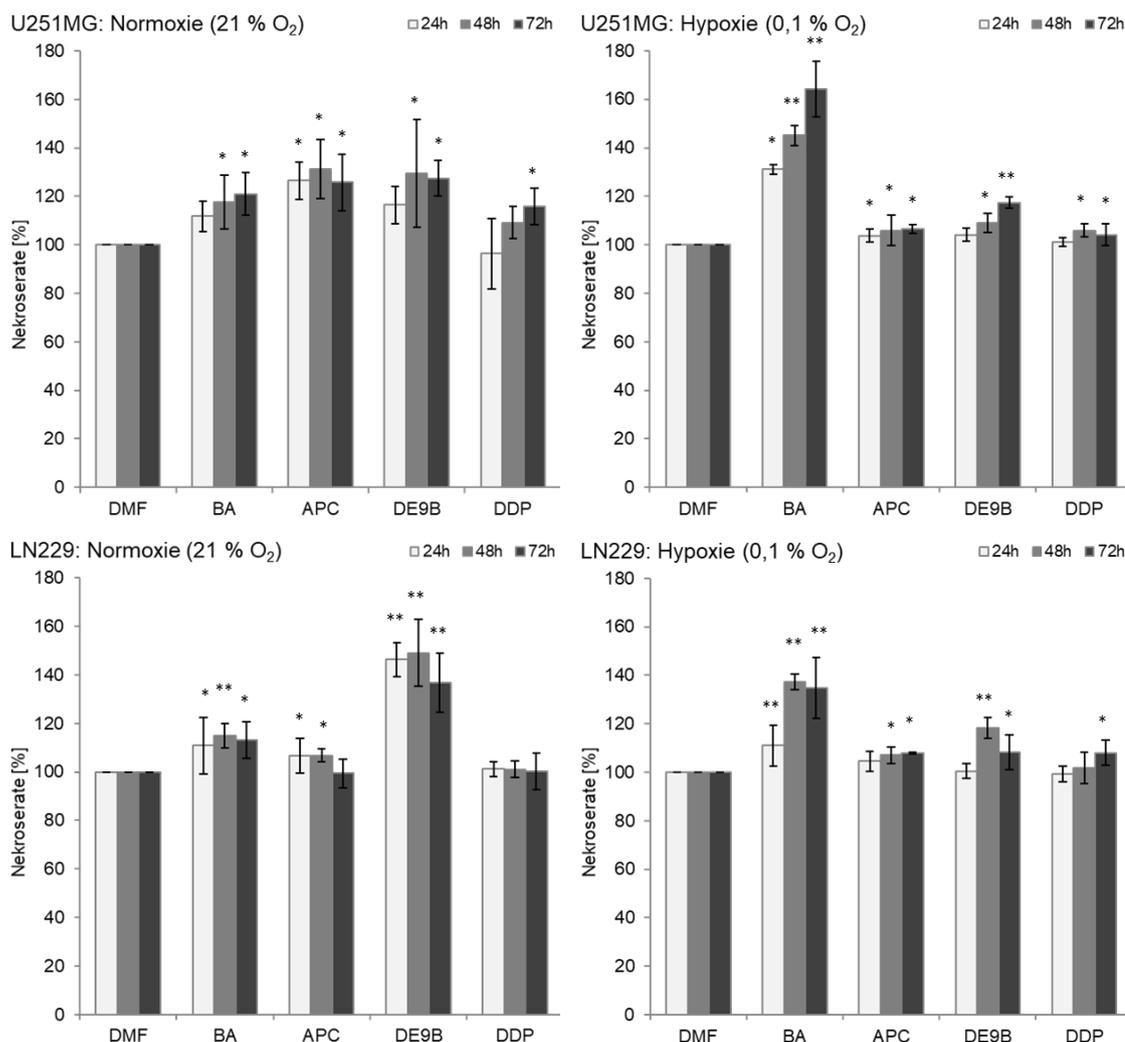
## 4.4 Zelltodmechanismen

In diesem Abschnitt wurde analysiert, inwieweit die untersuchten Substanzen BA, APC, DE9B und DDP die Zelltodmechanismen Nekrose (4.4.1) bzw. Apoptose (4.4.2) auslösen.

### 4.4.1 Nekroseanalyse mittels Trypanblau-Assay

Unter Nekrose versteht man den Zelltod durch Schädigung der Zellstruktur, welcher morphologisch durch Zellmembrandefekte, Zellschwellung, Mitochondriendysfunktion, Austritt von Zellplasmabeständen und Zellyse charakterisiert ist [99].

Mittels Trypanblau-Assay wurde in den GBM-Zelllinien U251MG und LN229 eine Nekrosemessung durchgeführt. Die Zellen wurden mit BA, APC, DE9B bzw. DDP inkubiert (Tab. 5) und für 24 h, 48 h bzw. 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Der Farbstoff penetriert in Zellen mit porösen Membranen und ermöglicht somit die Detektion nekrotischer bzw. spät-apoptotischer Zellen. Dargestellt ist die Nekroserate bezogen auf die DMF behandelten Kontrollzellen (Abb. 9).



**Abbildung 9 Nekroseanalyse der Zelllinien U251MG und LN229 nach 24 h-, 48 h- bzw. 72 h Inkubation mit BA, APC, DE9B bzw. DDP**

Dargestellt ist die Nekroserate (Trypanblau-positive Zellen) bei einer Kultivierung unter 21 % bzw. 0,1 % Sauerstoff. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % im Bezug zur DMF-Kontrolle. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und die Standardabweichung berechnet. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ )

Generell ist festzustellen, dass Nekrose abhängig von der Zelllinie, der Inkubationszeit, der Konzentration der Substanzen (Daten nicht gezeigt) sowie des Sauerstoffgehaltes ausgelöst wird. Nach der BA-Inkubation zeigt sich unter Normoxie im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen nur eine gering erhöhte Nekroserate auf 121,0 %  $\pm$  8,9 % (U251MG) bzw. auf 115,0 %  $\pm$  5,0 % (LN229). Die stärkere Zytotoxizität von BA unter Hypoxie (Abb. 6) spiegelt sich in einer mit der Inkubationsdauer ansteigenden Nekroserate auf max. 168,1 %  $\pm$  11,5 % (U251MG) bzw. 134,7 %  $\pm$  11,8 % (LN229) wider. DDP löst Nekrose im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen nur in der Zelllinie U251MG unter Normoxie in geringem Maß (115,8 %  $\pm$  7,5 %) aus und noch geringer in der Zelllinie U251MG unter Hypoxie bzw. in der Zelllinie LN229 unter Normoxie und Hypoxie. Vergleichbar verhält sich das BA-DDP-Derivat APC und führt

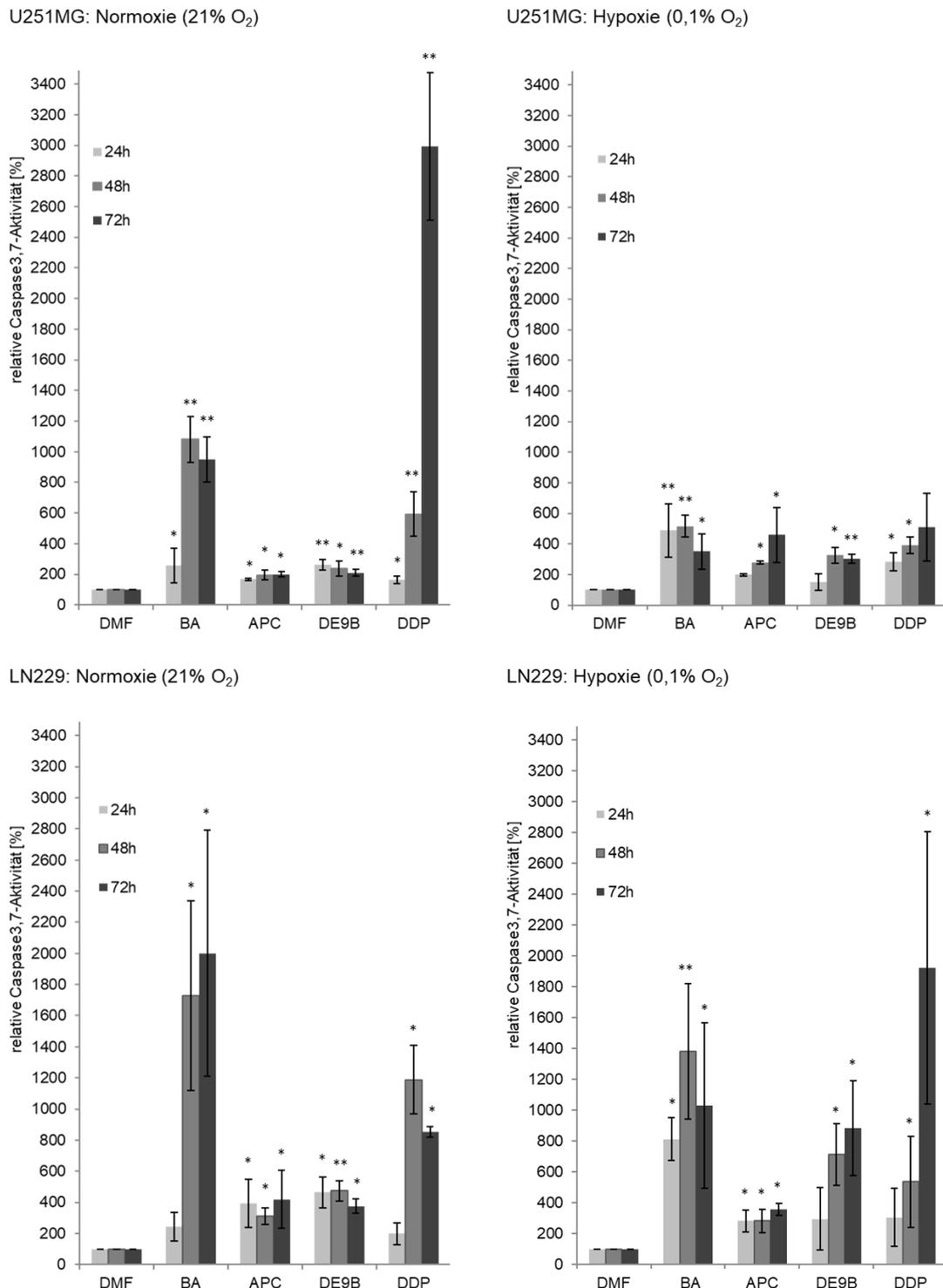
ebenso wie DDP nur in den U251MG-Zellen unter Normoxie zu einer erhöhten Nekroserate von maximal  $131,3\% \pm 12,1\%$  im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen. DE9B zeigt im Trypanblau-Assay in beiden GBM-Zelllinien im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen verstärkt Nekrose unter Normoxie (auf  $127,4\% \pm 7,3\%$  (U251MG) bzw. auf  $149,1\% \pm 13,7\%$  (LN229)) und schwächer unter Hypoxie (auf  $117,4\% \pm 2,4\%$  (U251MG) bzw. auf  $118,2\% \pm 4,2\%$  (LN229)). Unter Normoxie ist in den LN229-Zellen unter Normoxie eine stärkere Erhöhung der Nekroserate als in den U251MG-Zellen und unter Hypoxie eine ähnliche Nekroserate in beiden Zelllinien zu beobachten (Abb. 9).

#### 4.4.2 Apoptoseanalysen mittels Caspase-3/7-Assay und morphologischer Analyse

Apoptose gilt als programmierter, kontrollierter Zelltod mit einem regulierten Abbau der Zelle. Dabei kommt es zur Spaltung der genomischen DNA und der Aktivierung von proteolytischen Enzymen wie Caspasen [99]. Die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 wurde jeweils nach einer 24 h, 48 h und 72 h Inkubation der Zelllinien U251MG und LN229 unter Normoxie und Hypoxie mittels Casase-3/7-Assay ermittelt. Die Caspase-3/7-Aktivierung nach Behandlung mit den Substanzen BA, APC, DE9B und DDP (Tab. 5) wurde mit den DMF behandelten Zellen verglichen.

Es ist zu beobachten, dass die Stärke der Caspase-3/7-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, der Konzentration der Substanzen (Daten nicht gezeigt), des Sauerstoffgehaltes sowie der Zelllinie schwankt (Abb. 10). Auffällig ist zum einen, dass in den U251MG-Zellen unter Hypoxie deutlich weniger Caspase-3/7-Aktivität durch die Behandlungen induziert wurde als unter Normoxie (Abb. 10). Zudem bewirken die Substanzen in den U251MG-Zellen generell eine geringere Caspase-3/7-Aktivität als in den LN229-Zellen. BA führt im Vergleich zu den Kontrollzellen unter Normoxie zu einer 108-fach (U251MG) bzw. zu einer 200-fach (LN229) und unter Hypoxie zu einer 52-fach (U251MG) bzw. zu einer 138-fach (LN229) stärkeren Caspase-3/7-Aktivierung. Hervorzuheben ist, dass der Anstieg der Caspase-3/7-Aktivierung unter Normoxie nach einer 48 h Inkubation auftritt, während unter Hypoxie die Caspase-3/7-Aktivierung bereits nach 24 h deutlich zunimmt (Abb. 10). Im Vergleich zu den Kontrollzellen führt auch DDP zu einer starken Caspase-3/7-Aktivierung: in der Zelllinie U251MG unter Normoxie um das 299-fache und unter Hypoxie um das 51-fache bzw. in den LN229-Zellen unter Normoxie um das 119-fache und unter Hypoxie um das 192-fache. Die Inkubation mit den Derivaten APC und DE9B resultiert in beiden Zelllinien sowohl unter Normoxie als

auch unter Hypoxie in einer deutlich geringeren Caspase-3/7-Aktivierung (2-9-fach) im Vergleich zu BA und DDP (Abb. 10).



**Abbildung 10 Relative Caspase-3/7-Aktivität der Zelllinien U251MG und LN229 nach 24 h, 48 h bzw. 72 h Inkubation mit BA, APC, DE9B bzw. DDP**

Dargestellt sind die relativen Lumineszenzwerte des Caspase-3/7-Assays nach einer Kultivierung unter 21 % bzw. 0,1 % Sauerstoff. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % im Bezug zur DMF-Kontrolle. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und die Standardabweichung berechnet. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01)

Auch morphologisch unterscheidet sich eine apoptotische Zelle deutlich von einer nekrotischen Zelle durch Schrumpfen, Chromatinkondensation, *membrane blebbing* und das Ausbilden sog. *apoptotic bodies* [99]. So wurden die Effekte nach einer 48 h- bzw. 72 h Inkubation mit den Substanzen BA, DE9B, APC und DDP (Tab. 5) auf die Kernmorphologie mittels PI-Färbung untersucht. Initiale mikroskopische Analysen unter Normoxie zeigen, dass die Anzahl der mikroskopisch sichtbaren Mitosen im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen abnimmt und sich die Morphologie der Zellen nach Behandlung deutlich verändert (Daten nicht gezeigt). Typische morphologische Kennzeichen für den apoptotischen Zelltod wie Kernpyknosen sind jedoch unabhängig von der Behandlung nicht zu erkennen. Nach der DDP-Inkubation über 72 h sind Zelltrümmer nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Unter Hypoxie fällt auf, dass auch die DMF behandelten Zellen weniger Mitosefiguren aufweisen als die Kontrollzellen unter Normoxie. Es ist bekannt, dass in Normal- und Tumorzellen unter Hypoxie der Mitoseindex sinkt und Apoptose ausgelöst wird [20, 26]. In den Kontrollzellen sind jedoch unter Hypoxie keine apoptotischen Morphologien zu erkennen. Die behandelten Zellen unterscheiden sich auch unter Hypoxie in der Morphologie deutlich von den Kontrollzellen, weisen jedoch ebenso keine apoptosetypischen Morphologien auf. Nach der BA-Inkubation über 72 h unter Hypoxie sind Zelltrümmer zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass BA die Spaltung des Apoptosemarkers PARP in U251MG-Zellen bewirkt [30]. Um zu analysieren, welchen Einfluss die Derivate APC und DE9B auf den Proteingehalt von PARP haben, wurde nach einer 48 h Inkubation (Tab. 5) unter Normoxie und Hypoxie eine Westernblotanalyse durchgeführt.



**Abbildung 11 Proteingehalt der U251MG-Zellen nach 48 h Inkubation mit APC bzw. DE9B**  
Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Zellen wurden nach der Inkubation unter 21 % bzw. 0,1 % Sauerstoff kultiviert. Nach der Proteinisolierung wurden gleiche Proteinmengen des Gesamtzelllysates analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden folgende Proteine nachgewiesen: β-Aktin bzw. gespaltenes PARP. β-Aktin dient als Ladekontrolle.

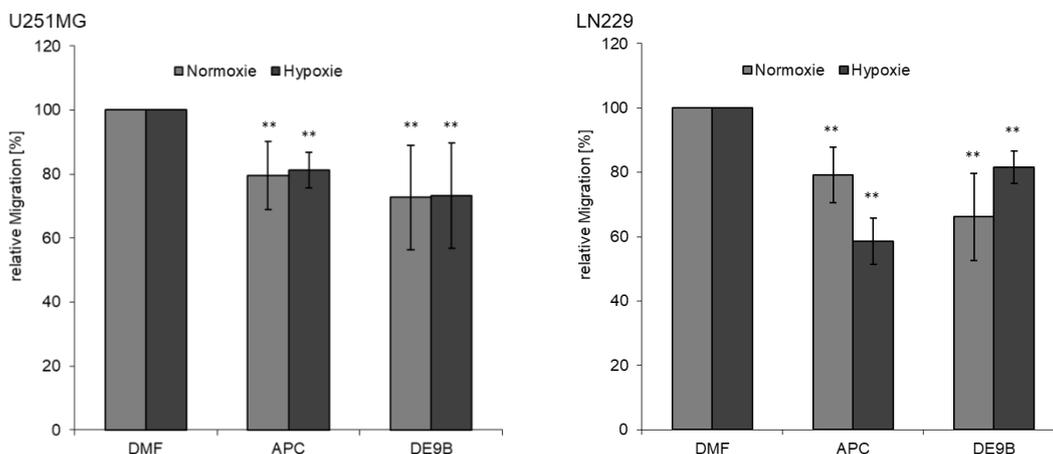
Unter Normoxie führen weder die Inkubation mit APC noch DE9B zu einer verstärkten PARP-Spaltung (Abb. 11). Unter Hypoxie bewirken sowohl APC als auch DE9B einen geringen Anstieg des Proteingehalts an gespaltenem PARP (Abb. 11). Diese Ergebnisse

bestätigen die Caspase-3/7-Untersuchung, da diese Effektorcaspasen direkt zur PARP-Spaltung führen und spiegeln wieder, dass APC und DE9B nur in geringem Maß Apoptose induzieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Derivate APC und DE9B, obwohl sie wie BA und DDP eine Proliferationshemmung (Abb. 7) bewirken, keinen Einfluss auf den Zellzyklus der GBM-Zellen zeigen (Abb. 8). Im Vergleich zu BA und DDP induzieren sie in einem geringeren Ausmaß Apoptose (Abb. 10 und 11). Ebenso wie BA und DDP lösen APC und DE9B in Abhängigkeit von der Zelllinie und der Sauerstoffkonzentration in unterschiedlichem Maß Nekrose aus.

#### 4.5 Migrationsanalyse

GBM ist ein stark invasiv wachsender Tumor, so dass gezielt neue Therapiemöglichkeiten gesucht werden, welche das Migrations- und Invasionspotential der Tumorzellen hemmen. Im Vorfeld konnte mittels Boydenkammer- und Scratch-Assay gezeigt werden, dass BA die Migration in den GBM-Zelllinien U251MG und U343MG hemmt [30]. Mittels Scratch-Assay wurde untersucht, ob auch die BA-Derivate APC und DE9B die Migration der Glioblastomzellen hemmen (Abb. 12).



**Abbildung 12 Relative Migration der Zelllinien U251MG und LN229 nach 18 h Inkubation mit APC bzw. DE9B, bestimmt mittels Scratch-Assay**

Dargestellt ist die relative Migration. Nach der Inkubation und Verwundung des Zellrasens wurden die Zellen für 18 h unter 21 % bzw. 0,1 % Sauerstoff kultiviert. Die Fläche des Scratches wurde mikroskopisch analysiert und anschließend quantifiziert. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % im Bezug zur DMF-Kontrolle. Es wurden fünf voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ )

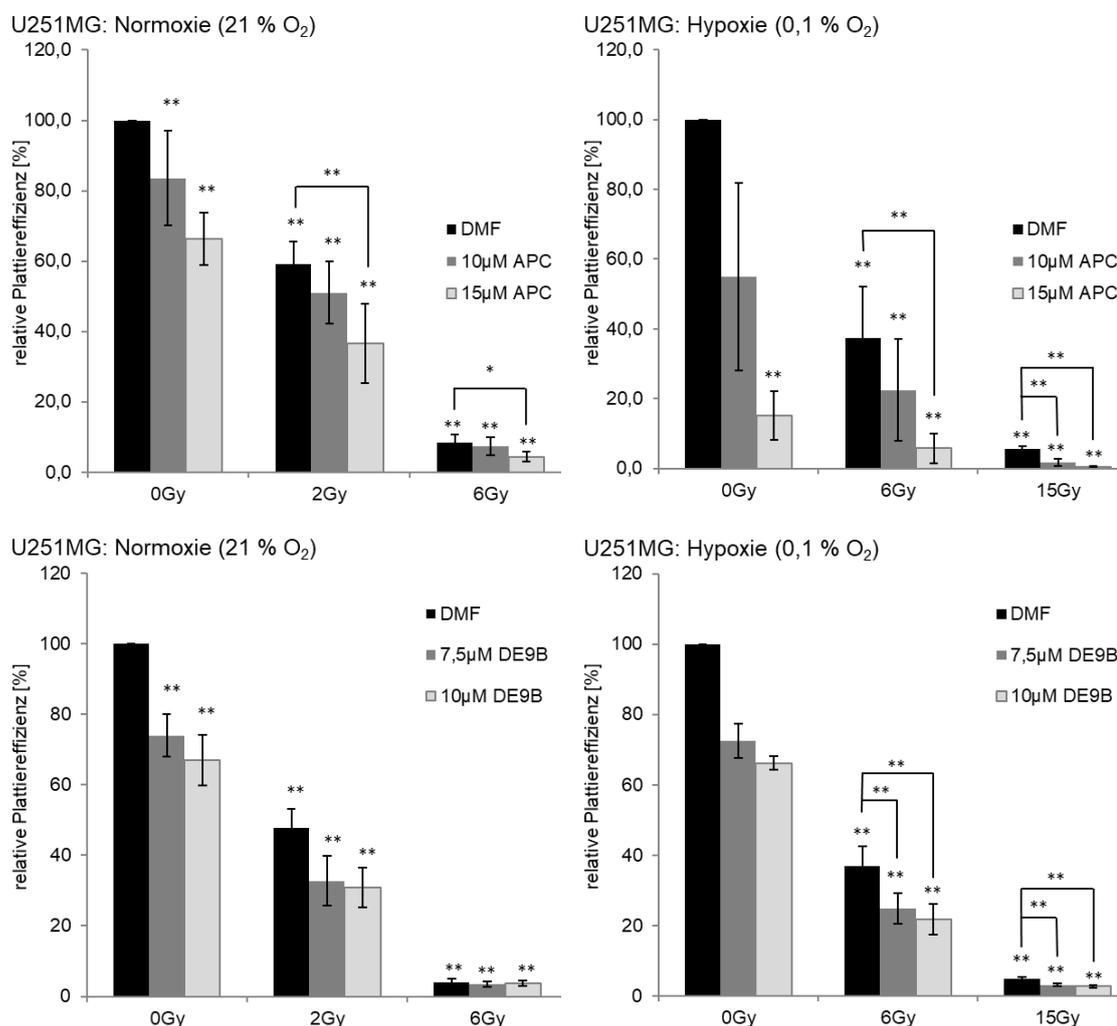
Die Zelllinien U251MG und LN229 wurden mit 5  $\mu\text{M}$  APC bzw. DE9B inkubiert, da diese Konzentration kaum Effekte auf die Zellproliferation und das Zellüberleben hat (Daten nicht gezeigt). Es konnte gezeigt werden, dass in den U251MG-Zellen die Migration unabhängig von der Sauerstoffkonzentration durch die Inkubation mit APC auf ca. 80 % bzw. mit DE9B auf ca. 70 % gehemmt wird. In der Zelllinie LN229 hemmt die APC-Behandlung die Migration unter Hypoxie (auf 58,7 %  $\pm$  7,2 %) deutlich stärker als unter Normoxie (auf 79,2 %  $\pm$  8,6 %). Anders verhält es sich nach der DE9B-Inkubation. DE9B inhibiert die Migration auf 66,2 %  $\pm$  13,6 % stärker als unter Hypoxie (auf 81,6 %  $\pm$  5,1 %).

#### 4.6 Analyse des klonogenen Zellüberlebens und der Strahlensensitivität

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass BA das klonogene Zellüberleben hemmt sowie radiosensitivierend auf GBM-Zelllinien wirkt. Diese Effekte sind unter Hypoxie deutlich stärker ausgeprägt als unter Normoxie [30]. Zunächst wurde die Wirkung von APC, DE9B sowie DDP in verschiedenen Konzentrationen auf das klonogene Zellüberleben (Langzeitüberleben) der Zelllinien U251MG (Abb. 13) und LN229 (Daten nicht gezeigt) mittels Klonogenitätsassay analysiert. Nach einer 24 h Inkubation unter Normoxie und Hypoxie wurden die Zellen für ca. zwei Wochen kultiviert und anschließend die gebildeten Zellkolonien ausgezählt.

In den Zelllinien U251MG (Abb. 13) und LN229 (Daten nicht gezeigt) bewirkt APC unter Normoxie eine deutliche Inhibierung des klonogenen Zellüberlebens, welche sich unter Hypoxie signifikant verstärkt. Die  $\text{EC}_{50}$  liegen etwas über 15  $\mu\text{M}$  unter Normoxie bzw. bei 12,1  $\mu\text{M}$  unter Hypoxie und sind somit vergleichbar mit denen des SRB-Assays (Tab. 4). DE9B hemmt in der Zelllinie U251MG das klonogene Zellüberleben unter Normoxie geringfügig effektiver als APC, jedoch unter Hypoxie deutlich schwächer (Abb. 13). Die Zytotoxizität von DE9B im Klonogenitätsassay ( $\text{EC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ ) ist deutlich geringer als im SRB-Assay und unabhängig vom Sauerstoffgehalt. Weiterhin fällt eine sehr flache Dosis-Wirkungs-Kurve auf, da die Effektivität mit steigender Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  kaum ansteigt (Daten nicht gezeigt). Die stark zytotoxischen Effekte der DDP-Behandlung zeigen sich im Klonogenitätsassay nicht nur wie im SRB-Assay unter Normoxie, sondern auch unter Hypoxie. So sind nach einer Inkubation mit  $\geq 5 \mu\text{M}$  DDP keine Zellkolonien detektierbar (Daten nicht gezeigt). DDP wirkt auf das

Klonogene Zellüberleben nicht nur unter Normoxie, sondern auch unter Hypoxie deutlich zytotoxischer als das BA-DDP-Derivat APC.



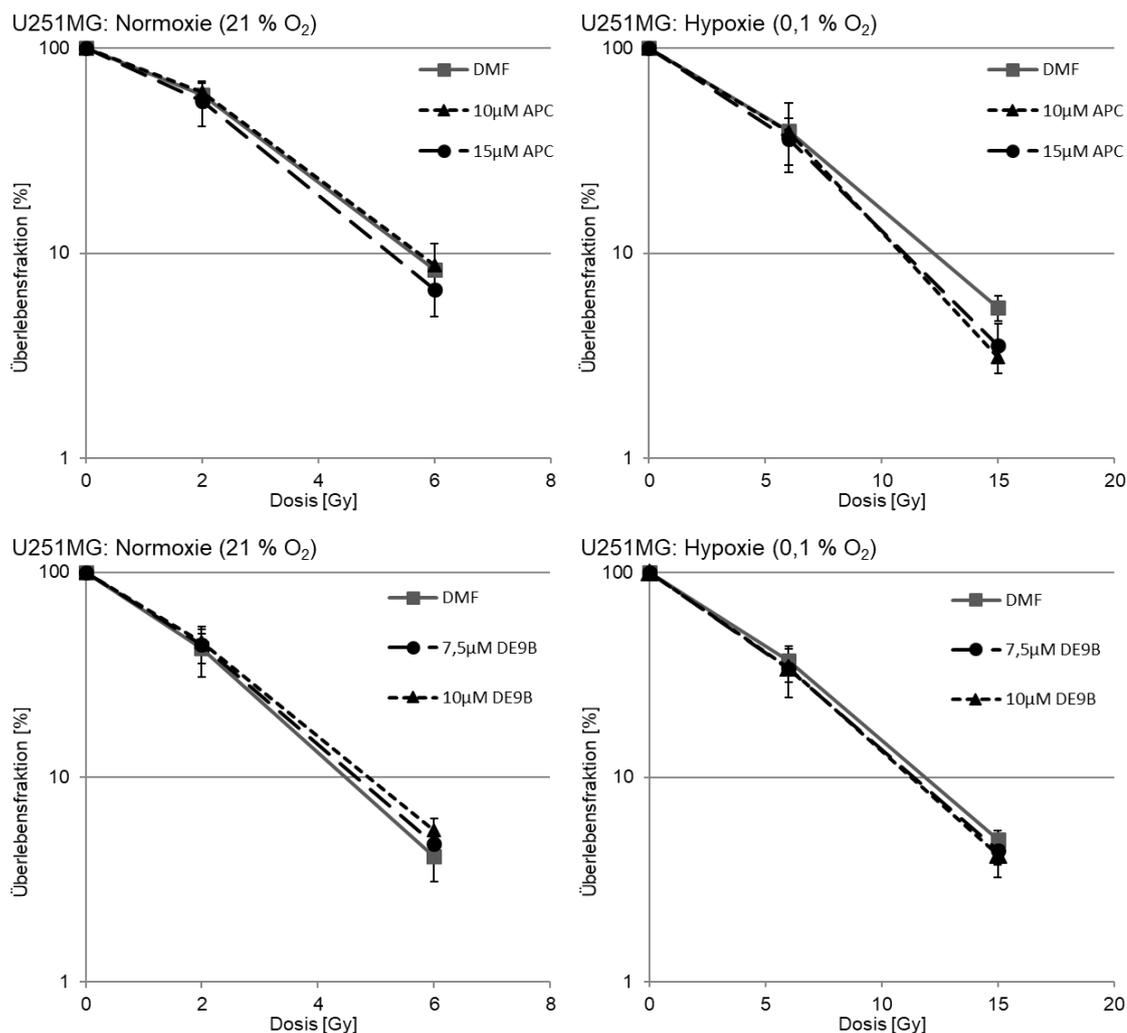
**Abbildung 13 Klonogenes Zellüberleben der Zelllinie U251MG nach einer 24 h Inkubation mit APC bzw. DE9B und anschließender Bestrahlung unter Normoxie und Hypoxie**

Dargestellt sind die relativen Plattiereffizienzen in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % im Bezug zur unbestrahlten DMF-Kontrolle. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ )

Weitere Experimente wurden durchgeführt, um die Effektivität einer Kombinationstherapie aus APC- bzw. DE9B-Inkubation und Bestrahlung zu beurteilen. Die Zellen wurden 24 h mit APC bzw. DE9B inkubiert und anschließend unter Normoxie mit 2 Gy und 6 Gy bzw. unter Hypoxie mit 6 Gy und 15 Gy bestrahlt. Der Klonogenitätsassay wurde 1 h nach der Bestrahlung inokuliert und für ca. 12 Tage kultiviert. Anhand der DMF behandelten Kontrollzellen ist zu sehen, dass die Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis und der Sauerstoffkonzentration deutliche Effekte auf das klonogene Zellüberleben hat (Abb. 13). So überleben unter Normoxie deutlich weniger Zellen bei geringeren Strahlendosen (2 Gy: 59,2 %  $\pm$  6,3 %; 6 Gy: 8,3 %  $\pm$  2,4 %) als unter

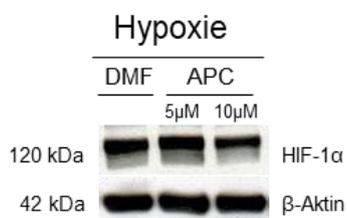
Hypoxie (6 Gy: 37,5 %  $\pm$  14,6 %; 15 Gy: 5,6 %  $\pm$  0,8 %) im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen. Die Kombination aus Bestrahlung und Inkubation mit 10  $\mu$ M APC unter Normoxie führt zu einer verstärkten, aber nicht signifikanten Inhibition des klonogenen Zellüberlebens (2 Gy: 51,0 %  $\pm$  8,8 %; 6 Gy: 7,3 %  $\pm$  1,6 %) im Vergleich zu den DMF behandelten, bestrahlten Kontrollzellen. Die Behandlung mit 15  $\mu$ M APC bewirkt eine stärkere, signifikante Reduktion des klonogenen Zellüberlebens (2 Gy: 36,7 %  $\pm$  11,3 %; 6 Gy: 4,4 %  $\pm$  1,3 %) im Vergleich zu den DMF behandelten, bestrahlten Kontrollzellen. Unter Hypoxie sind diese additiven Effekte stärker ausgeprägt und die Kombinationsbehandlung (10  $\mu$ M APC: 6 Gy: 22,5 %  $\pm$  14,7 %; 15 Gy: 1,8 %  $\pm$  1,0 %; 15  $\mu$ M APC: 6 Gy: 5,8 %  $\pm$  4,3 %; 15 Gy: 0,5 %  $\pm$  0,1 %) reduziert das klonogene Zellüberleben deutlich effektiver als die Bestrahlung allein. Die Behandlung mit dem Derivat DE9B in Kombination mit Bestrahlung führt unter Normoxie ebenfalls zu einer verstärkten, jedoch nicht signifikanten Hemmung des klonogenen Zellüberlebens im Vergleich zu den bestrahlten, DMF behandelten Kontrollzellen. Unter Hypoxie führt bereits eine Konzentration von 7,5  $\mu$ M (6 Gy: 24,8 %  $\pm$  4,4 %; 15 Gy: 13,2 %  $\pm$  0,4 %) zu einer signifikanten Hemmung im Vergleich zu den bestrahlten, DMF behandelten Kontrollzellen.

Im Anschluss wurden die radiosensitivierenden Effekte der APC- bzw. DE9B-Inkubation in Form des DMF 10 bestimmt (Tab. 6). Es wurden drei Dosiswerte (Normoxie: 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy; Hypoxie: 0 Gy, 6 Gy, 15 Gy) genutzt, um mittels eines durch Interpolation optimierten linear-quadratischen Modells, den DMF 10 zu berechnen. DE9B hat unabhängig vom Sauerstoffgehalt keinen Einfluss auf die Radiosensitivität der U251MG-Zellen. Hingegen führt die Behandlung mit APC unter Hypoxie zu einer geringen Radiosensitivierung der U251MG-Zellen (DMF 10 = 1,13; p-Wert: 0,06) (Abb. 14). Die Chemo- und Strahlentherapieresistenz der hypoxischen Areale in soliden Tumoren, wie auch in GBM, stellt ein großes Problem bei der Therapie dar. Substanzen, die gezielt an diesen Problempunkten angreifen, sind Gegenstand aktueller Forschungen (siehe 1.2 und 1.3). Eine Möglichkeit der Resistenz hypoxischer Areale entgegen zu wirken ist die Suppression von HIF-1 $\alpha$  [30, 31]. Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass BA in U251MG-Zellen unter Hypoxie den HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt senkt [30, 72]. Da die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das Derivat APC wie auch BA unter Hypoxie zytotoxischer und leicht radiosensitivierend wirkt, wurde mittels Westernblotanalyse untersucht, welchen Einfluss APC auf den Proteingehalt von HIF-1 $\alpha$  nach einer 48 h Inkubation unter Hypoxie hat. Auch das BA-Derivat APC reduziert in den U251MG-Zellen unter Hypoxie den Proteingehalt von HIF-1 $\alpha$  (Abb. 15).



**Abbildung 14 Strahlensensitivität der Zelllinie U251MG nach einer 24 h Inkubation mit APC bzw. DE9B**

Dargestellt sind die relativen Plattiereffizienzen in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % im Bezug zur unbestrahlten Probe der jeweiligen Kontrolle bzw. Behandlung. Es wurden vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und die Standardabweichung berechnet. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ )



**Abbildung 15 Proteingehalt der Zelllinie U251MG nach 48 h Inkubation mit APC**

Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Zellen wurden nach der Inkubation unter 21 % bzw. 0,1 % Sauerstoff kultiviert. Nach der Proteinisolierung wurden gleiche Proteinmengen des Gesamtzelllysates analysiert. Mittels spezifischer Antikörper wurden folgende Proteine nachgewiesen: β-Aktin bzw. HIF-1α. β-Aktin dient als Ladekontrolle.

## 5 Diskussion

GBM ist der häufigste Gehirntumor im Erwachsenenalter und ist durch ein schnelles, invasives Wachstum sowie eine Chemo- und Strahlentherapieresistenz gekennzeichnet. Die Prognose von GBM-Patienten ist trotz multimodaler Therapie mit einem mittleren Überleben von 12 bis 15 Monaten sehr schlecht [6]. Obwohl durch intensive Forschung Fortschritte im Verständnis der Tumorbilogie der GBM erzielt werden konnten, gibt es keine wesentlichen Verbesserungen in der Behandlung. Auf der Suche nach einer effizienten und nebenwirkungsarmen Therapiestrategie für GBM wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von molekularbiologische Methoden und neuen Substanzen, u. a. Naturstoffen auf ihre Wirksamkeit getestet. Pflanzliche Stoffe werden seit jeher zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen genutzt. Auch heute gibt es noch viele Medikamente, die aus Naturprodukten isoliert werden [49]. Spezielle Beispiele aus der Krebstherapie sind Vincristin und Vinblastin, Paclitaxel, Etoposid sowie Camptothecin und Podophyllotoxin. Somit sind zahlreiche natürlich vorkommende Pflanzenstoffe potentiell bioaktiv, preiswert bei der Gewinnung und hilfreich bei der Therapie verschiedenster Erkrankungen zu sein [48, 49].

### 5.1 Effekte auf Zytotoxizität, klonogenes Zellüberleben und Proliferation

#### 5.1.1 BA

BA ist ein Naturstoff mit einem vielfältigen Wirkungsspektrum und repräsentiert eine vielversprechende Alternative für die Behandlung einer Vielzahl von Tumoren. Auch in verschiedenen GBM-Zelllinien und primären GBM-Proben zeigte BA gute antitumorale Effekte, welche vielen herkömmlichen Chemotherapeutika wie DDP oder Doxorubicin sowie einer Bestrahlung mit 60 Gy überlegen waren [60, 61]. Es ist bekannt, dass die zytotoxischen Effekte einer BA-Behandlung im sauren Milieu und unter Hypoxie deutlich ansteigen. Weiterhin wirkt BA auch zytotoxisch auf inaktive, sich nicht teilende Tumorzellen. Zudem tolerieren Normalzellen hohe Dosen des Naturstoffs BA [78]. Im Gegensatz dazu wirken die meisten Chemotherapeutika systemisch v. a. auf proliferativ aktive Zellen und schädigen somit auch normale Körperzellen. Nicht-proliferativ aktive Tumorzellen sind dagegen resistent gegenüber zahlreichen Chemotherapeutika [19]. Dieser

Aspekt stellt oftmals ein Problem dar, da herkömmliche Chemotherapeutika v. a. hypoxische Tumorareale mit niedrigem pH-Wert und inaktive Zellen nicht erreichen, dies gilt auch bei GBM. Welcher Mechanismus hinter dieser Wirkungsweise von BA steht, ist noch nicht geklärt. Die gesteigerte Effektivität im sauren Milieu - möglicherweise basierend auf der chemischen Struktur von BA als Säure - könnte ein Grund für die fehlende systemische Zytotoxizität von BA sein, da im Normalgewebe deutlich höhere pH-Werte herrschen als in soliden Tumoren, insbesondere in deren hypoxischen Arealen [78].

In der eigenen Arbeit konnte mittels SRB-Assay gezeigt werden, dass BA in den GBM-Zelllinien U251MG, LN229 und U343MG deutliche zytotoxische Effekte hervorrief, die unter Hypoxie stark anstiegen (Abb. 6; Tab. 4). Die drei untersuchten Zelllinien reagierten ähnlich auf die 72 h Inkubation mit BA. Dies bestätigte die Ergebnisse früherer Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe, welche die gesteigerte Effektivität von BA unter Hypoxie in GBM-Zelllinien zeigten [30, 72]. Lena *et al.* untersuchten an einer TMZ-resistenten GBM-Zelllinie ebenfalls die Zytotoxizität von BA mittels eines Kristallviolett-basierten Zytotoxizitätstests und ermittelten vergleichbar starke Effekte [70]. Im Gegensatz dazu zeigten Wick *et al.* mittels Kristallviolettassay voneinander abweichende Sensitivitäten der verschiedenen GBM-Zelllinien mit EC50 zwischen 20-100  $\mu\text{M}$  [64].

Die BA-Behandlung bewirkte unter Normoxie zunächst eine deutliche Proliferationsverzögerung und mit zunehmender Inkubationsdauer einen Arrest (U251MG) bzw. eine Abnahme der Zellzahl (LN229). Unter Normoxie hemmte BA die Proliferation der U251MG-Zellen weniger effektiv als die Derivate APC und DE9B und in den LN229-Zellen ähnlich effektiv wie APC, aber weniger effektiv als DE9B. Unter Hypoxie inhibierte BA verglichen mit DDP und den Derivaten APC und DE9B die Proliferation am effektivsten und führte zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl (Abb. 7). Auffällig war, dass BA unter Hypoxie nicht nur effektiver, sondern auch frühzeitiger wirkte.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Zytotoxizität bietet die Analyse des klonogenen Langezeitüberlebens mit Hilfe des Klonogenitätsassays. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass BA ebenso das klonogene Zellüberleben der GBM-Zellen hemmt, wobei auch hier, ähnlich wie beim SRB-Assay, unter Hypoxie deutlich stärkere Effekte als unter Normoxie zu beobachten waren [30, 72]. Die EC50, die mit Hilfe des Klonogenitätsassays ermittelt wurden, sind vergleichbar mit denen des SRB-Assays (Tab. 4 und [30, 72, 100]). Weiterhin untersuchten Zuco *et al.* und Kessler *et al.* an insgesamt 35 Zelllinien verschiedener Tumorentitäten die Effekte von BA auf das klonogene Zellüberleben mit dem Ergebnis, dass BA in 30 Zelllinien sehr effektiv wirkte

und vier Zelllinien geringfügig bzw. eine Zelllinie deutlich resistent ansprechen [53, 56]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit beschrieben Wick *et al.*, dass sich die gemessenen Effekte von BA auf das klonogene Zellüberleben (Langzeitüberleben) der GBM-Zelllinien nicht von den mittels Zytotoxizitätsassay gemessenen Effekte auf das Kurzzeitüberleben unterscheiden [64]. Daraus lässt sich ableiten, dass die akuten zytotoxischen Effekte von BA ebenso effektiv das klonogene Langzeitüberleben der Tumorzellen negativ beeinflussen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da GBM-Patienten trotz aggressivem Behandlungsregime bestehend aus radikaler Resektion und adjuvanter Radiochemotherapie meist Rezidive erleiden [6]. Besonders die hohe Zytotoxizität von BA unter Hypoxie ist im Hinblick auf die Behandlung von GBM von großem Interesse, da in den soliden Tumoren hypoxische Areale auftreten, die meist durch eine Therapieresistenz gekennzeichnet sind.

BA stellt somit eine potentielle Antitumorsubstanz mit einem breiten, zytotoxischen Spektrum dar.

#### 5.1.2 DDP

DDP ist eines der wirksamsten Chemotherapeutika mit einer breitgefächerten klinischen Anwendung, welches jedoch aufgrund von verschiedenen Resistenzmechanismen in seiner Effektivität stark schwankt und v. a. aufgrund von Resistenzentwicklung in hypoxischen Arealen in seiner Wirksamkeit deutlich eingeschränkt ist. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen den Veränderungen des Phänotyps der Gliolastomzellen unter Hypoxie und der Therapieresistenz gegenüber DDP [26, 46]. Dennoch wirkt DDP in GBM-Zelllinien stark zytotoxisch und ist sogar effektiver als das nach Leitlinien eingesetzte Chemotherapeutikum TMZ [101]. In den 1990er Jahren wurde DDP in der GBM-Behandlung genutzt [46]. Aktuell stellt DDP jedoch nur noch ein „second-line“-Chemotherapeutikum dar [39] und wird selten bei Rezidiven verwendet (siehe 1.1.2) [6, 15, 102]. Mehrere *in vitro* Untersuchungen und klinische Studien zeigten eine gute Wirksamkeit der Kombination von DDP und TMZ und wiesen darauf hin, dass DDP die *MGMT*-Aktivität senkt und somit die Effektivität von TMZ steigt [15, 103–105].

*In vitro* zeigte sich eine gute Wirksamkeit von DDP in GBM-Zellen. Thakor *et al.* wiesen eine von der Inkubationszeit und Konzentration abhängige Zytotoxizität von DDP in der GBM-Zelllinie U87MG unter Normoxie nach [106]. In den eigenen Untersuchungen wirkt DDP stark zytotoxisch unter Normoxie. Die drei untersuchten GBM-Zelllinien wiesen jedoch unterschiedliche Sensitivitäten auf. So sprach die Zelllinie U251MG ca. zehnfach

sensitiver auf die DDP-Behandlung an als die Zelllinie LN229 (Abb. 6; Tab. 4). In Übereinstimmung dazu beobachteten Carminati *et al.* ebenfalls die unterschiedliche Effektivität von DDP in verschiedenen GBM-Zelllinien. Während die Zelllinie U343MG sensibel auf die DDP-Behandlung anspricht, zeigte sich die Zelllinie T98G resistent gegenüber DDP [42]. Eigene Daten zeigten zudem, dass die zytotoxische Wirkung unter Hypoxie deutlich abnahm (Abb. 6; Tab. 4). Jalota *et al.* zeigten in zwei GBM-Zelllinien (A172 und LN229) ebenso, dass DDP unter Normoxie effektiver wirkt als unter Hypoxie und dass verschiedene Zelllinien unterschiedlich sensitiv auf eine DDP-Behandlung ansprechen [107].

Die Proliferationsanalysen bestätigten die Ergebnisse des SRB-Assays und zeigten, dass in den U251MG- bzw. LN229-Zellen unter Normoxie 1  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  DDP die Proliferation stark hemmen. Unter Hypoxie war ebenfalls eine deutliche Hemmung des Zellwachstums zu beobachten (Abb. 7), wobei die 4- (LN229) bis 40-fache (U251MG) Konzentration im Vergleich zur Behandlung unter Normoxie eingesetzt wurde (Tab. 5). Ähnlich dem SRB- und Proliferationstest, zeigte auch der Klonogenitätsassay die stark inhibitorischen Effekte der DDP-Behandlung unter Normoxie (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde auch unter Hypoxie eine sehr starke Inhibierung des klonogenen Zellüberlebens durch die DDP-Behandlung nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). DDP hemmte unter Hypoxie somit effektiver das klonogene Langzeitüberleben als das Kurzzeitüberleben (SRB-Assay). Die Ursache für die abweichenden Dosis-Effekt-Kurven könnte aber auch methodisch bedingt sein. Das Abtrypsinieren und Inokulieren der Zellen nach der Behandlung bewirken neben Inkubation und Hypoxie zusätzlich Zellstress und können dazu beitragen, dass die Zellen schlechter adhärieren und Kolonien ausbilden können. Das Umsetzen der Zellen im Klonogenitätsassay nach Inkubation kann somit zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn die Zellen nach der Behandlung noch vital sind, aber nicht mehr adhärieren (siehe 5.1.2). Besonders Zelllinien mit einer niedrigen Plattiereffizienz sind somit für den Klonogenitätsassay nicht geeignet. Trotzdem stellt der Klonogenitätsassay den Goldstandard dar, um die Effekte einer Radiotherapie ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie zu messen, da die Fähigkeit der Zellen eine Zellkolonie zu bilden detektiert wird [108, 109].

Auch andere Studien bestätigten die erhöhte Resistenz der GBM-Zellen gegenüber einer DDP-Behandlung unter hypoxischen Bedingungen. Liang beobachtete mittels *CellTiter 96 Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay*, dass die GBM-Zellen bereits nach 24 h Hypoxie gegenüber der DDP-Behandlung 3-fach resistenter sind [46]. Carminati *et al.* zeigten, dass die DDP-Resistenz der GBM-Zellen mit der Dauer der

Hypoxie zunimmt [42]. Zusätzlich führte eine Reoxygenierung zu einer gesteigerten Expression von bestimmten Genen des Zellzyklus, der Invasion, der DNA-Reparatur, welche der malignen Progression dienen [42]. Es ist bekannt, dass sich im Zuge der malignen Tumorprogression Mutationen und chromosomale Aberrationen anreichern sowie Dysregulationen bestimmter Signalwege häufen und zu sehr unterschiedlichen Therapiesensitivitäten bzw. vielfältigen Resistenzmechanismen führen [10, 46]. Die unterschiedliche Sensitivität der GBM-Zelllinien auf die DDP-Behandlung in den verschiedenen eingesetzten Untersuchungsmethoden sowie die erhöhte Resistenz unter Hypoxie deuten auf eine Abhängigkeit der DDP-Wirkung von verschiedenen Signalwegen hin.

Resistenzen gegenüber DDP stellen stark limitierende Faktoren für die Patientenbehandlung dar. Kombinationstherapien sind eine Strategiemöglichkeit, die oftmals genutzt wird, um Resistenzentwicklungen zu vermeiden bzw. die Effekte einer Substanz auf resistente Zellen durch die Gabe einer zweiten Substanz zu verstärken. Es gibt eine Vielzahl an Arbeiten, die verschiedene Substanzen untersuchten, welche die DDP-Wirkung in resistenten Zellen verstärken sollen [15, 103–105, 110, 111]. Durch die Kombination von DDP und BA könnte diese Resistenz vermindert und die vorteilhaften Eigenschaften beider Substanzen ausgenutzt werden. Erste Befunde zeigten, dass BA sensitivierende Effekte auf die DDP-Behandlung in GBM-Zellen hat [74]. Eder-Czembirek *et al.* beobachteten hingegen, dass die Wirkung einer Kombination von BA und DDP in Kopf-Hals-Tumorzelllinien sehr unterschiedlich ausfallen kann. Während in der Zelllinie SCC9 antagonistische Effekte gemessen wurden, waren die Effekte in der Zelllinie SCC25 in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationsdauer synergistisch und additiv [58]. Yamai *et al.* zeigten ebenfalls in Ösophaguskarzinomzellen antagonistische Effekte bei der Kombination aus BA und DDP [112]. Es wird diskutiert, dass sich die Signalwege, über welche beide Substanzen ihre Wirkung entfalten überlappen und sich deshalb gegenseitig beeinträchtigen [58].

Auf der Suche nach einer effizienten und nebenwirkungsarmen Therapiestrategie für GBM wurde in der vorliegenden Arbeit die antitumorale Wirksamkeit des BA-DDP-Derivats APC und des BA-Derivats DE9B untersucht.

### 5.1.3 DE9B

Emmerich *et al.* zeigten in ersten Zytotoxizitätsanalysen (SRB-Assay, Normoxie) stark zytotoxische Effekte einer DE9B-Behandlung in Lungen-, Ovarial-, Mamma- und Schilddrüsenkarzinom- sowie Melanomzelllinien [97]. Zytotoxizitätsmessungen in GBM-Zelllinien bzw. Untersuchungen unter Hypoxie sowie Analysen zu den Wirkmechanismen wurden bisher nicht durchgeführt. Aufgrund seiner hohen Zytotoxizität wurden in der eigenen Arbeit weiterführende Analysen zur Wirkung von DE9B durchgeführt. Die stark zytotoxische Wirkung von DE9B wurde in den GBM-Zelllinien U251MG, LN229 und U343MG bestätigt. So zeigte DE9B im SRB-Assay unter Normoxie die stärksten Effekte im Vergleich zu den anderen Substanzen BA, APC und DDP. Die drei untersuchten GBM-Zelllinien sprachen wie auch auf die BA- und APC-Behandlung vergleichbar sensitiv auf die DE9B-Behandlung an (Abb. 6; Tab. 4). Unter Hypoxie war die Zytotoxizität im Gegensatz zu BA deutlich geringer als unter Normoxie, jedoch immer noch sehr hoch und vergleichbar mit BA (Abb. 6, Tab. 4). Auch andere BA-Derivate wie NVX-207, B10, HC7, CAI 1-4 büßen durch die chemische Modifikation die gesteigerte Zytotoxizität von BA unter Hypoxie ein [72, 113]. Eine Ursache für die geringere Wirkung unter Hypoxie könnte die deutlich verminderte Proliferation der Zellen bei Sauerstoffmangel [20]. Möglicherweise haben die Derivate im Vergleich zu BA die Fähigkeit auf ruhende, nicht-proliferativ aktive Zellen zytotoxisch zu wirken verloren und rufen wie herkömmliche Chemotherapeutika hauptsächlich bei proliferierenden Zellen Effekte hervor [19, 78]. Ein weiterer Grund für die Abnahme der Zytotoxizität unter Hypoxie könnte darin begründet sein, dass die Derivate durch die chemische Modifikation keine Säuren mehr darstellen und somit unter Hypoxie, also bei einem niedrigeren pH-Wert, schlechter wirken als unter Normoxie.

Zusätzlich durchgeführte 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)- und Kristallviolettassays ergaben mit dem SRB-Assay vergleichbare Dosis-Wirkungs-Kurven (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist, dass die stark zytotoxische Wirkung von DE9B (EC50: 2,0-4,3  $\mu$ M) unter Normoxie nur in den Zytotoxizitätsassays auftrat, welche in 96-Well-Platten durchgeführt wurden (siehe 3.2.3; Tab. 4). Für Untersuchungen der Klonogenität und Proliferation, welche in Zellkulturflaschen bzw. 6-Well-Platten durchgeführt wurden, waren deutlich höhere Konzentrationen (siehe 3.2.5 und 3.2.8; Tab. 5) erforderlich, um Effekte messen zu können. Bei den Substanzen BA, APC und DDP (mit der Ausnahme von DDP unter Hypoxie; siehe 5.1.2) korrelierten die Ergebnisse der verschiedenen Methoden zur Zytotoxizitätsmessung (SRB-Assay, Klonogeni-

tätsassay, Proliferationsassay) miteinander, während sich bei DE9B, wie schon beschrieben, starke Unterschiede zeigten. Möglicherweise stellte die Inkubationsdauer ein Grund dar, weshalb DE9B in den Zytotoxizitätsanalysen eine sehr starke Zytotoxizität zeigte, welche sich in den weiteren Untersuchungen nicht bestätigte. In den eigenen Zytotoxizitätsassays (SRB-, MTT- bzw. Kristallviolettassay) wurde über 72 h, in den Untersuchungen von Emmerich *et al.* über 96 h inkubiert [97]. Bei dem Klonogenitätsassay betrug die Inkubationsdauer nur 24 h, sodass Konzentrationen bis zu 10  $\mu\text{M}$  das klonogenen Überleben um weniger als 50 % reduzierten (Abb. 13). Somit scheinen die akuten zytotoxischen Effekte von DE9B nicht mit einer starken Hemmung des klonogenen Zellüberlebens der GBM-Zellen assoziiert zu sein. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass die Zellen beim Klonogenitätsassay in der Lage waren sich über den Verlauf der Kultivierung (ca. 12 d) von der 24 h Inkubation zu erholen. BA, APC und DDP hingegen scheinen bereits nach der 24 h Inkubation das klonogene Zellüberleben effektiv zu reduzieren (siehe 5.1.1, 5.1.2 und 5.1.4). Die Bedeutsamkeit bzw. die Vor- und Nachteile von Klonogenitätsassay und SRB-Assay sind in der Literatur umstritten und abhängig von der Zelllinie und der angewandten Behandlung. Es gibt eine Reihe von Untersuchungen, die zeigten, dass der SRB-Assay vergleichbare Ergebnisse zum traditionellen Klonogenitätsassay liefert [114–116]: Der SRB-Assay ist eine einfache Methode, um schnell und effektiv die Zytotoxizität einer Substanz auf das Kurzzeitüberleben zu erfassen. Für die Messungen unter Hypoxie muss allerdings beachtet werden, dass der SRB-Assay den mit der Zellzahl korrelierenden Gesamtproteininhalt misst und Zellen unter Hypoxie ihre Proteinsynthese um ca. 50 % reduzieren [26]. Der Klonogenitätsassay hingegen detektiert die Fähigkeit der Zellen eine Zellkolonie zu bilden und ist somit besser geeignet, um die Effekte einer Radiotherapie ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie zu messen [108]. In der angewandten Tumorthherapie ist es erstrebenswert die unbegrenzte Teilungsfähigkeit der Tumorzellen vollständig zu inhibieren, um einer Rezidiventstehung vorzubeugen. Neben der Inkubationszeit kann somit auch das methodische Vorgehen eine Ursache für die abweichenden Dosis-Effekt-Kurven sein. Auch in den Proliferationsanalysen wurden die Effekte einer DE9B-Behandlung gemessen, die wie im SRB-Assay ebenfalls auf eine Inkubationsdauer von bis zu 72 h zurückzuführen sind. Vermutlich reagieren die Zellen in den 6-Well-Platten bzw. Zellkulturflaschen weniger sensibel, da durch das größere Volumen das Verhältnis zwischen verfügbarem Medium und Nährstoffverbrauch durch die Zellen günstiger ist und somit die Wachstumsbedingungen konstanter sind. Ebenso können Zelldichte, von den Zellen ins Medium abgegebene Mediatoren oder der pH-Wert eine Rolle spielen. DE9B hemmte die Proliferation in beiden Zelllinien sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie (Abb. 7). Ebenso zeigten die

Proliferationsanalysen, dass DE9B unter Normoxie die Proliferation effektiver hemmte als unter Hypoxie. Weiterhin wurde in dieser Proliferationsuntersuchung ein geringfügig sensitiveres Ansprechen der Zelllinie LN229 gegenüber der Zelllinie U251MG gemessen (Abb. 7). Bache *et al.* zeigten ebenso, dass die GBM-Zelllinien ein unterschiedlich sensitives Ansprechen auf verschiedene BA-Derivate aufwiesen [72]

Insgesamt stellt DE9B ein stark zytotoxisches BA-Derivat dar. Die erhöhte Zytotoxizität v. a. unter Normoxie könnte zum einen durch die erhöhte Löslichkeit im Vergleich zu BA zustande kommen, zum anderen ist aber auch beschrieben, dass besonders Derivate mit Amingruppen ansteigende Effekte aufweisen [84]. Zusätzlich wurde diese potentielle Antitumor-Substanz mit DDP kovalent verbunden (APC) und in dieser Arbeit untersucht.

#### 5.1.4 APC

Aus den Zytotoxizitätsanalysen von Emmerich *et al.* ging hervor, dass APC in Ovarial-, Darm-, Haut-, Brust- und Lungenkrebszelllinien im Vergleich zu DE9B eine deutlich geringere Zytotoxizität aufweist. Emmerich *et al.* hatten in ihren Untersuchungen festgestellt, dass noch unkomplexierte BA-Derivate wie DE9B effektiver wirken als die mit Schwermetallen komplexierten BA-Derivate wie APC [97]. Dies sei auf den Abzug der Elektronendichte aus den funktionellen Gruppen sowie auf die sterischen Hinderung zurückzuführen [117]. Außerdem scheint DDP selbst aufgrund der herabgesetzten Polarität und Wasserlöslichkeit sowie der eingeschränkten Beweglichkeit im Zellplasma aufgrund der Komplexbildung voraussichtlich nicht in der Lage zu sein in den Zellkern zu gelangen [117]. Ahmad *et al.* diskutierten zudem, dass sowohl die Zunahme der Masse als auch die Sperrigkeit des Moleküls nachteilige Effekte auf die zytotoxische Wirkung einer Substanz haben [118]. Auch in anderen Untersuchungen wurde bestätigt, dass sperrigere Derivate durch die verminderte Fähigkeit der Membranpermeabilisation eine geringere Aktivität aufweisen [83, 89]. Die eigenen Untersuchungen zeigten in den GBM-Zelllinien ebenfalls eine geringere Zytotoxizität von APC im Vergleich zu DE9B (Abb. 6). Die EC50 der Zelllinien U251MG, LN229 und U343MG waren vergleichbar mit denen von BA. Die durchgeführten Zytotoxizitätsanalysen unter Hypoxie ergaben, dass APC etwas effektiver wirkt als unter Normoxie. APC zeigte somit ähnliche zytotoxische Eigenschaften wie BA im Gegensatz zu DE9B, welches BA strukturell ähnlicher ist. Die GBM-Zelllinien reagierten wie auf die Behandlung mit BA und mit dem anderen BA-Derivat DE9B ähnlich sensibel auf die APC-Behandlung. Im Vergleich zur DE9B-Behandlung

zeigte nach der APC-Behandlung die Zelllinie U251MG eine geringfügig höhere Sensitivität als die Zelllinie LN229. Auffällig war, dass das sensitivere Ansprechen unter Hypoxie in den Zelllinien LN229 und U343MG ausgeprägter war, während die Zelllinie U251MG unabhängig vom Sauerstoffgehalt reagierte. Auch in vorangegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigte sich, dass die GBM-Zelllinien zum einen unterschiedlich sensitiv auf die BA-Derivate NVX-207 und B10 reagierten und zum anderen, dass das Ansprechen auf die BA-Derivate unter Hypoxie ebenfalls unterschiedlich ausfallen kann [100].

Auch in der Proliferationsanalyse wurde deutlich, dass APC unter Normoxie ähnlich (LN229) bzw. stärker zytotoxisch (U251MG) als BA wirkt und unter Hypoxie weniger effektiv als BA die Proliferation hemmt. Diese Untersuchung zeigte ebenfalls ein geringfügig sensitiveres Ansprechen der GBM-Zelllinie U251MG im Vergleich zur Zelllinie LN229. An dem Kurvenverlauf der Kontrollzellen fiel auf, dass die Zelllinie U251MG eine deutlich schnellere Teilungsrate als die Zelllinie LN229 aufwies (Abb. 7). Möglicherweise ist die Wirkung von APC auf schnell proliferierende Zellen stärker ausgeprägt als auf langsamer proliferierende Zellen.

Die Wirkung der APC-Behandlung auf das klonogene Zellüberleben zeigte in beiden untersuchten GBM-Zelllinien U251MG und LN229 eine ähnliche Dosis-Wirkungs-Beziehung wie es bereits in den Zytotoxizitäts- und Proliferationsanalysen gezeigt wurde. Ebenfalls ist zu erkennen, dass sowohl unter Normoxie bzw. etwas stärker unter Hypoxie APC eine deutliche Reduktion des klonogenen Zellüberlebens hervorruft (Abb. 13). In beiden Zelllinien liegen die EC<sub>50</sub> unter Normoxie knapp über 15 µM (U251MG: siehe 4.6; LN229: Daten nicht gezeigt). Unter Hypoxie reagierte wie auch schon im SRB-Assay und der Proliferationsanalyse die Zelllinie LN229 (EC<sub>50</sub>: 6,2 µM; Daten nicht gezeigt) deutlich sensibler als die Zelllinie U251MG (EC<sub>50</sub>: 6,2 µM; siehe 4.6). APC hemmte somit effektiv sowohl das Kurzzeit- als auch das klonogene Langzeitüberleben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass BA in den untersuchten GBM-Zelllinien in Übereinstimmung mit der Literatur zytotoxisch auf Kurz- und Langzeitüberleben sowie stark proliferationshemmend wirkte. Diese Effekte verstärkten sich unter Hypoxie deutlich. Die DDP-Behandlung sprach in GBM-Zelllinien in Übereinstimmung mit bisherigen Veröffentlichungen unter normoxischen Bedingungen stark an, während unter Hypoxie DDP deutlich weniger effektiv war. APC wies ein ähnliches Zytotoxizitätsprofil wie BA auf. DE9B wirkte am zytotoxischsten auf das Kurzzeitüberleben, jedoch

weniger stark auf das klonogene Langzeitüberleben. Emmerich *et al.* zeigten beim Vergleich der Wirksamkeit von DE9B und APC in Tumor- und Normalzellen (Fibroblastenzelllinie), dass beide Substanzen keine Selektivität aufweisen [97]. Dagegen tolerierten Normalzellen eine deutlich höhere BA-Konzentration im Vergleich mit Tumorzelllinien [51, 53, 54, 61, 64, 56, 66]. Für DDP konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Fibroblasten DDP besser tolerieren als Tumorzellen (U343MG) [42]. Auch andere BA-Derivate wie bspw. die 28-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside von Betulin und BA verloren die Selektivität ihrer zytotoxischen Wirkung [93].

Für eine (Tumor-)Zelle gibt es verschiedene Möglichkeiten auf natürlichen oder behandlungsinduzierten Stress (bspw. Chemotherapeutika oder Naturstoffe wie BA-(Derivate)) zu reagieren. Neben einem reversiblen oder auch irreversiblen Zellzyklusarrest, sind verschiedene Zelltodformen bekannt, die in apoptotische und nicht-apoptotische Zelltodformen gegliedert werden können [99].

Die Bedeutung der Effekte einer Behandlung mit BA-(Derivaten) und DDP-(Derivaten) soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

## 5.2 Effekte auf den Zellzyklus und Induktion von Zelltod

Nicht nur in GBM, sondern auch in anderen Tumorentitäten bereiten Therapieresistenzen deutliche Probleme bei der Behandlung und sind mit einer schlechten Prognose verbunden [19, 31, 119–122]. Das Hauptziel der verschiedenen Therapieoptionen wie Chemotherapie, Bestrahlung und Immuntherapie besteht darin in den Tumorzellen einen Wachstumsarrest und/oder Zelltod auszulösen. Diese verschiedenen Formen der Zellinaktivierung unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch biochemisch voneinander [21].

### 5.2.1 BA

Aus zahlreichen Studien zur Beeinflussung des Zellzyklus durch eine BA-Behandlung geht hervor, dass die Effekte stark von der verwendeten Zelllinie abhängig sind: Pisha *et al.* zeigten in Melanomzellen unter Normoxie einen deutlichen G1-Arrest nach einer 36 h BA-Inkubation [52]. Hingegen konnten Selzer *et al.* in Melanomzellen und Melanozyten keine Veränderung der Zellzyklusverteilung nach BA-Behandlung messen

[54]. Wick *et al.* beschrieben in den GBM-Zelllinien LN18 und LN229 ebenso das Ausbleiben eines Zellzyklusarrestes nach einer 24 h Inkubation mit BA, zeigten jedoch eine p21-Akkumulation [64]. p21 und p27 hemmen zyklinabhängigen Kinasen und vermitteln darüber einen G1- oder G2/M-Zellzyklusarrest [21, 64]. Die GBM-Zelllinien LN229 und LN18 zeigten vermutlich wegen einer Störung im *retinoblastom gene product checkpoint* nicht den mit der p21-Akkumulation assoziierten Zellzyklusarrest [64, 123]. In anderen Untersuchungen wurde eine Reduktion des Cyclin D1-mRNA-Gehalts in der GBM-Zelllinie C6 und anderen Tumorzelllinien nach einer 24 h Inkubation mit BA bzw. eine p21-Akkumulation und Cyclin D1-Reduktion nach BA-Behandlung beschrieben [124, 125]. Cyclin D1 akkumuliert in der G1-Phase und ist für den Übergang in die S-Phase notwendig [21, 126]. Zellzyklusanalysen unter Hypoxie sind bisher nicht beschrieben. In den eigenen Untersuchungen waren unter Normoxie keine eindeutigen Effekte auf den Zellzyklus zu messen (Abb. 8). Unter Hypoxie zeigte sich jedoch nach 48 h eine deutliche Akkumulation der Zellen in der G2/M- und S-Phase bzw. eine Reduktion der Zellen in der G0/G1-Phase unter Hypoxie (Abb. 8) im Vergleich zu den DMF behandelten Kontrollzellen. Die Kontrollzellen zeigten unter Hypoxie eine deutliche Akkumulation in der G1/G0-Phase im Vergleich zu Normoxie. Es ist bekannt, dass unter Hypoxie die Zellen eine Akkumulation in dieser Zellzyklusphase sowie eine geringere Verdopplungsrate verglichen mit Normoxie aufweisen [20, 127]. Dies konnte durch die eigenen Untersuchungen ebenfalls gezeigt werden (Abb 7 und 8). In den Proliferationsanalysen war weiterhin zu beobachten, dass BA im Vergleich zur Normoxie unter Hypoxie früher und stärker auf die Zellproliferation wirkte (Abb. 7). Möglicherweise war die Inkubationsdauer von 48 h in der Zellzyklusanalyse zu kurz, um Effekte von BA unter Normoxie auf den Zellzyklus zu ermitteln.

In einer Vielzahl von Untersuchungen wird BA als Apoptoseinduktor beschrieben [49]. Es ist bekannt, dass BA u. a. zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und somit zur Freisetzung von mitochondrialen Apoptosefaktoren (z. B. Cytochrom c) führt, die über Aktivierung von Caspasen zur Spaltung des DNA-Reparatur Enzyms PARP sowie über die Aktivierung der caspaseaktivierten DNase CAD die DNA-Fragmentierung bewirken [4, 128]. BA stellt eine potentielle Substanz dar, um die Apoptose-rate zu erhöhen und könnte somit dazu beitragen einen Fortschritt in der Therapie von GBM zu erzielen, welche als besonders apoptoseresistent gelten [52, 62, 70, 73, 121]. Fulda *et al.* untersuchten die Apoptoseinduktion von BA in verschiedenen Tumorzelllinien und beschrieben in Neuroblastomzellen die stärkste Casaseaktivierung nach 18 h Inkubationsdauer sowie eine Anreicherung von proteolytisch gespaltenem PARP und

p18 als Folge der Caspaseaktivierung [62]. Wick *et al.* konnten eine Caspase-3/8-Aktivität nach der Inkubation der GBM-Zelllinien LN229 und LN18 mit BA bereits nach 2 h messen und ebenso proteolytisch gespaltenes PARP sowie eine DNA-Fragmentierung nachweisen [64]. Auch die von Wick *et al.* nachgewiesene p21 Akkumulation spricht für eine Apoptoseinduktion, da p21 ein *downstream*-Mediator der BA vermittelten p53-abhängigen Apoptose ist [64]. In den Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurden in den GBM-Zelllinien U251MG und U343MG ebenfalls die proteolytische Spaltung von PARP und eine Abnahme des Apoptoseinhibitor Survivin unter Normoxie und Hypoxie nachgewiesen [30, 72]. Weitere Apoptoseanalysen nach BA-Inkubation unter Hypoxie sind bisher kaum beschrieben. In Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Studien führte eine BA-Inkubation unter Normoxie und Hypoxie in den eigenen Untersuchungen zu einem deutlichen Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität in den GBM-Zelllinien U251MG und LN229 (Abb. 10). Auch hier waren die Effekte unter Hypoxie früher zu messen (24 h) als unter Normoxie (48h). Es fällt auf, dass die U251MG-Zellen generell eine geringere Caspase-3/7-Aktivierung aufwies als die LN229-Zellen (Abb. 10).

Initiale mikroskopische Untersuchungen lassen nach einer BA-Behandlung keine Apoptose-typischen Veränderungen der Zellkernmorphologie in der GBM-Zelllinie U251MG erkennen (siehe 4.4.2). Interessanterweise waren auch nach Behandlung mit DDP, DE9B und APC trotz Caspase-3/7-Aktivierung ebenfalls keine Apoptosekörperchen nachweisbar, obgleich die Caspase-3/7-Aktivität bei allen Substanzen bereits nach 24 h bis 48 h geringfügig bis stark anstieg (Abb. 10). Es ist zu diskutieren, ob die GBM-Zelllinien trotz Apoptoseinduktion, keine eindeutigen Apoptosemorphologien ausbilden. So zeigten weitere Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe ebenso, dass trotz nachgewiesener Apoptoseinduktion mittels Caspase-3/7- und Annexin-V-Assay in der Zelllinie U251MG morphologisch Apoptose nicht nachweisbar war [100, 129]. Aktuelle Untersuchungen von Sanchez-Osuna *et al.* zeigten, dass in den GBM-Zelllinien LN18, LN229, U251MG, A172, T98G und U87MG trotz caspaseabhängiger Apoptoseinduktion aufgrund einer zu geringen Konzentration der caspaseaktivierten DNase CAD kein kompletter, klassischer Apoptoseprozess abläuft [4]. Nicht nur das Auslösen von Apoptose, sondern auch die Induktion anderer Zelltodmechanismen, wie Nekrose oder Autophagie, durch BA sind beschrieben. Mittels LDH-Messung wurde in Melanozyten und Melanomzellen eine konzentrationsabhängige Nekroseinduktion durch eine BA-Behandlung nachgewiesen [66, 81]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben ebenfalls mittels LDH-Assay gezeigt, dass BA dosisabhängig Nekrose auslöst, jedoch erst bei höheren Konzentrationen (20-30  $\mu\text{M}$ ) in geringem Maß [72]. Nach der Inkubation mit der EC50 (10-15  $\mu\text{M}$ ; Tab. 5) war für die Zelllinien U251MG und LN229 kein Anstieg

der Nekroserate messbar [72]. Die Nekroseanalyse mittels Trypanblaufärbung in der eigenen Arbeit zeigte unter normoxischen Bedingungen ebenso kein Anstieg an nekrotischen Zellen (Abb. 9). Auch Lena *et al.* untersuchten die Wirkung von BA in einer TMZ-resistenten Zelllinie und zeigten, dass die Inkubation mit dem EC50 kaum Nekrose, aber signifikant Apoptose auslöst [70]. Unter Hypoxie kam es dagegen zu einem Anstieg von Trypanblau-positiven Zellen nach 72 h Behandlung mit BA (Abb. 10). Die eigenen Beobachtungen sowie die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass BA primär Apoptose auslöst. Unter Hypoxie war die Apoptoseinduktion zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt als unter Normoxie nachweisbar, sodass das Stadium der Spätapoptose mit permeabler Membran (aufgrund des fehlenden Abbaus der apoptotischen Zellen *in vitro*) bereits nach 48 h und 72 h erreicht sein könnte und die Zellen den Farbstoff durch die nicht mehr intakte Membran der apoptotischen Zellen aufgenommen haben. Die mit steigender Inkubationszeit zunehmenden trypanblau-positiven Zellen nach BA-Behandlung unter Hypoxie scheinen somit die stärkere und frühzeitigere Wirkung von BA unter Hypoxie zu repräsentieren, sodass es sich hierbei nicht primär um nekrotische, sondern um spät-apoptotische Zellen handelt. Es kann vermutet werden, dass die Zelltrümmern in der mikroskopischen Analyse spät-apoptotische Zellen darstellen.

Eine dritte Form des Zelltods stellt die Autophagie dar. Lefrance *et al.* beschrieben in ihrem Review, dass GBM-Zelllinien Autophagie auslösen und dass Substanzen, die Autophagie induzierten, neue potentielle Wirkstoffe gegen apoptoseresistente GBM-Zellen darstellen [122]. Für BA und BA-Derivate ist bekannt, dass sie über Autophagie Apoptose einleiten können. Lena *et al.* zeigten mittels Acridine Orange-Färbung, dass durch BA (EC50) unter Normoxie in einer TMZ-resistenten GBM-Zelllinie kurz nach Inkubationsbeginn Autophagie auslöst wird [70]. Auch in Blasenkrebszelllinien wurde mittels Acridineorange-Färbung nachgewiesen, dass BA Autophagie auslöst [130]. Initiale Untersuchungen dieser Arbeit zur Autophagie zeigten mittels Acridineorange-Färbung, dass BA in beiden Zelllinien sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie kaum Autophagie induzierte (Daten nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um genauere Aussagen zur Autophagieinduktion in U251MG- und LN229-Zellen durch BA treffen zu können. Möglicherweise wurde in den eigenen Untersuchungen zu spät gemessen (48 h), wenn Apoptose über Autophagie eingeleitet wird und somit Autophagie zuvor stattfindet (< 24 h).

### 5.2.2 DDP

Es ist bekannt, dass DDP durch das Interkalieren in der DNA zu Störungen des Zellzyklus führt [131]. Kondo *et al.* zeigten, dass DDP unter Normoxie in der GBM-Zelllinie U87MG einen G2/M-Arrest hervorrief [132]. In der eigenen Arbeit konnte unter Normoxie ebenfalls eine deutliche Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase nach Inkubation mit DDP gezeigt werden. Unter Hypoxie waren diese Effekte deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 8). In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen zeigten Thakor *et al.*, dass DDP in der GBM-Zelllinie U87MG sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie einen G2/M-Arrest sowie eine damit einhergehende Akkumulation von Cyclin B1 auslöste. Auch in diesen Untersuchungen fielen die Effekte unter Hypoxie schwächer aus [106].

Ebenso gilt DDP als klassisches apoptose-auslösendes Chemotherapeutikum [42]. In den eigenen Untersuchungen bewirkte DDP eine deutliche inkubationszeitabhängige Caspase-3/7-Aktivierung (Abb. 10). Jalota *et al.* konnten in den GBM-Zelllinien LN229 und A172 unter Normoxie eine deutlich stärkere Caspase-Aktivierung messen als unter Hypoxie [107]. Ebenso wiesen Thakor *et al.* eine inkubationszeitabhängige Apoptoseinduktion in der GBM-Zelllinie U87MG nach, welche unter Hypoxie schwächer ausfiel als unter Normoxie [106]. Carminati *et al.* konnten in der GBM-Zelllinie U343MG nach DDP-Inkubation apoptotische Zellveränderungen nachweisen [42]. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den eigenen Caspase-Untersuchungen, die ebenfalls zeigten, dass die Apoptoseinduktion über die Zeitspanne von 24 h bis 72 h unter Normoxie stetig anstieg (Abb. 10). Es wurde postuliert, dass neben den verschiedenen Zelltodformen wie Nekrose, Autophagie oder Seneszenz, die in einer geschädigten Zelle induziert werden können, DDP primär Apoptose auslöst [42]. In Übereinstimmung dazu ließen auch die eigenen Nekroseanalysen keinen deutlichen Anstieg an trypanblau-positiven Zellen nach DDP-Behandlung erkennen (Abb. 9). Somit kann geschlossen werden, dass DDP in den untersuchten GBM-Zelllinien LN229 und U251MG keinen nekrotischen Zelltod hervorruft. Die in der Zelllinie U251MG geringe, mit der Inkubationszeit (72 h) steigende Zunahme der trypanblau-positiver Zellen stellt wahrscheinlich, wie bereits bei BA diskutiert (siehe 5.2.1), spätapoptotische Zellen dar. Dies war verbunden mit mikroskopisch sichtbaren Zelltrümmern, die bei der Zelllinie U251MG nach einer 72 h Inkubation mit DDP unter Normoxie detektiert wurden (siehe 4.4.2). Emdad *et al.* zeigten, dass DDP in GBM-Zelllinien neben Apoptose, wenn auch in geringem Maß Autophagie auslöst [101]. Die Induktion von verschiedenen Zelltodmechanismen in GBM-Zellen ist vorteilhaft für die Behandlung, da verschiedene Signalwege aktiviert werden und die Substanzen trotz Apoptoseresistenz wirksam sind [101]. In den untersuchten GBM-Zellen

U251MG und LN229 löste DDP lediglich unter Normoxie, jedoch nicht unter Hypoxie Autophagie aus. Im Gegensatz dazu wiesen Jalota *et al.* weder in den GBM-Zelllinien A172 und LN229 unter Normoxie noch unter Hypoxie eine Autophagieinduktion durch DDP nach [107].

Die geringere Zytotoxizität von DDP auf das Kurzzeitüberleben unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie (Abb. 6) war mit geringeren Effekten auf die Zellzyklusverteilung sowie Induktion von Zelltod verbunden. Dennoch wurde nach DDP-Behandlung mit den entsprechend ermittelten, hohen Konzentrationen (Tab. 5) im Vergleich mit den anderen Substanzen BA, APC und DE9B unter Hypoxie die höchste Apoptoserate in den untersuchten GBM-Zellen beobachtet (Abb. 10).

Welche Wirkungsmechanismen hinter der Zytotoxizität der Derivate von BA und DDP steckten, wurde in den folgenden Abschnitten untersucht.

### 5.2.3 DE9B

Ebenso wie bei BA zeigten Zellzyklusuntersuchungen verschiedener Studien von BA-Derivate unterschiedliche Ergebnisse: Diese scheinen nicht nur zelllinienabhängig, sondern auch abhängig von der chemischen Modifikation von BA zu sein. Kommera *et al.* untersuchten in der Darmkrebszelllinie HCT116 die Effekte der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere von den D-Glucopyranosederivaten der BA auf den Zellzyklus, welche sich als konzentrations-, zeit- und derivatabhängig herausstellten. Während die EC50 des 28-O-acetylbetulin-3-yl- $\beta$ -D-glucopyranosid keine spezifischen Zellzyklusveränderungen, sondern direkt Apoptose auslöste, induzierte die EC50 des 28-O-acetylbetulin-3-yl- $\alpha$ -D-glucopyranosid nach 24 h einen G1-Arrest und nach 48 h eine G1- sowie eine diskrete G2/M-Akkumulation der Zellen [90]. Santos *et al.* zeigten eine Akkumulation von Leberkrebszellen in der S-Phase nach Inkubation mit der EC50 von Carbamat-BA-Derivaten [95]. Die Derivate DE9B und APC wurden bisher kaum untersucht. DE9B hatte trotz deutlicher Proliferationshemmung keinen Einfluss auf den Zellzyklus (Abb. 8). Dies lässt vermuten, dass DE9B die Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle durch Auslösen von Zelltod bewirkte ohne einen Zellzyklusarrest bzw. -verzögerung zu induzieren.

Die Induktion von Apoptose, als eine Form des Zelltods, konnte in den untersuchten GBM-Zelllinien U251MG und LN229 nach Behandlung mit DE9B durch die Detektion eines Anstieges der Caspase-3/7-Aktivität nachgewiesen werden, welcher jedoch deutlich geringer ausfiel als der durch BA bzw. DDP induzierte Anstieg (Abb. 10). Auffällig

war, dass wie schon bei BA beobachtet auch hier die Caspase-3/7-Aktivierung in der Zelllinie U251MG deutlich geringer war als in der Zelllinie LN229. Möglicherweise ist die Zelllinie LN229 sensibler für die Apoptoseinduktion durch BA und BA-Derivate. Es ist aus den Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays hervorgegangen, dass DE9B unter Normoxie effektiver und frühzeitiger wirkte als unter Hypoxie. Der Caspase-3/7-Assay bestätigte dies, da das Maximum der Casapse-3/7-Aktivität unter Normoxie bereits nach 24 h und unter Hypoxie erst nach 48 h bzw. 72 h messbar war. Kommera *et al.* untersuchten ebenfalls BA-Derivate auf ihre Zytotoxizität und ihre Fähigkeit Apoptose zu induzieren. Verwendet wurden dabei die EC90, um einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität zu messen [89]. Andererseits konnten Santos *et al.* für die von ihnen untersuchten BA-Derivate bei eingesetzter EC50 eine Apoptoseinduktion nachweisen [95].

Es ist bekannt, dass BA zu einem gesteigerten Proteinlevel von proteolytisch gespaltenen PARP in GBM-Zelllinien führt [30, 72]. Das BA-Derivat DE9B bewirkte in der Zelllinie U251MG unter Normoxie keinen, jedoch unter Hypoxie einen geringen Anstieg an proteolytisch gespaltenen PARP (Abb. 11), was die geringe Apoptoseinduktion durch DE9B bestätigt. Die Inaktivierung von PARP wird durch die Caspasen katalysiert. Möglicherweise war die Caspase-3/7-Aktivierung durch DE9B unter Normoxie zu gering, um in der Westernblotanalyse einen gesteigerten Proteingehalt von proteolytisch gespaltenen PARP detektieren zu können.

Obwohl DE9B im SRB-Assay zytotoxischer wirkte als BA, induzierte es jedoch in einem wesentlich geringeren Ausmaß Apoptose. Auch Baratto *et al.* beschrieben ein 2,4-Dinitrophenylhydrazin-BA-Derivat mit einer höheren Zytotoxizität als BA, aber einem geringeren Potenzial zur Apoptoseinduktion. Sie diskutierten, dass die Penetrationsfähigkeit, Löslichkeit, Stabilität sowie Metabolisierung der Substanz einen Einfluss auf den Wirkmechanismus selbst bzw. auf die Schnelligkeit der Wirkung haben können [87]. Ebenso ist es möglich, dass eine Koexistenz von verschiedenen Zelltodmechanismen vorliegt [70]. Mittels Trypanblau-Assay wurde ermittelt, dass DE9B unter Normoxie in den Zelllinien U251MG und LN229 nach 48 h zu einem stärkeren Anstieg der nekrotischen Zellen als BA führte (Abb. 9). Unter Hypoxie kam es zu einem geringeren Anstieg an nekrotischen Zellen als unter Normoxie. Emmerich beschrieb in seiner Masterarbeit die Fähigkeit der Amine die Zellmembran zu permeabilisieren und somit Nekrose auszulösen [117]. Weiterhin ist bekannt, dass Polyamine das Enzym Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase aktivieren, welches über eine Wasserstoffperoxidproduktion zu DNA-Schäden und Zelltod führt [133], wobei kontrovers diskutiert wird, ob dabei Apoptose oder Nekrose ausgelöst wird [134, 135].

Arbeiten anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass BA und einige BA-Derivate auch Autophagie induzieren (siehe 5.2.1). Erste Untersuchungen zur Autophagie mittels Acridineorange-Färbung zeigten, dass DE9B im Gegensatz zu BA, DDP und APC Autophagie sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie auslöste (Daten nicht gezeigt). Gonzalez *et al.* zeigten die Autophagieinduktion in der Glioblastomzelllinie U87MG bereits wenige Stunden nach Inkubationsbeginn mit dem BA-Derivat B10 [136], ebenso wie Lena *et al.* mit BA (siehe 5.2.1) [70]. Laut Gonzalez *et al.* induzierte das Derivat B10 über Autophagie Apoptose [136]. In den eigenen Untersuchungen wurde zu einem deutlich späteren Zeitpunkt gemessen, so dass zu diskutieren ist, ob das Ausmaß der Autophagie wenige Stunden nach Inkubationsbeginn bzw. vor der gemessenen Caspaseaktivierung (< 24 h) deutlich größer gewesen wäre.

#### 5.2.4 APC

Kombinationstherapien aus verschiedenen Chemotherapeutika bzw. Chemo- und Radiotherapie werden genutzt, um verschiedene Signalwege zu aktivieren und somit Resistenzen zu vermeiden [74]. In der Substanz APC sind die beiden Moleküle BA und DDP kovalent miteinander verbunden.

APC zeigte anders als BA und DDP keinen Effekt auf den Zellzyklus der behandelten GBM-Zellen (Abb. 8). Dies lässt vermuten, dass die zytotoxischen Effekte auf der Induktion von Zelltod beruhen.

APC schien im Gegensatz zu BA und DDP zelllinien- und sauerstoffabhängig verschiedene gleichermaßen Zelltodmechanismen auszulösen. BA und DDP lösten primär Apoptose aus (siehe 5.2.1 und 5.2.2). BA wirkt direkt auf die Mitochondrien [62] und DDP interkaliert in die DNA [41]. Möglicherweise können beide Substanzen gekoppelt in dem Molekül APC nicht unabhängig voneinander wirken bzw. zu ihren Wirkorten gelangen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen, wäre eine Verlängerung des Spacers zwischen BA und DDP im Molekül, sodass beide Apoptoseauslöser unabhängiger voneinander an ihren Wirkorten in der Zelle agieren können. Ein ähnliches Prinzip beschrieben Urban *et al.* und Drag-Zalesinska *et al.* für Esterderivate, welche durch die Estergruppe leichter durch die Membran in die Zelle gelangen und nach intrazellulärer enzymatischer Abspaltung der Aminosäure vom BA-Derivat frei vorliegen und Apoptose induzieren konnten [83, 137]. Negativ könnte sich jedoch auswirken, dass das resultierende Molekül durch die Modifikationen noch größer wäre. Somit ist zu diskutieren, ob größere und sperrigere Moleküle überhaupt in die Zelle gelangen können.

Ahmad *et al.* untersuchte verschiedene enzymatisch synthetisierte BA-Ester und stellte fest, dass die Zytotoxizität mit der Länge der Alkylkette an C-3 abnahm [118]. Außerdem korrelierte die Effektivität mit der Löslichkeit, der Sperrigkeit sowie der Hydrophobizität des Moleküls [83].

Generell haben die Ergebnisse gezeigt, dass APC im Vergleich zu BA und DDP deutlich schwächer Apoptose in den Zelllinien U251MG und LN229 auslöste und auch kaum Nekrose induzierte. Die Wirkungsweise von APC scheint stark von der Zelllinie und der Sauerstoffkonzentration abhängig zu sein. In der Zelllinie LN229 induzierte APC primär Apoptose und kaum Nekrose (Abb. 9 und 10). In der Zelllinie U251MG war unter Normoxie bereits nach 24 h ein deutlicher Anstieg der Nekroserate nachweisbar (Abb. 9). Unter Hypoxie hingegen wurden kaum nekrotische Zellen, jedoch eine Caspase-3/7-Aktivierung detektiert (Abb. 10). Die Messung des Proteingehaltes von gespaltenem PARP als Apoptosemarker zeigte wie bei DE9B unter Normoxie keinen, jedoch unter Hypoxie einen leicht gesteigerten Proteingehalt (Abb. 11). In verschiedenen *in vitro* Untersuchungen wurde eine Autophagieinduktion durch die Behandlung mit BA bzw. BA-Derivaten nachgewiesen (siehe 5.2.1 und 5.2.3). In den initialen Untersuchungen zur Autophagie zeigte APC die gleichen Effekte wie DDP (siehe 5.2.2). Beide Substanzen schienen insbesondere unter Normoxie Autophagie zu induzieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit BA bzw. DDP in den untersuchten GBM-Zelllinien zu einem Zellzyklusarrest führten und primär Apoptose auszulöste, auch wenn andere Arbeitsgruppen eine Koexistenz verschiedener Zelltodmechanismen postulierten [66, 70, 81, 101, 107, 130]. Die Behandlung mit den BA-Derivaten APC und DE9B induzierte im Vergleich zu BA und DDP keinen Zellzyklusarrest, aber verschiedene Zelltodarten. DE9B löste neben Autophagie in beiden Zelllinien unter Normoxie vorwiegend Nekrose und unter Hypoxie vorwiegend Apoptose aus. APC induzierte vorwiegend Apoptose, jedoch in der Zelllinie U251MG unter Normoxie Nekrose. Außerdem führte APC wie auch DDP unter Normoxie zu Autophagie. Die Derivatisierung von BA scheint die Wirkungsweise von APC und DE9B im Vergleich zu BA verändert zu haben.

### 5.3 Einfluss auf die Migration

Das diffuse, invasive Wachstum von GBM stellt ein zentrales Problem in der Therapie dar und ist einer der Gründe für die schlechte Prognose der Patienten [121]. Es werden

gezielt neue Therapiemöglichkeiten gesucht, welche auch das Migrations- und Invasionspotential der Tumorzellen hemmen.

Die Effekte von BA und DDP auf die Migration der GBM-Zelllinien U251MG, LN229 und U343MG wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte mittels Boydenkammer- und Scratch-Assay nachgewiesen werden, dass BA die Migration in den GBM-Zelllinien LN229 und U343MG hemmt [30, 72]. Rzeski *et al.* konnten ebenso mittels Scratch-Assay zeigen, dass BA die Migration in der GBM-Zelllinie C6 inhibiert [124]. Yoon *et al.* wiesen die Hemmung nicht-toxischer Dosen von BA der Migration im Scratch-Assay sowie der Invasion im Matrigel-Assay glatter Muskelzellen nach und stellten fest, dass BA die Expression und die proteolytische Aktivität der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 reduzierte [125]. Zusätzlich konnten Guo *et al.* in Glioblastomzelllinien anhand des Matrigel-Assays die Inhibierung der Invasion durch BA zeigen. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt [138].

Untersuchungen zum Einfluss von DDP auf das Migrationsverhalten der GBM-Zelllinie U87MG zeigten, dass DDP die Migration unter Normoxie nur gering und unter Hypoxie nicht hemmt [106]. Ebenso wurde anhand von Nasopharynxkarzinomzellen gezeigt, dass DDP die Migration und Invasion nur geringfügig inhibiert [139].

Die eigenen Untersuchungen zeigten mittels Scratch-Assay, dass die Derivate DE9B und APC ähnlich wie BA die Migration der GBM-Zelllinien U251MG und LN229 sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie hemmen (Abb. 15). Um die Ergebnisse des Scratch-Assays zu bestätigen sollten weitere Tests wie der Boydenkammer-Assay oder die Bestimmung der Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen oder der Protease *Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator* durchgeführt werden. Um auszuschließen, dass Zelltodereignisse bzw. Proliferationseffekte das Ergebnis beeinflusst haben, wurde zum einen eine Substanzkonzentration gewählt, die in der Proliferationsanalyse kaum Effekte auf die Zellzahl hatte (Daten nicht gezeigt) und zum anderen eine Inkubationszeit gewählt (16 h), die knapp unter der Verdopplungszeit der GBM-Zelllinien lag. Rzeski *et al.* setzten in ihren Migrationsuntersuchungen an der GBM-Zelllinie C6 ebenso BA-Konzentrationen unterhalb der EC50 ein [124]. Um Proliferationseffekte minimieren bzw. ausschließen zu können, könnte für weitere Untersuchungen ein Proliferationshemmer, wie beispielsweise Mitomycin, eingesetzt werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Derivate APC und DE9B die Migration der GBM-Zelllinien U251MG und LN229 unter Normoxie und Hypoxie hemmten. Es ist bekannt, dass BA im Gegensatz zu DDP ebenso die Migration unter Normoxie und Hypoxie

inhibiert. Die Substanzen APC und DE9B haben somit die Fähigkeit der Migrationshemmung nach der Derivatisierung behalten.

## 5.4 Einfluss auf die Strahlensensitivität

Die Resistenz von GBM gegenüber einer Bestrahlung stellt ein zentrales Problem in der Behandlung dar. Trotzdem spielt Bestrahlung eine wichtige Rolle bei der Behandlung von GBM-Patienten. Die Maximaldosis ist durch das umliegende Normalgewebe deutlich beschränkt und meist nicht ausreichend, um den Tumor allein durch Bestrahlung zu behandeln. Die Kombination aus Chemo- und Strahlentherapie kann nach der radikalen Resektion des Tumors das mittlere Überleben von GBM-Patienten verbessern [21, 13]. Biston untersuchte *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell mit strahlenresistenten F98-GBM-Zellen die Wirkung der Kombination von Bestrahlung und photoaktivierbaren Chemotherapeutika am Beispiel von DDP und konnten zeigen, dass durch synergistische Effekte das Tumolvolumen reduziert und das Überleben der Versuchstiere deutlich verlängert wurde [140]. Die Effekte von DDP auf die DNA behindern die Reparaturmöglichkeiten von DNA-Schäden, die durch eine Bestrahlung induziert werden [141].

Bisher wurden nur wenige Untersuchungen zur Wirkung von BA auf die Radiosensitivität von GBM-Zellen durchgeführt. Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Behandlung mit BA (24 h Inkubation) in Kombination mit Bestrahlung unter Normoxie, v. a. aber unter Hypoxie zu einer Radiosensitivierung der GBM-Zelllinie U251MG führte [30]. Weiterhin konnten auch in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB231 radiosensitivierende Effekte unter Normoxie und verstärkt unter Hypoxie nachgewiesen werden [113]. Eine Erklärung für die verstärkten Effekte unter Hypoxie liefern die Westernblotanalysen, welche zeigten, dass BA die Hypoxie induzierte Expression von HIF-1 $\alpha$  sowie CA IX hemmt [30, 72]. Dies ist für die hypoxischen, therapieresistenten Tumorareale in GBM von besonderer Bedeutung. Weiterhin ist bekannt, dass Zellen in der G2/M-Phase am strahlensensibelsten sind [21, 142]. Da BA wie bereits beschrieben zu einem G2/M-Arrest in GBM-Zellen führte (Abb. 8), könnte auch dies eine Erklärung für die Radiosensitivierung darstellen. Weitere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten jedoch auch, dass BA auf das strahlenbiologische Verhalten der GBM-Zelllinie U343MG [30] und der Mammakarzinomzelllinie MCF7 [113] keinen Einfluss hatte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die radiosensitivierende Wirkung von BA zelllinienspezifisch variiert. Selzer *et al.* zeigten einen additiven Effekt von BA und Bestrahlung (2 Gy) in

Melanomzelllinien unter Normoxie und postulierten, dass BA einen anderen Wirkmechanismus als die Bestrahlung hat und somit beide Behandlungen unabhängig voneinander wirken. Ebenso konnten Eder-Czembirek *et al.* einen additiven Effekt von BA und Bestrahlung (4 Gy) in Kopf-Hals-Tumorzelllinien nachweisen [59].

Die Kombination aus der Behandlung mit dem BA-Derivat DE9B und Bestrahlung zeigte additive Effekte unter Normoxie, welche unter Hypoxie stärker ausfielen (Abb. 13). Synergistische Effekte waren, anders als bei BA, weder unter Normoxie noch unter Hypoxie zu messen. Durch die chemische Modifikation verliert DE9B offensichtlich die radio-sensitivierenden Eigenschaften von BA (Abb. 14, Tab. 6).

Dagegen zeigte die Kombination aus APC-Behandlung und Bestrahlung unter Normoxie und Hypoxie additive Effekte (Abb. 13), aber auch schwache radiosensitivierende Effekte unter Hypoxie (Abb. 14, Tab. 6). Allerdings fielen diese deutlich schwächer aus als bei BA. Eine mögliche Erklärung für die radiosensitivierenden Effekte könnte sein, dass APC wie BA unter Hypoxie die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  reduzierte (Abb. 15).

Die Derivate DE9B und APC sind somit potentielle Substanzen für eine Kombination mit Bestrahlung, da sie keine antagonistischen Effekte, sondern additive bzw. schwach synergistische Effekte zeigen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung von DDP gekoppelten BA-Derivaten für die Tumorthherapie aufzuklären und auf deren molekularen und strahlebiologischen Effekte zu charakterisieren.

## 6 Zusammenfassung

BA ist eine vielversprechende, potentielle Antitumor-Substanz, die bisher noch nicht in der Tumorthherapie genutzt wird. DDP ist ein erfolgreich eingesetztes Chemotherapeutikum. BA und DDP aktivieren die Apoptosekaskade über verschiedene Mechanismen. Beide Substanzen weisen jedoch auch nachteilige, limitierende Eigenschaften auf: einerseits die schlechte Löslichkeit von BA, andererseits die systemischen Nebenwirkungen sowie die Resistenzentstehung von DDP in vielen Tumoren. Durch chemische Modifikation wird versucht diese Limitationen zu beheben. Bspw. Oxaliplatin, ein Derivat von DDP, weist verbesserte Eigenschaften auf. Auch von BA wurde in den letzten Jahren eine große Anzahl von besser löslichen Derivaten synthetisiert und auf ihre Eigenschaften getestet. Die chemische Kopplung beider apoptoseauslösenden Substanzen in einem Molekül könnte die Löslichkeit verbessern, die nötige Dosis und somit die systemischen Nebenwirkungen verringern sowie die Resistenzentstehung vermeiden. In dieser Arbeit wurden die Derivate DE9B und APC untersucht. Das noch unkomplexierte Amin DE9B weist die höchste Zytotoxizität im SRB-Assay auf. Es hat stark veränderte Eigenschaften im Vergleich zur Vorläuferstruktur BA. So verliert DE9B die gesteigerte Wirksamkeit unter Hypoxie, die starke Hemmung des klonogenen Zellüberlebens und die Steigerung der Radiosensitivität. Das BA und DDP gekoppelte Derivat APC weist trotz umfangreicherer chemischer Modifikation ein ähnliches Zytotoxizitätsprofil auf wie BA mit zunehmender Wirksamkeit unter Hypoxie und einer effektiven Hemmung des klonogenen Langzeitüberlebens auf. Die Resistenz der GBM-Zelllinien gegenüber der DDP-Behandlung unter Hypoxie ist nicht mehr nachweisbar. In ihrer Wirkungsweise unterscheiden sich beide Derivate deutlich von den beiden Grundsubstanzen. Weder APC noch DE9B scheinen wie die Grundsubstanzen BA und DDP primär zu einem Zellzyklusarrest und apoptotischen Zelltod zu führen. DE9B und APC lösen in Abhängigkeit von der Zelllinie und des Sauerstoffgehaltes Apoptose, Nekrose und Autophagie aus. Sowohl APC als auch DE9B hemmen wie ihre Grundsubstanzen BA und DDP die Migration der GBM-Zelllinien. Beide Derivate sind für eine Kombinationstherapie mit Bestrahlung geeignet, da sie keine antagonistischen Effekte, sondern teilweise additive bis hin zu schwach synergistischen Effekten zeigen. Insgesamt wurden mit DE9B und APC zwei neue BA-Derivate synthetisiert, die für die Therapie von GBM interessante Eigenschaften aufweisen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die molekularen und strahlenbiologischen Effekte dieser Substanzen aufzuklären.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*: 87–108
2. Robert-Koch-Institut Gesundheit in Deutschland (2015). Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Gemeinsam getragen von RKI und Destatis, Berlin
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*: 97–109
4. Sánchez-Osuna M, Martínez-Escardó L, Granados-Colomina C, Martínez-Soler F, Pascual-Guiral S, Iglesias-Guimaraes V, Velasco R, Plans G, Vidal N, Tortosa A, Barcia C, Bruna J, Yuste VJ (2016) An intrinsic DFF40/CAD endonuclease deficiency impairs oligonucleosomal DNA hydrolysis during caspase-dependent cell death. A common trait in human glioblastoma cells. *Neuro-oncology*: 950–961
5. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2016) CBTRUS Statistical Report. Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro-oncology*: v1-v75
6. Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine*: 492–507
7. Krex D, Klink B, Hartmann C, Deimling A von, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G (2007) Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain: a journal of neurology*: 2596–2606
8. Farrell CJ, Plotkin SR (2007) Genetic causes of brain tumors. Neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurologic clinics*: 925-46
9. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*: 764–772
10. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology*: 1445–1453
11. Komori T (2017) The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. The Major Points of Revision. *Neurologia medico-chirurgica*: 1-11
12. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2015) S2k-Leitlinien: Gliome - Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-099l\\_S2k\\_Gliome\\_\\_2015-06.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome__2015-06.pdf). Gesehen 8. Oktober 2017
13. Stupp R, van den Bent, Martin J, Hegi ME (2005) Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Current neurology and neuroscience reports*: 198–206
14. Konsensus-Statement: State of the Art-Therapiestandard bei neu diagnostiziertem Glioblastoma multiforme. [http://uvm.at.dedi3025.your-server.de/backup/213.145.228.170/med-diplom.at/fortbildung/glioblastoma\\_multi-forme\\_01.html](http://uvm.at.dedi3025.your-server.de/backup/213.145.228.170/med-diplom.at/fortbildung/glioblastoma_multi-forme_01.html). Gesehen 8. Oktober 2017

15. Wang Y, Kong X, Guo Y, Wang R, Ma W (2017) Continuous dose-intense temozolomide and cisplatin in recurrent glioblastoma patients. *Medicine*: e6261
16. Hegi Monika E., Diserens Annie-Claire, Gorlia Thierry, Hamou Marie-France, de Tribolet Nicolas, Weller Michael, Kros Johan M., Hainfellner Johannes A., Mason Warren, Mariani Luigi, Bromberg Jacqueline E.C., Hau Peter, Mirimanoff René O., Cairncross J. Gregory, Janzer Robert C., Stupp Roger (2005) MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*: 997–1003
17. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M (2012) Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*: 707–715
18. Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R (2012) Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*: 916–926
19. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M (2001) Treatment resistance of solid tumors. Role of hypoxia and anemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)*: 243–259
20. Spiro IJ, Rice GC, Durand RE, Stickler R, Ling CC (1984) Cell killing, radiosensitization and cell cycle redistribution induced by chronic hypoxia. *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics*: 1275–1280
21. Sauer R *Strahlentherapie und Onkologie. MTAR-Ausbildung, 4. überarb. Aufl.* Urban & Fischer, München, Jena (2003): S. 135-165; S. 333-336
22. Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M (1991) Oxygenation of human tumors. Evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer research*: 3316–3322
23. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P (1996) Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer research*: 4509–4515
24. Rampling R, Cruickshank G, Lewis AD, Fitzsimmons SA, Workman P (1994) Direct measurement of pO<sub>2</sub> distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics*: 427–431
25. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW (1996) Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer research*: 941–943
26. Vaupel P, Mayer A, Hockel M (2004) Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods in enzymology*: 335–354
27. Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*: 207–214
28. Sedlakova O, Svastova E, Takacova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S (2014) Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Frontiers in physiology*: 400

29. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC (1953) The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*: 638–648
30. Bache M, Zschornak MP, Passin S, Keßler J, Wichmann H, Kappler M, Paschke R, Kaluđerović GN, Kommera H, Taubert H, Vordermark D (2011) Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions. *Radiation Oncology*: 111
31. Kessler J, Hahnel A, Wichmann H, Rot S, Kappler M, Bache M, Vordermark D (2010) HIF-1 $\alpha$  inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *BMC cancer*: 605
32. Pawel J von, Roemeling R von, Gatzemeier U, Boyer M, Elisson LO, Clark P, Talbot D, Rey A, Butler TW, Hirsh V, Olver I, Bergman B, Ayoub J, Richardson G, Dunlop D, Arcenas A, Vescio R, Viallet J, Treat J (2000) Tirapazamine plus cisplatin versus cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A report of the international CATAPULT I study group. *Cisplatin and Tirapazamine in Subjects with Advanced Previously Untreated Non-Small-Cell Lung Tumors. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*: 1351–1359
33. Brown JM (1993) SR 4233 (tirapazamine). A new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *British journal of cancer*: 1163–1170
34. Sweeney PJ, Nicolae D, Ignacio L, Chen L, Roach M, Wara W, Marcus KC, Vijayakumar S (1998) Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in cancer patients receiving radiotherapy. Final report of a randomized, open-labelled, phase II trial. *British journal of cancer*: 1996–2002
35. Herrmann T, Baumann M, Dörr W *Klinische Strahlenbiologie. Kurz und bündig*, 4., völlig überarb. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München (2006): S. 55-72
36. Hall EJ, Giaccia AJ *Radiobiology for the radiologist*, 7. ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2012): pp. 5-15
37. Brown JM (2007) Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods in enzymology*: 297–321
38. Giaccone G (2000) Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*: 9-17; discussion 37-8
39. Boulikas T, Vougiouka M (2004) Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review). *Oncology reports*: 559–595
40. Voigt W, Dietrich A, Schmoll H-J (2006) Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. *Cisplatin und seine Analoga. Pharmazie in unserer Zeit*: 134–143
41. Dietrich A, Mueller T, Paschke R, Kalinowski B, Behlendorf T, Reipsch F, Fruehauf A, Schmoll H-J, Kloft C, Voigt W (2008) 2-(4-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-undecyl)-propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II): a novel platinum compound that overcomes cisplatin resistance and induces apoptosis by mechanisms different from that of cisplatin. *Journal of medicinal chemistry*: 5413–5422
42. Carminati PO, Mello SS, Fachin AL, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Carlotti CG, Donadi EA, Passos, Geraldo Aleixo Silva, Sakamoto-Hojo ET (2010) Alterations in gene expression profiles correlated with cisplatin cytotoxicity in the glioma U343 cell line. *Genetics and molecular biology*: 159–168

43. Fuertes MA, Alonso C, Perez JM (2003) Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical reviews*: 645–662
44. Gómez-Ruiz S, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Kaluđerović GN (2012) On the discovery, biological effects, and use of Cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorganic chemistry and applications*: 140284
45. Thomas Karow RL-R *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 16. Aufl. (2008): S. 889
46. Liang BC (1996) Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines. *Journal of neuro-oncology*: 149–155
47. Hennequin C, Favaudon V (2002) Biological basis for chemo-radiotherapy interactions. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*: 223–230
48. Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP (2010) Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. *Anti-Cancer Drugs*: 215–227
49. Ali-Seyed M, Jantan I, Vijayaraghavan K, Bukhari SNA (2016) Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms of a Promising Anticancer Therapy. *Chemical biology & drug design*: 517–536
50. Udeani GO, Zhao GM, Geun Shin Y, Cooke BP, Graham J, Beecher CW, Kinghorn AD, Pezzuto JM (1999) Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharmaceutics & drug disposition*: 379–383
51. Kwon HJ, Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, Yu J (2002) Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Japanese journal of cancer research : Gann*: 417–425
52. Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM (1995) Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature medicine*: 1046–1051
53. Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, Formelli F (2002) Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer letters*: 17–25
54. Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B, Kodym R (2000) Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology*: 935–940
55. Ehrhardt H, Fulda S, Führer M, Debatin KM, Jeremias I (2004) Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Leukemia*: 1406–1412
56. Kessler JH, Mullauer FB, de Roo, Guido M., Medema JP (2007) Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Letters*: 132–145
57. Thurnher D, Turhani D, Pelzmann M, Wannemacher B, Knerer B, Formanek M, Wacheck V, Selzer E (2003) Betulinic acid. A new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head & neck*: 732–740
58. Eder-Czembirek C, Czembirek C, Erovic BM, Selzer E, Turhani D, Vormittag L, Thurnher D (2005) Combination of betulinic acid with cisplatin--different cytotoxic effects in two head and neck cancer cell lines. *Oncology reports*: 667–671

59. Eder-Czembirek C, Erovic BM, Czembirek C, Brunner M, Selzer E, Pötter R, Thurnher D (2010) Betulinic Acid a Radiosensitizer in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Strahlentherapie und Onkologie*: 143–148
60. Jeremias I, Steiner HH, Benner A, Debatin K-M, Herold-Mende C (2004) Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells. *Acta Neurochirurgica*: 721-729
61. Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM (1999) Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. *Klinische Padiatrie*: 319–322
62. Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nunez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM (1997) Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer research*: 4956–4964
63. Schmidt ML, Kuzmanoff KL, Ling-Indeck L, Pezzuto JM (1997) Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*: 2007–2010
64. Wick W, Grimm C, Wagenknecht B, Dichgans J, Weller M (1999) Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*: 1306–1312
65. Fulda S, Debatin KM (2000) Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. *Medical and pediatric oncology*: 616–618
66. Galgon T, Wohlrab W, Drager B (2005) Betulinic acid induces apoptosis in skin cancer cells and differentiation in normal human keratinocytes. *Experimental dermatology*: 736–743
67. Kim DS, Pezzuto JM, Pisha E (1998) Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*: 1707–1712
68. Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, Safe S (2007) Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer research*: 2816–2823
69. Mullauer FB, van Bloois L, Daalhuisen JB, Ten Brink, Marieke S., Storm G, Medema JP, Schiffelers RM, Kessler JH (2011) Betulinic acid delivered in liposomes reduces growth of human lung and colon cancers in mice without causing systemic toxicity. *Anti-Cancer Drugs*: 223–233
70. Lena A, Rechichi M, Salvetti A, Bartoli B, Vecchio D, Scarcelli V, Amoroso R, Benvenuti L, Gagliardi R, Gremigni V, Rossi L (2009) Drugs targeting the mitochondrial pore act as cytotoxic and cytostatic agents in temozolomide-resistant glioma cells. *Journal of Translational Medicine*: 1-13
71. Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM (1998) Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer research*: 4453–4460
72. Bache M, Bernhardt S, Passin S, Wichmann H, Hein A, Zschornak M, Kappler M, Taubert H, Paschke R, Vordermark D (2014) Betulinic acid derivatives NVX-207 and B10 for treatment of glioblastoma--an in vitro study of cytotoxicity and radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*: 19777–19790

73. Jung G-R, Kim K-J, Choi C-H, Lee T-B, Han SI, Han H-K, Lim S-C (2007) Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*: 277–285
74. Fulda S, Debatin K-M (2005) Sensitization for Anticancer Drug-Induced Apoptosis by Betulinic Acid. *Neoplasia*: 162–170
75. Ganguly A, Das B, Roy A, Sen N, Dasgupta SB, Mukhopadhyay S, Majumder HK (2007) 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 research*: 11848–11858
76. Jiang M, Zhou Y, Yang M, Zhang R, Zou M, Cai G, Pan D (2010) Influence of betulinic acid on proliferation, migration, cell cycle and apoptosis of pancreatic cancer cells. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*: 3056–3059
77. Karna E, Szoka L, Palka JA (2010) Betulinic acid inhibits the expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*: 15–20
78. Noda Y, Kaiya T, Kohda K, Kawazoe Y (1997) Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing. *Chemical & pharmaceutical bulletin*: 1665–1670
79. Wang HM, Soica CM, Wenz G (2012) A comparison investigation on the solubilization of betulin and betulinic acid in cyclodextrin derivatives. *Natural product communications*: 289–291
80. Jager S, Winkler K, Pfuller U, Scheffler A (2007) Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album L.* *Planta medica*: 157–162
81. Suresh C, Zhao H, Gumbs A, Chetty CS, Bose HS (2012) New ionic derivatives of betulinic acid as highly potent anti-cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*: 1734–1738
82. Tan JM, Karthivashan G, Arulselvan P, Fakurazi S, Hussein MZ (2014) Sustained Release and Cytotoxicity Evaluation of Carbon Nanotube-Mediated Drug Delivery System for Betulinic Acid. *Journal of Nanomaterials*: 1–11
83. Drag-Zalesinska M, Kulbacka J, Saczko J, Wysocka T, Zabel M, Surowiak P, Drag M (2009) Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*: 4814–4817
84. Csuk R, Sczepek R, Siewert B, Nitsche C (2013) Cytotoxic betulin-derived hydroxypropargylamines trigger apoptosis. *Bioorganic & medicinal chemistry*: 425–435
85. Ding W, Sun M, Luo S, Xu T, Cao Y, Yan X, Wang Y (2013) A 3D QSAR study of betulinic acid derivatives as anti-tumor agents using topomer CoMFA. Model building studies and experimental verification. *Molecules (Basel, Switzerland)*: 10228–10241
86. Jeong HJ, Chai HB, Park SY, Kim DS (1999) Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*: 1201–1204
87. Baratto LC, Porsani MV, Pimentel IC, Pereira Netto AB, Paschke R, Oliveira BH (2013) Preparation of betulinic acid derivatives by chemical and biotransformation

- methods and determination of cytotoxicity against selected cancer cell lines. *European journal of medicinal chemistry*: 121–131
88. Drąg-Zalesińska M, Wysocka T, Borska S, Drąg M, Poręba M, Choromańska A, Kulbacka J, Sączko J (2015) The new esters derivatives of betulin and betulinic acid in epidermoid squamous carcinoma treatment - In vitro studies. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*: 91–97
  89. Kommera H, Kaluđerović GN, Dittrich S, Kalbitz J, Dräger B, Mueller T, Paschke R (2010) Carbamate derivatives of betulinic acid and betulin with selective cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*: 3409–3412
  90. Kommera H, Kaluderovic GN, Bette M, Kalbitz J, Fuchs P, Fulda S, Mier W, Paschke R (2010) In vitro anticancer studies of alpha- and beta-D-glucopyranose betulin anomers. *Chemico-biological interactions*: 128–136
  91. Kommera H, Kaluderovic GN, Kalbitz J, Paschke R (2010) Synthesis and anticancer activity of novel betulinic acid and betulin derivatives. *Archiv der Pharmazie*: 449–457
  92. You Y-J, Kim Y, Nam N-H, Ahn B-Z (2003) Synthesis and cytotoxic activity of A-ring modified betulinic acid derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*: 3137–3140
  93. Gauthier C, Legault J, Lavoie S, Rondeau S, Tremblay S, Pichette A (2009) Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins. *Journal of natural products*: 72–81
  94. Kvasnica M, Sarek J, Klinotova E, Dzubak P, Hajduch M (2005) Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*: 3447–3454
  95. Santos RC, Salvador JAR, Cortes R, Pachon G, Marin S, Cascante M (2011) New betulinic acid derivatives induce potent and selective antiproliferative activity through cell cycle arrest at the S phase and caspase dependent apoptosis in human cancer cells. *Biochimie*: 1065–1075
  96. Rajendran P, Jaggi M, Singh MK, Mukherjee R, Burman AC (2008) Pharmacological evaluation of C-3 modified Betulinic acid derivatives with potent anticancer activity. *Investigational new drugs*: 25–34
  97. Emmerich D, Vanchanagiri K, Baratto LC, Schmidt H, Paschke R (2014) Synthesis and studies of anticancer properties of lupane-type triterpenoid derivatives containing a cisplatin fragment. *European journal of medicinal chemistry*: 460–466
  98. Smith RA, Yuan H, Weissleder R, Cantley LC, Josephson L (2009) A wortmannin-cetuximab as a double drug. *Bioconjugate chemistry*: 2185–2189
  99. Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Łos M (2013) Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways. Implications for cancer therapy development. *Journal of cellular and molecular medicine*: 12–29
  100. Stephan Bernhardt (2012) Betulinsäure und Betulinsäurederivate als potentielle Effektoren einer strahlentherapeutischen Behandlung in Glioblastomzelllinien. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
  101. Emdad L, Qadeer ZA, Bederson LB, Kothari HP, Uzzaman M, Germano IM (2011) Is there a common upstream link for autophagic and apoptotic cell death in human high-grade gliomas? *Neuro-oncology*: 725–735

102. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, Black K, Sisti M, Brem S, Mohr G (1995) Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet* (London, England): 1008–1012
103. Capdevila L, Cros S, Ramirez J-L, Sanz C, Carrato C, Romeo M, Etxaniz O, Hostalot C, Massuet A, Cuadra JL, Villa S, Balana C (2014) Neoadjuvant cisplatin plus temozolomide versus standard treatment in patients with unresectable glioblastoma or anaplastic astrocytoma. A differential effect of MGMT methylation. *Journal of neuro-oncology*: 77–84
104. Silvani A, Eoli M, Salmaggi A, Lamperti E, Maccagnano E, Broggi G, Boiardi A (2004) Phase II trial of cisplatin plus temozolomide, in recurrent and progressive malignant glioma patients. *Journal of neuro-oncology*: 203–208
105. Brandes AA, Basso U, Reni M, Vastola F, Tosoni A, Cavallo G, Scopece L, Ferreri AJ, Panucci MG, Monfardini S, Ermani M (2004) First-line chemotherapy with cisplatin plus fractionated temozolomide in recurrent glioblastoma multiforme. A phase II study of the Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*: 1598–1604
106. Thakor FK, Wan K-W, Welsby PJ, Welsby G (2017) Pharmacological effects of asiatic acid in glioblastoma cells under hypoxia. *Molecular and Cellular Biochemistry*: 179–190
107. Jalota A, Kumar M, Das BC, Yadav AK, Chosdol K, Sinha S (2016) Synergistic increase in efficacy of a combination of 2-deoxy-D-glucose and cisplatin in normoxia and hypoxia. Switch from autophagy to apoptosis. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*: 12347–12358
108. Banasiak D, Barnetson AR, Odell RA, Mameghan H, Russell PJ (1999) Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line. *Radiation oncology investigations*: 77–85
109. Wannemacher M, Wenz F, Debus J (Hrsg) *Strahlentherapie*, 2., überarb. Aufl. Springer, Berlin (2013): S. 87-98
110. Ikeda H, Nakano G, Nagashima K, Sakamoto K, Harasawa N, Kitamura T, Nakamura T, Nagamachi Y (1987) Verapamil enhancement of antitumor effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) in nude mouse-grown human neuroblastoma. *Cancer research*: 231–234
111. Kondo Y, Kondo S (2006) Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*: 85–90
112. Yamai H, Sawada N, Yoshida T, Seike J, Takizawa H, Kenzaki K, Miyoshi T, Kondo K, Bando Y, Ohnishi Y, Tangoku A (2009) Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *International journal of cancer. Journal international du cancer*: 952–960
113. Bache M, Munch C, Guttler A, Wichmann H, Theuerkorn K, Emmerich D, Paschke R, Vordermark D (2015) Betulinyl Sulfamates as Anticancer Agents and Radiosensitizers in Human Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*: 26249–26262

114. Pauwels B, Korst AEC, Pooter CMJ de, Pattyn GGO, Lambrechts HAJ, Baay MFD, Lardon F, Vermorken JB (2003) Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer chemotherapy and pharmacology*: 221–226
115. Griffon G, Merlin JL, Marchal C (1995) Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. *Anti-cancer drugs*: 115–123
116. Perez RP, Godwin AK, Handel LM, Hamilton TC (1993) A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*: 395–399
117. Daniel Emmerich (2012) Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Anti-Tumor-Wirkung von Acetylbetulininsäure-cis-Platin-Konjugaten. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
118. Ahmad FBH, Ghaffari Moghaddam M, Basri M, Abdul Rahman MB (2010) Anti-cancer activity of 3-O-acylated betulinic acid derivatives obtained by enzymatic synthesis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*: 1025–1029
119. Haar CP, Hebbar P, Wallace GC, Das A, Vandergrift WA, Smith JA, Giglio P, Patel SJ, Ray SK, Banik NL (2012) Drug Resistance in Glioblastoma: A Mini Review. *Neurochemical Research*: 1192–1200
120. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Larocca LM, Peschle C, Maria R de (2006) Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death and Differentiation*: 1238–1241
121. Eisele G, Weller M (2013) Targeting apoptosis pathways in glioblastoma. *Cancer Letters*: 335–345
122. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R (2005) Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*: 2411–2422
123. Wagenknecht B, Trepel M, Deimling A von, Grimm C, Rollbrocker B, Hayashi Y, Lang F, Dichgans J, Gulbins E, Weller M (1997) p53 Accumulation Promotes Dephosphorylation and Proteolytic Cleavage of Retinoblastoma Protein in Human Malignant Glioma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*: 304–311
124. Rzeski W, Stepulak A, Szymanski M, Sifringer M, Kaczor J, Wejksza K, Zdzisinska B, Kandefer-Szerszen M (2006) Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*: 11–20
125. Yoon JJ, Lee YJ, Kim JS, Kang DG, Lee HS (2010) Betulinic acid inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration. *Journal of cellular biochemistry*: 1501–1511
126. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & development*: 812–821
127. Amellem O, Löffler M, Pettersen EO (1994) Regulation of cell proliferation under extreme and moderate hypoxia. The role of pyrimidine (deoxy)nucleotides. *British journal of cancer*: 857–866
128. Fulda S (2009) Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. *Molecular nutrition & food research*: 140–146

129. Henri Wichmann Bedeutung von EGFR und HER2 in Glioblastomen und Weichteilsarkomen- Tumorbiologische und prognostische Untersuchungen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
130. Chadalapaka G, Jutooru I, Burghardt R, Safe S (2010) Drugs that target specificity proteins downregulate epidermal growth factor receptor in bladder cancer cells. *Molecular cancer research: MCR*: 739–750
131. Sorenson CM, Barry MA, Eastman A (1990) Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *Journal of the National Cancer Institute*: 749–755
132. Kondo S, Yin D, Morimura T, Kubo H, Nakatsu S, Takeuchi J (1995) Combination therapy with cisplatin and nifedipine induces apoptosis in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human glioblastoma cells. *British journal of cancer*: 282–289
133. Babbar N, Hacker A, Huang Y, Casero RA, JR (2006) Tumor necrosis factor alpha induces spermidine/spermine N1-acetyltransferase through nuclear factor kappaB in non-small cell lung cancer cells. *The Journal of biological chemistry*: 24182–24192
134. Agostinelli E, Belli F, Molinari A, Condello M, Palmigiani P, Vedova LD, Marra M, Seiler N, Arancia G (2006) Toxicity of enzymatic oxidation products of spermine to human melanoma cells (M14): sensitization by heat and MDL 72527. *Biochimica et biophysica acta*: 1040–1050
135. Calcabrini A, Arancia G, Marra M, Crateri P, Befani O, Martone A, Agostinelli E (2002) Enzymatic oxidation products of spermine induce greater cytotoxic effects on human multidrug-resistant colon carcinoma cells (LoVo) than on their wild-type counterparts. *International journal of cancer*: 43–52
136. Gonzalez P, Mader I, Tchoghadjian A, Enzenmüller S, Cristofanon S, Basit F, Debatin K-M, Fulda S (2012) Impairment of lysosomal integrity by B10, a glycosylated derivative of betulinic acid, leads to lysosomal cell death and converts autophagy into a detrimental process. *Cell Death and Differentiation*: 1337–1346
137. Urban M, Sarek J, Tislerova I, Dzubak P, Hajduch M (2005) Influence of esterification and modification of A-ring in a group of lupane acids on their cytotoxicity. *Bioorganic & medicinal chemistry*: 5527–5535
138. Guo Y-B, Shao Y-M, Chen J, Xu S-B, Zhang X-D, Wang M-R, Liu H-Y (2016) Effect of overexpression of HOX genes on its invasive tendency in cerebral glioma. *Oncology letters*: 75–80
139. Sun X-J, Zhang P, Li H-H, Jiang Z-W, Jiang C-C, Liu H (2014) Cisplatin combined with metformin inhibits migration and invasion of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating E-cadherin and MMP-9. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*: 4019–4023
140. Biston M-C (2004) Cure of Fisher Rats Bearing Radioresistant F98 Glioma Treated with cis-Platinum and Irradiated with Monochromatic Synchrotron X-Rays. *Cancer Research*: 2317–2323
141. Turchi JJ, Henkels KM, Zhou Y (2000) Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK. *Nucleic acids research*: 4634–4641
142. Pawlik TM, Keyomarsi K (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*: 928–942

## 8 Thesen

1. Das BA-Derivat DE9B zeigt unter Normoxie die stärkste zytotoxische Wirkung auf die untersuchten GBM-Zelllinien, das BA-Derivat APC ist hingegen weniger effektiv und zeigt ein ähnliches Zytotoxizitätsprofil wie BA.
2. APC zeigt wie BA eine erhöhte Effektivität unter Hypoxie, während die Zytotoxizität von DE9B unter Hypoxie etwas abnimmt.
3. Die zytotoxischen Effekte von APC wirken ebenso effektiv auf das klonogene Zellüberleben, DE9B hingegen hemmt weniger effektiv das klonogene Zellüberleben im Vergleich zu den akuten zytotoxischen Effekten.
4. Weder DE9B noch APC beeinflussen die Zellzyklusverteilung unter Normoxie und Hypoxie.
5. DE9B und APC lösen in Abhängigkeit von der Zelllinie und dem Sauerstoffgehalt verschiedene Zelltodmechanismen unterschiedlich stark aus. Neben Apoptose und Nekrose zeigen erste Untersuchungen auch das Auftreten von Autophagie.
6. DE9B löst in der Zelllinie LN229 stärker eine Caspase-3/7-Aktivierung aus als in der Zelllinie U251MG und führt unter Normoxie zu einer stärkeren Nekroseinduktion als unter Hypoxie. Autophagie wird in beiden Zelllinien durch DE9B sowohl unter Normoxie und Hypoxie ausgelöst.
7. APC induziert in der Zelllinie LN229 Apoptose, aber kaum Nekrose und in der Zelllinie U251MG unter Normoxie Nekrose, hingegen unter Hypoxie Apoptose. Autophagie wird durch APC ebenso wie durch DDP nur unter Normoxie ausgelöst.
8. Die Behandlung mit DE9B bzw. APC führt zur Reduktion der Migration von den Zelllinien U251MG und LN229 unter Normoxie und Hypoxie.
9. DE9B beeinflusst die Radiosensitivität der GBM-Zellen nicht, eine Behandlung mit APC führt zu einer geringen Radiosensitivierung und Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalts unter Hypoxie.

## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

---

Ort, Datum, Unterschrift

## Erklärung über frühere Promotionsversuche

Gemäß § 7 (2) der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vom 09.12.2008 erkläre ich hiermit, keine früheren Promotionsversuche unternommen zu haben.

---

Ort, Datum, Unterschrift

# Lebenslauf

## Persönliches

\* 26.01.1990 in Gera

Ledig, keine Kinder

## Beruf

seit 09/17 Assistenzärztin für Pathologie  
Institut für Pathologie am Städtischen Klinikum Dessau-Roßlau

## Studium

10/09 – 12/16 Martin-Luther-Universität Halle(Saale)-Wittenberg  
Studium Humanmedizin, Abschlussnote: 2,1

## Praktisches Jahr

11/15 – 10/16 1. Terial: Pathologie Städtisches Klinikum Dessau-Roßlau  
2. Terial: Chirurgie Mater Dei Hospital Malta  
3. Terial: Innere Medizin Krankenhaus St. Elisabeth&St. Barbara Halle

## Stipendien, Kongresse und Veröffentlichungen

03/15 – 06/15 Leonardostipendium: Auslandsterial in Malta

10/14 Bache M, Bernhardt S, Passin S, Wichmann H, Hein A, Zschornak M, Kappler M, Taubert H, Paschke R, Vordermark D.  
Betulinic Acid Derivates MVX-207 and B10 for Treatment of Glioblastoma - An in Vitro Study of Cytotoxicity and Radiosensitization.

04/13 – 03/14 Universitätsklinikum Halle (Saale): Promotionskolleg Medizin  
Mitglied und Förderung durch das Modul 6: Promotionsstipendium

02/14 23. Symposium Experimentelle Strahlenbiologie und Klinische Strahlentherapie in Tübingen (Buchbeitrag, Posterpräsentation)

10/13 – 11/13 Institute for Biological Research „Sinisa Stankovic“ University Belgrade

09/13 XV. Bilaterales Symposium in Poznan (Posterpräsentation)

05/13 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie in Berlin (Posterpräsentation)

## Schulbildung

06/08 Zabelgymnasium Gera; Abschlussnote: 1,6

## 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 sowie Dr. rer. nat. Bache für die Überlassung des Themas, der sehr guten Betreuung sowie für die Durchsicht dieser Dissertation.

Ich danke Prof. Dr. rer. nat. Paschke für die Bereitstellung der Substanzen, für die vielen hilfreichen Ratschläge und für die Übernahme des Gutachtens.

Diese Dissertation entstand im Rahmen des „Promotionskolleg Medizin“ des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter der Leitung von Prof. Dr. Stang. An dieser Stelle vielen Dank an die Steuergruppe sowie meine Kobetreuerin des Promotionskollegs PD Dr. rer. nat. Bartling für zahlreiche entscheidende Hinweise.

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 und Dr. rer. nat. Henri Wichmann für die unzähligen Ratschläge bei den praktischen Arbeiten wie auch beim Schreiben der Dissertation. Ich danke Dr. rer. nat. Mathias Kappler und Katharina Theuerkorn, die mir stets mit wertvollem Rat zur Seite standen. Herzlichen Dank an Gabi Thomas und Kathrin Spröte für die Einführung in die Methodik und außerordentliche Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Meinen Eltern danke ich für ihr Vertrauen, für die moralische Unterstützung und sorgfältiges Fehlerlesen.