

**Molekular- und strahlenbiologische Untersuchungen zur Wirkung  
von Betulinsäure und Betulin in humanen Glioblastomzelllinien  
unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Martin Paul Zschornak  
geboren am 11. September 1986 in Hoyerswerda  
Betreuer: Prof. Dr. D. Vordermark  
Gutachter: 1. Prof. Dr. D. Vordermark  
2. Prof. Dr. G. Posern  
3. Prof. Dr. F. Rödel, Frankfurt/M.

14.06.2022  
26.07.2022

Ich widme diese Arbeit den Patient\*innen.

## Referat

Als aggressivster und häufigster Hirntumor im Erwachsenenalter, stellt sich das Glioblastom (GBM) trotz multimodaler Therapie mit einer infausten Prognose dar. Aufgrund des invasiven, rapiden Wachstums sowie hypoxischer Gewebsanteile mit Chemo- und Radioresistenz existiert keine suffiziente onkologische Therapie.

Betulinsäure (BS), ein Naturstoff der Birkenrinde, hat interessante Eigenschaften für die Tumorthherapie. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von BS auf zell- und strahlenbiologische Eigenschaften von Gliomzelllinien unter Normoxie und Hypoxie zu untersuchen. Die Zellen wurden nach BS-Behandlung am Linearbeschleuniger mit Photonen bestrahlt und im Anschluss erfolgten Experimente zur Zytotoxizität, klonogenem Überleben, Apoptoseinduktion, Strahlensensitivität, Zellzyklusregulation und Migration. Es wurden RNA-Analysen für die Expression von Hif-1 $\alpha$ , CA-IX, GLUT-1 und SVV durchgeführt und der Proteingehalt des Apoptosemarkers PARP und Apoptoseinhibitors SVV bzw. des Hypoxiemarkers Hif-1 $\alpha$  bestimmt.

Die Analysen zur Zytotoxizität zeigten eine Abnahme des klonogenen Zellüberlebens mit steigender BS Konzentration und eine erhöhte Zytotoxizität unter hypoxischen Bedingungen. Der mRNA- und Proteingehalt der Hypoxiemarker Hif-1 $\alpha$  und CA-IX wurde durch eine BS-Behandlung reduziert. Die Westernblots wiesen nach BS-Behandlung einen erhöhten Proteingehalt des Apoptoseproteins PARP und einen verminderten Proteingehalt des Apoptoseinhibitors SVV auf. BS hemmte effektiv die Migration und leitete in beiden Zelllinien Apoptose und Nekrose ein. In Kombination mit Bestrahlung wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in der Zelllinie U343MG additive und in der U251MG radiosensitivierende Effekte nachgewiesen. Dieser Unterschied korrelierte mit den Effekten auf den Zellzyklus. Betulin (Bet) zeigte insgesamt geringer ausgeprägte Ergebnisse.

BS ist geeignet die Effekte einer Tumorthherapie insbesondere in hypoxischen Tumoren zu verbessern. Die Kombination von BS mit einer Radiatio an GBM führt zu additiven Effekten bzw. einer Radiosensitivierung. *In vivo* Studien und Kombinationen mit neuen BS-Derivaten sollten diese Untersuchungen fortführen.

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Glioblastoma Multiforme</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Einteilung	1
1.1.2	Klinik, Diagnostik und Therapie	3
1.1.3	Prognose, limitierte Therapieoptionen und aktuelle Forschung	5
<b>1.2</b>	<b>Tumorhypoxie und Radiatio</b>	<b>7</b>
<b>1.3</b>	<b>Betulinsäure und Betulin</b>	<b>10</b>
1.3.1	Bedeutung von Betulinsäure und Betulin	10
1.3.2	Wirkmechanismen der Betulinsäure	12
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>15</b>
<b>3.3</b>	<b>Antikörper</b>	<b>16</b>
<b>3.4</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>16</b>
<b>3.5</b>	<b>Kits</b>	<b>17</b>
<b>3.6</b>	<b>Puffer, Medien und Lösungen</b>	<b>17</b>
3.6.1	Zellkultivierung	17
3.6.2	Annexin-V/PI-Assay	17
3.6.3	Zellzyklus-Analyse	17
3.6.4	RNA-Isolation	17
3.6.5	Protein-Isolation	18
3.6.6	Western Blot	18
<b>3.7</b>	<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>18</b>
<b>3.8</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>20</b>
3.8.1	Kultivierungsbedingungen und Kryokonservierung	20
3.8.2	Zellzahlbestimmung und Zellwachstumsanalyse	20
3.8.3	Betulin- und Betulinsäureaufbereitung	21
3.8.4	Klonogenitätstest	21
3.8.5	Apoptose-Assays	22
3.8.6	Annexin-V/PI-Assay	22
3.8.7	DAPI-Analyse	23
3.8.8	Migrationstests	24
3.8.9	Hypoxische Kulturbedingungen	26

<b>3.9</b>	<b>Durchflusszytometrische Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.9.1	Zellzyklus-Analysen.....	27
3.9.2	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen in Ethanol.....	27
3.9.3	Messung am FACScalibur.....	28
<b>3.10</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.10.1	RNA-Isolierung aus Zellkulturen.....	28
3.10.2	RNA-Quantifizierung.....	29
3.10.3	Reverse Transkription.....	29
3.10.4	Quantitative Real-Time-PCR mittels QuantiTect SYBR Green PCR Kit.....	30
3.10.5	Multiplex-PCR.....	31
3.10.6	Proteinisolierung aus Zellkulturen mittels RIPA-Lysepuffer.....	32
3.10.7	Quantifizierung des Proteingehaltes.....	32
3.10.8	Western Blot.....	32
3.10.9	Statistische Auswertung.....	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Proliferation und Langzeitüberleben unter Betulinsäure-Inkubation</b> .....	<b>35</b>
4.1.1	Zellwachstum in Abhängigkeit von der Betulinsäure-Konzentration.....	35
4.1.2	Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der Betulinsäure-Konzentration unter Normoxie.....	36
4.1.3	Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der Betulinsäure-Konzentration und vom Sauerstoffgehalt.....	36
<b>4.2</b>	<b>Analyse des Zellzyklus nach Betulinsäure-Behandlung</b> .....	<b>37</b>
4.2.1	Zellzyklusuntersuchungen an Gliomzellen 24 h und 48 h nach Betulinsäure-Behandlung und Radiatio unter Hypoxie.....	37
<b>4.3</b>	<b>Effekte von Betulinsäure und Bestrahlung auf die Apoptoseinduktion von GBM-Zellen</b> .....	<b>40</b>
4.3.1	DAPI-Analyse zur Beurteilung morphologischer Kriterien der Apoptose nach Betulinsäure-Behandlung.....	41
4.3.2	Annexin-V/PI Färbung nach Betulinsäure-Behandlung unter Hypoxie.....	42
4.3.3	Gegenüberstellung der Wirkung von Betulinsäure unter Normoxie und Hypoxie nach Annexin-V/PI-Färbung.....	43
4.3.4	Fluoreszenzmikroskopie und Annexin-V/PI-Färbung der U343MG nach Betulinsäure-Behandlung unter Hypoxie.....	43
4.3.5	Vergleich von Normoxie und Hypoxie unter Betulinsäure-Behandlung nach 24 h in Zelllinie U343MG mittels Durchflusszytometrie nach Annexin-V/PI-Färbung.....	44
4.3.6	Optimierung der Inkubationszeit von Betulinsäure unter Normoxie und Hypoxie mittels Annexin-V/PI-Färbung und Durchflusszytometrie.....	45
<b>4.4</b>	<b>RNA-Untersuchungen nach Betulinsäure-Behandlung</b> .....	<b>47</b>
4.4.1	Einfluss von Betulinsäure auf die mRNA-Expression der Hypoxiemarker Hif-1 $\alpha$ , GLUT-1, CA-IX und des Apoptoseinhibitors SVV in der U251MG unter Hypoxie und Radiatio mittels qt-PCR.....	48
<b>4.5</b>	<b>Protein-Analysen von PARP, Hif-1<math>\alpha</math> und SVV nach Betulinsäure-Behandlung</b> .....	<b>49</b>
4.5.1	Einfluss von Betulinsäure und Bestrahlung auf die Protein-Expressionslevel von PARP, Hif-1 $\alpha$ und SVV in U251MG und U343MG.....	49
4.5.2	Einfluss der Inkubationsdauer von Betulinsäure auf die Protein-Expressionslevel von PARP und Hif-1 $\alpha$ in U251MG-Zellen.....	50
<b>4.6</b>	<b>Effekte von Betulinsäure auf die Migration von Gliomzelllinien</b> .....	<b>51</b>
4.6.1	Einfluss von Betulinsäure auf die Migration der U251MG und U343MG unter Normoxie.....	51
4.6.2	Einfluss von Betulinsäure auf die Migration der U251MG unter Normoxie und Hypoxie.....	52
<b>4.7</b>	<b>Effekte von Betulinsäure und Betulin auf die Radiosensitivität unter Normoxie und Hypoxie</b> .....	<b>53</b>
4.7.1	Einfluss von Betulinsäure und Bestrahlung auf das klonogene Zellüberleben von Gliomzellen unter Normoxie und Hypoxie.....	53
4.7.4	Einfluss von Betulin auf die Radiosensitivität der U251MG und U343MG unter Hypoxie.....	55

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
5.1	Effekte auf Zytotoxizität, Proliferation und klonogenes Zellüberleben .....	57
5.2	Zelltod und Zellzyklus.....	58
5.3	RNA und Proteine .....	60
5.4	Migration .....	62
5.5	Strahlensensitivität.....	63
5.6	Ausblick .....	64
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>79</b>
	<b>Erklärungen</b>	<b>vii</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>viii</b>

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
A <sub>max</sub>	Absorptionsmaximum
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRX	ATP-abhängige Helikase
Bet	Betulin
bidest.	bidestilliert
BA	<i>betulinic acid</i>
BS	Betulinsäure
Bsp.	Beispiel
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Ca	Carcinom
ca.	circa
CA-IX	Carboanhydrase IX
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cm	Centimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cT	cycle threshold
C	Cytosin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol - Dihydrochlorid
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (DNS Desoxyribonukleinsäure)
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
ECL	<i>enhanced chemilumineszenz</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
E <sub>max</sub>	Emissionsmaximum
E <sub>min</sub>	Emissionsminimum
EF	<i>enhancement factor</i> (Verstärkungsfaktor)
EGFR	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FLAIR	<i>fluid attenuated inversion recovery</i> (Flüssigkeitsunterdrückte MRT-Sequenz)
FKS	fetales Kälberserum
fw	<i>forward</i> (vorwärts)
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GLUT	Glucosetransporter
Gy	Gray
h	<i>hour</i> (Stunde)
HCL	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hif-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1-Alpha
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase

---

HRE	hypoxia-responsive elements
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IDH	Isozitatdehydrogenase
Ig	Immunglobulin
IGF-II	<i>insulin-like growth factor II</i>
kBp	Kilobasenpaare
kDa	kilo Dalton
KM	Kontrastmittel
Ko	Kontrolle
KOF	Körperoberfläche
L	Liter
lat.	lateinisch
M	molar
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
μ	Mikro
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MLU	Martin-Luther-Universität
mM	Millimolar
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSCLC	<i>non-small lung cancer</i> Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NF	Neurofibromatose
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
OP	Operation
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumjodid
PE	<i>plating efficiency</i> (Platiereffizienz)
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
RIPA	<i>modified radioimmunoprecipitation</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium, b.n. dem Roswell Park Mem Institute
rv	<i>reverse</i> (rückwärts)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SF	<i>survival fraction</i> (Überlebensfraktion)
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>



---

SVV	Survivin
TBS	<i>tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzmischung)</i>
TBST	TBS mit Tween® 20
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
T	Thymin
TMZ	Temozolomid
UKH	Universitätsklinikum Halle (Saale)
UV	ultraviolett
V	Volt
VMAT	<i>Volumetric-modulated arc therapy</i>
vs.	gegenüber
Vol	Volumen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Die Behandlung von Patient\*innen mit der Diagnose GBM stellt auch in der heutigen Zeit respektive der infausten Prognose eine der größten Herausforderungen der Humanmedizin dar. Die gegenwärtige Behandlungsstrategie vereint alle drei Säulen der Onkologie mit Chirurgie, Radiatio und medikamentöser Therapie und wurde derzeit erweitert durch physikalische Wirkprinzipien wie *tumor treating fields*. Nicht zuletzt spielt neben der hochmalignen Zellbiologie, Chemoresistenz und Rezidivneigung die Tumorphoxie eine tragende Rolle in der Strahlenresistenz des mutierten Hirngewebes.

## 1.1 Glioblastoma Multiforme

### 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Einteilung

Die Gliome stellen eine recht heterogene Gruppe von primären Tumoren des ZNS dar. Sie weisen histologische Verwandtschaft zum Stützgewebe der Gliazellen und deren Vorläuferzellen auf. Hierzu zählen meist astrozytäre (60 %), oligodendrogliale und ependymale Tumoren [1]. Mit einem Anteil von 30 - 50 % kommen Gliome von allen Hirntumoren am häufigsten vor [2] und bei einer altersstandardisierten Inzidenz von etwa 3 pro 100.000 Einwohnern ist das GBM als aggressivster Tumor in der Gliomgruppe auch der häufigste maligne hirneigene Tumor. Es kann in jeder Altersgruppe auftreten, wobei sich eine Häufung im Bereich des 45. bis 70. Lebensjahres (Durchschnittsalter 62 Jahre) mit einer Tendenz für das männliche Geschlecht mit 6:4 gegenüber dem weiblichen Geschlecht zeigt.

Die Ursachen für die Entstehung verschiedener Hirntumore sind bis dato unklar. Jedoch weisen sehr seltene erbliche Tumorsyndrome wie bspw. das Li-Fraumeni-Syndrom, das Turcot-Syndrom oder Neurofibromatosen ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko auf. Des Weiteren wird eine familiäre Häufung beschrieben, jedoch bleibt das statistische Risiko bei erkrankten Verwandten gering [3]. Nach diagnostischer zerebraler Computertomographie und therapeutischer Kopfbestrahlung im Kindes- und Jugendalter zeigt sich mit langer Latenz ein vermutlich geringfügig erhöhtes Risiko. Außerdem wird eine risikobehaftete berufliche Exposition gegenüber Pestiziden debattiert. Der gesicherte Zusammenhang zwischen Mobiltelefonie und Hirntumoren ist derzeit nicht belegt, aber insbesondere bei häufiger Nutzung nicht auszuschließen. Virale Erkrankungen und Lebensstilfaktoren wie Rauchen oder Alkohol tragen nach heutigem Wissensstand nicht zur Risikosteigerung bei [4].

Neben den histologischen Kriterien werden weitere Charakteristika wie die Tumorentwicklung oder Tumormanifestation zur Klassifizierung beschrieben. Etabliert hat

sich insbesondere die Unterscheidung zwischen den primären Glioblastomen, welche selbst (*de novo*) aus gesundem Hirngewebe entstehen, und den sekundären Glioblastomen, die sich aus besser differenzierten bereits vorexistierenden Gliomen entwickelt haben.

Maligne Gliome zeigen innerhalb eines Tumorbefundes als auch interindividuell bei Tumoren mit gleichem *Grading*, erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Histologie und tumorbiologischen Eigenschaften [5]. Die unterschiedliche Fähigkeit zur Tumorzellinvasion und -infiltration, eine erhöhte Zellproliferation und Störungen der Steuerung des Zellzyklus akzelerieren möglicherweise das Wachstum und die Infiltrationsgeschwindigkeit bestimmter Gliome. Diese können innerhalb einiger Wochen und Monate ein rapides Wachstum aufweisen und somit eine Hürde für den zeitigen Therapiebeginn, verbunden mit einer schlechteren Prognose, darstellen [6].

Zur Einteilung und Klassifizierung der Gliome wurden aufbauend auf die zytogenetischen Arbeiten von Bailey und Cushing von 1926 sowie Etablierung der 4 Malignitätsstufen durch Zülch *et al.* beginnend 1979 [1] stets Neuerungen eingeführt. Kriterien wie das Mitose- und Wachstumsverhalten, die Kernmorphologie und Nekrosezeichen wurden berücksichtigt und Gliome in zwei benigne (*low grade* Grad I+II) und zwei maligne Tumorgrade (*high grade*, Grad III+IV) eingeteilt. Weitere häufige genetische Veränderungen betreffen Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie p53 und p16, Deletionen auf Chromosom 10 und 19q,

**Tab. 1:** WHO-Einteilung der Gliome (modifiziert nach Ohgaki und Kleihues *et al.*, 2007 ohne Ependymome).

Tumorgrad/Grading	Gruppe	Typ
Low grade WHO-Grad I	Astrozytäre Gliome	Pilozytisches Astrozytom
		Subependymales Riesenzellastrozytom
Low grade WHO-Grad II	Astrozytäre Gliome	Pilomyxoides Astrozytom
		Diffuses Astrozytom
		Pleomorphes Xanthoastrozytom
		Oligodendrogliale Tumore
High grade WHO-Grad III	Astrozytäre Gliome	Oligodendrogliom
		Mischgliome
	Oligodendrogliale Tumore	Anaplastisches Astrozytom
<b>High grade WHO-Grad IV</b>	<b>Astrozytäre Gliome</b>	Anaplastisches Oligodendrogliom
		<b>Glioblastoma multiforme</b>
		Riesenzellglioblastom
		Gliosarkom

sowie Amplifikation des EGF-Rezeptors, als auch Mutationen der Isocitratdehydrogenase (IDH), welche zu einer vermehrten Bildung von 2-Hydroxyglutarat führt und die Methylierung von DNA bewirkt [7].

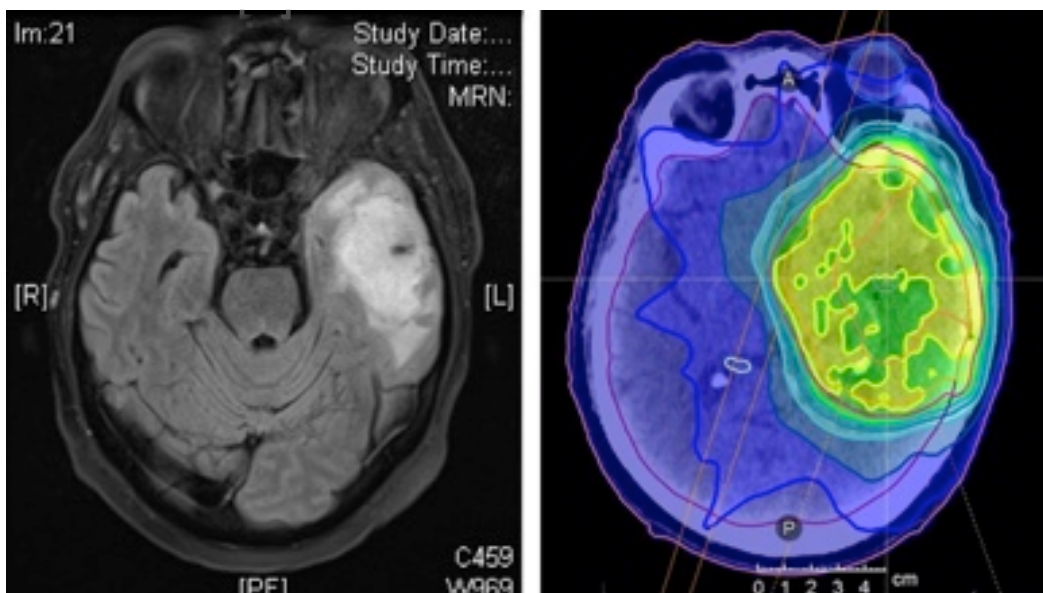
So wurde im Laufe der Zeit die Klassifikation über die histomorphologischen und molekulargenetischen Eigenschaften in der revidierten 4. Auflage der WHO- Klassifikation [8, 9] erweitert, wobei in der 5. Auflage von 2021 schließlich Augenmerk auf die integrierte Diagnose mit prädiktiven Aussagen gelegt wird. Insbesondere die Differenzierung des Mutationsstatus bezüglich IDH, LOH (loss of heterozygosity) bei 1p19q- Allel-Kodeletion und ATRX-Verlust wird durch Louis *et al.* diskutiert [10] und lässt zunehmend bessere prognostische Aussagen zu. Zur Übersicht ist in Tab. 1 eine vereinfachte WHO-Einteilung basierend auf Ohgaki und Kleihues *et al.*, 2007 [8] gezeigt.

### 1.1.2 Klinik, Diagnostik und Therapie

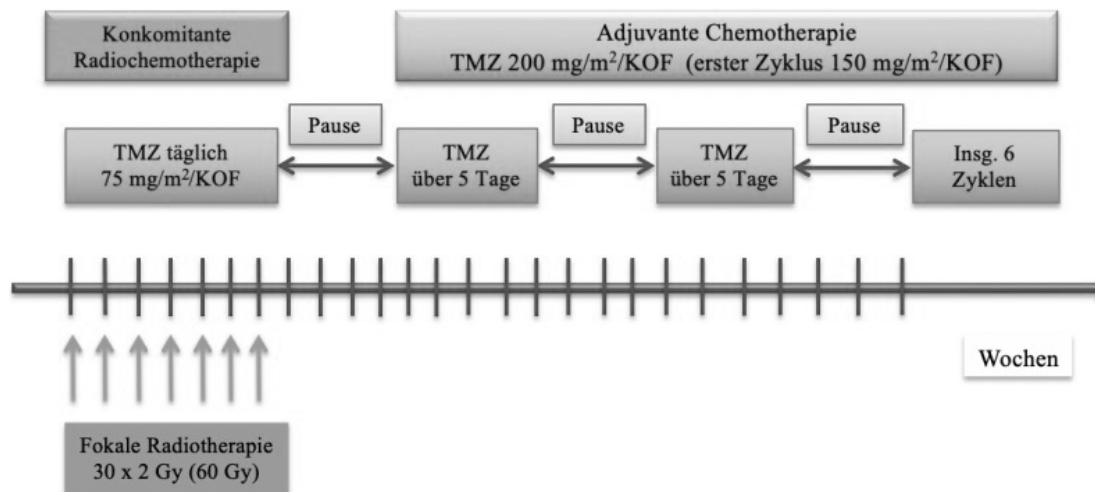
Charakteristische Klinik und Anamnese sind neu aufgetretene neurologische Symptome wie Epilepsie, fokale Defizite sowie kognitive Einschränkungen und Wesensveränderungen. Infolge der raumfordernden Wirkung des Tumors und/oder eines etwaigen begleitenden Hirnödems kann eine Hirndrucksymptomatik mit Kopfschmerz, Erbrechen und Bewusstseinstrübungen imponieren. Je nach anatomischer Lage des Tumors kann es zu neurologischen Ausfällen motorischer (z.B. Gangstörungen) oder sensorischer Natur (z.B. Sehstörungen, Parästhesien) kommen. Die körperliche Status-Erhebung dient zum Ausschluss einer systemischen Krebserkrankung sowie von Kontraindikationen für eine neurochirurgische Intervention [6]. Vermehrt wird über den *Karnofsky Performance Status* hinausgehend eine neurokognitive Erhebung mittels *Mini-Mental Status* sowie *Montreal Cognitive Assessments* als individuelle Screening-Methode außerhalb von Studien im europäischen Raum angewandt [11–14]. Neuroradiologische Verfahren sind für die Diagnostik essentiell. Als Methode der Wahl gilt die dünngeschichtete (< 5 mm) zerebrale T1-gewichtete Magnetresonanztomographie mit und ohne Kontrastmittel (KM) und zusätzlicher T2-FLAIR Sequenz. Das GBM (Abb. 1) zeigt sich hier meist als inhomogene, KM-aufnehmende Raumforderung mit begleitendem Perifokalödem [15]. Zunehmend werden besonders in Zentren Spezialverfahren wie Perfusions-MR und Aminosäure-PET-/SPECT zur Evaluation bestimmter Tumorhotspots, Verlaufskontrolle, Pseudoprogress- und Radionekrose-Ausschluss genutzt [15].

Die Indikationsstellung zur OP und Radikalität der Resektion sind erheblich von der Tumorlokalisation und Begleiterkrankungen (*frailty*) abhängig. Um therapiebedingte neurologische Defizite und Komplikationsrisiken zu minimieren, erfolgt die OP unter Neuronavigation (Rahmenlose Stereotaxie) [16]. Bei ungünstiger Tumorlokalisation ergeben sich zusätzliche peri- und postoperative Risiken. So besteht bspw. bei Nähe zum

Ventrikelsystem die Gefahr der Ventrikelleckage und Tumorzellverschleppung, oder bei Tumoren mit zentralem Tumorsitz und Stammganglien- oder Hirnstammnähe die Gefahr schwerer neurologischer Defizite. Bei möglicher OP profitieren jedoch Patient\*innen von einer erfolgreichen weitgehenden Tumorresektion. Studien zeigten hier, dass die im postoperativen MRT nicht mehr nachweisbare KM-Anreicherung zum verlängerten medianen Überleben von 16,7 Monaten vs. 11,8 Monaten,  $p < 0,0001$ , führt [17, 18]. Die intraoperative 5-Aminolaevulinsäure-Färbung ist ein Standard zur Evaluation von Tumorresten in der Resektionshöhle. Zur histologischen Sicherung neben fluoreszenzgestützter Mikrochirurgie wird bei schlechtem Zugang eine stereotaktische Biopsie favorisiert. Wegen der ausgeprägten Migrationsfähigkeit von Gliomzellen ist eine R0-Resektion von GBM in der Praxis unmöglich und folglich eine weitere adjuvante Anschlusstherapie im Sinne einer Radiatio oder Radiochemotherapie indiziert [19–21]. Die Schädigung von DNA/RNA und weiteren zellulären Bestandteilen wie beispielsweise Zuckermolekülen und Proteinen durch ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika wird durch verschiedene Reparaturmechanismen begrenzt kompensiert. Bei simultaner Applikation einer systemischen Chemotherapie und Radiatio ist die Reparatureffizienz in Tumorzellen deutlich reduziert und führt vermehrt zum Zelltod [22, 23]. So erfolgt nach radikaler OP die Standardradiochemotherapie nach Stupp als normofractionierte Radiotherapie (d.h. in 2 Gy Einzeldosen bis 60 Gy Gesamtdosis) mit konkomitanter Temozolomidgabe (TMZ) von täglich 75 mg/m<sup>2</sup> KOF (Körperoberfläche) über den



**Abb. 1: Patient mit GBM links fronto-temporal - behandelt am UKH, Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie.** Präoperatives MRT, T1-KM Sequenz. Diffus infiltrativ wachsendes GBM - KM aufnehmend, hyperintens, zentrale KM-Aussparung hypointens mit Hypoxie-Areal, Perifokalödem hyperintens (links). VMAT-Bestrahlungsplan, Zielvolumen inkl. Sicherheitssaum und Risikostrukturen (rechts). Eigene Aufnahmen.



**Abb. 2: nach Stupp**, konkomitante Therapie Temozolomid (TMZ)/Strahlentherapie und nachfolgend adjuvante Therapie mit Temozolomid, mod. nach [24].

gesamten Bestrahlungszeitraum gefolgt von einer Temozolomiderhaltungstherapie mit 150 bis 200 mg/m<sup>2</sup>KOF (im 5/23 - tägigem Rhythmus) für 6 Zyklen. Dadurch konnte die mediane Überlebenszeit von 12,1 auf 14,6 Monate verlängert werden ( $p = 0,001$ ). Moderate Nebenwirkungen sind Erbrechen und Übelkeit, seltener Myelosuppression und Leberversagen [15, 25, 26]. Als Prodrug wird TMZ im Körper über mehrere Schritte zu Methylhydrazin umgewandelt, welches als Alkylanz durch Basenmethylierung an DNA und folgender Misspaarung zum vermehrten Zelltod der Tumorzellen führt. Die Wirkung ist bei GBM besonders mit hypermethylierten Promoter-Regionen für das O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (*MGMT*)-Gen gegeben und mit einer besseren Prognose assoziiert [27, 28]. Das mittlere Überleben der Patient\*innen mit methylierten *MGMT*-Promotor lag demnach im Stupp *Trial* (Abb. 2) bei 21,7 Monaten (vs. 12,7 Monate), das 2-Jahres-Überleben bei 46 % (vs. 13,8 %) [29]. Bei älteren Patient\*innen ab 65 - 70 Jahren sollte je nach *MGMT*-Status eine Temozolomid-basierte Therapie mit hypofraktionierter Radiatio gegenüber einer Standardradiatio abgewogen werden [29, 30].

Zur Standardradiatio werden kumulative Gesamtdosen von etwa 55 bis 60 Gray (in 1,8 bis 2 Gy-Fractionen) unter Berücksichtigung von Sicherheitssaum und Lagerungsungenauigkeit fokussiert auf das Tumorzielvolumen bzw. die Resektionshöhle mit stark abfallenden Dosen in den Hirnrandgebieten appliziert. Eine Ganzhirnradiatio wird heutzutage nicht mehr angewandt [31].

### 1.1.3 Prognose, limitierte Therapieoptionen und aktuelle Forschung

Obwohl eine in Krebszentren und auf Evidenzklasse 1b basierte, multimodale Therapie etabliert ist, bleibt die Prognose bei GBM weiterhin infaust, mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa 14,6 Monaten. Nach Einführung des Stupp Schemas (Abb. 2)

---

verdoppelte sich die 2-Jahresüberlebensrate im Vergleich zu alleinigen postoperativen Radiatio von 10,4 % auf etwa 26,5 % [25]. Das 5-Jahres-Überleben in Deutschland betrug 2018 nur ca. 7 % [4].

In der Supportivtherapie kommen bei Übelkeit und Kopfschmerz durch raumfordernde, perifokale und vasogene Ödeme Kortikoide zum Einsatz [32, 33]. Des Weiteren zeigte sich hier als phytotherapeutische Alternative der Einsatz von Boswelliensäuren. Dieser Weihrauchextrakt war bei einem Anteil an Patient\*innen von bis zu 40 % antiödematös oder führte zumindest zur Reduktion der Kortikoidgaben [34]. Eine antiangiogene Therapie mittels Bevacizumab kann ebenfalls durch Senken der Gefäßpermeabilität das perifokale Ödem lindern. Jedoch ist die Anwendung von Bevacizumab in der Standardtherapie derzeit noch nicht zu empfehlen und wird in Studien und zur Salvagetherapie eingesetzt [35, 36]. Bei etwa der Hälfte der Gliom-Patient\*innen treten im Krankheitsverlauf epileptische Krampfanfälle auf. Sie werden bereits nach dem ersten Auftreten durch Lamotrigen und Levetiracetam antikonvulsiv therapiert [37]. Wie bei den meisten onkologischen Diagnosen, ist auch beim GBM das Risiko für Thrombosen und Lungenembolien signifikant gesteigert, sodass eine Antithrombose-therapie mittels niedermolekularen Heparinen erfolgt. Die praktische Erfahrung zeigt, dass auch nach Hirn-OP nur ein sehr geringes Risiko für intrakranielle Blutungen besteht und der Nutzen zur Thromboseprophylaxe überwiegt [38]. Nach heutigem Stand, zeigte die zusätzliche Behandlung mittels Optune via elektrischer Wechselfelder (*Tumor Treating Fields*) nach abgeschlossener Radiochemotherapie und stabiler Verlaufskontrolle ein verbessertes progressionsfreies- und Gesamtüberleben für Patient\*innen mit neu diagnostiziertem Glioblastom [39]. Ein weiterer Behandlungsansatz ist die Thermo-therapie mittels supramagnetischer Nano-Partikel und magnetischer Wechselfelder, bei experimenteller Studienlage [40].

Als wichtigen prognostischen Marker stellt sich der Mutationsstatus des *IDH1*-Gens dar und findet Raum in künftigen Tumorklassifikationen. Es wird diskutiert, dass primäre (de novo entstandene) GBM regelhaft einen IDH1-Wildtyp aufweisen, wohingegen IDH-mutierte sekundäre GBM durch Malignisierung aus GradII/III-Gliomen hervorgehen [41–43]. Weitere Angriffspunkte betreffen die Inhibierung des EGF-Rezeptors durch Gefitinib oder Erlotinib, der Integrine durch Cilengitide und der Tyrosin-Kinase durch Imatinib, welche bislang aber kaum Erfolg zeigten [44]. Auch Antisense-Oligonukleotide gegen TGF- $\beta$ 2, einem äußerst immunsuppressiven Zytokin, könnten neue Therapieoptionen darstellen [45]. Die Kombination von Angiogenesehemmern wie z.B. dem VEGF-Antikörper Bevacizumab mit Irinotecan zeigte zumindest in Phase-I/II-Studien eine Erhöhung des 6-monatigen progressionsfreien Überlebens auf 43 % im Vergleich zu 15 % in einer historischen Kontrollgruppe [36].

Nicht zuletzt stellen besonders bei ungünstiger Tumorlokalisation die zusätzlichen neurologischen Ausfälle und Komplikationen nach chirurgischer Intervention mit meist stark geminderter Lebensqualität bei ohnehin infaustem Krankheitsverlauf eine psychomotionale Extremlast dar. Die Neuroonkologie wird auch in Zukunft für Patient\*innen mit demselben Tumortyp individualisierte Therapiekonzepte nutzen. Die molekulare Einordnung wird künftig von noch größerer Bedeutung sein, wobei die weitere Erforschung von genetischen Alterationen an Gliomen voranschreitet und einen Hoffnungsschimmer zur Optimierung der bislang aussichtslosen Therapie des GBM darstellt. Größte Hürde in der Behandlung sind zudem die meist zentral gelegenen hypoxischen Tumorteile mit verminderter Zellteilungsrate, gekennzeichnet durch Chemotherapie- und Apoptose-resistenz [46–51].

## 1.2 Tumorhypoxie und Radiatio

Hypoxie bezeichnet den Mangelzustand oder die verringerte Sauerstoffzufuhr in Zellen und Geweben. Biochemisch ergibt sich dadurch eine verminderte Fähigkeit zum Elektronentransfer in der mitochondrialen Atmungskette. Dies kann ein akuter oder chronischer Prozess sein [23]. Hypoxie entsteht im Körper ebenfalls unter physiologischen Bedingungen bspw. nach vermehrter Aktivität oder Aufenthalt in großer Höhe, kann aber auch pathologisch durch Gefäß-, Herz- und Lungenerkrankungen vorherrschen, worauf der Körper lokal oder systemisch reagiert. Verringerte Sauerstoffpartialdrücke zeigen sich pathologisch besonders in soliden Tumoren [49, 52–56] der Mammae, der Cervix, des Hirns, sowie des Weichteilgewebes. Hypoxie kann u.a. durch rasantes Wachstum von Tumoren und damit Defekten der Mikrozirkulation und Gewebdiffusion auftreten [56]. Hierbei kommt es zu einer Änderung der physiologischen Prozesse innerhalb der Zellen und des Tumorgewebes. Bei neu aufgetretener Hypoxie sterben Normalzellen ab einem kritischen  $pO_2$  und bei Tumorzellen wird die Progression zunächst durch eingeschränkte Proliferation und Induktion von Apoptose und Nekrose gehemmt [57]. Jedoch können die Tumorzellen durch genetische Alterierungen, Mutationen mit *gain* und *loss of function* von Onko- und Tumorsuppressorgenen, Adaptationen und Selektionsdruck im hypoxischen Milieu überleben, proliferieren und weiter mutieren [58].

Bedeutende regulierende Mechanismen bei den Hypoxie-induzierten Stoffwechselwegen stellen die Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren (Hif-1, -2 und -3) dar. Sie steuern und regulieren die Transkription bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck [59, 60]. Übergeordnet steht die PAS-Superfamilie (Per-ARNT-Sim). Vertreter dieser sind als Heterodimere aus einer sauerstoffsensiblen  $\alpha$ -Einheit und einer ubiquitär exprimierten  $\beta$ -Einheit aufgebaut [61]. Hif-1 stellt den generellen Regulator der zellulären Hypoxie-Antwort mit Hemmung oder Aktivierung der darauffolgenden zellulären Prozesse dar. Es wird im



Unterschied zum meist Zelltyp-abhängigen Hif-2 und 3 konstitutiv exprimiert, unter Hypoxie durch Expression zahlreicher Hypoxie-assoziiierter Gene induziert und stabilisiert [59, 61–63].

Unter physiologischem Sauerstoffangebot wird das an zwei Prolylresten hydroxylierte Hif-1 $\alpha$  durch den von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor ubiquitinyliert und anschließend über das Proteasom abgebaut. Bei sinkendem Sauerstoffangebot wird die Hif-1 $\alpha$ -Untereinheit durch Hemmung der Hif-Prolylhydroxylase stabilisiert und in den Kern transloziert. Dort bindet es zusammen mit Hif-1 $\beta$  als Heterodimer an Hypoxie reagierende Bereiche, den *hypoxia responsive elements* (HRE), in Promoter-Regionen an über 70 bekannten Targetgenen. So werden bspw. Glukoseaufnahme (über Glukosetransporter GLUT-1 und 3), pH-Regulation (CA-IX), Zellproliferation (z.B. IGF-2), Angiogenese (z.B. VEGF), Invasion bzw. Metastasierung, Apoptose, Proliferation und Zelladhäsion [60, 64–66] gesteuert.

Durch Hypoxie-induziertes *Remodeling* des Mikromilieus, des Stoffwechsels und der Proliferationswege entstehen mutierte Tumorzellen mit zunehmender Hypoxie- und Radioresistenz und zunehmender Tumoraggressivität, assoziiert mit Verschlechterung der Prognose [51]. Aus diesem Grund rückten Biomarker für Hypoxie (Hif-1 $\alpha$ , CA-IX, GLUT-1) in das Rampenlicht der Forschung. Ein wichtiger pH-Regulationsfaktor, der durch Hypoxie beeinflusst wird, ist das Transmembranprotein Carboanhydrase CA-IX. Es führt durch Katalyse der Hydratisierung von Kohlendioxid zu Bicarbonat schließlich zur Azidose des hypoxischen Tumorareals [67], mit Folge einer Chemotherapieresistenz [51]. Die Sauerstoffpräsenz ist aufgrund der Bildung von freien Radikalen essenziell für die Effektivität einer Radiatio [64]. Sogar eine erneute Sauerstoffzufuhr führte nach Hypoxie zur verbesserten Radiotoxizität. In Studien wurde die Bedeutung von Erythropoetin zur Re-Oxygenierung von Tumorgewebe beschrieben und der Zusammenhang für die Sensibilisierung bzw. Effektivitätssteigerung einer Radiatio und Chemotherapie gezeigt [23, 68]. Die ionisierende Strahlung in der Radiotherapie bewirkt letale DNA-Schäden und leitet den Zelltod durch direkte und indirekte Effekte ein. Die Strahlenwirkung kann einerseits direkt an Biomolekülen wie DNA und Proteinen wirken und durch Herausschlagen elektrisch geladener Teilchen Ionisationsprozesse in Gang setzen, oder andererseits indirekt durch Interaktion mit Wasser freie Radikale und Peroxide bilden, welche ihrerseits wiederum Ionisationsprozesse an DNA und Proteinen hervorrufen. Dabei werden mehrere Mechanismen unterschieden, z.B. Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Vernetzungen zwischen DNA und DNA oder DNA und Proteinen, Basenmodifikationen und -verluste, Modifikationen an Zuckermolekülen oder kombinierte Schäden als sog. „*bulky lesions*“, mit irreparablen Veränderungen [23], wobei besonders DNA-Schäden von Bedeutung sind.

Geringe Strahlen-Dosen zwischen 0,1 - 2 Gy verursachen einen für die Zelle effektiv reparablen DNA-Schaden. Deutlich höhere Dosen führen zu irreparablen Schäden und

letztlich zum Absterben der Zelle. Die durch Bestrahlung ausgelöste Stresskaskade löst über physiologische Prozesse ebenso Reparaturvorgänge aus, die nach ca. 6 - 8 h beendet sind [69]. Bei kritischen Schäden und Irreparabilität wird die Kaskade bis zum Zelltod fortgeführt. Die Effektivität zur Reparatur ist in normalen Zellen insgesamt höher als bei Tumorzellen. Um diesen Sachverhalt zu nutzen, wird bei der Radiatio von Tumoren eine Fraktionierung durchgeführt. Hierbei wird den Normalzellen eine effizientere Reparatur bei ausreichendem Schaden für die Tumorzellen ermöglicht. Bei der fraktionierten Bestrahlung wird die kumulative Gesamtdosis je nach Indikation und kurativem oder palliativem Behandlungsansatz (meist zw. 50 - 70 Gy oder 30 - 36 Gy) auf täglich applizierte Einzeldosen von 1,8 - 2,5 Gy oder 3 Gy verteilt [69]. Sich schnellteilende Zelltypen bspw. hämatopoetischen oder epidermalen Ursprungs stellen als Risikostrukturen aufgrund erhöhter Strahlensensitivität zu schonende und ggf. symptomatisch zu kontrollierende Faktoren dar. Demgegenüber stehen die langsam wachsenden soliden Tumore mit hypoxischen Anteilen, welche einer Dosisescalation bedürfen [23]. Die Strahlenresistenz in Verbindung mit Hypoxie ist eine grundlegende Hürde diverser Tumoren, speziell bei der Radiatio des GBM und dessen Mikromilieu. Die Präsenz von Sauerstoff zur anschließenden Radikalbildung steigert die Anzahl und Wahrscheinlichkeit der Fixierung von DNA-Schäden. Das Verhältnis ist invers bei Sauerstoffabwesenheit [23, 64, 70]. In Studien wurde gezeigt, dass bereits ab einem erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck von unter 25 - 30 mm Hg signifikant reduzierte Strahlenschäden resultieren [23, 64]. Der Schaden kann jedoch unter ausreichender Oxygenierung wiederum bis zu dreifach gesteigert sein als im Vergleich zum Sauerstoffabschluss [69]. Der Verstärkungsfaktor oder die OER (*oxygen enhancement ratio*) beschreibt dieses Verhältnis.

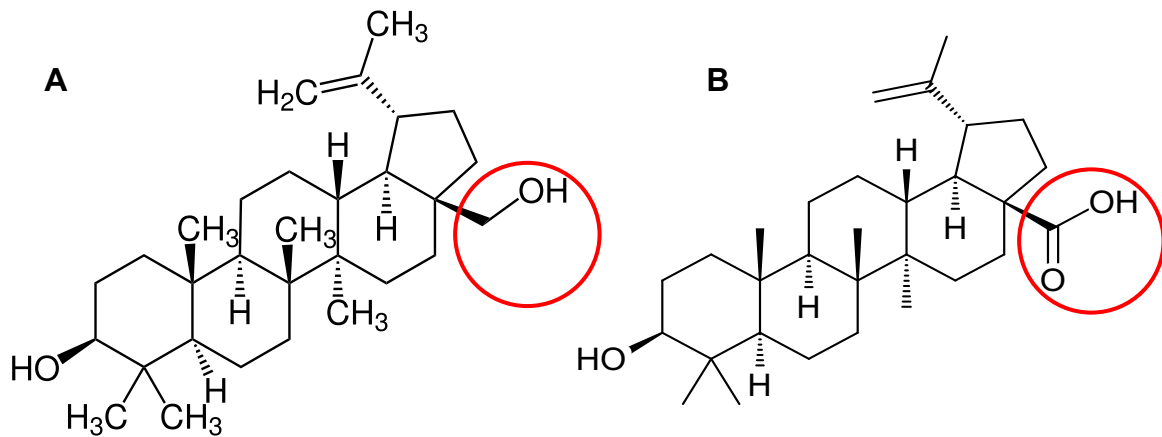
Zur Optimierung der Bestrahlung und Steigerung der Therapieeffizienz bei Schonung von Normalgeweben und Risikostrukturen kommen gegenwärtig diverse Modalitäten zum Einsatz. Durch neoadjuvante Reduktion des Tumolvolumens via OP und/oder Chemotherapie kann die zu verschreibende kumulative Strahlendosis gesteigert werden, sowie die Fraktionierung optimiert werden [23]. Zur Optimierung der Lagerung und Dosisauslastungen kommen *Cone-Beam-CT* und Bestrahlungstechniken wie VMAT (*Volumetric-modulated arc therapy*) zum Einsatz. Durch Verwendung von *Radiosensitizern* lassen sich ebenso Tumorareale mit verminderter Sauerstoffzufuhr effektiver behandeln. Die Prognose von Patient\*innen mit fortgeschrittenem kleinzelligen Bronchial-Ca konnte so z.B. mittels Gabe von Cisplatin als Systemtherapie kombiniert mit dem DNA-Reparatur Inhibitor Tirapazamin verbessert werden [71]. Weiterhin stellt die Suppression von Hif-1 $\alpha$  mittels Chemotherapeutika oder siRNA [72–75] u.a. gezeigt *in vitro* bzw. an Xenograft Mäusen, eine Option zur Verbesserung der Strahlenwirkung auf hypoxische Tumorzellen [64] dar.

## 1.3 Betulinsäure und Betulin

### 1.3.1 Bedeutung von Betulinsäure und Betulin

Pflanzenprodukte sind seit Jahrtausenden in diversen Kulturen für die Behandlung von Erkrankungen im Gebrauch [76]. In jüngerer Zeit konnten zahlreiche chemische Bestandteile aus natürlich vorkommenden Pflanzen in der Krebsmedizin phytochemisch erforscht und etabliert werden. Hierzu zählen u.a. Vinblastin und Vincristin (Indol-Alkaloide), Camptothecin und Podophyllotoxin (heterocyclische Amine) sowie Paclitaxel und Etoposid [76, 77]. Eine äußerst interessante Gruppe pflanzlicher Derivate stellen die Phytoalexine dar. Sie werden von Pflanzen, insbesondere von Bäumen, als Abwehr bzw. Immunantwort auf exogene Reize durch Viren, Bakterien oder Pilze über eine Polysaccharid und Glykoprotein vermittelte Reaktion ausgeschüttet [78]. Bet und BS als Vertreter der bisher zu 20.000 an der Zahl isolierten Triterpene besitzen ein Kohlenstoff-C-30-Grundgerüst und können aus diversen pflanzlichen Quellen gewonnen werden. In Birken- und Platanenrinde befinden sie sich in besonders hohem Maße und rückten mit ihren vielfältigen Strukturen und biologischen Aktivitäten ins Blickfeld der Tumorforschung [76].

Dem deutsch-russischen Pharmazeut Prof. Johann Tobias Lowitz gelang die Isolierung von Bet aus der Birkenrinde durch Sublimierungsverfahren [76, 77, 79] im Jahre 1788, und im Jahre 1876 führte Dr. Ulrich Hausmann dessen Elementaranalyse durch [80]. Die Muttersubstanz Betulin als pentazyklisches Triterpen stellt einen Alkohol dar und gehört zur Klasse der Lupane, mit einem Kohlenstoff-C-5-Ring und vier Kohlenstoff-C-6-Ringen (Abb. 3). Durch Oxidation an Kohlenstoff-C-28 (Abb. 3 rot) lässt sich das hier näher untersuchte Carbonsäurederivat Betulinsäure herstellen. Außerdem kann es aus der Rinde vieler Baumgewächse wie Platanen, Birken (*Betulae*) und Ebenholzgewächsen durch Trennverfahren mittels Extraktionsmitteln und Kristallisationsprozessen direkt hergestellt werden. Ökonomisch zeigt sich einerseits die Gewinnung aus Platanen [81], da hier ein geringerer Energieaufwand nötig ist und es geringere Verunreinigungen mit anderen Triterpenen gibt, und andererseits die Gewinnung aus weißer Birkenrinde (Betulingehalt zwischen 5 – 34 %, Durchschnitt 22 %) unter Verwendung von Ethanol-Wassergemischen via azeotroper Rektifikation und hochsiedender Kohlenwasserstoff-Lösungsmittel [77, 82]. BS in Reinform ist ein kristalliner, weißer Feststoff. Die molare Masse beträgt 456,71 g/mol (Abb. 3). Sie zeigt limitierte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Ether, Chloroform und Methanol, eine geringe Löslichkeit in Benzol, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Petrolether und Wasser und ist sehr gut löslich in Pyridin und Essigsäure [83].



**Abb. 3: chemische Strukturen der Verbindungen Bet und BS.**

A) Betulin: (3 $\beta$ )-Lup-20(29)-en-3,28-diol, MW: 442,72 g/mol;

B) Betulinsäure: 3 $\beta$ -Hydroxy-lup-20 (29)-en-28-säure, MW: 456,71 g/mol.  
mod. [83], rot markiert: C-28.

Die heilenden Wirkkräfte von Birkenrindenextrakten werden seit langem in der Volksmedizin zur Wundheilung und Antisepsis geschätzt. Die ungünstige Löslichkeit der BS wird hier durch Aufbereitung des parasitären Birken-/Chagapilzes umgangen. Dieser extrahiert Bet und BS aus der Rinde und führt durch weitere Konjugate zu verbesserter Bioverfügbarkeit [76]. BS zeigt sich pharmakologisch aktiver als Bet und besitzt ein breites Wirkspektrum an biologischen Eigenschaften [83]. BS weist antivirale (SARS-CoV2, HIV, Influenza A, Hepatitis A Virus -1,) [84, 85], fungizide (*Candida Albicans*) [83], antibakterielle (*Staph. aureus E. coli*), antihelminthische [86] sowie anti-Malaria-Aktivität auf. Darüber hinaus werden immunmodulatorische Effekte mit Entzündungshemmung beschrieben [87–90].

Über diese biologischen Effekte hinausgehend wurden bereits systematische Studien mit diversen Tumorzellen verschiedenster Histologien angefertigt und antitumorale Effekte beschrieben [77]. So konnten in zahlreichen Studien *in vitro* zytotoxische Effekte von BS in Zelllinien von Bronchial- [91–93], HNO- [94–96], Cervix- und Ovarial- [91], Kolon- [92], Leukämien [92, 97], Mamma- [92, 98], malignen Melanomen [91, 99–101], Nierenzell- [93], Prostata-Ca [92, 102] und auch Gliomen [93, 103–106] beobachtet werden. Die selektive Zytotoxizität von BS gegenüber Tumorzellen und die Resistenz gegenüber Normalzellen ist ein Vorteil der klinisch genutzt werden kann. *In vitro* Studien belegten die gute Verträglichkeit an Astrozyten [106], Melanozyten [100, 107] sowie peripheren Blutzellen [91, 92] und Endothelzellen [108], neuronalen Zellen [104] und Fibroblasten [91, 109]. Fortführende Untersuchungen am Mausmodell zeigten eine systemisch gute Verträglichkeit von BS [91, 99, 100–102, 110, 111] bei Toleranzen zu 500 mg/kg Körpergewicht. Ein potenzieller Nutzen im Gegensatz zu vielen Chemotherapeutika ist zudem die zytotoxische Wirkung auf resistente Tumorzelllinien [103, 112, 113]. Bet als Muttersubstanz zeigte in

---

Studien ähnliche antitumorale Eigenschaften wie BS [81]. Dieses therapeutische Fenster bietet Ansatzpunkte für die ergänzende onkologische Therapie bei Gliomen.

### **1.3.2 Wirkmechanismen der Betulinsäure**

Bis dato wurden diverse Studien zur Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen der BS durchgeführt. Dennoch bleibt mit vielen Unstimmigkeiten ein eindeutiger Mechanismus ungeklärt. Konform in den Studien ist der Sachverhalt, dass BS mittels Induktion des intrinsischen Apoptoseweges eine Signalkaskade zum Zelltod einleitet [66]. Ursächlich hierfür ist ein Effekt an der Mitochondrienmembran mit Erhöhung der Permeabilitäts-erhöhung und Zunahme an Porenöffnungen [113]. Dies führt zum Verlust der Membranintegrität und Abnahme des Membranpotenzials [93]. Infolge dessen werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aus der Atmungskette und weitere mitochondriale Apoptose-Faktoren (AIFs) und Cytochrom c freigesetzt. Diese bedingen die Aktivierung von Caspasen (Procaspase 9 und 3) als irreversiblen Vorgang zur weiteren Aktivierung von Endonukleasen (z.B. CAD), als auch DNA-Fragmentierung und Filamentfragmentierung [66, 93, 95, 106, 114], wobei BS die Apoptose unabhängig von p53 und CD-95 induziert [57]. Durch den direkten Wirkmechanismus an der Mitochondrienmembran, werden Signalwege umgangen, welche durch Genmutationen eine Apoptose von Tumorzellen verhindern könnten. Verschiedene Arbeiten beschreiben, dass BS eine Therapieresistenz gegenüber konventionellen Systemtherapeutika umgehen kann und sich keine bisher bekannten gemeinsamen Resistenzen zu anderen Chemotherapeutika zeigen [93, 99, 113, 115]. So wurden in Kombination mit Chemotherapeutika additive und synergistische Zytotoxizitäten hervorgerufen, wobei für das therapeutische Fenster notwendige Dosierungen gesenkt werden konnten. Gezeigt wurde dies an verschiedenen neuroektodermalen Zelllinien von GBM, Medulloblastom, Melanom als auch an Nierenzellkarzinomzellen mit den Substanzen Actinomycin D, Doxorubicin, VP16, Taxol und Cisplatin, wobei die sensitivierenden Effekte bei untransformierten Fibroblasten und striatalen Neuronen als Beispiel von Normalzellen ausblieben [116, 117].

Darüber hinaus wurde durch BS eine Proliferations- und Migrationsinhibierung an diversen Zelllinien wie GBM-, Pankreaskarzinomzellen und Melanomzellen gezeigt [72, 100, 118–120]. Zudem vermindert BS die Angiogenese über Hemmung des in diversen Tumorzellen überexprimierten Enzyms Aminopeptidase N, sowie die wachstumsfaktorvermittelte Angiogenese, welche über die Mitochondrienfunktion in Endothelzellen reguliert wird [108]. Fortführend werden weitere Interaktionen von BS durch Hemmung der Topoisomerase I-DNA-Komplex-Bildung diskutiert, wobei die Topoisomerase I zur Entspiralisierung der DNA vor Transkription und Replikation in Eukaryoten notwendig ist [121].

Interessanterweise wurde gezeigt, dass BS bei niedrigem pH-Wert toxischer wirkt [185]. Hypoxische Areale solider Tumoren weisen ein saures Milieu mit ruhenden langsam proliferierenden Zellen auf, wobei dies einen Angriffspunkt für BS darstellt [77]. Radiosensitivierende Effekte wurden für Melanom- [100] und Kopf- und Halstumorzelllinien [96] beschrieben und werden in dieser Arbeit an GBM Zelllinien näher untersucht.

Die Effekte von BS auf den Zellzyklus sind bisher umstritten und zeigten sich stark von den verwendeten Zelllinien abhängig [122], weshalb sich diese Arbeit ebenfalls damit auseinandersetzt.

## 2 Zielstellung

Therapeutische Problematik des hochmalignen GBM sind seine Chemo- und Radioresistenz bei rapidem Wachstum und Entstehung hypoxischer Tumorareale.

Gegenwärtige multimodale Therapiestrategien müssen mit neuen nebenwirkungsarmen, selektiv zytotoxischen Derivaten ergänzt werden, die im Hypoxiemilieu aktiv sind.

BS zeigt interessante therapeutische Eigenschaften und wirkt bei Normalzelltoleranz zytoselektiv auf Tumorzellen. Erste Daten zeigten, dass BS darüber hinaus einen potenziellen Einfluss auf die Radiosensitivität nimmt. Mitochondrial ausgelöste Zelltodformen stellen ein BS-induziertes Angriffsziel dar.

Zu Beginn der Arbeit lagen kaum Daten zur Wirkung von BS unter Hypoxie und Assoziation zur Hif-1 $\alpha$ -Expression, sowie nur wenige Untersuchungen zur Kombination von BS mit einer Strahlentherapie vor [46, 123]. Zum Einfluss auf die Radiosensitivität insbesondere unter Hypoxie bei Glioblastomzelllinien existierten zu Beginn dieser Dissertation keine Literaturangaben.

Zielstellung der Arbeit war es, Untersuchungen der Wirkung von BS und Bet an Gliomzelllinien unter Hypoxie durchzuführen, sowie einen Vergleich zur Normoxie zu führen.

Dabei wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Messungen zur Zytotoxizität und klonogenem Zellüberleben nach BS-Behandlung an den Zelllinien U251MG, U343MG unter Normoxie und Hypoxie.
2. Durchflusszytometrische Zellzyklusuntersuchungen nach BS-Behandlung an den Zelllinien U251MG und U343MG unter Hypoxie.
3. Etablierung eines Assays zur Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate nach BS-Behandlung (Annexin-V/PI-Test). Vergleich der Zelltodraten der Zelllinien U251MG und U343MG unter Normoxie und Hypoxie.
4. Analyse des Proteingehalts von proteolytisch gespaltenem PARP, Hif-1 $\alpha$  und SVV, sowie der mRNA-Expressionslevel von Hif-1 $\alpha$ , CA-IX, GLUT-1 und SVV nach BS-Behandlung.
5. Untersuchungen zur Migration und Radiosensitivität nach BS-Behandlung an den Zelllinien U251MG und U343MG unter Normoxie und Hypoxie.

Aufbauend auf den Ergebnissen soll im Diskussionsteil erläutert werden, inwiefern BS für eine Behandlung von GBM geeignet ist.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Zelllinien

Für die Experimente wurden die humanen Glioblastomzelllinien U251MG und U343MG verwendet. Die Zelllinie U251MG stammt aus der American Type Culture Collection (Rockville, USA) und die Zelllinie U343MG von Cell Lines Service (Eppelheim, Deutschland). Die Zellkultivierung erfolgte in den Laboren der AG Molekulare Strahlenbiologie der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie.

**Tab. 2:** Verwendete Glioblastomzelllinien

Name	Ursprung	Bezeichnung	Referenzen
U251MG	Homo sapiens, Glioblastom	ATCC® Nr. HTB-17™	Ponten J <i>et al.</i> , 1968
U343MG	Homo sapiens, Glioblastom	DSMZ Nr. ACC 408	Vaheri A <i>et al.</i> , 1976

### 3.2 Chemikalien und Reagenzien

#### Chemikalie/Reagenz

#### Hersteller

2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Annexin-V-FLUOS	Roche Diagnostics (Mannheim)
Accutase	PAA (Cölbe)
BS	BioSolutions Halle GmbH
Bet	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)
CasyTon	Roche (Reutlingen)
DAPI	Serva (Heidelberg)
Desoxycholat	Sigma (Steinheim)
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter
DMSO (steril filtriert)	Sigma (Steinheim)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
EGTA	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (96 %)	Sigma (Steinheim)
Fetales Kälberserum	Biowhittaker (Heidelberg)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Giemsa-Lösung	Sigma (Steinheim)
Halt™ Phosphatase Inhibitor „Cocktail“	Pierce (Rockford, USA)
Hepes/NaOH	Roth (Karlsruhe)
LDS-Probenpuffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Saliter (Obergünzburg)
MES Puffer 20x	Invitrogen (Karlsruhe)
Methanol (100 % pro analysis)	Sigma (Steinheim)
Mowiol® 4-88	Merck (Darmstadt)
Natriumpyruvat	PAA (Cölbe)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas (St. Leon-Rot)



PBS	PAA (Cölbe)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
probenreduzierendes Agenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Propidiumiodid	Sigma (Steinheim)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma (Steinheim)
RNase A	Sigma (Steinheim)
RPMI 1640 (25 mM HEPES und L-Glutamin)	Lonza (Walkersville, USA)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Transferpuffer 20x (Western Blot)	Invitrogen (Karlsruhe)
Tris (20 M)	Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl (50 mM)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Trypsin	Serva (Heidelberg)
Tween® 20	Serva (Heidelberg)

### 3.3 Antikörper

Tab. 3: Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Klon	Verdünnung	Ursprungsspezies	Hersteller
β-Aktin	Ac 15	1:5000	Maus	Sigma
Hif-1α	Hif-1α	1:3000	Kaninchen	BD Biosciences
PARP cleaved	Asp 214	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling
Survivin	AF 886	1:2000	Kaninchen	R&D Systems
Anti-Kaninchen IgG	P0446	1:1000-1:2000	Ziege	DAKO
Anti-Maus IgM	P0206	1:5000	Kaninchen	DAKO

### 3.4 Oligonukleotide

Tab. 4: Oligonukleotide

Gen	NCBI-Nr.	Lokalisation in mRNA	Primer	Sequenz 5'→ 3'
CA-IX	NM_001216.3	885-918	CA9 fw	GAAAACAGTGCCTATGAGCAGTTG
		1097-1077	CA9 rv	TGCTTAAGCACTCAGCATCAC
GAPDH	NM_002046.7	943-962	GAPDH fw	CACCCACTCCTCCACCTTTG
		1052-1033	GAPDH rv	CCACCACCCTGTTGCTGTAG
Hif-1α	NM_001530.4	1194-1213	HIF-1α fw	CCACAGGACAGTACAGGATG
		1343-1322	HIF-1α rv	TCAAGTCGTGCTGAATAATACC
HPRT	NM_000194.3	371-390	HPRT fw	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
		632-613	HPRT rv	CTTGCGACCTTGACCATCTT
SVV	NM_001168.3	125-146	SVV fw	ACATTCAAGAACTGGCCCTTCT
		226-205	SVV rv	CAAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG
GLUT-1	NM_006516.4	1175-1195	GLUT-1 fw	TTCACTGTGCTGTCGCTGTTT
		1281-1262	GLUT-1 rv	AGCGCGATGGTCATGAGTAT

### 3.5 Kits

Kit	Hersteller
Bio-Rad Protein-Assay (Bradford Reagenz)	Biorad (Richmond, USA)
Integrity Assay (Annexin-V-Test)	Roche (Mannheim)
ECL™ Western Blotting Reagenz	Amersham (Freiburg)
ECL Plus Western Blotting Reagenz	Amersham (Freiburg)
Plexor PCR-System	Promega (Wisconsin, USA)
QuantiTect SYBRGreen PCR Kit	Qiagen (Hilden)
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Venor GeM Mykoplasmen-Detektionskit	Minerva Biolabs GmbH (Berlin)
ZymoResearch RNA MiniPrep™ Kit	Zymo Research (CA, USA)

### 3.6 Puffer, Medien und Lösungen

#### 3.6.1 Zellkultivierung

Kulturmedium RPMI komplett	500 ml RPMI 1640 50 ml FKS 10 ml Antibiotika (S/P) 5 ml Natriumpyruvat
Gefriermedium	50 ml Kulturmedium RPMI komplett 30 ml FKS 20 % DMSO (frisch hinzugeben)

#### 3.6.2 Annexin-V/PI-Assay

10x Bindungspuffer	2,4 g 100 mM Hepes/NaOH pH 7,4 8,2 g 1,4 M NaCl 0,735 g 50 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O add. 100 ml bidest. H <sub>2</sub> O
1x Bindungspuffer	add bidest. H <sub>2</sub> O
Annexin-V/PI-Markierungslösung	5 µl Annexin-V Fluos 5 µl PI-Färbepuffer Hepes/NaOH 25 µl 10 x Bindungspuffer 215 µl bidest. H <sub>2</sub> O

#### 3.6.3 Zellzyklus-Analyse

Propidium-Iodid Puffer	50 mg Natriumcitrat 10 µl 500 mM EDTA 2,5 mg PI 5 mg DNase freie RNase A ad. 50 ml 1x PBS
------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### 3.6.4 RNA-Isolation

Lysepuffer	10 ml RLT-Puffer (RNeasy-Kit) 100 µl 2-Mercaptoethanol
------------	-----------------------------------------------------------

### 3.6.5 Proteinisolation

RIPA-Lysepuffer	50 mM (pH 7,4) Tris-HCl 200 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton X-100 0,25 % Desoxycholat 1:100 Phosphatase-Inhibitor (frisch hinzugeben)
-----------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3.6.6 Western Blot

1x TBS	50 ml 10x TBS 450 ml Aqua bidest.
10x TBS	100 ml 5 M NaCl 300 ml 1 M Tris (pH von 8,0 mittels HCl) 600 ml Aqua bidest.
1x TBST	50 ml 10x TBS 450 ml Aqua bidest. 500 µl Tween® 20
1x Transferpuffer	50 ml Transferpuffer (20x) 200 ml Methanol 750 ml Aqua bidest.
Antikörperlösung	1x TBST 10 % Magermilchpulver
Blockierungsreagenz	1x TBST 10 % Magermilchpulver
Entwicklerlösung	80 g Entwickler 500 ml Aqua bidest.
Fixiererlösung	100 ml Fixiererkonzentrat 300 ml Aqua bidest.
MES-Laufpuffer	50 ml MES Puffer (20x) 950 µl aqua bidest.
Strippingpuffer	2 ml SDS (20 %) 2 ml Tris-HCl 16 ml Aqua bidest. 150 µl 2-Mercaptoethanol

### 3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

8,0 µm ThinCert™ für 24-Well-Platten	Greiner (Frickenhäusen)
Aeroclip® Gaspcklip	Merck (Darmstadt)
Anaerocult® P Gaspacks	Merck (Darmstadt)
Anaerotest® Teststreifen	Merck (Darmstadt)
Analysewaage Adventurer™	Ohaus (Parsippany, USA)

Coulter Isoton II Diluent (Puffer für Z2)	Coulter-Beckman (Krefeld)
Coulter Z2 Particle Count & Size Analyzer (Zellzählgerät)	Coulter-Beckman (Krefeld)
BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer	BD Biosciences (Franklin L., USA)
Bechergläser	Merck (Darmstadt)
CASY® DT (Zellzählgerät)	Schärfe System GmbH (Reutlingen)
Zytospinkammer	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Digital Kamera Power Shot G2	Canon (Tokyo, Japan)
BZ-8000 Fluoreszenzmikroskop	Keyence (Osaka, Japan)
Einweghandschuhe	Meditrade (Kiefersfelden)
Einweg-Zellkulturartikel (6-Well-Platten, 24-Well-Platten, Gewebekulturflaschen, Petrischalen, Pipetten/ -spitzen, Zentrifugationsröhrchen)	Greiner (Frickenhäusen)
FACS-Röhrchen	
Gefrierbehälter	BD Pharmingen, Heidelberg
Inverses Fluoreszenzmikroskop HBO50/AC	Nalgene (Hereford, U.K)
Inverses Labormikroskop	Zeiss (Jena)
Inkubator Heracell™ 150i	Zeiss (Jena)
Labsonic 2000 U	Heraus (Hanau)
Laminarbox	B. Braun (Melsungen)
Linearbeschleuniger	Heraeus (Hanau)
ONCOR™ Impression+ IMRT	
Magnetrührer	Siemens (Erlangen)
Magnetrührstäbchen	IKA-Labortechnik (Staufen)
Messzylinder	Merck (Darmstadt)
Parafilm	Merck (Darmstadt)
pH-Meter inoLab pH 720	Merck (Darmstadt)
Pipetboy	WTW (Weilheim)
Pipetten	Bioscience (Fernwald)
Polyacrylamid-Gradientengel (4-12 %)	Eppendorf (Hamburg)
PVDF-Membran 0,45 µm	Invitrogen (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße	Millipore (Schwalbach)
Rollenmischgerät RM 5	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilm Biomax MR	Karl Hecht KG (Sondheim)
Röntgenfilmentwickler	Kodak (Stuttgart)
Röntgenfilmfixierer	Kodak (Stuttgart)
Rotorgene RG-6000 (Real-time Cyclus)	Kodak (Stuttgart)
Smart Spec™ 300 (Photometer)	LTF (Wasserburg)
Sterile Syringe Filter (0,2 µm)	Biorad (Richmond, USA)
Sterile Syringe 5 ml Spritze	VWR (San Francisco, USA)
Sterilcan® Einmalkanüle	BD (New Jersey, USA)
Thermoblock UBD	B. BRAUN (Melsungen)
Thermocycler PTC-100™	Grant (Cambridge, GB)
Thermomixer MR 3001	MJ Research (Waltham, USA)
Trans-Blot® Cell	Heidolph (Schwabach)
Vortex-Genie® 2	Biorad (Richmond, USA)
Wasserbad	Scientific industries inc. (Staufen)
Wattestäbchen	Julabo GmbH (Seelbach)
XCell Sure Lock™ (Elektrophoresegerät)	NOBA Verbandmittel (Wetter)
Zentrifuge Universal 32R	Invitrogen (Karlsruhe)
Zentrifuge 5415R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
	Eppendorf (Hamburg)

## **3.8 Zellbiologische Methoden**

### **3.8.1 Kultivierungsbedingungen und Kryokonservierung**

Die aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

Die humanen Glioblastomzelllinien U251MG und U343MG wurden in RPMI 1640 Flüssigmedium mit 10 % FKS, 1 % Pyruvat, sowie 185 U/ml Penicillin und 185 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wuchsen in sterilen Kulturflaschen als adhärenente Monolayer und wurden bei 37 °C, 3 % CO<sub>2</sub>, atmosphärischem Sauerstoffgehalt und maximaler Luftfeuchte inkubiert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte je nach Zellwachstum alle 1-3 Tage.

Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 passagiert. Hierzu wurde das Kultumedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Zum Ablösen der adhärenenten Zellen wurde je Kulturflasche 1 ml 0,05%ige Trypsin/EDTA-Lösung für eine Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C im Brutschrank verwendet. Durch Hinzugabe von 5 ml FKS-haltigem Kulturmedium wurde die Trypsinreaktion gestoppt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation in 15 ml Röhrchen bei 1000 rpm für 5 min. Das erhaltene Zellpellet wurde je nach Größe in 1-6 ml Medium resuspendiert und in entsprechendem Verhältnis in neue mit frischem Medium gefüllte Kulturflaschen 1:2 bis 1:4 überführt.

Für die Kryokonservierung wurden die Zelllinien als Pellet in 1,8 ml Gefriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert. Im Anschluss erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Um die konservierten Zellen wieder in Zellkultur zu bringen, wurden die Gefrieröhrchen im 37 °C-Wasserbad erwärmt und der Inhalt rasch in je 4 ml Kulturmedium überführt. Nach anschließender Zentrifugation von 5 min bei 1000 rpm wurde das Pellet mit 5 ml Medium gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert um Rückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in sterile Kulturflaschen mit komplettem Medium überführt und nach erfolgreichem Anwachsen wieder passagiert.

### **3.8.2 Zellzahlbestimmung und Zellwachstumsanalyse**

Zur Zellzahlbestimmung wurden 100 µl Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:100 mit TBST verdünnt. Die Messung erfolgte mit dem Zählgerät Z2 (Beckman-Coulter). Hierfür wurde die Glaskapillare des Z2 in die verdünnte Lösung getaucht und unter Sogwirkung Partikel zwischen 10 µm und 37 µm Durchmesser registriert. Über einen programmierten Verdünnungsfaktor wurde die Konzentration der Ursprungszellsuspension ermittelt.

Bei Untersuchungen zur Zytotoxizität von Bet und BS wurden 250.000 - 1.000.000 Zellen der jeweiligen Zelllinie in sterile Kulturflaschen eingestreut. Nach Kultivierung für 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Flaschen mit 37 °C PBS gespült. Im Anschluss wurde

frisches Medium mit entsprechender Konzentration an Bet bzw. BS für eine Inkubationszeit von 24 h und 48 h bzw. 72 h unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen hinzugefügt. Die Kulturflaschen wurden zusätzlich mit 0, 6 oder 15 Gy bestrahlt. Zur Zellzählung wurden die Zellen wie oben beschrieben abtrypsiniert und die Zellzahl am Zählgerät bestimmt.

### **3.8.3 Betulin- und Betulinsäureaufbereitung**

Bet und BS wurden von Prof. Dr. Paschke (BioSolutions, Halle GmbH) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung und die Verwendung der Bet- bzw. BS-Lösungen erfolgte unter der Laminarbox. Zum Lösen der kristallinen Pulver wurde in entsprechenden Mengen steril filtriertes DMSO (Sigma) verwendet und jeweils eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mM hergestellt. Diese wurde mittels einer Spritze und einem 0,2 µM Sterilfilteraufsatz (VWR, USA) in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung der Stocklösungen fand im Dunklen bei 4 °C statt.

### **3.8.4 Klonogenitätstest**

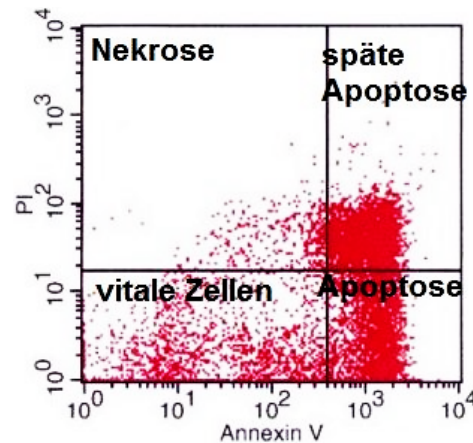
Der Klonogenitätstest ist als Langzeitassay eine strahlenbiologisch bewährte Methode und stellt den *in vitro* Goldstandard [123] dar um die Langzeitwirkung einer Radiatio auf klonogene Zellen zu untersuchen. Dabei kann auch der Einfluss von Chemotherapeutika auf die Radiosensibilität der Zellen quantifiziert werden. Für den Test wurde eine bestimmte Anzahl von zuvor behandelten Zellen in Petrischalen oder Kulturflaschen eingestreut und solange kultiviert, bis sich Kolonien bilden, die makroskopisch erkennbar sind (ab ca. 50 Zellen). Um die relative Platiereffizienz zu beurteilen, wurden die gezählten Kolonien einer behandelten Probe gegenüber einer internen Kontrolle (z.B. DMSO behandelte Zellen) als Quotient dargestellt. Die Zellen wurden unter Normoxie und Hypoxie mit Bet und BS für 24 h inkubiert und 1,5 h vor Zellernte mit Einzeldosen von jeweils 2 Gy, 6 Gy und 15 Gy bestrahlt. In Vorversuchen wurde die optimale Platiereffizienz ermittelt und dieser entsprechend erfolgte das Einstreuen der Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit angewärmtem Medium. Je nach Zellwachstum wurden die Zellen 10 bis 14 Tage kultiviert. Durch Inkubation der Zellen mit 3,7%iger Formaldehydlösung für 20 min. wurden die Zellkolonien fixiert. Danach wurden die Kulturflaschen mit Aqua dest. gespült und für 20 min mit 10%iger Giemsa-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Flaschen erneut mit Aqua dest. gespült. Die Kolonien der behandelten Proben wurden über einer Lichtkammer ausgezählt. Als Kolonie wurden Zellkonglomerate ab einer Größe von 50 Zellen gewertet. Es erfolgten mindestens drei voneinander unabhängige Versuche.

### 3.8.5 Apoptose-Assays

Die Begriff Apoptose beschreibt den Vorgang, bei dem die zielgerichtete, programmierte Veränderung der Genexpression zum kontrollierten Untergang einer Zelle führt. Auslöser sind extrinsische, intrinsische oder stressinduzierte Signale, die über Signalkaskaden zum regulierten Abbau der Zelle führen, ohne dass Nachbargewebe Schaden nehmen. Die Fähigkeit zur Apoptose ist eine essentielle Eigenschaft von Zellen für die gesunde Entwicklung und den Erhalt des Organismus. Biochemisch und morphologisch davon abzugrenzen ist der ungerichtete Zelltod, die Nekrose [124], welche morphologisch durch Zellschwellung, Mitochondriendysfunktion, Zellmembrandefekte, Austritt von Zellplasmabeständen und schließlich Zellyse charakterisiert ist. Unter Wasserverlust der Zelle zeigen sich als morphologische Kriterien der Apoptose dagegen ein sog. „membrane blebbing“, Ausstülpungen der Zellmembran und „apoptotic bodies“ - membranumhüllte vesikuläre Abschnürungen und abschließend das Schrumpfen der Zelle. Außerdem sind Chromatinkondensation, Kernpyknoten und Kernfragmentierung weitere Charakteristika. Nachbarzellen und Phagozyten verdauen schließlich die anfallenden Zellreste. Als Nachweismethoden der Apoptose und zur Ermittlung der Apoptoserate dienen der Annexin-V-Test am Durchflusszytometer und die DAPI-Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie.

### 3.8.6 Annexin-V/PI-Assay

Annexin-V dient als Apoptosemarker der Vitalitätskontrolle von Zellen. Durch den Zelltod verlieren die Zellen zunehmend ihr Membranpotenzial und ihre Membranintegrität. Hierbei wird das Phosphatidylserin, ein anionisches Phospholipid, welches unter vitalen Verhältnissen ins Innere der Zelle gerichtet ist, nach außen transloziert und so den phagozytierenden Zellen präsentiert [125]. Da Annexin-V dieses kalziumabhängig mit hoher Affinität bindet, lassen sich die apoptotischen Zellen markieren. Die beschädigte Zellmembran nekrotischer Zellen ermöglicht, dass Annexin-V zusammen mit PI in die Zelle eindringt. Es wurde eine Doppelfärbung mit dem Nekrosemarker PI durchgeführt um zwischen lebenden (PI u. Annexin-V negativ), früh apoptotischen (Annexin-V positiv), spät apoptotischen (PI und Annexin-V positiv) und nekrotischen (PI positiv) Zellen zu unterscheiden. Um ebenfalls alle apoptotischen Zellen einzuschließen auch jene, die im Medium flotieren, wurde der Überstand ebenfalls untersucht. Da PI nicht nur DNA, sondern auch RNA bindet, wurde zur PI-Lösung DNase freie RNase hinzugegeben um falsch PI positive Zellen auszuschließen. Die gefärbten Zellen konnten sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden.



**Abb. 4: Exemplarische Darstellung eines Dot-Plots** mit Quadranteneinteilung der Zellpopulationen in Nekrose links oben (A-/PI+), vitale Zellen links unten (A-/PI-), späte Apoptose rechts oben (A+/PI+), Apoptose rechts unten (A+/PI-).

Für den Versuchsansatz wurden die Zelllinien U251MG und U343MG mit 400.000 Zellen pro Kulturflasche eingestreut und für 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Bet bzw. BS für einen Zeitraum zwischen 6 bis 48 h unter Normoxie bzw. Hypoxie. Die adhärennten Zellen wurden nach der Behandlungszeit mittels Accutase schonend vom Kulturflaschenboden abgelöst, in PBS gewaschen und mit dem Überstand vereinigt. Nach Zentrifugation der gewonnenen Zellen bei 1000 rpm und 4 °C für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die verbliebenen Zellen in 1 ml Inkubationspuffer resuspendiert. Anschließend wurden in FACS Röhrchen mit je 100 µl Färbungslösung jeweils 125 µl der Zellsuspension pipettiert und die Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden 400 µl Bindungspuffer je Probe hinzugegeben und es erfolgte die zügige Messung am BD FACS-Calibur Durchflusszytometer (FL1/FL2;  $E_{\max}$  = 488 nm;  $E_{\min}$  = 350 nm) und Fluoreszenzmikroskop. Die Datenakquisition erfolgte mit der Software CellQuest und die Auswertung der Dot-Plot-Daten (Abb. 4) zur Bestimmung der Apoptose und Nekroserate mit dem Programm Cyflogic und Cellfit.

### 3.8.7 DAPI-Analyse

Der fluoreszierende Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) interkaliert in die AT-reichen Regionen von DNS und kann mittels UV Licht, bei einem  $A_{\max}$  = 358 nm, angeregt werden. Hierbei emittiert der Farbstoff blaues bis cyanfarbenes Licht bei  $E_{\max}$  = 461 nm. Somit kann durch ein Fluoreszenzmikroskop (BZ – 8000 Keyence) mit DAPI-Filter eine morphologische Auswertung der markierten Zellkerne vorgenommen werden. Zum Schutz der Fluoreszenz wurde das Anti-Fading-Mittel Mowiol aufgetragen. Die Zellkerne wurden nach apoptotischen Kriterien wie Kernpyknose, Kernfragmentierung und Zelltrümmer bzw. Chromatinfragmente beurteilt. Es wurden Zellen im Untersuchungszeitraum von 1,5 h bis 48 h nach Behandlung untersucht. Zur Zellernte wurden die Zellen abtrypsiniert und mit



dem Überstand vereinigt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert. Zur Fixierung wurde den Zellen unter leichtem Schwenken 1 ml 80 % EtOH zugetropft und die Zellen konnten so bei 4 °C lagern. Vor der Färbung wurden die fixierten Zellen resuspendiert und  $2,5 \cdot 10^4$  bis  $5 \cdot 10^4$  Zellen in einer Cytospinkammer auf einem Objektträger bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die luftgetrockneten Zellen auf dem Objektträger wurden anschließend mit DAPI-dihydrochlorid-PBS-Lösung (0,2 µl, 1 mg/ml) für 5 min bei Dunkelheit inkubiert, in PBS gewaschen und angetrocknet. Anschließend wurde Mowiol auf die Zellakkumulate aufgetragen und mit einem Deckglas versiegelt. Die getrockneten Proben wurden bis zur Auswertung bei 4 °C im dunklen Kühlschrank gelagert. Etwa 500 mit DAPI-gefärbte Zellen auf unterschiedlichen Sichtfeldern wurden nach morphologischen Kriterien beurteilt.

#### **3.8.7.1 Mykoplasmenkontrolle**

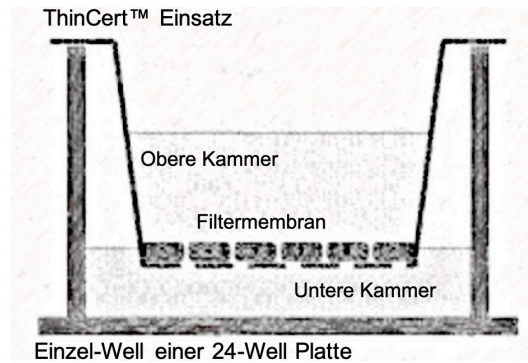
Mit Hilfe der DAPI-Färbung und Mykoplasmen-PCR wurden die Zellkulturen regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht.

#### **3.8.8 Migrationstests**

Der Begriff Migration oder Wanderungsfähigkeit bezeichnet das aktive räumliche Verhalten von Zellen zu ihrer Umgebung. Das Modifizieren ihres Zytoskeletts ermöglicht einigen Körperzellen die amöboide Fortbewegung über Filo- oder Lamellipodien. Migration spielt besonders bei embryonalen, Bindegewebs- und Immunzellen eine tragende Rolle und ist eine Grundvoraussetzung für die komplexen zellulären Abläufe im menschlichen Organismus. Jedoch kann die Eigenschaft von Zellen ihren Ort im hohen Maße zu verändern auch gefährlich sein, wie es in der Pathogenese bei Krebszellen zu beobachten ist. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet um das Migrationsverhalten der humanen Glioblastomzelllinien in Kombination mit Bet- und BS-Behandlung zu untersuchen.

##### **3.8.8.1 Modifizierter Boydenkammer-Assay mit 8,0 µm ThinCerts™ in 24-Wells**

Der nach Boyden benannte Migrationstest wurde modifiziert und in einer Kulturplatte aus 24 Wells ausgeführt. Jede Well bildet ein System aus jeweils zwei Kammern, zwischen denen die Zellen über eine Filtermembran migrieren. Die obere Kammer wird von einem Filtereinsatz (ThinCerts™, Greiner Bio-One, Frickenhausen) gebildet, dessen Boden eine poröse Kunststoffmembran ist. Diese Membran weist eine Porengröße von 8 µm auf und ermöglicht es den in die obere Kammer eingestreuten Zellen in die untere Kammer zu migrieren. Um eine Migrationsrate zu stimulieren wurde in das obere Kompartiment fetales



**Abb. 5: Modifizierter Boydenkammer-Assay.** Durch einen ThinCert™ Einsatz in einer Einzel-Well werden eine obere und untere Kammer gebildet, welche durch eine Filtermembran (8,0 µm Porengröße) voneinander getrennt sind. In der oberen Kammer befinden sich die Ausgangszellen in FKS freien Medium. In der unteren Kammer befindet sich 20% FKS-haltiges Medium als Chemoattraktant für die migrationsfähigen Zellen. Die in die untere Kammer migrierten Zellen wurden pellitiert, gewaschen und die Zellzahl nach einem Verdünnungsfaktor am CASY® DT bestimmt.

Kälberserum (FKS) -freies und in das untere als Chemoattraktant dienendes 20%iges FKS-Kulturmedium gegeben.

Für die Behandlung wurden die Zellen für 24 h nach Behandlungsvorschrift unter hypoxischen Bedingungen mit Bet und BS bzw. Kontrollmedium inkubiert und 1,5 h vor dem Einstreuen bestrahlt. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit PBS gespült und anschließend schonend mit Accutase abgelöst, in FKS-freiem Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden pro Filtereinsatz 200.000 Zellen in 300 µl FKS-freiem Medium einpipettiert (Abb. 5). Nach einer Migrationsdauer von 20 h bei 3 % CO<sub>2</sub> und 37 °C wurden die Filtereinsätze entfernt und die Zellen aus dem unteren Kompartiment analysiert. Dazu wurde aus der unteren Kammer der Kulturüberstand zusammen mit den trypsinierten Zellen vereinigt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Zell-Pellet in 4 ml PBS gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl am Zellzählgerät CASY® DT /Schärfe System GmbH, Reutlingen). Zur Messung wurden 100 µl der Zellsuspension 1:100 mit CASYton verdünnt und Partikel der Größe 7-50 µm gemessen. Über einen programmierten Verdünnungsfaktor wurde die Zahl der migrierten Zellen pro ml ermittelt. Jedes Behandlungs- bzw. Bestrahlungsschema wurde als doppelter Ansatz ausgeführt. Als Negativkontrolle wurde zellfreies Medium verwendet.

### 3.8.8.2 Wound-Scratch-Assay

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert und die Migration während der Behandlung beobachtet. Pro Well wurden definierte Zellzahlen von 800.000 Zellen unter Schwenken eingestreut. Nach 24 h Kultivierung und Erreichen einer ca. 90%igen Konfluenz wurde mittels einer sterilen 200 µl Pipettenspitze ein gerader Spalt in den Zellrasen gekratzt. Danach wurden die Wells mit PBS und Medium gewaschen. Daraufhin folgten die

Behandlung und das Anlegen von Hypoxie mit ggf. anschließender Radiatio. Pro Well wurden 3 ml mit Bet bzw. BS versetztes Medium in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben und die behandelten 6-Well-Platten inklusive Hypoxieindikatorstreifen innerhalb Anaerobags im Brutschrank inkubiert und 2 h nach Erreichen des hypoxischen Milieus bestrahlt. Die Zellen wurden unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen bei 37 °C inkubiert, bis die Läsion der Kontrolle zugewachsen war ( $t = 16$  h). Darauf folgend wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen für 20 min mit 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert. Über die Abstände und Flächen zwischen den Zellfronten erfolgte der Vergleich von den behandelten Zellen und den Kontrollen mit Hilfe der Software Adobe Photoshop CS 4.

### 3.8.9 Hypoxische Kulturbedingungen

Zur Generierung anaerober Kulturbedingungen diente ein sauerstoffbindendes Gasgeneratorsystem (Anaerocult® P, Merck), welches durch Zugabe von Wasser ein CO<sub>2</sub>-reiches Milieu schafft. Die Kulturflaschen mit den behandelten Zellen wurden zusammen mit einem Katalysator und einem mit Wasser befeuchteten Anaerotest®-Indikatorstreifen in den mitgelieferten Kunststoffbeutel gegeben. Anschließend wurden mit einem Pipetboy Aqua dest. auf den Katalysator pipettiert um die sauerstoffbindende Reaktion zu starten. Das System wurde mit einem Aneroclip® luftdicht abgeschlossen und ein mitgeführter methylenblauer Indikatorstreifen zeigte bei Erreichen der Sauerstoffarmut (< 0,1 % O<sub>2</sub>) einen Farbumschlag nach weiß. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 6 h bis 48 h bei 37 °C im Inkubator.

#### 3.8.9.1 Bestrahlungsexperimente

Die Zellen wurden eingestreut, behandelt und 24 h bzw. 48 h nach normoxischer bzw. hypoxischer Kultivierung mit Dosen von 2 Gy, 6 Gy und 15 Gy bestrahlt. Zur Radiatio der Kulturflaschen diente der Linearbeschleuniger ONCOR™ Impression + IMRT (6 - 15 MV; 2 Gy/min) in der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie der MLU Halle-Wittenberg. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Zellen unter Normoxie bzw. Hypoxie in den Inkubator bei 37 °C gestellt. Unmittelbar danach erfolgte die Zellernte für die weiteren Untersuchungen wie Klonogenitätstests, Protein- und RNA-Isolation, Annexin-V/PI-Assay, DAPI-Färbung und Zellzyklus-Analyse. Für weitere Experimente wurde die Ernte 24 h, 36 h und 48 h nach Bestrahlung wiederholt. Unbestrahlte Zellen der entsprechenden Ansätze wurden als interne Kontrollen mit zur Bestrahlung geführt und den gleichen vorherrschenden Temperaturschwankungen ausgesetzt. Zur Ermittlung der Strahlensensitivität der Glioblastomzelllinien diente die Dosis-Überlebens-Beziehung. Sie lässt sich als *survival fraction*  $SF_n$  in Bezug auf eine Strahlendosis  $n$  darstellen und wird aus dem Quotienten der Koloniezahl bestrahlter Proben und der Koloniezahl unbestrahlter

Kontrollzellen errechnet. Zur Bestimmung des Einflusses der Behandlung auf den Bestrahlungseffekt, diente der *enhancement factor* EF. Er wird für eine Strahlendosis durch den Quotienten der SF einer unbehandelten Kontrolle und der entsprechenden behandelten Probe bestimmt.

Mit Hilfe des Dosis-modifizierenden Faktors 10 (DMF10) kann aus den Dosis-Überlebenskurven bei 10%iger relativer Platiereffizienz eine durch die Behandlung veränderte Bestrahlungswirkung und Radiosensitivität bzw. -resistenz ermittelt werden. Die DMF10 Bestimmung aus den relativen klonogenen Überlebensfraktionen erfolgte durch Anwendung des linear quadratischen Modells  $SF = \exp - (\alpha D + \beta D^2)$ .

Hier ergibt ein  $DMF10 < 1$  eine Radioprotektion und  $DMF10 > 1$  eine Radiosensitivierung.

### 3.9 Durchflusszytometrische Methoden

Bei der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen aus einer Suspension durch eine Kapillare gesaugt und die optischen Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen bestimmt. Hierbei werden die Größe, Granularität, sowie Fluoreszenz im roten und grünen Bereich ermittelt. Das Datenpaket kann in einem Dot-Plot dargestellt und statistisch ausgewertet werden, wobei durch das Setzen von Gates und Regionen einzelne Subpopulationen voneinander abgegrenzt werden können. Zur Messung wurde das Durchflusszytometer FACSCalibur verwendet.

#### 3.9.1 Zellzyklus-Analysen

Zur Bestimmung des relativen DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie diente PI, welches in DNA und RNA interkaliert. Nach Permeabilisierung der Zellen mit Ethanol und Verdau der RNA mit RNase A, bindet PI proportional an die DNA. Somit ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle. Die Messergebnisse werden als *counts* (Zellzahl) gegen die relative Fluoreszenzintensität von PI (FL2A) in einem Histogramm dargestellt (Abb. 6) und spiegeln die Zellzyklusverteilung der Zellpopulation wieder. Hierbei stellt den Hauptanteil die G0/G1 (DNA-Gehalt: 2n) Population dar. Zellen in G2/M fluoreszieren doppelt so stark (DNA-Gehalt: 4n). Zellen der S-Phase befinden sich in der DNS-Synthese und erscheinen im Bereich dazwischen (DNA-Gehalt: 2n – 4n). Apoptotische Zellen, Zellmaterial und -fragmente erscheinen mit geringerer Fluoreszenz im SubG1-Bereich (hypoploid). Zellen in der G2/M-Phase sind sensibler für eine Radiatio als in der frühen G1/S-Phase [23, 126]. Zur Datenauswertung wurde die Software CellFit und Cyflogic verwendet [72].

#### 3.9.2 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen in Ethanol

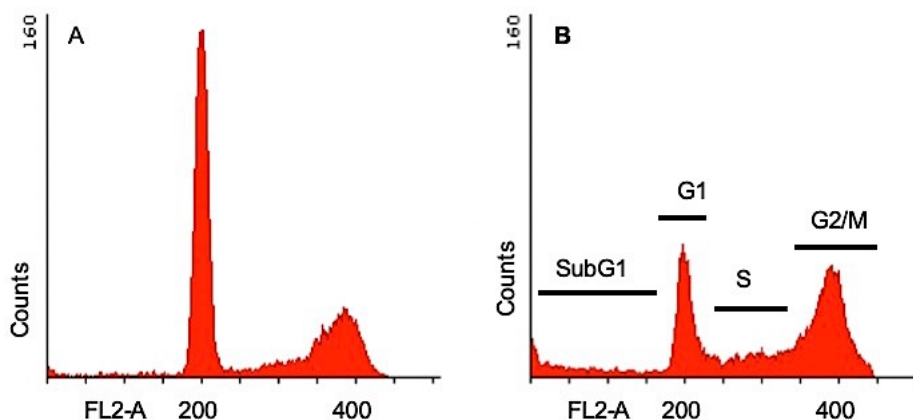
Die Zellen wurden nach entsprechender Behandlung durch Trypsinierung geerntet und nach Abstoppen mit Kulturmedium bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand

verworfen und in PBS resuspendiert. Die Zellsuspension mit 200.000 – 500.000 Zellen pro Probe wurden auf Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt und anschließend unter Vortexen mit 100%igem Ethanol (-20 °C) tropfenweise auf eine Endkonzentration von 70 % eingestellt. Die Zellen konnten so bei 4 °C bis zur Analyse mehrere Tage aufbewahrt werden.

### 3.9.3 Messung am FACScalibur

Am Analysetag wurden die in Ethanol fixierten und permeabilisierten Zellen zur Messung des DNA-Gehalts und Zellzyklusanalyse nach Zugabe von PBS bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und dieser Waschschrift wiederholt. Anschließend wurde das erhaltene Zellpellet in 500 µl RNase-haltiger PI-Färbelösung (2.2.1) resuspendiert und für 20 min für RNA-Verdau und DNA-Färbung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Zellen wurden direkt vor Messung am FACScalibur *gevortext*. Dubletten wurden von der Messung ausgeschlossen. Die Datenaquisition erfolgte mit der Software CellQuest im FL2 Kanal FL2-A und FL2-W.



**Abb. 6: Zellzyklusverteilungen der Zelllinie U251MG im FL2-A Histogramm.**

Zellzyklusphasen von links nach rechts: SubG1-; G1-; S-; G2/M-Phase aus der Software Cyflogic. Die Zellen wurden vor der Messung unter hypoxischen Bedingungen (< 0,1 % O<sub>2</sub>) für 48 h kultiviert und mit BS behandelt. A) unbehandelte DMSO-Kontrolle B) Behandlung mit 10 µM BS.

## 3.10 Molekularbiologische Methoden

### 3.10.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Die Zellernte für die RNA-Isolation erfolgte 24 h bzw. 48 h nach Inkubation mit BS bzw. Bet. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert und zusammen mit dem Kulturüberstand zentrifugiert. Die Lagerung des Zellpellets erfolgte bei -20 °C. Zur RNA-Isolierung diente das RNeasy<sup>®</sup> Mini RNA-Isolationskit (Qiagen, Hilden). Hierbei wurde das Pellet in 350 µl Lysepuffer resuspendiert und mit einem Volumen von 350 µl 70%igem EtOH gemischt. Die

Mischung wurde danach auf eine RNeasy-Säule überführt und für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert um die RNA an die Säule zu binden. Anschließend erfolgte die Reinigung der RNA nach Herstellerangaben in drei Waschschrritten. Zum Eluieren wurden den RNA-Proben 30 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und diese 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die RNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.10.2 RNA-Quantifizierung

Die Reinheit und der Gehalt der gewonnenen RNA wurde mittels Smart Spect TM (Biorad) spektralphotometrisch bestimmt. Für die Messung wurde die isolierte RNA im Verhältnis 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Eine optische Dichte  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht dabei 40 µg/mL RNA. Die RNA Proben wurden auf Verunreinigungen durch Proteine und DNA bei einer Extinktion von 280 nm untersucht. Die Reinheit ergibt sich aus dem Quotienten  $OD_{260} / OD_{280}$ . Bei Werten zwischen 1,7 bis 2,0 wurde das RNA-Produkt als rein betrachtet.

### 3.10.3 Reverse Transkription

Zur Umschreibung der isolierten mRNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde reverse Transkriptase verwendet. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt als Ansatzpunkt Primer, welche sich basenkomplementär an den RNA-Strang binden. Die verwendeten *random*-Hexamer-Primer, binden unspezifisch entlang der RNA. Unter Anwesenheit der Primer und dNTPs erzeugt die reverse Transkriptase ein DNA/RNA-Hybrid. Durch Erhitzen und Denaturieren des Hybrids kann wiederum die Einzelstrang-cDNA mit Hilfe einer DNA-abhängigen Polymerase zu einem Doppelstrang synthetisiert werden. Hierbei wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) verwendet und 1 µg Gesamt-RNA in der Reaktion eingesetzt. Zur effektiven Primer-Anlagerung wurde der Ansatz erst 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C gekühlt. Tab. 5 zeigt die Zusammensetzung des Hybridisierungsansatzes. Daraufhin wurde der Mastermix hinzugegeben, der sich gemäß Tab. 6 zusammensetzt. Im Thermocycler PTC-100TM fand die reverse Transkription Tab 7. folgend statt. Die Lagerung der cDNA erfolgte längerfristig bei -80 °C.

**Tab. 5:** cDNA-Synthese Hybridisierungsansatz

1x Hybridisierungsansatz	Vol <sub>end</sub> 12 µl
1 µg RNA	x µl
H <sub>2</sub> O	y µl
<i>random</i> Primer	1 µl

**Tab. 6:** cDNA-Synthese Mastermix

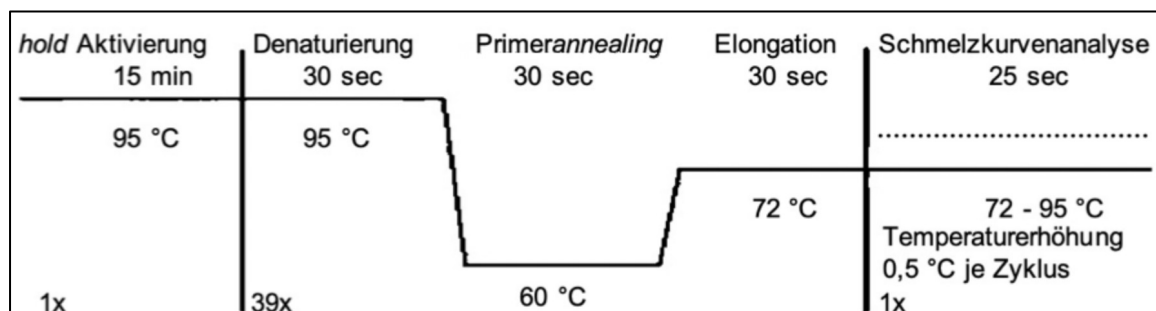
1x Mastermix	Vol <sub>end</sub> 8 µl
5 x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl

**Tab. 7:** cDNA-Synthese Thermocycler PTC-100™ Programm

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
Primerhybridisierung	5 min	25 °C
cDNA-Synthese	60 min	42 °C
Denaturierung	5 min	70 °C

### 3.10.4 Quantitative Real-Time-PCR mittels QuantiTect SYBR Green PCR Kit

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion qRT-PCR bietet basierend auf dem Amplifikationsprinzip der herkömmlichen PCR die Möglichkeit der quantitativen Expressionsanalyse mithilfe des fluoreszierenden Cyanidfarbstoffs SYBR Green. Dieser bindet unspezifisch und hochsensitiv an die sich bildende dsDNA, wobei seine Fluoreszenzintensität bis auf das 1000-fache der ungebundenen Form ansteigt. Mit Abschluss einzelner Elongationsschritte (Abb. 7) wird das Fluoreszenzsignal in „real time“ gemessen. Die entstandene Produktmenge korreliert hierbei mit dem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Der  $c_T$ -Wert (*cycle threshold value*) ergibt die Zykluszahl bei Überschreitung des festgelegten Fluoreszenzschwellenwertes (*threshold*) und dient zur Auswertung der qRT-PCR. Bei diesem Wert ist das Fluoreszenzsignal stärker als die Fluoreszenz der Hintergrundaktivität. Je höher der *template*-DNA-Gehalt im Ansatz ist, desto eher wird der Wert erreicht. Zur Mengenbestimmung dient die relative Standardkurvenmethode. Durch einen intern mitgeführten Standard lassen sich anhand der  $c_T$ -Werte die Konzentrationen der Proben ermitteln. Für die quantitative Bestimmung der

**Abb. 7:** Schema der Zyklen für die qRT-PCR

synthetisierten mRNA wird diese als relativer Wert zu konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen bezogen, welche sich in ihren Expressionswerten nicht verändern. Hierfür eignen sich GAPDH oder HPRT. Zum Ausschluss von Artefakten, welche das Fluoreszenzsignal anheben wie bei Primer-Dimerbildung, wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Am Ende der Reaktion wurde eine Analyse der Schmelzkurve vorgenommen. Der Denaturierungsschritt bei einer für das Amplifikat charakteristischen Temperatur diente zur Auftrennung des Doppelstrangs in zwei Einzelstränge. Dadurch wird der interkalierte Farbstoff freigesetzt und die Fluoreszenz nimmt entsprechend ab. Zur Bewertung der Reinheit des Produktes wurde der thermische Übergang beurteilt, welcher sich hierfür einheitlich darstellen musste. Tab. 8 enthält den Ansatz des SYBR®-Green PCR Kits QuantiTect™ und Tab. 9 das Protokoll, welche für die Reaktion verwendet wurden:

**Tab. 8:** QuantiTect SYBRGreen PCR-Ansatz

1x Ansatz	Vol <sub>end</sub> 15 µl
SYBRGreen QuantiTect 2x	7,5 µl
Primer fw (20 µM)	0,25 µl
Primer rv (20 µM)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	6 µl
Template	1 µl

**Tab. 9:** PCR-Protokoll der qRT-PCR

Schritt	Dauer	Temperatur	Wiederholungen
1 - <i>hold</i> Aktivierung	15 min	95 °C	1
2 -Denaturierung	30 sec	95 °C	39
3 -Primerannealing	30 sec	60 °C	39
4 -Elongation	30 sec	72 °C	39
5 -Schmelzkurvenanalyse	25 sec	72-95 °C	1

### 3.10.5 Multiplex-PCR

Zum Nachweis mehrerer verschiedener Genomabschnitte wurde die Multiplex-PCR entwickelt. Sie ist eine Form der qRT-PCR, bei der die Amplifikation verschiedener PCR-Produkte in nur einem Reaktionsgefäß abläuft. Verwendet wurden hierfür die miteinander nicht-hybridisierenden, fluoreszenzmarkierten Primer Hif-1α, Survivin, CA-IX, GLUT-1 und HPRT bzw. GAPDH aus dem Plexor PCR System Kit (Promega, USA). Zur Quantifizierung der Expressionslevel dienten mitgeführte externe Standards. Der Mastermix wurde entsprechend Tab. 10 angesetzt.



**Tab. 10:** Multiplex-PCR Mastermix

1 x Mastermix	Vol. <sub>end</sub> 15 µl
Primer (fw/rv)	je 0,3 µl
H <sub>2</sub> O (Nuklease frei)	1,1 µl
Template (cDNA)	1 µl
MOPS/EDTA Puffer	3 µl
Plexor® Master Mix 2x	7,5 µl

### 3.10.6 Protein-Isolierung aus Zellkulturen mittels RIPA-Lysepuffer

Die Zellkulturflaschen wurden zur Proteinisolation 24 h und 48 h nach Behandlung auf Eis gelagert und mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden bei 4 °C mit einem Zellspatel (*Cellscraper*) abgekratzt und zusammen mit dem Zellüberstand für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurde der Überstand abgesaugt und die Proben bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden durch Zugabe von ca. 50 - 70 µl RIPA-Lysepuffer aufgeschlossen und nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 4 °C mittels Ultraschall (Labsonic 2000 U) für 10 sec bei 4 °C homogenisiert. Danach folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 10 min. Durch eine Zentrifugation wurden Zelltrümmer vom Überstand für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C abgetrennt und das Lysat bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.10.7 Quantifizierung des Proteingehaltes

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration diente die Bradfordmethode. Bei saurem pH bildet Coomassie-Brillant-Blue-G-250 Komplexe mit basischen und aromatischen Protein-Seitenketten. Dabei wird die anionische Form dieses Trimethylmethanfarbstoffs stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 nm auf 595 nm. Zur Herstellung des Färbereagens findet eine Verdünnung des Bradford-Reagens im Verhältnis 1:5 mit Aqua bidest. statt. Um die Konzentration zu bestimmen wurden 2 µl vom Proteinlysate mit 998 µl Färbelösung für 20 min inkubiert und folgend mittels photometrischer Messung die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert (Bradford-Reagenz) bestimmt. Anhand einer Eichkurve wurden aus den detektierten Absorptionwerten die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

### 3.10.8 Western Blot

Die denaturierten Proteine werden zuerst mit einem Polyacrylamid-Gel nach ihrer Molekulargröße in Proteinbanden aufgetrennt. Ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld ermöglicht den sich anschließenden Proteintransfer auf eine

Membran. An der Membranoberfläche bleiben die Proteine aufgrund hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten und die Proteine sind nun für Antikörper-Bindung zugänglich. Nach diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Die Proteinbanden werden nun auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper (monoklonal oder polyklonal) identifiziert, indem sie sich an die passenden Proteinbanden binden. Unspezifisch gebundene Antikörper werden durch Waschschriffe mit Puffern wieder entfernt.

### **3.10.8.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Vor Auftrennung müssen die Proteine durch das Detergenz SDS denaturiert werden. Dabei findet eine Anlagerung von SDS an die Proteine statt, sodass ihre Eigenladung maskiert wird und diese nun negativ geladen vorliegen. Danach erfolgt die Auftrennung im porösen Träger-Polymergel durch elektrischen Strom. Kleine Proteine mit weniger Polypeptidketten passieren die Gelporen schneller, große Proteine hingegen werden im Gel stärker gebremst. Je Probe wurden 20 µg Protein in 4-12%igen Bis-Tris-Gradientengelen (Invitrogen) aufgetrennt. Zur Denaturierung wurden die Proben zunächst mit 2 µl Denaturierungspuffer und 6 µl Laufpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert. Zum Proteinlauf wurde das Gel in der Gelkammer fixiert (XCell Sure Lock™, Invitrogen) und diese mit 1 x MES-Laufpuffer gefüllt, sowie eine Spannung von 180 V, bei 4 °C und einem Strom von 120 mA für 1,15 h angelegt. Als Molekulargewichtsmarker wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) mitgeführt.

### **3.10.8.2 Proteintransfer**

Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt. Dabei wurde das Tank-Blot-Verfahren in einer Mini Trans-Blot® Cell (Biorad, Richmond, USA) angewendet. Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese für 1 min in MeOH inkubiert. Der Proteintransfer in 1 x Transferpuffer wurde bei 150 V, 260 mA für 2,3 h und 4 °C durchgeführt.

### **3.10.8.3 Immundetektion**

Antikörper können spezifisch und unspezifisch an Antigene binden. Zum Vermeiden unspezifischer Bindungen wurde die PVDF-Membran für 1 h mit Blockierungsreagenz aus 10%igem (w/v) Magermilchpulver und TBST-Puffer in einem 50 ml Greiner-Röhrchen inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers. Die PVDF-Membran wurde mit dem Antikörperreagenz bei 4 °C auf einem Rollenmischgerät über Nacht

inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein 3-maliger Waschschrift mit TBST. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 1 h auf dem Rollenmischer bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde hierfür in 10 % (w/v) Magermilch/ TBST-Puffer verdünnt. Im Anschluss erfolgte wiederum ein 3-maliger Waschschrift mit TBST zum Entfernen ungebundener Sekundärantikörper. Die Proteinsignale wurden durch das ECL- bzw. ECL-Plus/Prime-Verfahren (Amersham, Freiburg) detektiert. Hierbei wird die Peroxidase-vermittelte Oxidation von Luminol genutzt um über Chemolumineszenz einen Röntgenfilm (Kodak® Biomax MR) zu belichten. Zum Stoppen der Reaktion wurde Röntgenfilmfixierer (Kodak) und zum Entwickeln Röntgenfilmentwickler (Kodak) verwendet. Die Intensitäten der Proteinbanden im Vergleich zu den Kontrollen ermöglichten eine Quantifizierung der Proteinmenge wobei zur Normierung der  $\beta$ -Aktin-Gehalt diente.

### **3.10.9 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Analyse erfolgte der gepaarte *Student's* t-Test. Bei den Experimenten wurden die Rohdaten auf 100 % gesetzt und die Standardabweichung berechnet. Ein p-Wert von  $\leq 0.05$  wurde als signifikant und von  $< 0,01$  als hoch signifikant angesehen. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) und Origin 8.0. Die Ergebnisse repräsentieren prozentuale Anteile der unbehandelten DMSO-Kontrollen, deren Wert willkürlich auf 100 % festgesetzt wurde um als Referenzwerte gegenüber einer Behandlung bzw. Radiatio zu dienen.

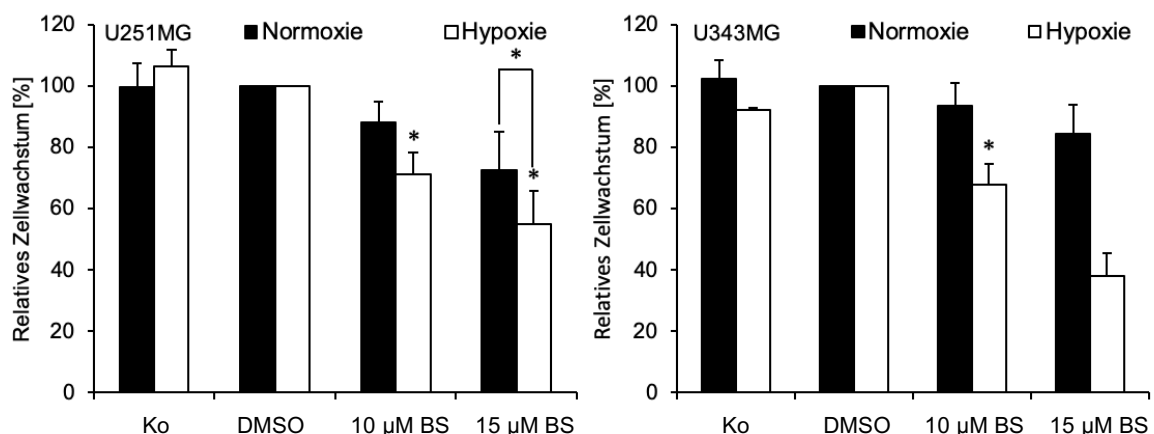
## 4 Ergebnisse

Zielstellung dieser Arbeit waren die Untersuchungen zu strahlen- und molekularbiologischen Effekten von BS (engl. BA) und Bet unter normoxischen im Vergleich zu hypoxischen Kultivierungsbedingungen. Untersucht wurden die Gliomzelllinien U251MG und U343MG um die Effekte von BS in Kombination mit einer Radiatio im Vergleich von Normoxie und Hypoxie zu zeigen.

### 4.1 Proliferation und Langzeitüberleben unter Betulinsäure-Inkubation

#### 4.1.1 Zellwachstum in Abhängigkeit von der Betulinsäure-Konzentration

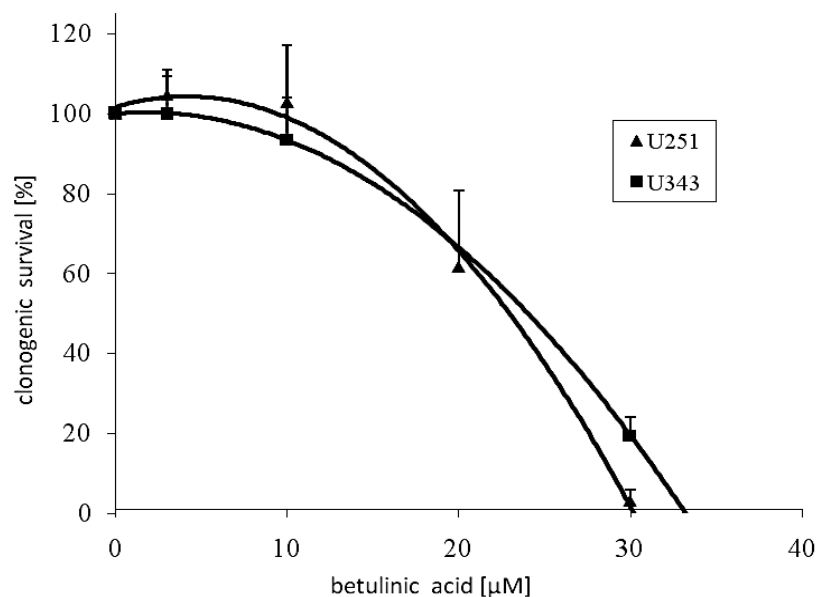
Die Daten zeigen, dass sowohl insbesondere bei Hypoxie mit steigender BS-Konzentration (beide Zelllinien:  $> 15 \mu\text{M}$ ) ein starker Abfall im Zellwachstum zu erkennen ist (Abb. 8). Der IC50-Wert unter Hypoxie von U251MG-Zellen liegt bei  $16 \mu\text{M}$  und der von U343MG-Zellen bei  $12 \mu\text{M}$ . Unter Normoxie betrug das relative Wachstum bei einer Konzentration von  $15 \mu\text{M}$  für die U251MG noch 72 % bzw. für die U343MG noch 85 %. Das deutet auf ein stärkeres Ansprechen von BS in der Glioblastomzelllinie U343MG unter Hypoxie im Vergleich zur U251MG hin. Unter Normoxie zeigt sich die U251MG jedoch sensibler gegenüber BS. Hinsichtlich der Wirkung unter Normoxie bzw. Hypoxie lässt sich feststellen, dass beide Zelllinien unter Hypoxie mit vermindertem Wachstum auf eine BS-Behandlung reagieren, dabei war die Hemmung bei Behandlung der U251MG mit  $15 \mu\text{M}$  BS signifikant gesteigert ( $p = 0,021$ ).



**Abb. 8: Relatives Zellwachstum nach 24 h-Inkubation mit BS.** Dargestellt ist das relative Wachstum der Gliomzelllinien U251MG und U343MG nach 24 h Inkubation mit BS unter Normoxie und Hypoxie. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % bezüglich der korrespondierenden DMSO-Kontrolle. Es wurden mind. drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\* signifikantes  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der Betulinsäure-Konzentration unter Normoxie

Zur Bestimmung des Langzeitüberlebens wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Im Vorfeld erfolgten Proliferationsuntersuchungen durch Bestimmung vitaler Zellen. Die beiden Gliomzelllinien U251MG und U343MG zeigten mit zunehmender BS-Konzentration (3 - 30  $\mu\text{M}$ ) unter Normoxie eine deutliche Abnahme des klonogenen Zellüberlebens. Nach 24 h Inkubation mit BS betrug eine 50%ige Inaktivierung des klonogenen Zellüberlebens (IC50) 23  $\mu\text{M}$  für U251MG bzw. 24  $\mu\text{M}$  für U343MG (Abb. 9). Eine längere Inkubationszeit von 48 h führte zu einer erhöhten Zytotoxizität in beiden Zelllinien.

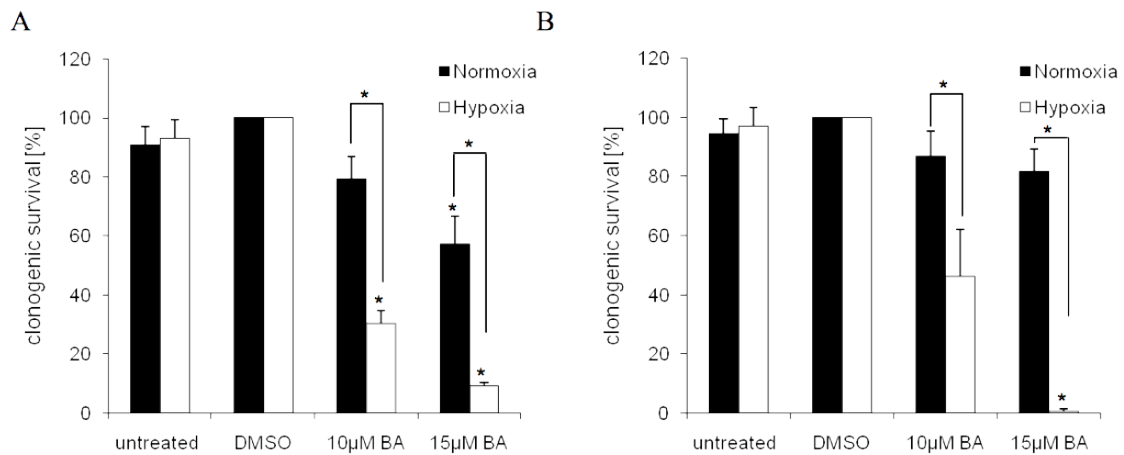


**Abb. 9: Überlebensrate (*clonogenic survival*) der Zelllinien U251MG und U343MG im Koloniebildungstest nach 24 h Inkubation mit BS (*betulinic acid*) unter normoxischen Bedingungen (21 %  $\text{O}_2$ ).** Die Daten repräsentieren Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen. (IC50 U251MG: 23  $\mu\text{M}$  IC50 U343MG: 24  $\mu\text{M}$ ). Übernommen aus Bache, Zschornak et al. 2011 [72].

#### 4.1.3 Klonogenes Überleben in Abhängigkeit von der Betulinsäure-Konzentration und vom Sauerstoffgehalt

Unter Normoxie stellt sich eine Reduktion des klonogenen Überlebens von 20 – 40 % dar. Während unter Normoxie nur eine moderate Abnahme der Klonogenität erkennbar ist, zeigt sich unter Hypoxie ein wesentlich stärkerer hemmender Effekt.

Nach 24 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  BS unter Normoxie reduzierte sich das klonogene Überleben in der U251MG auf 79 %  $\pm$  7 % ( $p = 0,07$ ) und 57%  $\pm$  9 % ( $p = 0,03$ ) sowie in der U343MG auf 87 %  $\pm$  8 % ( $p = 0,15$ ) und 82%  $\pm$  7 % ( $p = 0,07$ ). Unter Hypoxie zeigte sich ein signifikanter Hemmungseffekt von BS auf das klonogene Überleben (Abb. 10) mit 30 %  $\pm$  4 % ( $p = 0,01$ ) und 9 %  $\pm$  1 % ( $p = 0,03$ ) bzw. 46 % ( $p = 0,10$ ) und 0.8%  $\pm$  0,5 % ( $p = 0,03$ ). Unter hypoxischen Bedingungen wies BS in beiden Gliomzelllinien eine verstärkte Zytotoxizität auf.



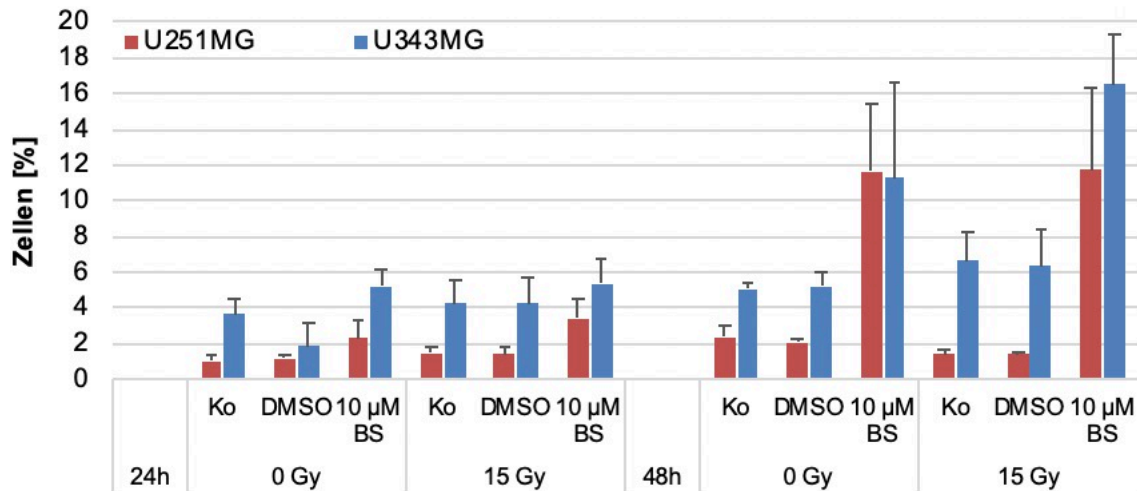
**Abb. 10: Klonogenes Überleben der Zelllinien U251MG (A) und U343MG (B) im Koloniebildungstest unter Normoxie (schwarz) und Hypoxie (weiß).** Die Aussaat der Zellen erfolgte 24 h nach Inkubation mit BS (*betulinic acid*, BA) unter Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) und Hypoxie (< 0,1 % O<sub>2</sub>). DMSO diente als Bezugskontrolle. Die Daten repräsentieren Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Versuche (\* p < 0,05). Übernommen aus Bache, Zschornak *et al.* 2011 [72].

## 4.2 Analyse des Zellzyklus nach Betulinsäure-Behandlung

Zur Beurteilung der Zellzyklusverteilung und möglicher Hinweise auf eine Zellzyklus-abhängige Proliferationshemmung der behandelten Gliomzellen im Vergleich zu den unbehandelten DMSO-Kontrollzellen wurde eine DNA-Färbung mit PI durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür für 24 h und 48 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert und am Linac bestrahlt. Die Messung des DNA-Gehaltes erfolgte am Becton Dickinson FACS-Calibur.

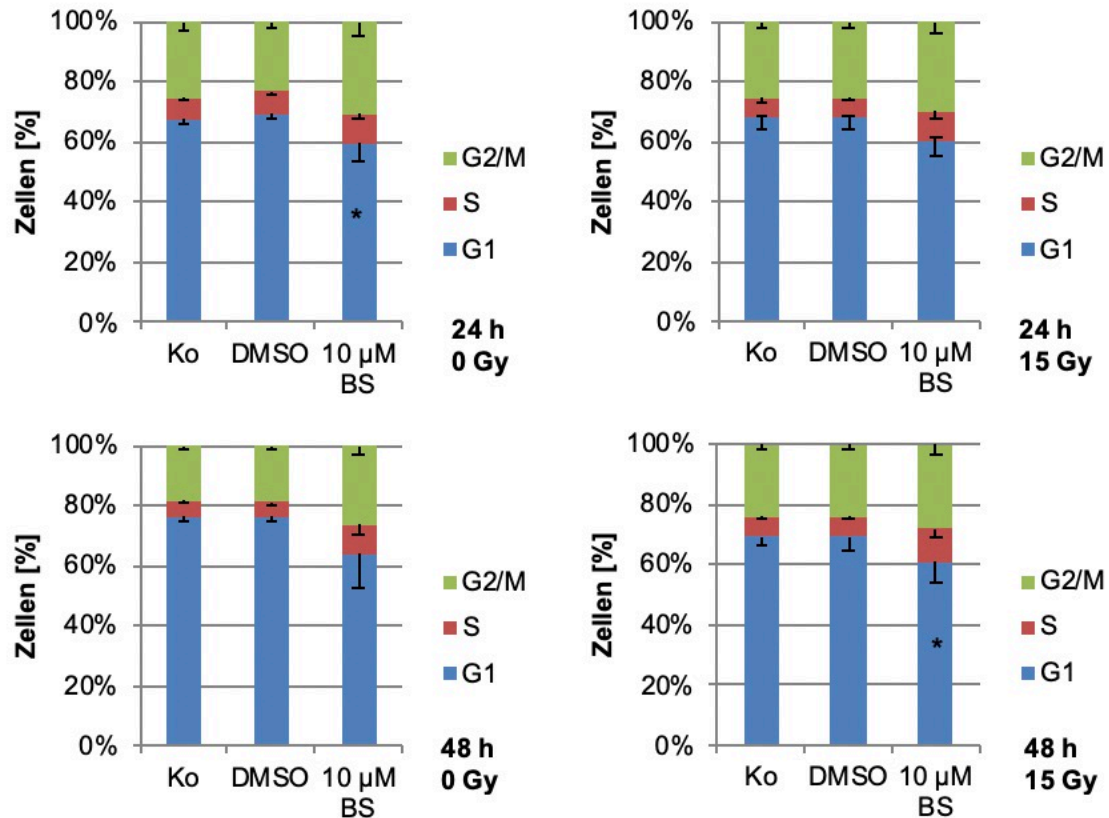
### 4.2.1 Zellzyklusuntersuchungen an Gliomzellen 24 h und 48 h nach Betulinsäure-Behandlung und Radiatio unter Hypoxie

Vorversuche in der Arbeitsgruppe wiesen unter Normoxie mit einer Behandlung von 10 µM BS nur sehr geringe Effekte auf den Zellzyklus nach, sodass in dieser Arbeit zum einen unter hypoxischen Bedingungen und zum anderen zusätzlich in Kombination mit einer Radiatio untersucht wurde, ob eine zellzyklusabhängige Proliferationshemmung auftritt. Hypoxie führt in U343MG-Zellen zu einem Anstieg der SubG1-Zellen auf 4 % bis 6 %. Dagegen sind in U251MG-Zellen kaum SubG1-Zellen zu beobachten ( $\leq 2\%$ ). Insbesondere nach 48h führt eine Behandlung mit BS in beiden Zelllinien zu einem Anstieg der SubG1-Phase auf 12 % bis 16 % (Abb. 11). Zudem ist für U343MG-Zellen ein Absinken an G1-Zellen bzw. ein Anstieg an G2M- und S-Phase-Zellen nach BS-Behandlung zu beobachten (Abb. 12). Die gleichen Effekte sind in U251MG-Zellen noch stärker ausgeprägt (Abb. 13). Die Bestrahlung selbst scheint unter Hypoxie bzw. BS-Behandlung in beiden Zelllinien kaum Effekte auf den Zellzyklus hervorzurufen.



**Abb. 11: Anteil der SubG1-Phase-Zellen von U251MG und U343MG 24 h und 48 h nach Inkubation mit BS unter hypoxischen Bedingungen - ohne und mit Radiatio.** Gezeigt ist der prozentuale Anteil der SubG1-Zellpopulationen in den Zellzyklusphasen nach Kultivierung und Radiatio von 15 Gy unter Hypoxie mit  $< 0,1\%$   $O_2$ . Es wurden mind. drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ).

Hypoxie allein zeigte im Vergleich zu Normoxie bei DMSO-Kontrollzellen eine Zunahme von Zellen in der G1/G0-Phase. Des Weiteren zeigte sich nach BS-Behandlung für beide Zelllinien eine Abnahme der Zellen in der Population der G1-Phase (Abb. 12, 13) und ein Anstieg der Zellen in der S-Phase. Die BS-Behandlung führte bei U251MG-Zellen zu einer Zunahme an Zellen in der SubG1-Phase mit nachgewiesenem Zelldebris, sowie in der G2/M-Phase mit Zellzyklusarrest. Für die Zelllinie U343MG zeigt sich eine geringere Abnahme der Population der G1-Phase und geringere Zunahme der G2/M-Phase, jedoch ebenfalls ein Anstieg an Zellen in der SubG1-Phase mit steigender BS-Konzentration. Mit zusätzlicher Radiatio zeigte sich in der U251MG eine größere Zunahme der Zellen/Zelltrümmer in der SubG1-Phase (24 h: 2-fach, 48 h: 6-fach) als bei der U343MG (24 h: gleichbleibend, 48 h: 3-fach). Diese ist mit den Daten zum Klonogenitätstest konform. Nach einer Behandlungsdauer von 48 h war dieser Effekt verstärkt. Unter Hypoxie zeigen die Zellen im Zellzyklus einen G1-Arrest im Vergleich von 24 h zu 48 h. Die zusätzliche BS-Inkubation bewirkt hier insgesamt eine Abnahme der G1- und Zunahme der G2/M-Phase. In der Zelllinie U343MG sind diese Effekte geringer, in der U251MG stärker ausgeprägt. In Abb. 12 sind die Populationen ohne Zelltrümmer und Debris (SubG1-Phase) dargestellt. Die zusätzliche Radiatio in U343MG-Zellen mit 15 Gy führte nach 24 h Inkubation zu keinem zusätzlichen Effekt der Änderung der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen. Ein geringer Effekt in der G1-Phase war jedoch nach 48 h Inkubation mit 10 µM BS zu sehen ( $59,9\% \pm 2,9\%$  vs.  $53,6\% \pm 2,8\%$ ,  $p = 0,012$ ) sowie ein leichter Anstieg an Zellen in der S-Phase ( $4,7\% \pm 0,5\%$  vs.  $6,9\% \pm 2,9\%$ ). Die alleinige Behandlung mit 10 µM BS führte unter Hypoxie im Vergleich zu den DMSO-Kontrollzellen bereits nach 24 h Inkubation



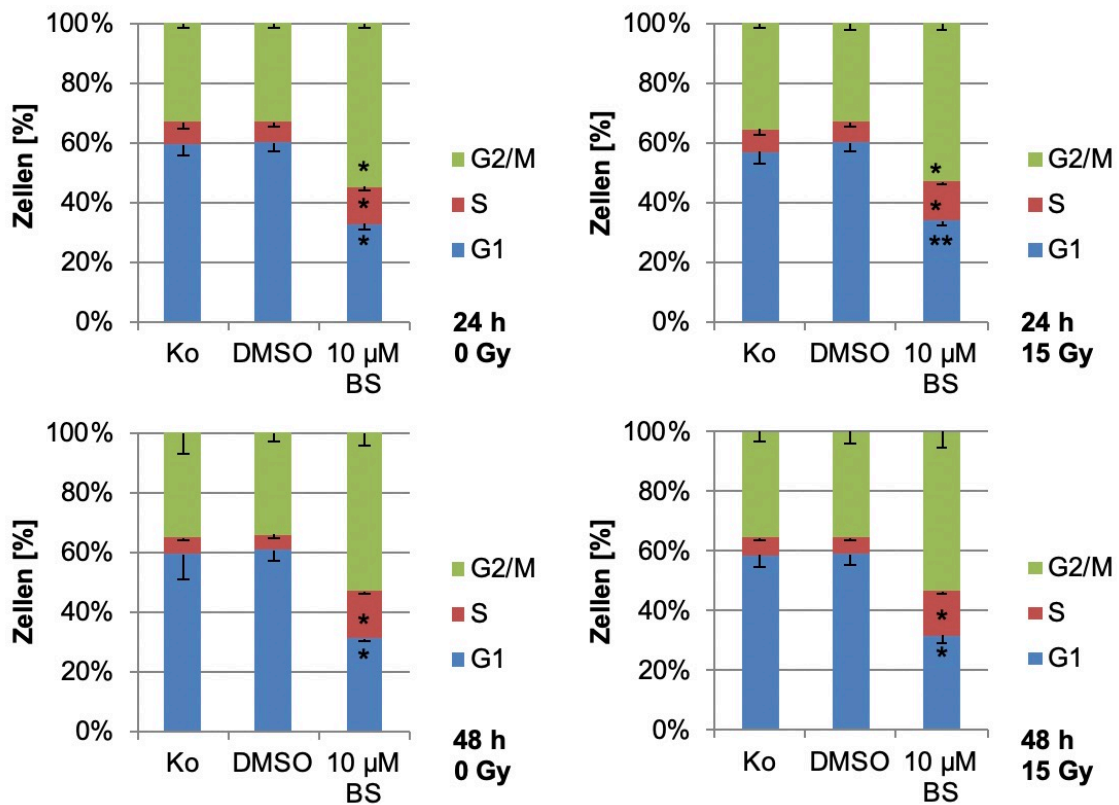
**Abb. 12: Zellzyklusverteilung der Zelllinie U343MG nach 24 h und 48 h Inkubation mit BS unter hypoxischen Bedingungen ohne (links) und mit Radiatio (rechts).** Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Zellpopulationen in den Zellzyklusphasen nach Kultivierung und Radiatio von 15 Gy unter Hypoxie mit  $< 0,1\%$   $O_2$ . Es wurden mind. drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ).

zu einer Abnahme von  $69,3\% \pm 1,4\%$  auf  $59\% \pm 5,6\%$ ,  $p = 0,048$  in der G1-Phase (Abb. 12).

In U251MG-Zellen zeigte sich nach 24 h unter Hypoxie in den unbehandelten und unbestrahlten Kontrollen bereits eine erhöhte Anzahl von Zellen in der G2/M-Phase ( $33,0\% \pm 1,4\%$ ) und der S-Phase ( $7,0\% \pm 1,9\%$ ) gegenüber der U343MG. Nach 24 h Behandlung mit  $10\ \mu\text{M}$  BS stieg der Anteil signifikant auf  $54,9\% \pm 1,5\%$ ,  $p = 0,009$  in der G2/M-Phase bzw.  $12,5\% \pm 1,3\%$ ,  $p = 0,006$  in der S-Phase und sank signifikant in der G1-Phase von  $59,9\% \pm 2,8\%$  auf  $32,6\% \pm 1,9\%$ ,  $p = 0,008$ . Die Bestrahlung der Zellen wirkte hier kaum zusätzliche Effekte auf den Zellzyklus. Es ergaben sich relativ geringe Unterschiede zwischen einer 24 h oder 48 h Behandlung (Abb. 13).

Die Zunahme an Zelltrümmern in der SubG1-Phase zeigte sich korrelierend mit steigender BS-Konzentration. In der Zelllinie U251MG zeigte sich hier  $10\ \mu\text{M}$  BS als geeignete Konzentration. Zur Verdeutlichung der Effektivität zur Generierung von Zelltrümmern, wurden die SubG1-Phase-Werte in das jeweilige Verhältnis zur korrespondierenden





**Abb. 13: Zellzyklusverteilung der Zelllinie U251MG nach 24 h und 48 h Inkubation mit BS unter hypoxischen Bedingungen ohne (links) und mit Radiatio (rechts).** Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Zellpopulationen in den Zellzyklusphasen nach Kultivierung und Radiatio von 15 Gy unter Hypoxie mit  $< 0,1\%$   $O_2$ . Es wurden mind. drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ).

DMSO-Kontrolle gesetzt. Hierbei zeigt sich für die U251MG ohne Radiatio eine 5,5-fache und mit Radiatio von 15 Gy eine 8-fache Erhöhung des SubG1-Phase-Anteils der behandelten Zellen mit BS. In der U343MG betrug dieses Verhältnis nur das 2,2- bzw. 2,6fache. Insgesamt zeigt sich durch die BS Behandlung eine Zunahme an Zellen in der strahlensensibleren G2/M-Phase. Die U251MG zeigte diesen Effekt deutlich stärker ausgeprägt als die U343MG. Die Zunahme an Zelltrümmern der SubG1-Phase nach Radiatio zeigte sich unter BS-Behandlung an der U251MG ebenfalls deutlich verstärkt im Vergleich zur Zelllinie U343MG.

### 4.3 Effekte von Betulinsäure und Bestrahlung auf die Apoptoseinduktion von GBM-Zellen

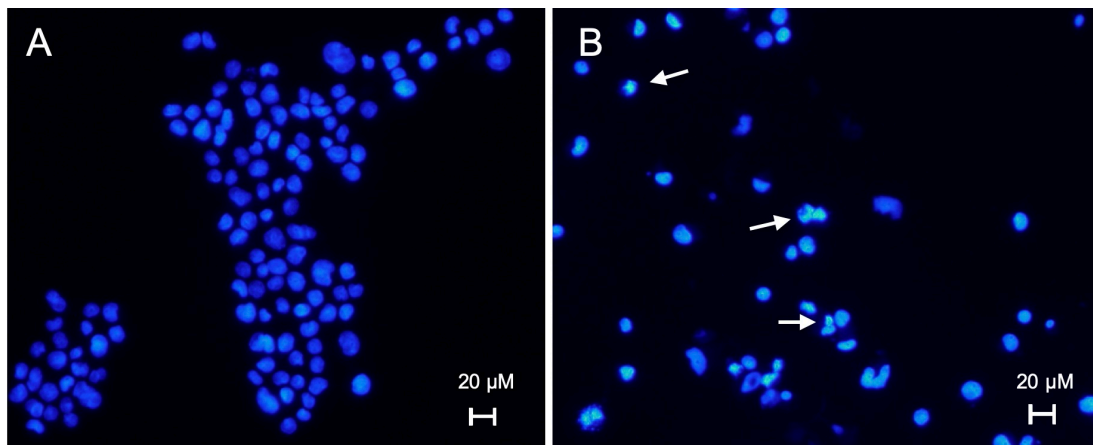
Im ersten Schritt zur Apoptoseanalyse wurde zur qualitativen Beurteilung des Zelltodes die DAPI-Färbung angewandt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde anschließend der Annexin-V/PI-Test etabliert.

### 4.3.1 DAPI-Analyse zur Beurteilung morphologischer Kriterien der Apoptose nach Betulinsäure-Behandlung

Zur Beurteilung der morphologischer Apoptosekriterien der Zellkerne in der U251MG und der U343MG wurde die DAPI-Zellkern-Färbung durchgeführt. Hier stellte sich heraus, dass die morphologischen Kriterien der Apoptose bei den verwendeten Zelllinien in relativ geringem Maße auftraten (Abb. 14). Die typischen Apoptosekriterien wie Kernfragmentierungen waren in den benutzten Zelllinien in geringem Maße nur unter Hypoxie zu verzeichnen und es traten vereinzelt Kernkondensationen und Kernpyknosen auf, wobei teilweise Zelltrümmer mit Chromatin in der U251MG sichtbar waren. Die behandelten und bestrahlten Zellen zeigten diese Kriterien im Vergleich zu den DMSO-Kontrollzellen in größerem Maße. Die Zelllinie U343MG wies nach Behandlung mit BS und Bestrahlung von 15 Gy unter Hypoxie in sehr geringem Maße morphologische Unterschiede zu den DMSO-Kontrollzellen auf (Daten nicht gezeigt).

Die typischen Apoptosekriterien waren in einem erweiterten Untersuchungszeitraum von 48 h nach Behandlung ebenfalls nicht zu verzeichnen. Im Vergleich waren die morphologischen Veränderungen bei der U251MG deutlicher als bei der U343MG zu beobachten (Abb. 14 B).

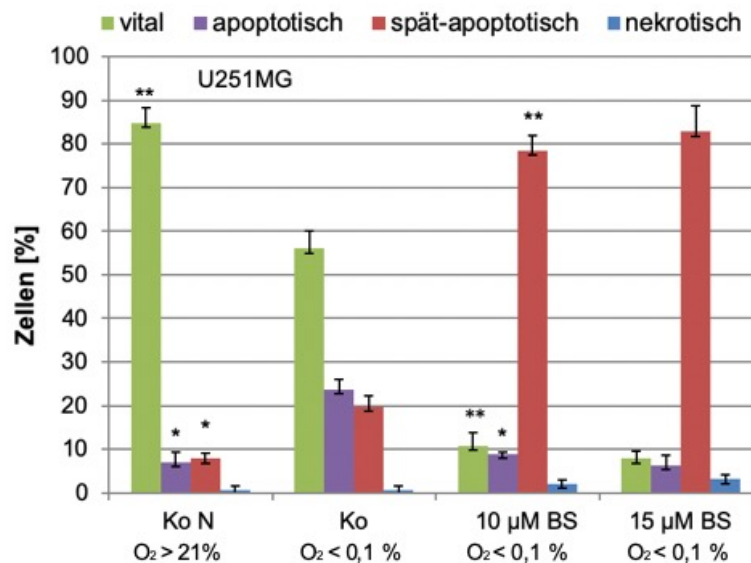
Aufgrund des geringen Apoptosenachweises in Glioblastomzellen anhand dieser Methode wurde ein weiterer Assay, mittels Annexin-V/PI-Färbung, etabliert.



**Abb. 14: DAPI-Färbung von U251MG-Zellen nach Behandlung mit BS und Bestrahlung mit 15 Gy unter 48 h Hypoxie.** Es sind blau fluoreszierende Zellkerne der einzelnen Versuche dargestellt. A) U251MG: DMSO-Kontrolle, B) U251MG: 10 µM BS. Typische Apoptosezeichen gekennzeichnet mit Pfeil: DNA-Fragmentation, Kernkondensation/-pyknosen. Gezeigt ist ein repräsentatives Sichtfeld aus mind. drei voneinander unabhängigen Versuchen (Skalierungsbalken: 20 µM).

### 4.3.2 Annexin-V/PI Färbung nach Betulinsäure-Behandlung unter Hypoxie

Die Zelllinie U251MG zeigt bereits durch Anlegen von Hypoxie im Kulturbeutel ohne BS-Behandlung eine Verminderung vitaler Zellen und einen Anstieg in der apoptotischen und spät-apoptotischen Zellpopulation im Vergleich zur Normoxie. Bei einer BS-Behandlung mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bzw. 15  $\mu\text{M}$  BS verstärkt sich der Effekt und der Anteil nekrotischer Zellen nimmt ebenfalls zu. Alleiniges Anlegen von Hypoxie und somit Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes von 21 % auf < 0,1 % führte nach 48 h in der U251MG zu einer Abnahme der vitalen Zellen von 84,7 %  $\pm$  3,5 % ( $p < 0,001$ ) auf 56,0 %  $\pm$  4,1 % ( $p < 0,001$ ) und zu einer Zunahme der apoptotischen bzw. spät-apoptotischen Zellen von 6,9 %  $\pm$  2,5 % ( $p = 0,006$ ) auf 23,7 %  $\pm$  2,3 % bzw. 7,8 %  $\pm$  1,2 % ( $p = 0,005$ ) auf 19,6 %  $\pm$  2,7 %. Durch 10  $\mu\text{M}$  BS-Behandlung verstärkte sich diese Verringerung vitaler Zellen auf 10,8 %  $\pm$  2,9 % ( $p < 0,001$ ) bei Erhöhung apoptotischer bzw. spät-apoptotischer Zellen auf 8,8 %  $\pm$  0,4 % ( $p = 0,006$ ) und 78,4 %  $\pm$  3,5 % ( $p < 0,001$ ). Durch Steigerung der BS Konzentration auf 15  $\mu\text{M}$  verstärkte sich dieser Effekt weiter mit Verringerung vitaler Zellen auf 7,8 %  $\pm$  1,6 % und Erhöhung apoptotischer bzw. spät-apoptotischer Zellen auf



**Abb. 15: Durchflusszytometrische Apoptoseanalyse in U251MG-Zellen nach 48 h Behandlung mit BS unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle.** Aufgetragen ist die relative Zellzahl in %. Dabei steht blau für nekrotische Zellen, rot für spät-apoptotische Zellen, grün für vitale Zellen und lila für apoptotische Zellen. Mit steigender BS-Konzentration steigt der Anteil der apoptotischen und spät-apoptotischen Zellpopulation, während der Anteil an vitalen Zellen sinkt. Dargestellt ist der Effekt unter Hypoxie. Die Hypoxie-Kontrolle (Ko) zeigt im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle (Ko N) zusätzlich ein Zellanstieg in der apoptotischen und spät-apoptotischen Zellpopulation. Es sind die Mittelwerte drei voneinander unabhängiger Untersuchungen dargestellt. Die ausgeschriebenen Prozentzahlen im Fließtext (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; Ko dient als Bezug).

nur noch  $6,2 \% \pm 2,3 \%$  und  $82,8 \% \pm 5,9 \%$ . Zusätzlich stieg der Anteil nekrotischer Zellen auf  $3,1 \% \pm 1,9 \%$  jedoch ohne Signifikanz.

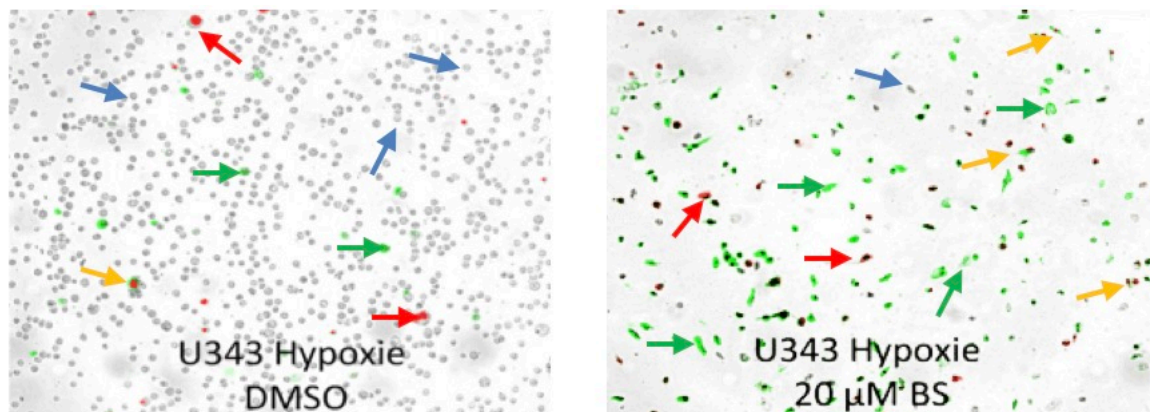
Da bereits ein Großteil der Zellen durch Anlegen der Hypoxie für eine Dauer von 48 h in Apoptose übergeht (Abb. 15), wurde in weiteren Experimenten eine zeitabhängige Inkubationsreihe mit definierter Konzentration angefertigt.

#### 4.3.3 Gegenüberstellung der Wirkung von Betulinsäure unter Normoxie und Hypoxie nach Annexin-V/PI-Färbung

Mittels Annexin-V/PI-Assay wurden an den Glioblastomzelllinien U251MG und U343MG Apoptoseanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 h vor den Messungen mit BS ( $5 \mu\text{M}$  bis  $25 \mu\text{M}$ ) inkubiert und unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert.

Zur Etablierung des Assays erfolgte zunächst die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zur Optimierung der Reproduzierbarkeit und Standardisierung der Ergebnisse, erfolgten anschließend die Messungen mittels Durchflusszytometrie und Software-gestützter Auswertung der Daten.

#### 4.3.4 Fluoreszenzmikroskopie und Annexin-V/PI-Färbung der U343MG nach Betulinsäure-Behandlung unter Hypoxie



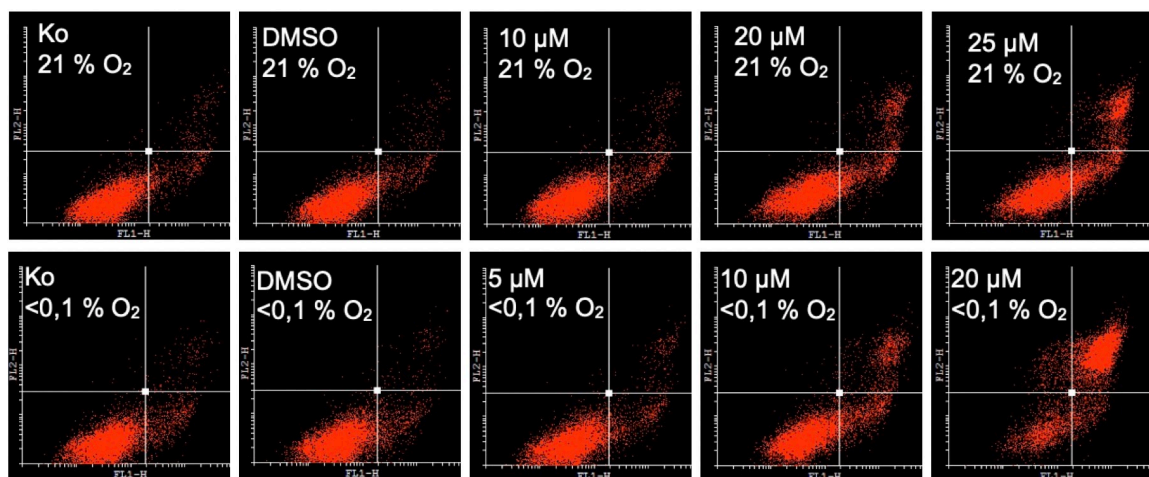
**Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopie der Zelllinie U343MG nach BS-Behandlung unter Normoxie und Hypoxie mit Annexin-V-Fluos/PI Färbung.** Dargestellt sind unter Hypoxie mit  $20 \mu\text{M}$  BS behandelte Zellen und DMSO-Kontrollzellen der Zelllinie U343 MG nach Färbung mit Annexin-V und PI. dargestellt. Overlay – Überlagerungsdarstellung von Phasenkontrast, Annexin-V, PI. Unter BS Einfluss zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollzellen ein erhöhter Anteil an Annexin-V positiven (A+) Zellen. Dieser Effekt wird durch Hypoxie verstärkt. Ebenso erhöht sich die Fraktion an PI positiven Zellen (PI+) sowie (PI+ und A+). Pfeil blau: vital / grün: früh-apoptotisch / gelb: spät-apoptotisch / rot: nekrotisch

Unter BS-Einfluss zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen ein erhöhter Anteil an Annexin-positiver Zellen. Ebenso erhöht sich die Fraktion an PI-positiver Zellen. Insgesamt führte eine Behandlung der Zelllinien U251MG und U343MG mit BS zu einer Verminderung des Anteils vitaler Zellen bei gleichzeitiger Erhöhung des Anteils apoptotischer und spät-apoptotischer Zellen. Vereinzelt zeigten sich darüber hinaus nekrotische Zellen. Dieser Effekt wurde durch Hypoxie verstärkt (Abb. 16).

#### 4.3.5 Vergleich von Normoxie und Hypoxie unter Betulinsäure-Behandlung nach 24 h in Zelllinie U343MG mittels Durchflusszytometrie nach Annexin-V/PI-Färbung

Um die optimale Konzentration für weitere Annexin-V/PI-Untersuchungen zu bestimmen wurde eine Konzentrationsreihe von 5  $\mu\text{M}$  bis 25  $\mu\text{M}$  BS und 24 h Inkubation angefertigt. Die Zelllinie U343MG wurde hierfür gewählt, da diese in den vorhergehenden Versuchen nach Hypoxieanlage und BS-Behandlung eine deutlichere Verminderung der Klonogenität als die U252MG und somit BS hier eine stärkere Toxizität zeigte. Da aus den vorhergehenden Versuchen deutlich wurde, dass BS unter Hypoxie bereits verstärkt toxisch wirkt, wurde unter Hypoxie zusätzlich mit 5  $\mu\text{M}$  und unter Normoxie mit 25  $\mu\text{M}$  BS inkubiert. Die Messungen am FACS zeigten eine bessere Reproduzierbarkeit und ermöglichten umfangreichere Versuche, als die Auswertung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.

In der Zelllinie U343MG zeigt sich mit steigender Konzentration von BS eine Abnahme an vitalen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Wie in Abb. 17 verdeutlicht, sinkt durch



**Abb. 17: Dot-Plots FL2/FL1 der Zelllinie U343MG. Dargestellt sind durchflusszytometrisch ermittelte Dot-Plots der Zelllinie U343MG nach 24 h Behandlung und Färbung mit Annexin-V/PI. Normoxie (oberer Reihe), Hypoxie (untere Reihe) mit jeweils steigender Betulinsäurekonzentration nach rechts. Quadrantenzuordnung: nekrotische Zellen links oben (A-/PI+), vitale Zellen links unten (A-/PI-), spät-apoptotische Zellen rechts oben (A+/PI+), apoptotische Zellen rechts unten (A+/PI-).**

20  $\mu\text{M}$  BS-Behandlung unter Normoxie die Zahl vitaler Zellen von 93,9 % auf 81,7 %. Unter Hypoxie ist dabei eine Vitalitätsabnahme von 92,7 % bereits bei 10  $\mu\text{M}$  BS auf 82,4 % und bei 20  $\mu\text{M}$  BS auf 14,9 %. Damit zeigt sich unter hypoxischen Bedingungen eine höhere BS-induzierte Zytotoxizität an U343MG-Zellen evident. Durch die Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  BS steigt der Anteil apoptotischer Zellen unter Normoxie von 4,6 % auf 11,7 %, sowie der Anteil spät-apoptotischer Zellen von 1,4 % auf 6,8 %. Unter Hypoxie steigt der Anteil apoptotischer Zellen von 6,0 % auf 7,4% mit bereits 10  $\mu\text{M}$  BS und der Anteil spät-apoptotischer Zellen von 1,2 % auf 77,0 % mit 20  $\mu\text{M}$  BS. Die Fraktion der nekrotischen Zellen nimmt nach BS-Behandlung unter Hypoxie ebenfalls stärker zu (von 0,06 % auf 3,94 % mit 20  $\mu\text{M}$  BS) als unter Normoxie (von 0,03 % auf 0,13 % mit 20  $\mu\text{M}$  BS).

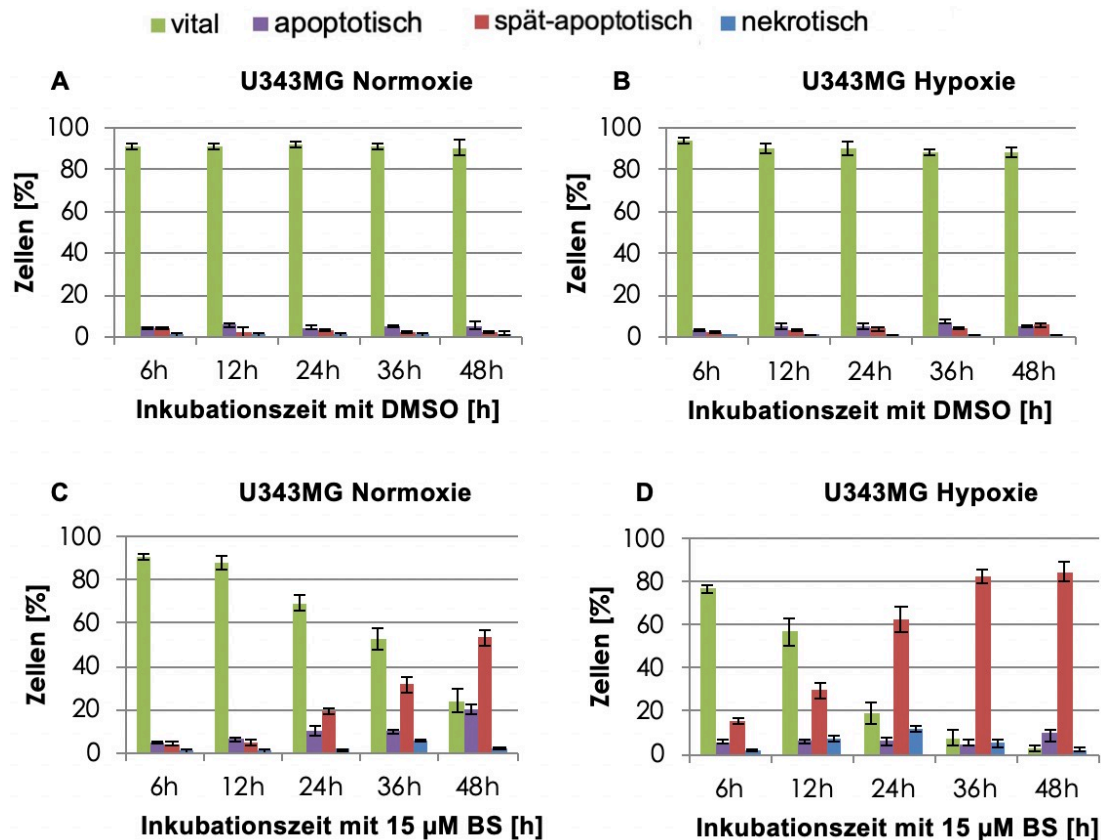
Zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  BS stellt sich im Vergleich zu den Kontrollzellen ein geeigneter Anteil erhöhter Annexin-V-positiver und PI-positiver Zellen bei einer Verminderung des Anteils Annexin-V-negativer und PI-negativer Zellen von 91,0 % auf 81,7 % ein. Dieser Effekt wird durch Hypoxie verstärkt und zeigt bei der Behandlung von 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  BS eine Abnahme vitaler Zellen von 82,0 % auf 14,9 %, sodass die geeignete Konzentration auf 15  $\mu\text{M}$  BS für weitere Experimente mit der Zelllinie U343MG zu Annexin-V bestimmt wurde. Um zu untersuchen ob eine Verstärkung des Hypoxie-Effektes über die Verlängerung der Hypoxie-Zeit möglich ist und ob eine Zelllinie bereits früher auf die Behandlung reagiert, wurden weitere FACS-Analysen mit 15  $\mu\text{M}$  BS durchgeführt.

#### **4.3.6 Optimierung der Inkubationszeit von Betulinsäure unter Normoxie und Hypoxie mittels Annexin-V/PI-Färbung und Durchflusszytometrie**

Um die geeignete Behandlungszeit für die Zelllinien bestimmen zu können, wurden zum Vitalitätsnachweis Zeitreihen mit 6 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h Behandlungsdauer und sich jeweils anschließendem Annexin-V/PI-Test und Durchflusszytometrie angefertigt. Dabei wurde die Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  BS eingesetzt und die Zellen unter Normoxie und Hypoxie inkubiert. Der Anteil vitaler Zellen nach alleiniger Inkubation mit DMSO für 48 h ergab in der Zelllinie U343MG bzw. U252MG unter Normoxie 90 % bzw. 82 % und unter Hypoxie bereits eine Abnahme auf 89 % bzw. 62 %. Hierbei zeigte sich die U251MG unter alleiniger DMSO-Lösungsmittel-Behandlung auf die Hypoxie sensibler als die Zelllinie U343MG im Sinne der Apoptoserate.

Die U343MG verzeichnete unter Normoxie nach 24 h BS-Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur DMSO-Kontrolle einen Anstieg der apoptotischen und spät-apoptotischen Population von 4,6 %  $\pm$  0,5 % und 3,1 %  $\pm$  0,7 % auf 10,0 %  $\pm$  2,3 und 19,0 %  $\pm$  1,5 %, verbunden mit einer Abnahme der vitalen Zellen auf 69,3 %  $\pm$  3,7 %. Unter Hypoxie zeigt sich dieser Anstieg apoptotischer Zellen bereits nach 6 h bis zu einer deutlich stärkeren Abnahme vitaler Zellen nach 24 h auf 19,1 %  $\pm$  5,0 %. Ohne BS-Behandlung erfolgt unter Hypoxie bis zu 48 h kaum ein Anstieg der apoptotischen Fraktion (Abb. 18).

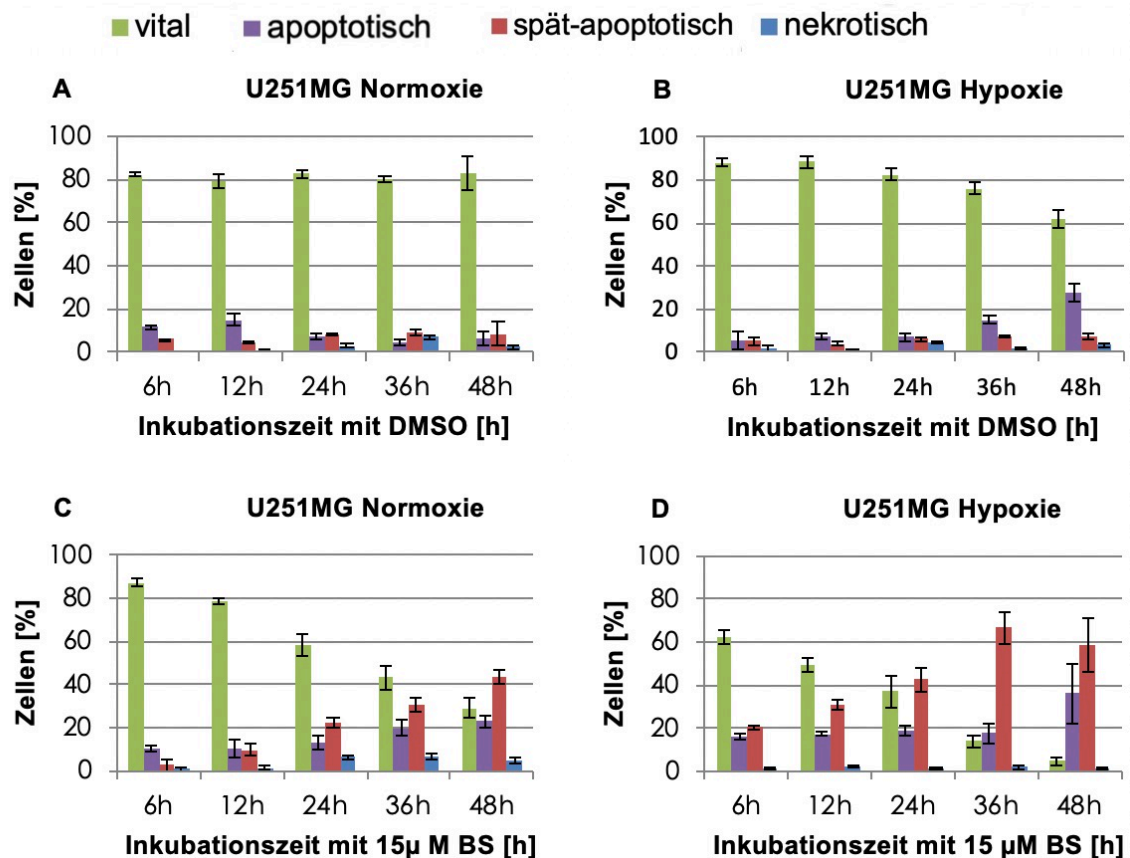




**Abb. 18: Vergleich der Inkubationszeit von BS der U343MG Zelllinie. Dargestellt sind durchflusszytometrisch ermittelte Fraktionen der Zelllinie U343MG nach Inkubationszeit von 6 h bis 48 h und Färbung mit Annexin-V/PI. Die Wirkung von 15 µM BS hat unter Normoxie nach 24 h einen Anstieg der apoptotischen und spät-apoptotischen Population zur Folge. Die Wirkung von 15 µM BS zeigt unter Hypoxie bereits nach 6 h einen Anstieg der apoptotischen und spät-apoptotischen Population. Ohne BS-Behandlung ist ein Anstieg der apoptotischen Fraktion erst ab 36 h zu verzeichnen.**

In der Zelllinie U251MG führt die Wirkung von 15 µM BS unter Normoxie nach 24 h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu einem Anstieg der apoptotischen und spät-apoptotischen Population von  $7,7 \% \pm 0,5 \%$  und  $7,0 \% \pm 1,5 \%$  auf  $13,0 \% \pm 1,5 \%$  und  $22,4 \% \pm 2,6 \%$ . Die Wirkung von 15 µM BS bedingt unter Hypoxie bereits nach 6 h einen deutlichen Anstieg der apoptotischen und spät-apoptotischen Population. Ohne BS-Behandlung ist ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Fraktion erst ab 36 h unter Hypoxie ersichtlich (Abb. 19).

Es ist festzustellen, dass hypoxische Kulturbedingungen in beiden Zelllinien die Fraktion apoptotischer Zellen erst nach 36 h erhöhen, wobei die Zelllinie U251MG gegenüber der U343MG eine größere Apoptoserate aufweist. Während die zusätzliche BS-Inkubation in beiden Zelllinien unter Hypoxie bereits nach 6 h Apoptose auslöst, war unter Normoxie eine konzentrationsabhängige Zunahme erst ab einer Inkubationszeit von 24 h bis 48 h nachweisbar. Unter Hypoxie zeigte sich die Zelllinie U343MG sensibler gegenüber der BS-



**Abb. 19: Vergleich der Inkubationszeit von BS der U251MG Zelllinie.** Dargestellt sind durchflusszytometrisch ermittelte Fraktionen der Zelllinie U251MG nach Inkubationszeit von 6 h bis 48 h und Färbung mit Annexin-V/PI. Die Wirkung von 15 µM BS bedingt unter Normoxie nach 12 h einen Anstieg der apoptotischen und spät-apoptotischen Population (C). Die Wirkung von 15 µM BS verursacht unter Hypoxie bereits nach 6 h einen Anstieg der apoptotischen und spät-apoptotischen Population (D). Ohne BS-Behandlung ist ein Anstieg der apoptotischen Fraktion erst ab 36 h zu verzeichnen.

Inkubation von 24 h bei nur noch 19 % vitalen Zellen gegenüber 37 % in der U251MG. Des Weiteren stellte sich nach Inkubation zeitabhängig eine frühere Apoptose der U251MG gegenüber der U343MG heraus mit prozentualen Anteilen vitaler Zellen nach 12 h Normoxie von 78 % zu 88 % und unter Hypoxie mit 49 % zu 57 %.

Während in der DAPI-Färbung nur vereinzelt Apoptosekriterien sichtbar waren, wurde mittels Annexin-V/PI-Assay eine deutliche Inkubationszeit-abhängige Wirkung von BS auf einen fließenden Übergang der Zelltodformen von Apoptose bis Nekrose in beiden GBM-Zelllinien nachgewiesen.

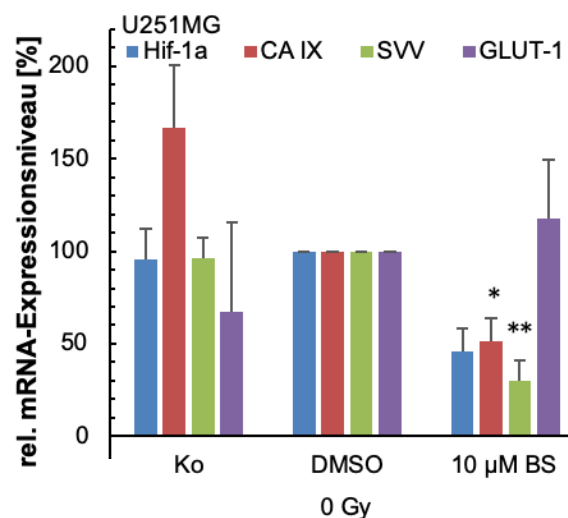
#### 4.4 RNA-Untersuchungen nach Betulinsäure-Behandlung

In den Vorversuchen zeigte sich die U251MG mit ihren stabileren mRNA-Expressionsniveaus an ubiquitären Referenzgenen besser für die PCR-Untersuchungen geeignet als die U343MG. Im Folgenden wurden deshalb an der Zelllinie U251MG die Auswirkungen der BS-Behandlung und simultaner Bestrahlung auf die mRNA-Expression untersucht.



#### 4.4.1 Einfluss von Betulinsäure auf die mRNA-Expression der Hypoxiemarker Hif-1 $\alpha$ , GLUT-1, CA-IX und des Apoptoseinhibitors SVV in der U251MG unter Hypoxie und Radiatio mittels qt-PCR

Für die Analyse von Hypoxiemarkern wurde die mRNA aus den Gliomzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Danach wurden Multiplex-PCRs und Real-Time-PCRs mit Gen-spezifischen Primern durchgeführt, wobei als Referenzgen GAPDH bzw. HPRT diente. Um die Effekte einer BS-Behandlung auf die Hypoxiemarker Hif-1 $\alpha$ , GLUT-1, CA-IX und den Apoptoseinhibitor SVV zu untersuchen, wurden die U251MG Zellen unter hypoxischen Kulturbedingungen mit BS inkubiert und anschließend entsprechende mRNA-Expressionsniveaus analysiert.



**Abb. 20: mRNA-Expressionslevel von Hypoxiemarkern in U251MG-Zellen nach 24 h Inkubation mit 10 µM BS unter Hypoxie.** Dargestellt sind die relativen Expressionsniveaus der Hypoxie-Marker-Gene Hif-1 $\alpha$ , GLUT-1, CA-IX und des Apoptose-Inhibitor-Proteins SVV. Zur Ermittlung des Effektes von BS und Bestrahlung wurden die Werte auf die zugehörigen DMSO-Kontrollen der entsprechenden Gene bei 0 Gy normiert. Bei den präsentierten Werten handelt es sich um Mittelwerte von mind. drei voneinander unabhängigen Versuchen (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

Die Versuche belegten, dass die 10 µM BS-Behandlung die mRNA-Expressionslevel von Hif-1 $\alpha$ , CA-IX als auch SVV reduziert. Die Behandlung unter Hypoxie mit 5 µM BS zeigte nur geringe Änderungen in den mRNA-Expressionsniveaus. Für eine 10 µM BS Behandlung von 24 h ohne Bestrahlung war eine signifikante Verminderung der Expression von SVV-mRNA auf 29,8 %  $\pm$  11,0 % ( $p = 0,01$ ) zu beobachten. Auch die relative mRNA-Expression von Hif-1 $\alpha$  sank auf 45,9 %  $\pm$  12,1 % ( $p = 0,24$ ) und von CA-IX auf 51,4 %  $\pm$  12,3 % ( $p = 0,03$ ). Das Expressionsniveau von GLUT-1 wurde interessanterweise nicht herabreguliert (Abb. 20).

Um den Bestrahlungseffekt zu untersuchen, wurden die Effekte der einzelnen Gene nach einer simultanen Radiatio mit 15 Gy analysiert. Hierbei bewirkte die Bestrahlung auf mRNA-

Ebene für SVV, Hif-1 $\alpha$  und CA-IX keine zusätzlichen Effekte. Für GLUT-1 war wiederum keine Herabregulation der mRNA-Expressionslevel zu beobachten. Ähnliche Resultate waren auch nach einer Inkubationszeit von 48 h zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

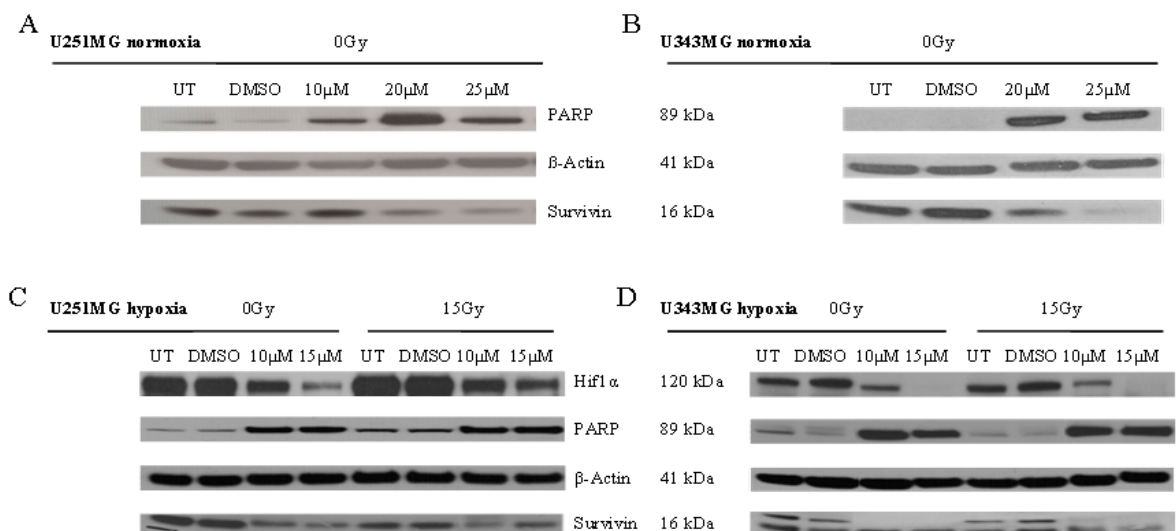
#### 4.5 Protein-Analysen von PARP, Hif-1 $\alpha$ und SVV nach Betulinsäure-Behandlung

Neben mRNA-Expressionsanalysen wurde der Einfluss von BS auf das Protein-Niveau von Apoptose-Induktor PARP, Hypoxiemarker Hif-1 $\alpha$  und Apoptose-Inhibitor Survivin mittels Western Blot charakterisiert.

##### 4.5.1 Einfluss von Betulinsäure und Bestrahlung auf die Protein-Expressionslevel von PARP, Hif-1 $\alpha$ und SVV in U251MG und U343MG

Für die Messung der Proteinexpression der Zelllinien U251MG und U343MG nach Behandlung mit BS für 24 h und einer Radiatio mit einer Einzeldosis von 15 Gy wurden Antikörper (AK) gegen PARP, Hif-1 $\alpha$  und SVV eingesetzt. Die Inkubation erfolgte unter Normoxie mit Konzentrationen von 10  $\mu$ M bis 25  $\mu$ M BS und unter Hypoxie von 10  $\mu$ M bis 15  $\mu$ M BS mit einer zusätzlichen Radiatio als Einzeldosis von 15 Gy.

Die Westernblotanalysen zeigen unter dem Einfluss von BS kräftigere Banden an gespaltenem PARP und schwächere SVV-Level, während das Hypoxie-induzierte Proteinlevel an Hif-1 $\alpha$  sinkt. Unter Normoxie führte die Inkubation mit 20  $\mu$ M und 25  $\mu$ M BS



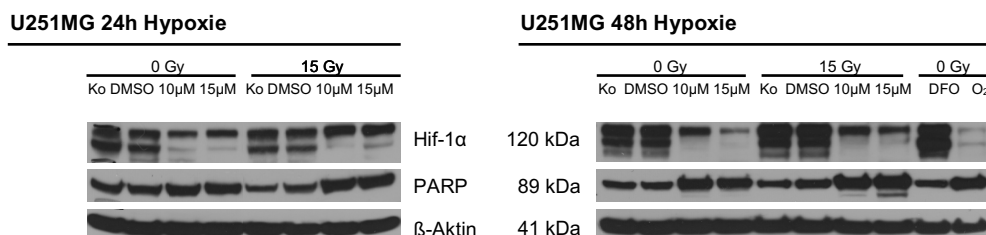
**Abb. 21: PARP-, Hif-1 $\alpha$ - und SVV-Proteinexpression der Zelllinien U251MG und U343MG nach Behandlung mit BS für 24 h unter Normoxie und Hypoxie sowie Radiatio mit 15 Gy unter Hypoxie.** Die Bestrahlung erfolgte unter Normoxie bzw. Hypoxie mit 10  $\mu$ M bis 15  $\mu$ M bzw. 25  $\mu$ M BS. Zur Detektion wurden AK gegen PARP, Hif-1 $\alpha$  und SVV eingesetzt. Die Western Blot-Analysen zeigen unter dem Einfluss von BS kräftigerer Banden an gespaltenem PARP und schwächere SVV-Banden an, während das Hypoxie-induzierte Proteinlevel an Hif-1 $\alpha$  sinkt. Nach Proteinisolierung wurden jeweils gleiche Proteinmengen des Gesamtzell-Lysates und als Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin verwendet. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot dreier voneinander unabhängiger Versuche. Übernommen aus Bache, Zschornak *et al.* 2011 [72].

in der Zelllinie U251MG neben einer PARP-Spaltung auch zu einer Verringerung des Apoptose-Inhibitors Survivin. Unter Hypoxie ließen sich gleiche Effekte wie unter Normoxie schon bereits bei geringeren BS-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  BS beobachten. Zusätzlich führte die Behandlung mit BS zu einer Reduktion der Expressionslevel an Hypoxie-induziertem Protein Hif-1 $\alpha$  in beiden Zelllinien (Abb. 21).

Die Kombination von BS-Behandlung mit einer Radiatio nach 24 h bewirkt keine zusätzlichen Effekte auf die PARP-Spaltung oder Expression an Survivin, weder unter normoxischen noch hypoxischen Bedingungen. Die Expression von Hypoxie-induziertem Hif-1 $\alpha$  zeigt sich in der Zelllinie U251MG stärker ausgeprägt als in der Zelllinie U343MG.

#### 4.5.2 Einfluss der Inkubationsdauer von Betulinsäure auf die Protein-Expressionslevel von PARP und Hif-1 $\alpha$ in U251MG-Zellen

Zusätzlich wurde der Einfluss der Hypoxiedauer auf das Protein-Niveau von PARP und Hif-1 $\alpha$  im Western Blot in der U251MG analysiert (Abb. 22). Hier diente DFO (Desferrioxamin) [10  $\mu\text{M}$ ] als Hif-1 $\alpha$  pos. Hypoxie-Kontrolle und eine O<sub>2</sub>-exponierte Probe mit 15  $\mu\text{M}$  BS als Hif-1 $\alpha$  neg. Normoxie-Kontrolle. Die Proben wurden 24 h und 48 h nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  BS bestrahlt und anschließend geerntet. Das PARP-Protein-expressionslevel ist nach 24 h Behandlung mit BS im Vergleich zu den Kontrollen erhöht und steigt nach 48 h Behandlung weiter an. Die HIF-1 $\alpha$ -Expression zeigt sich im Vergleich nach 48 h stärker gehemmt. Die Radiatio mit 15 Gy zeigt unter Hypoxie eine zusätzliche Steigerung an PARP-Protein in der Zelllinie U251MG.



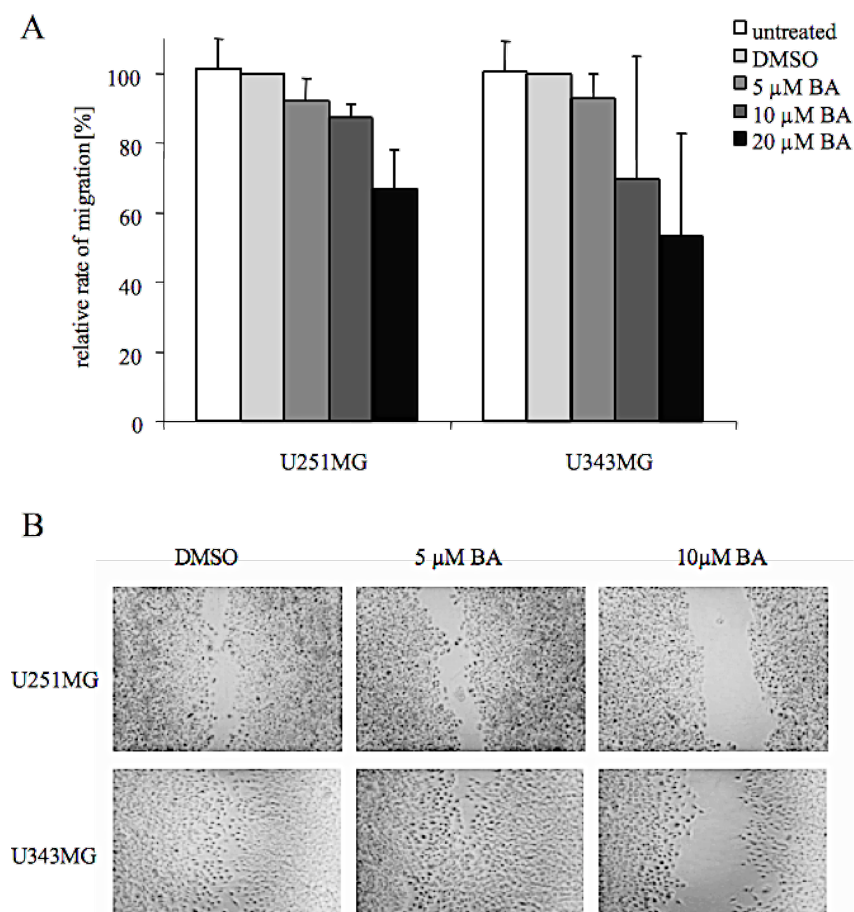
**Abb. 22: Zeitabhängige Proteinexpression der Zelllinie U251MG nach 24 h und 48 h Behandlung mit BS und Radiatio mit 15 Gy.** Die Inkubation erfolgte unter Hypoxie mit 10  $\mu\text{M}$  bis 15  $\mu\text{M}$  BS und anschließender Bestrahlung. Zur Detektion wurden AK gegen PARP und Hif-1 eingesetzt. Die Western Blot-Analysen zeigen unter dem Einfluss von BS stärkere PARP- und schwächere SVV-Banden, während das Hypoxie-induzierte Proteinlevel an Hif-1 $\alpha$  sinkt. Der Effekt zeigte sich nach 48 h verstärkt. DFO (Desferrioxamin) [10  $\mu\text{M}$ ]: HIF-1 $\alpha$  pos. Kontrolle, O<sub>2</sub>: 15  $\mu\text{M}$  BS unter Normoxie: HIF-1 $\alpha$  neg. Kontrolle. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot dreier voneinander unabhängiger Versuche. (übernommen aus Zschornak 2011, OncoRay Posterpreis, Symposium experimentelle Strahlentherapie Dresden).

## 4.6 Effekte von Betulinsäure auf die Migration von Gliomzelllinien

Die Migration von Tumorzellen ist ein entscheidender Mechanismus zur lokalen Ausbreitung und Metastasierung von Malignomen. Diverse Systemtherapien zielen darauf ab die Migrationsfähigkeit von Tumoren zu hemmen.

### 4.6.1 Einfluss von Betulinsäure auf die Migration der U251MG und U343MG unter Normoxie

Die Effekte von BS auf die Migrationsfähigkeit beider Glioblastomzelllinien wurden nach 24 h Inkubation im Boydenkammer-Assay und im Wound-Scratch-Assay beurteilt. Die Migrationsraten zeigten sich nach höheren Konzentrationen von BS in den Zelllinien U251MG und U343MG vermindert. Verglichen zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen führte eine Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  BS unter normoxischen



**Abb. 23: Effekte von BS auf die Migration von Gliomzelllinien.** Dargestellt sind Migrationsraten mit BS-behandelter U251MG- und U343MG-Zellen. Die Analysen erfolgten durch modifizierten Boydenkammer-Assay (A) und Wound-Scratch-Assay (B) unter normoxischen Bedingungen. Im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen zeigte die Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  BS eine verminderte Migrationsfähigkeit in beiden Zelllinien. Die Daten und mikroskopischen Darstellungen repräsentieren Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Versuche. Übernommen aus Bache, Zschornak *et al.* 2011 [72].

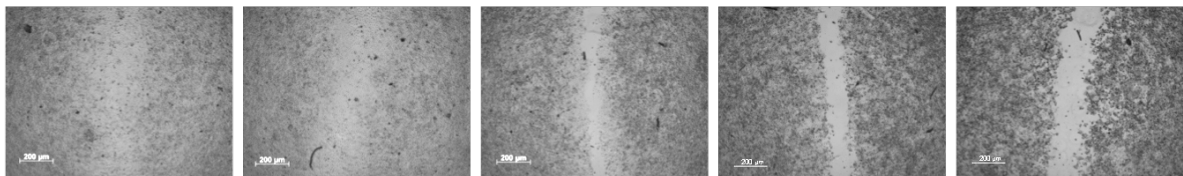
Bedingungen im Boydenkammer-Assay (Abb. 23 A) zu einer verminderten Migrationsrate von 92 % ( $p = 0,21$ ), 87 % ( $p = 0,12$ ) und 67 % ( $p = 0,09$ ) in U251MG, sowie zu 93 % ( $p = 0,10$ ), 70 % ( $p = 0,20$ ) und 53 % ( $p = 0,08$ ) in U343MG. Ebenso zeigten sich verminderte Migrationsraten nach BS-Behandlung im mikroskopisch beurteilten Wound-Scratch-Assay (Abb. 23 B).

#### 4.6.2 Einfluss von Betulinsäure auf die Migration der U251MG unter Normoxie und Hypoxie

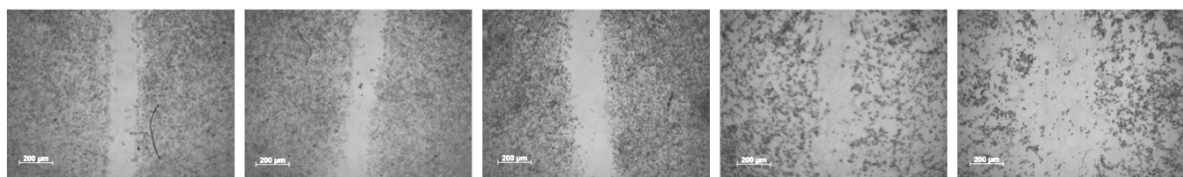
Nachfolgend wurde untersucht, ob BS unter Hypoxie ebenfalls die Migration beeinflusst. Hierfür wurde zur mikroskopischen Darstellung der Wound-Scratch-Assay gewählt. In der mikroskopischen Auswertung (Abb. 24) zeigte sich unter Normoxie eine Hemmung der Migration der U251MG Zellen bei noch sichtbarem Zellspalt bis zu einer Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$ .

Mit steigender BS-Konzentration nahm die Größe des verbleibenden Zellspaltes und damit die Hemmung der Migration zu. Unter Hypoxie war bereits ab 5  $\mu\text{M}$  eine makroskopisch sichtbare Hemmung der Migration zu erkennen. Ab 10  $\mu\text{M}$  war zusätzlich der Zelltod mit Abschwimmen der Tumorzellen zu beobachten.

##### Normoxie



##### Hypoxie



Ko

DMSO

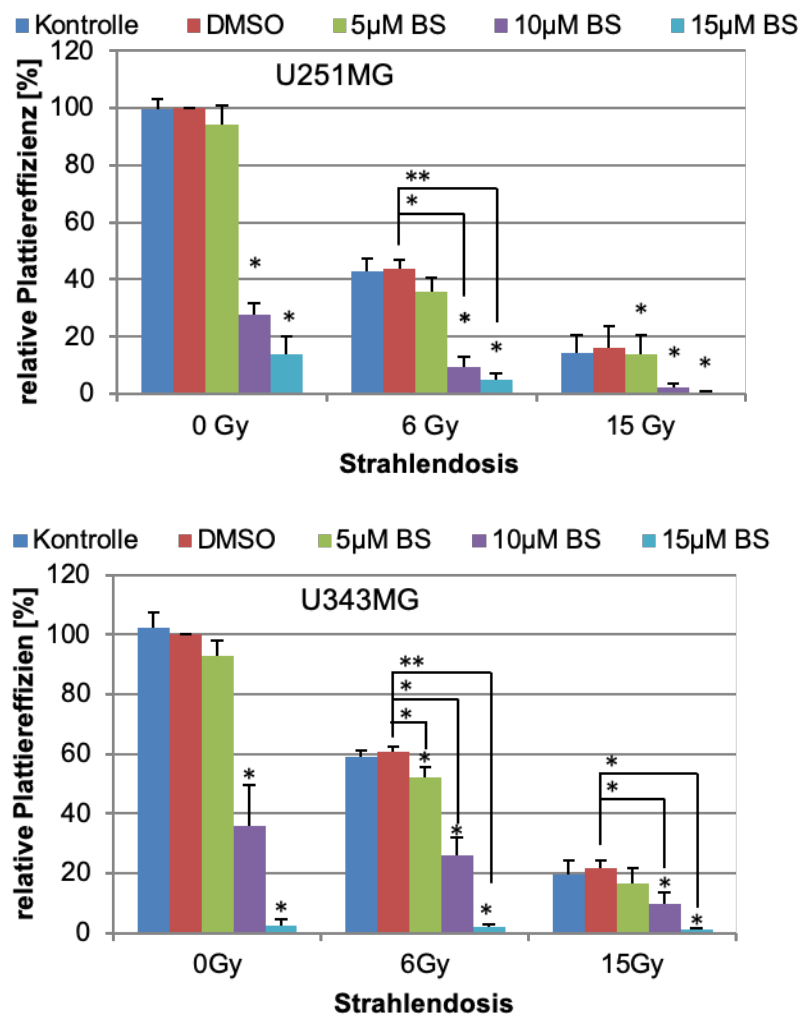
5  $\mu\text{M}$  BS10  $\mu\text{M}$  BS15  $\mu\text{M}$  BS

**Abb. 24: Migration der Zelllinien U251MG nach 24 h Inkubation mit BS, Lichtmikroskopische Bildausschnitte aus dem Wound-Scratch-Assay.** Nach der Inkubation und Verwundung des Zellrasens mit einer 200  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze wurden die Zellen für 18 h unter 21 % bzw. < 0,1 % Sauerstoff kultiviert. Die Fläche des Scratches wurde mikroskopisch analysiert. Der Bezug galt der unbehandelten- und DMSO-Kontrolle. Es wurden mind. drei unabhängige Versuche durchgeführt. Gezeigt ist eine verminderte Migrationsfähigkeit ab 5  $\mu\text{M}$  BS. Zusätzlich verstärkte zytotoxische Effekte sind unter Hypoxie bereits ab 10  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Skalierungsbalken 200  $\mu\text{m}$ .

## 4.7 Effekte von Betulinsäure und Betulin auf die Radiosensitivität unter Normoxie und Hypoxie

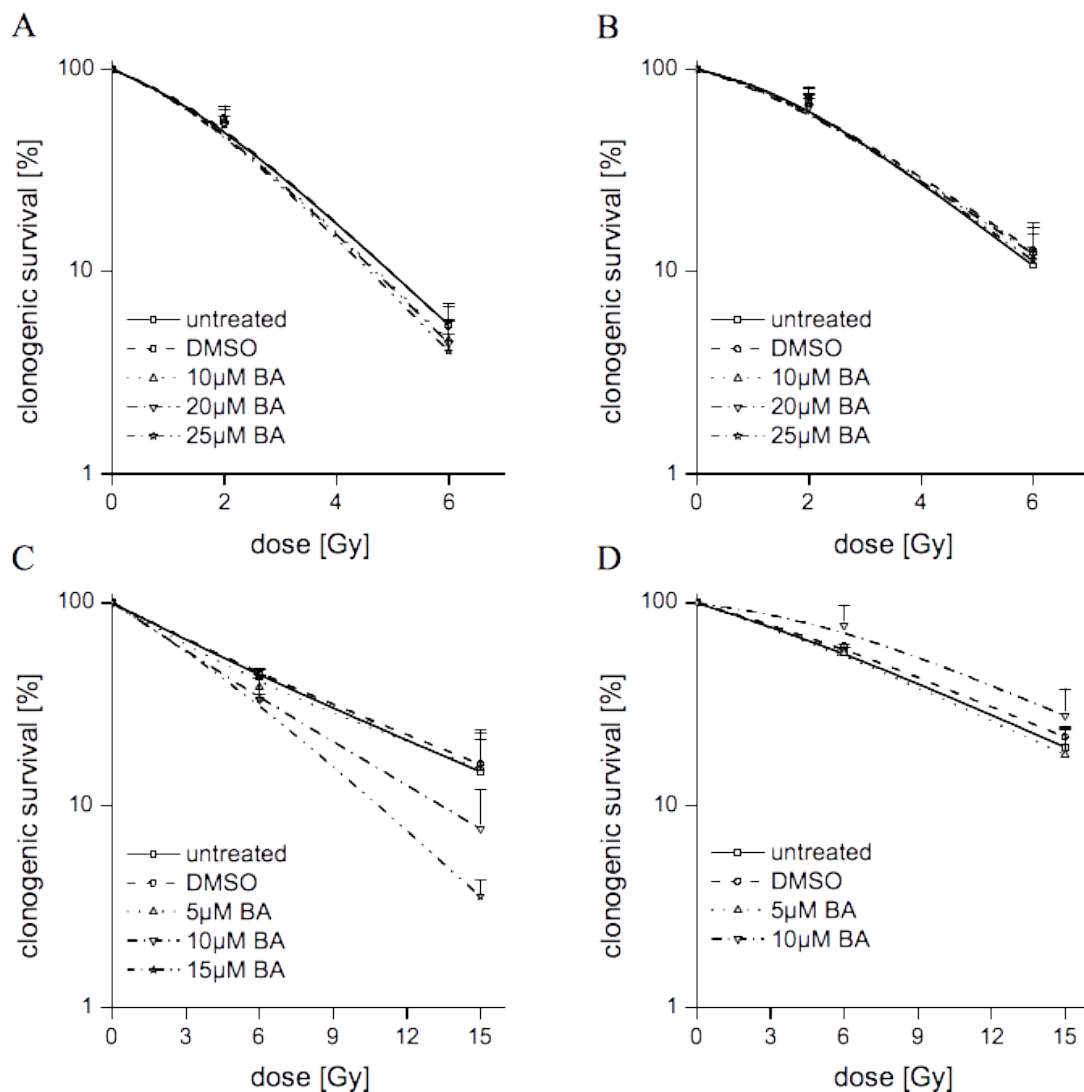
### 4.7.1 Einfluss von Betulinsäure und Bestrahlung auf das klonogene Zellüberleben von Gliomzellen unter Normoxie und Hypoxie

Die vorhergehenden Experimente belegten, dass eine Behandlung mit BS das klonogene Überleben der Gliomzelllinien U251MG und U343MG vermindert. Dieser mit Apoptose assoziierte Effekt ist unter Hypoxie für beide Zelllinien signifikant stärker ausgeprägt als unter Normoxie (Abb. 10). Im Vergleich mit Normoxie zeigte insbesondere die simultane BS-Behandlung und Radiatio unter Hypoxie mit zunehmender Strahlendosis deutlichere Effekte auf das klonogene Zellüberleben. Die Kombination aus Bestrahlung und Inkubation



**Abb. 25: relatives klonogenes Zellüberleben der Zelllinie U251MG und U343MG nach 24 h Inkubation mit BS und anschließender Bestrahlung unter Hypoxie.** Dargestellt sind die relativen Plattiereffizienzen in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Bei den Werten handelt es sich um eine Normierung auf 100 % im bezogen auf die unbestrahlte DMSO-Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte mind. drei voneinander unabhängig durchgeführter Versuche (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ).

mit 10  $\mu\text{M}$  bzw. 15  $\mu\text{M}$  BS unter Hypoxie führte in der U251MG zu einer Abnahme des relativen klonogenen Zellüberlebens bei 6 Gy von 27,7 % auf 9,3 % ( $\pm 3,4$  %) bzw. von 13,8 % auf 4,7 % ( $\pm 2,4$  %) sowie bei 15 Gy auf 2,2 % ( $\pm 1,3$  %) bzw. 0,5 % ( $\pm 0,2$  %) im Vergleich zu den unbestrahlten DMSO-Kontrollzellen. In der U343MG dagegen ist bei simultaner Kombination ein additiver Effekt der Inhibition für 10  $\mu\text{M}$  (6 Gy: 26,0 %  $\pm 5,7$  %; 15 Gy: 9,7 %  $\pm 4,2$  %) bzw. 15  $\mu\text{M}$  (6 Gy: 2,0 %  $\pm 0,6$  %; 15 Gy: 0,9 %  $\pm 0,5$  %) im Vergleich zu den bestrahlten DMSO-Kontrollzellen zu beobachten (Abb. 25).



**Abb. 26: Klonogenes Überleben der U251MG (A, C) und U343MG (B, D) unter Normoxie (A, B) und Hypoxie (C, D) in Abhängigkeit von BS-Konzentration und Strahlendosis.** Die Platiereffizienz der unbestrahlten Kontrolle wurde auf 100% normiert und in Relation zur jeweiligen Kontrolle bzw. Behandlung gesetzt. Es erfolgte eine 24 h Inkubation mit BS und eine anschließende Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 0 Gy; 2 Gy; 6 Gy und 15 Gy. Eine Radiosensitivierung wurde in der U251MG beobachtet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Versuche. Übernommen aus Bache, Zschornak *et al.* 2011 [72].



Die Radiatio mit 2 Gy ohne Behandlung reduzierte das relative klonogene Überleben unter Normoxie auf 70 % (SF2 = 0,70) in der U251MG und 71 % (SF2 = 0,71) in der U343MG. Unter Hypoxie waren ca. 6 Gy notwendig, um vergleichbare Effekte auf das klonogene Überleben beider Zelllinien zu erzielen (Abb. 26). Um einen zusätzlichen potenziellen strahlentherapeutischen Nutzen von BS abzuleiten, erfolgte im Anschluss an die Inkubation die Analyse der Effekte auf die Radiosensitivität an den Glioblastomzelllinien U251MG und U343MG. Eine Kombination von BS und Radiatio zeigte für die Zelllinie U343MG sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen einen additiven Effekt (Abb. 26). Bei der Zelllinie U251MG ließ sich durch BS ein radiosensitivierender Effekt unter Normoxie beobachten (Abb. 26).

Der Verstärkungsfaktor in U251MG-Zellen lag hier für eine Strahlendosis von 6 Gy (*enhancement factor* EF6) und Behandlung mit 20 µM bzw. 25 µM BS bei 1,2 ( $p = 0,02$ ) bzw. 1,3 ( $p = 0,15$ ). Die Radiosensitivität war dabei unter Hypoxie deutlich gesteigert. Hierbei wurde nach einer Behandlung mit 15 µM BS und einer Strahlendosis von 15 Gy ein Verstärkungsfaktor (EF15) von 4,5 ( $p = 0,03$ ) nachgewiesen. Dies wird auch durch die Ermittlung des DMF10 deutlich (Tab. 11). Während der DMF10 durch eine BS-Behandlung in U251MG-Zellen unter Normoxie mit  $\leq 1,1$  berechnet wurde, war dieser unter Hypoxie mit  $> 1,4$  deutlich gesteigert.

**Tab. 11: Effekte der BS-Behandlung auf die Radiosensitivität der U251MG und U343MG unter Hypoxie**

Normoxie U251MG	Hypoxie U251MG
20 µM: EF <sub>6Gy</sub> = 1,2 ( $p = 0,02$ )	10 µM: EF <sub>15Gy</sub> = 2,2 ( $p = 0,02$ )
25 µM: EF <sub>6Gy</sub> = 1,3 ( $p = 0,15$ )	15 µM: EF <sub>15Gy</sub> = 4,5 ( $p = 0,03$ )
20 µM DMF10 = 1,1 ( $p = 0,04$ )	10 µM DMF10 = 1,4 ( $p = 0,03$ )
25 µM DMF10 = 1,1 ( $p = 0,10$ )	15 µM DMF10 = 1,5 ( $p = 0,01$ )

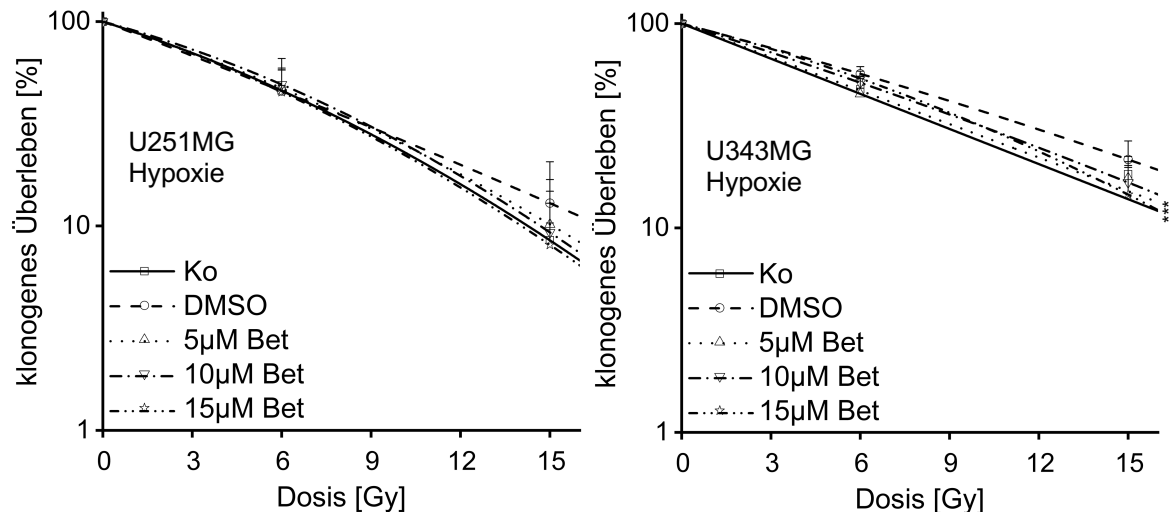
  

Normoxie U343MG	Hypoxie U343MG
20 µM: EF <sub>6Gy</sub> = 1,1 ( $p = 0,30$ )	5 µM: EF <sub>15Gy</sub> = 1,3 ( $p = 0,50$ )
25 µM: EF <sub>6Gy</sub> = 1,1 ( $p = 0,70$ )	10 µM: EF <sub>15Gy</sub> = 0,8 ( $p = 0,90$ )
20 µM DMF10 = 1,0 ( $p = 0,40$ )	5 µM DMF10 = 1,1 ( $p = 0,05$ )
25 µM DMF10 = 1,0 ( $p = 0,50$ )	10 µM DMF10 = 1,0 ( $p = 0,06$ )

#### 4.7.4 Einfluss von Betulin auf die Radiosensitivität der U251MG und U343MG unter Hypoxie

Der Verstärkungsfaktor in U251MG-Zellen lag unter Normoxie für eine Strahlendosis von 6 Gy (EF6) und Behandlung mit 15 µM bzw. 20 µM Bet bei 1,4 ( $p = 0,12$ ) bzw. 1,8 ( $p = 0,09$ ). Unter Hypoxie wurde nach einer Behandlung mit 10 µM bzw. 15 µM Bet und einer Strahlendosis von 15 Gy ein vergleichbarer Verstärkungsfaktor (EF15) von 1,4 ( $p = 0,30$ ) bzw. 1,6 ( $p = 0,12$ ) nachgewiesen. Die Radiosensitivität der Zelllinie U251MG





**Abb. 27: Strahlensensitivität der Zelllinie U251MG und U343MG nach einer 24 h Inkubation mit Bet unter Hypoxie.** Das klonogene Überleben ist in Abhängigkeit von der Strahlendosis graphisch dargestellt. Die Platiereffizienz der unbestrahlten Kontrolle wurde auf 100 % normiert und in Relation zur jeweiligen Kontrolle bzw. Behandlung gesetzt. Es erfolgte eine 24 h Inkubation mit Bet unter Hypoxie und eine anschließende Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 0 Gy; 6 Gy und 15 Gy. Die Daten repräsentieren Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Versuche (\*  $p < 0,05$  für U343MG mit 15 Gy: 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M und 15  $\mu$ M).

war sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie geringfügig gesteigert. Der DMF10 war durch eine Bet-Behandlung in U251MG-Zellen unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie mit  $\leq 1,2$  nicht gesteigert. Eine geringfügige Radiosensitivierung wird in der Zelllinie U343MG nur unter Hypoxie mit einem DMF10  $\leq 1,3$  beobachtet.

Die Kombination von Bet und Radiatio zeigte für beide Zelllinien sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen (Abb. 27) mit vorwiegend additiven Effekten kaum einen Einfluss auf die Radiosensitivität. Für die Behandlung mit BS und simultaner Bestrahlung dagegen ließ sich in der Zelllinie U251MG ein signifikanter radiosensitivierender Effekt bereits unter Normoxie beobachten. Unter Hypoxie war die Radiosensitivierung dabei zusätzlich gesteigert (Abb. 26, Tab. 11).

**Tab. 12: Effekte der Bet-Behandlung auf die Radiosensitivität der U251MG und U343MG unter Hypoxie**

Normoxie U251MG	Hypoxie U251MG
15 $\mu$ M: $EF_{6Gy} = 1,4$ ( $p = 0,12$ )	10 $\mu$ M: $EF_{15Gy} = 1,4$ ( $p = 0,30$ )
20 $\mu$ M: $EF_{6Gy} = 1,8$ ( $p = 0,09$ )	15 $\mu$ M: $EF_{15Gy} = 1,6$ ( $p = 0,12$ )
15 $\mu$ M DMF10 = 1,1 ( $p = 0,20$ )	10 $\mu$ M DMF10 = 1,1 ( $p = 0,03$ )
20 $\mu$ M DMF10 = 1,2 ( $p = 0,08$ )	15 $\mu$ M DMF10 = 1,1 ( $p = 0,40$ )

Normoxie U343MG	Hypoxie U343MG
3 $\mu$ M: $EF_{6Gy} = 1,1$ ( $p = 0,13$ )	10 $\mu$ M: $EF_{15Gy} = 1,3$ ( $p = 0,24$ )
10 $\mu$ M: $EF_{6Gy} = 1,1$ ( $p = 0,47$ )	15 $\mu$ M: $EF_{15Gy} = 1,8$ ( $p = 0,16$ )
3 $\mu$ M DMF10 = 1,0 ( $p = 0,40$ )	10 $\mu$ M DMF10 = 1,2 ( $p = 0,20$ )
10 $\mu$ M DMF10 = 1,0 ( $p = 0,50$ )	15 $\mu$ M DMF10 = 1,3 ( $p = 0,15$ )

## 5 Diskussion

Das Pflanzenderivat BS präsentiert sich mit breitem Wirkspektrum als potenziell ergänzender Therapieansatz bei der Behandlung von Tumoren. Die gebräuchlichsten Chemotherapeutika wirken systemisch auf stark proliferierende Zellen und gehen daher mit Nebenwirkungen und Toxizität gegenüber sich schnell teilender Körperzellen einher. Langsam proliferierende Tumorzellen in hypoxischen Geweben sind einer Chemotherapie nicht gut zugänglich [49]. In ausgewählten Studien waren die zytostatischen Effekte der BS den bereits etablierten Systemtherapeutika wie Doxorubicin und DDP überlegen [103, 104]. Normale Gewebszellen, als auch immortalisierte Astrozyten weisen gegenüber BS eine hohe Verträglichkeit auf, wobei selbst ruhende Tumorzellen angegriffen werden [90, 106]. Der molekulare Wirkmechanismus von BS und Induktion verschiedener Zelltodformen ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Untermauert wird die Wirkung an Biomembranen durch Studien an roten Blutkörperchen, wobei BS durch Membranpermeabilisierung Eryptose auslöst [127]. Die verstärkte Zytotoxizität bei niedrigem pH-Wert und hypoxischem Mikromilieu ist ein plausibler Ansatz für die bessere Verträglichkeit der Substanz an Normalzellen mit höheren pH-Wert [128] im Vergleich zur gesteigerten Toxizität an Tumorzellen [90–92, 100, 104, 107, 108, 110].

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

Verschiedene Autoren untersuchten bereits an einem größeren Spektrum diverser histologischer Subtypen entarteter Zellen die Wirkung von BS. So belegten bspw. Zuco *et al.* 2002 und Kessler *et al.* 2007 an über 30 Zelllinien die zytotoxischen Effekte von BS auf das klonogene Zellüberleben, bei einer deutlichen Zytotoxizität in davon 30 Zelllinien und kaum einer nachgewiesenen Resistenz [91, 92]. In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Methoden gezeigt, dass BS in den GBM-Zelllinien U251MG und U343MG starke zytotoxische Effekte bewirkte, die sich unter hypoxischen Bedingungen deutlich verstärkten (Abb. 10). Der Sachverhalt bestätigte sich in weiteren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe "Molekulare Strahlenbiologie" UKH durch Bache *et al.* 2019 an GBM-Zelllinien [72, 129] sowie auch anderer Arbeitsgruppen durch Kutkowska *et al.* 2021 [130]. Die Experimente zum relativen Zellüberleben zeigten mit steigender BS-Konzentration an beiden Zelllinien eine gesteigerte Zytotoxizität. Die ermittelten Zytotoxizitäten zwischen 5 bis 20  $\mu\text{M}$  BS stimmen dabei weitgehend mit denen von Lena *et al.* 2009 untersuchten TMZ-resistenten GBM-Zelllinien überein [113], wobei Wick *et al.* [106] mittels Kristallviolett-Assay voneinander abweichende Sensitivitäten von  $\text{IC}_{50}$  zwischen 20-100  $\mu\text{M}$  abhängig von den Inkubationszeiten und der Methodik darstellte.

Unter Normoxie wies die BS-Inkubation eine Inkubationsdauer-abhängige Proliferationshemmung auf. Diese war in der U251MG deutlich stärker ausgeprägt als in der U343MG

(Daten nicht gezeigt). Unter Hypoxie invertierte sich dieser Effekt Zelllinien-abhängig und die U343MG wird durch Wachstums-Arrest wesentlich stärker in der Proliferation als auch im klonogenen Überleben gehemmt, als die unter Normoxie sensiblere Zelllinie U251MG (Abb. 8, 10).

Weitere Untersuchungen der AG Strahlenbiologie wiesen bei vergleichbaren IC50 Werten nach [131], dass BS ebenso im Sulforhodamin B (SRB)-Assay zytotoxische Effekte hervorruft, welche unter hypoxischen Bedingungen deutlich stärker als unter Normoxie waren [72, 129]. Wie Bache *et al.* beschrieben, zeigten verschiedene BS-Derivate bereits unter Normoxie eine starke Zytotoxizität [72, 129, 132, 133]. Unter diesen imponierte jedoch nur BS mit einer 2- bis 3-fach erhöhten Zytotoxizität unter Hypoxie.

Der Effekt auf das klonogene Langzeit-Überleben spielt besonders bei der Rezidivneigung des GBM mit seinen resistenten hypoxischen Tumorarealen trotz multimodaler Therapie, wie durch Wen *et al.* 2008 zusammengefasst, eine wichtige Rolle [134], sodass BS hier als potentes Therapeutikum eine anhaltende Wirkung erzielen kann.

## 5.2 Zelltod und Zellzyklus

Inwiefern die durch BS induzierte Zytotoxizität den Zellzyklus bzw. den Zelltod in beiden Zelllinien unter Normoxie und Hypoxie beeinflusst, wurde mittels Zellzyklusmessung, DAPI-Färbung und Annexin-V/PI-Test untersucht.

Starke Effekte oder gar eine ausbleibende Wirkung von BS auf den Zellzyklus sind Zelllinien-abhängig und wurden in mehreren Studien analysiert. Selzer *et al.* 2000 beschrieben, dass in den Melanomzelllinien MES20 unter Normoxie zum einen keine Zellzyklus-Veränderungen nach BS-Behandlung messbar waren [100], wohingegen in anderen diversen Melanomzelllinien durch Pisha *et al.* 2000 ein G1-Arrest beschrieben wird [99]. Auch in verschiedenen Gliomzelllinien wie LN18 und LN229 blieb trotz p21-Induktion ein Zellarresteffekt aus, vermutlich wie Wick *et al.* 1999 beschreiben, über einen Gendefekt im *retinoblastom gene product checkpoint* [106]. Zellzyklusanalysen unter Hypoxie sind Gegenstand der aktuellen Forschung, so fanden Kutkowska *et al.* 2021 bereits Effekte an NSCLC-Zelllinien mit assoziiertem G1-Arrest bei vermehrter p21- und verminderter Cyclin D1- und B1-Expression [130]. Cyclin D1 akkumuliert in der G1-Phase und ist für den Übergang in die S-Phase notwendig [23, 56, 135] und p21 hemmt zyklinabhängige Kinasen worüber ein G1- oder G2/M-Zellzyklusarrest vermittelt wird [100].

Zellzyklusmessungen in der eigenen AG zeigten in U251MG- und U343MG-Zellen unter Normoxie keine deutlichen Effekte durch eine BS-Behandlung. Weitere Studien beschreiben, dass eine Anreicherung der Zellen in der G1-Phase unter Hypoxie mit einer niedrigeren Zellteilungsrate verbunden ist [50, 136].

In dieser Arbeit wurde mittels FACS-Analysen nachgewiesen, dass es nach einer 24 h BS-Inkubation unter Hypoxie zur deutlichen Reduktion von Zellen in der G1-Phase und

signifikanten Akkumulation von Zellen in G2/M- und S-Phase (Abb. 12, 13) kommt. Dieser Effekt war in der U251MG stärker ausgeprägt. Zudem war der Anteil an SubG1-Zellen bzw. Zelltrümmern in dieser Zelllinie erhöht (Abb. 11). Die Kombination von Bestrahlung und BS-Inkubation hatte auch nach 48 h Inkubationsdauer kaum einen zusätzlichen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der Gliomzellen.

BS wird in zahlreichen Untersuchungen als Induktor der Apoptose beschrieben [77], welche durch den Mechanismus der Destabilisierung der Mitochondrienmembran und Freisetzung dort gelegener Apoptosefaktoren (Cyt c, Smac) zum Zelltod führt. Diese setzen eine Caspasenaktivierung in Gang, welche die Spaltung des DNA-Reparatur-Enzyms PARP einleitet, sowie durch CAD-Aktivierung schließlich DNA-Fragmentation auslöst [137, 138]. Zur effektiveren Therapie von Apoptose-resistenten GBM-Zellen stellt BS deshalb ein hoffnungsvolles Agens dar [16, 93, 99, 105, 106, 113, 115]. Zudem wird deutlich, dass durch BS weitere Zelltodformen ausgelöst werden können. Die Gliom-Zelllinien U251MG und U343MG zeigten in der DAPI-Färbung kaum Apoptose-typische morphologische Veränderungen wie Kernpyknose und Kernfragmentation (Abb. 14). Diese traten nur vereinzelt in der durch BS radiosensitivierten Zelllinie U251MG unter Hypoxie auf. Verschiedene Studien weisen auf eine Reihe von histologischen und morphologischen Besonderheiten der Gliomzellen hin, sodass nicht typische morphologische Apoptosekriterien wie bspw. *membran-blebbing* erfüllt werden [139]. Weiterführende Apoptoseuntersuchungen mit dem Annexin-V/PI-Test zeigten mikroskopisch (Abb. 16) als auch durchflusszytometrisch (Abb. 17 - 19) zunehmende Apoptoseraten für beide GBM-Zelllinien mit zunehmender Inkubationszeit. Während die Apoptoserate unter Normoxie erst nach 36 h ansteigt, ist unter Hypoxie bei einer Inkubationsdauer von bereits 6 h in beiden Zelllinien Apoptose messbar, mit einem geringen Übergang zur Nekrose ab 24 h. Die Zelllinie U251MG zeigte hier ein deutlich früheres Ansprechen auf BS als die U343MG. Zu diesem zeitlichen Wirkungsunterschied passen Daten aus der eigenen AG Bache *et al.* 2019 an U251MG- und LN229-Zellen [133]. Demnach konnte bereits nach 24 h unter Hypoxie gegenüber 48 h unter Normoxie die Aktivierung von Caspasen 3/7 demonstriert werden. Die durch Hypoxie gesteigerte Zytotoxizität von BS wurde durch Kutkowska *et al.* 2021 erstmalig auch an nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellen nachgewiesen [130]. Verschiedene BS-induzierte Zelltodformen wie klassische Apoptose, Autophagie und Nekrose werden in diversen Arbeiten diskutiert. Lena *et al.* 2009 demonstrierten an einer TMZ-resistenten Zelllinie, dass BS signifikant Apoptose bei geringer Nekroserate auslöst [113]. Im extrinsischen Apoptose-Stimulus würden nach DISC-Bildung über Aktivierung von Initiator-Caspase 8 weitere Effektorcaspasen (CAS 3, 6 und 7) den Zelltod einleiten. Falls dies nicht effektiv gelingt, spaltet CAS 8 Bid zu tBid, welches durch Translokation in die Mitochondrien die intrinsische Apoptose Typ 2 einleitet. Sie kann ebenfalls über Autophagie

eingeleitet werden [140–143]. Bei diesem degradativen lysosomal-abhängigen Zelltodprozess führt bereits eine geringe Permeabilisation und Depolarisation der Mitochondrienmembran zur Einleitung der Autophagie [117], wobei Glioblastomzellen gegenüber Autophagie weniger resistent erscheinen, als gegenüber der Apoptose vom Typ 1 [33, 140]. Weitere Arbeiten beschreiben, dass die BS-Behandlung u.a. in der Glioblastomzelllinie U251MG [128] und Harnblasenkarzinomzelllinien [144] neben Apoptose auch Autophagie induziert. Weitere Autoren wie Gonzalez *et al.* 2012 und Fischer *et al.* 2014 zeigten, dass die Lysosomen-assoziierte Autophagie in GBM-Zelllinien auch durch andere BS-Derivate wie B10 induzierbar ist [119, 145]. Die BS vermittelte Autophagie kann laut einer aktuellen Studie von Zhang *et al.* 2021 an Harnblasenkarzinom-Zelllinien EJ und T24 über den AMPK/mTOR/ULK1-Signalweg eingeleitet werden [146]. Experimente in der eigenen AG von Bache *et al.* 2019 und Güttler *et al.* (unveröffentlicht) belegen ebenfalls, dass BS neben Apoptose andere Zelltodformen wie Nekrose und Autophagie auslöst [129, 131].

Zusammenfassend weisen die Daten aus dem Annexin-V/PI-Test im Einklang mit Zytotoxizitäts- und Zellzyklusanalysen auf einen fließenden Übergang der bekannten BS-induzierten Zelltodformen hin, wobei Hypoxie diesen Effekt verstärkt und mit frühzeitiger Wirkungsdynamik einleitet (Abb. 18, 19). Typische morphologische Apoptosezeichen waren in der DAPI-Färbung dennoch kaum ersichtlich. Dies wurde in weiteren Untersuchungen der AG zur Aktivität von Caspase-3/7 sowie Annexin-V/PI-Tests [131, 147] bestätigt. Grund hierfür könnte trotz Caspasenaktivität eine zu geringe Menge an Endonukleasen wie die caspaseaktivierte-DNase (CAD) sein [138]. Das Behandlungs- und Beobachtungszeitfenster zur Beschreibung des Zelltodverlaufes ist schließlich essentiell für die Untersuchung der gemeinsamen Endstrecke von Apoptose, Autophagie, sowie Nekrose (Abb. 15, 19, 20) und stellt aktuell schließlich die durch BS-induzierte Nekroptose zur Diskussion [128, 148].

### 5.3 RNA und Proteine

Der Apoptosenachweis an den Gliomzelllinien U251MG und U343MG wurde neben dem Annexin-V/PI-Test zusätzlich im Western Blot geführt. Hier zeigten sich stark erhöhte Proteinlevel an proteolytisch gespaltenem PARP und eine Reduktion des Apoptoseinhibitor-Proteins SVV unter Normoxie und Hypoxie, sowohl nach 24 h als auch 48 h Inkubation (Abb. 21, 22). Dies findet Übereinstimmung mit Ergebnissen von Fulda *et al.* 1997, welche die p53-unabhängige Apoptose von BS in diversen neuroektodermalen Tumorzelllinien mit Anreicherung von gespaltenem PARP und p18 als Folge der Caspaseaktivierung zeigte [93]. Weitere Autoren wie Wick *et al.* 1999 zeigten Apoptosemechanismen an Gliomzelllinien nach BS-Behandlung durch Aktivierung von Caspase-3 und 8 mit einer Zunahme an gespaltenem PARP und DNA-Fragmentierung,

sowie p21 Akkumulation [106]. In dieser Arbeit führte eine zusätzliche Bestrahlung in der Zelllinie U251MG zu einem weiteren Anstieg an PARP-Proteinlevels besonders nach 48 h Inkubationszeit unter Hypoxie.

Die Bestimmung der mRNA- und Proteinexpressionslevel der Hypoxiemarker Hif-1 $\alpha$  und CA-IX weist nach BS-Behandlung der GBM-Zelllinie U251MG eine deutliche Verminderung (Abb. 20) auf. Der hemmende Effekt von BS auf das Hypoxie-induzierte Protein Hif-1 $\alpha$  ist somit auch auf mRNA-Ebene in Übereinstimmung mit weiteren Studien nachgewiesen [149]. In dieser Arbeit korreliert die gesteigerte Zytotoxizität von BS mit verminderten mRNA-Levels von CA-IX, Hif-1 $\alpha$  und SVV. Nach Radiatio der Zellen ist auf mRNA-Ebene kein zusätzlicher Effekt erkennbar. Demgegenüber war das Expressionsniveau für GLUT-1 interessanterweise nicht vermindert. Ein weiterer zellulärer Signalweg über die BS-induzierte Aktivierung der Adenosinmonophosphat-abhängigen Kinase (AMPK)-Signalkaskade, erklärt warum trotz des Abbaus von Hif-1 $\alpha$  die mRNA-Expression von GLUT-1 unabhängig hochreguliert wird. Die AMPK-Aktivierung ist schließlich Folge der Destabilisierung der Mitochondrienintegrität und wird aufwärts reguliert [75, 150]. So setzte BS über selbigen Signalweg auch eine anti-diabetische Wirkung in Gang [151].

Untersuchungen an endometrialen Adenokarzinomzellen durch Karna *et al.* 2010 zeigten nach BS-Behandlung ebenfalls reduzierte Hif-1 $\alpha$ -Expressionsniveaus [89]. In Übereinstimmung dazu reduzierte sich an Prostatakarzinomzelllinien [101] unter Hypoxie die transkriptionelle Aktivität und das Proteinexpressionsniveau von Hif-1 $\alpha$ . Aufschluss über den Mechanismus wurde in der Arbeit von Kim *et al.* 2020 an hypoxischen Cervixkarzinomzellen gegeben [152]. Hier erfolgte eine verminderte Hif-1 $\alpha$  Proteinakkumulation mit BS-induzierter Aktivierung des Proteasoms zum Hif-1 $\alpha$ -Abbau, jedoch ohne reduzierte Hif-1 $\alpha$ -mRNA-Expression. Dennoch wurde eine Herabsenkung der Hif-1 $\alpha$ -vermittelten Induktion von Targetgenen wie GLUT-1, VEGF und PDK1 gemessen. Vordermark *et al.* 2016 beschreiben, dass Hif-1 $\alpha$  als zentraler Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor bedeutende Schalterproteine wie CA-IX, VEGF und GLUT-1 reguliert [167]. Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben an der GBM-Zelllinie U251MG nach BS-Behandlung reduzierte CA-IX-mRNA-Level. Daten der eigenen Arbeitsgruppe Bache *et al.* 2015 beschreiben die CA-IX-Reduktion in Mammakarzinomzellen auch auf Proteinebene [132]. Das CA-IX- Expressionslevel zählt als solider Hypoxiemarker und korreliert mit der Tumormalignität, wobei die Hif-1 $\alpha$ -Expression stark mit der CA-IX- Expression verbunden ist [153]. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nach BS-Behandlung und in Konkordanz zur gesteigerten Zytotoxizität unter Hypoxie deutlich (Abb. 20). Eine erhöhte CA-IX-Expression ist mit Tumorphoxie und einer schlechteren Prognose verbunden [154]. Zudem berichten Shin *et al.* 2011 von einem BS-induzierten Anti-Angiogenese-Effekt in hypoxischen Prostatazellen durch Reduktion der VEGF-

Expression über Inhibierung der Bindung von Hif-1 $\alpha$  und STAT3 an den Promotorregionen [149]. Die Tumorphoxie und assoziierte Hif-1 $\alpha$ -Expression nimmt einen starken Einfluss auf die schlechte Prognose solider Tumoren [55, 56] und ist durch Chemo- und Strahlentherapieresistenz gekennzeichnet [50, 64]. Insgesamt ist festzustellen, dass BS einen hemmenden Effekt auf die Hypoxie-induzierte Genexpression hat. Diese hemmende Wirkung ist assoziiert mit einer gesteigerten Zytotoxizität an GBM-Zelllinien.

#### 5.4 Migration

Das invasive und diffuse Wachstum ausgehend von mutierten Einzelzellen stellt eine therapeutische Hürde dar [119]. BS bietet potenzielle migrations- und invasionshemmende Eigenschaften. Für beide GBM-Zelllinien zeigte sich nach BS-Inkubation eine verringerte Migrationsrate. Im Scratch-Assay (Abb. 24) wurde durch bereits lichtmikroskopisch sichtbare Zelltrümmer deutlich, dass additiv zytotoxische Effekte zum Tragen kommen. Diese waren wie die Zytotoxizität besonders unter Hypoxie verstärkt. Um den zytotoxischen Effekt auszuschließen, wurde eine weitere Methode zur Migrationsmessung mittels modifizierten Boydenkammer-Assays (Abb. 23) unter normoxischen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse wiesen vergleichbare migrationshemmende Effekte von BS an beiden Zelllinien auf.

Weitere Studien belegten die Hemmung der Migration und Invasion durch BS mittels Scratch- bzw. Matrigel-Assays. Rzeski *et al.* 2006 führten den Nachweis an Gliomzelllinien und vielen weiteren Tumorzellentitäten, bspw. an Rhabdomyosarkom, Schilddrüsenkarzinom, Ovarialkarzinom, Cervixkarzinom, Mammakarzinom, Multiplen Myelom und Bronchialkarzinom [120], sowie Jiang *et al.* 2010 an Pankreaskarzinomzellen [118]. Untersuchungen aus der eigenen AG durch Bache *et al.* 2014 und 2015 zeigten außerdem eine migrationshemmende Wirkung der BS-Derivate NVX-207 und B10 [129] an Gliomzelllinien, sowie der BS an Mammakarzinomzellen [132]. Der Mechanismus für die Reduktion der Invasionsfähigkeit von Gliomzelllinien [155] nach BS-Behandlung bleibt diskutabel. Zum einen wird durch Yoon *et al.* 2010 die verminderte Expression und Transkription von Matrixmetalloproteasen 2 und 9 beschrieben [156] und zum anderen wird durch Lai *et al.* 2017 eine Hemmung der Rac-Proteine an Sphäroid-Gliomzellen der U251MG dargestellt. Rac-Proteine aktivieren als GTPasen STAT3- und ERK-Signalwege und greifen regulatorisch in die Migration, den Zellzyklus und Proliferation ein [157]. Auch Shin *et al.* 2011 beschreiben eine BS-induzierte STAT3 Hemmung an hypoxischen Prostatakarzinom-Zelllinien [149].

Schlussfolgernd ist festzustellen, dass die migrationshemmenden Eigenschaften von BS und BS-Derivaten aus GBM-Zelllinien das gesuchte Wirkspektrum eines effektiven Therapeutikums gegenüber malignen Zellen ergänzen. Die zusätzlichen zytotoxischen Effekte von BS unter Hypoxie potenzieren dieses Angriffsziel.

## 5.5 Strahlensensitivität

Bei der Behandlung des GBM nimmt die Radiatio im multimodalen Therapiekonzept eine äußerst wichtige Rolle ein. Jedoch stellt die Radio-Resistenz ein Kernproblem dar. Der Strahlendosisgrenzwert ist zum einen durch Risikostrukturen und umliegendes Normalgewebe gegeben, zum anderen steigt bei Dosisescalation das Radionekrosrisiko. Nach Radikal-OP wurde durch adjuvante, simultan-kombinierte Radiatio-Chemotherapie das mittlere Überleben von GBM-Patient\*innen gesteigert [23, 26].

Verschiedene Arbeiten, wie Selzer *et al.* 2000 an Melanomzelllinien [100] und Eder-Czemberek *et al.* 2010 an Kopf-Hals-Tumorzelllinien [96], charakterisieren additive bzw. synergistische Effekte der BS-Inkubation bei simultaner Bestrahlung. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Bedeutung einer BS-Behandlung unter Hypoxie in Kombination mit einer Radiatio untersucht.

In Kombination mit einer Bestrahlung zeigte sich bei der Zelllinie U251MG unter Normoxie bereits eine Radiosensitivierung, welche unter Hypoxie verstärkt wurde (Abb. 26). Die Radiosensitivierung erwies sich als abhängig von der Zelllinie. Für die Zelllinie U343MG waren additive Effekte messbar. So wurde in dieser Studie erstmalig nachgewiesen, dass eine Inkubation mit BS in Kombination mit Radiatio unter Hypoxie zu einer Radiosensitivierung führte, welche im Vergleich zur Normoxie sogar gesteigert war [72]. Ein plausibler Ansatz für die verstärkte Radiosensitivierung der U251MG unter Hypoxie könnte die BS-abhängige Zellzyklusumverteilung der strahlenresistenten G1-Phase Zellen in die sensiblere G2/M-Phase sein (Abb. 13). Kessler *et al.* 2010 beschreiben ebenfalls diesen Unterschied der gleichen Zelllinien bei der Chetomin-vermittelten Radiosensitivierung durch Hif-1 $\alpha$ -Inhibierung an U251MG Zellen bei ausbleibender Sensitivierung an U343MG Zellen [76]. Weitere Untersuchungen durch Bache *et al.*, 2015, 2019 [132, 133], Fischer *et al.* 2014 [145], Güttler *et al.* 2021 [158] und Petrenko *et al.* 2021 [159] unterstützen die Beobachtung additiver bzw. radiosensitivierender Effekte durch eine Behandlung mit BS bzw. BS-Derivaten an Gliom- bzw. Mammakarzinomzellen unter Hypoxie.

Ein Grund für die verbesserte Wirksamkeit unter Hypoxie und Radiatio könnte die zusätzliche Bildung von Sauerstoffradikalen sein. Lena *et al.* 2009 beschreiben die Poren-induzierende Eigenschaft von BS und somit den Verlust der Doppelmembranintegrität an Mitochondrien, wodurch ROS (reaktive Sauerstoffspezies) aus der Atmungskette freigesetzt werden [113]. Unter Sauerstoffmangel besteht eine verminderte Wirkung ionisierender Strahlung durch fehlende ROS-Bildung und verminderte Radiolyse des Wassers [64]. Petrenko *et al.* 2021 zeigten an Mammakarzinomzellen, dass 3-O-acetyl-Betulin, bzw. auch in Kombination mit einem CA-IX-Inhibitor, durch vermehrte Sauerstoffradikalbildung starke Effekte auf den DNA-Schaden, die Zytotoxizität und die Radiosensitivität unter Hypoxie ausübt [159].



Für die einer Radiatio schlecht zugänglichen hypoxischen Tumoreareale besonders in GBM kann dies ein wichtiges therapeutisches Angriffsziel sein. Im Vergleich zum radiosensitivierenden Effekt von BS auf U251MG-Zellen, war dieser Effekt nach Behandlung mit Bet nur schwach ausgeprägt (Abb. 27). Ebenfalls war durch Bet eine kaum bedeutende Radiosensitivierung an der U343MG messbar. Diese Effekte stimmen zudem mit den Zellzyklus-Daten (nicht gezeigt) überein. Eine zusätzliche Radiatio bewirkte hier für die U343MG kaum weitere Veränderungen im Zellzyklus, wobei in der U251MG ein geringfügiger Anstieg von Zellen in G2/M-Phase deutlich wurde, mit einer leichten Abnahme der sich in der S-Phase befindlichen Zellen. Die Ursache dieses Unterschieds zu BS lässt sich mit der biologisch gesteigerten Wirksamkeit von BS bei saurem pH-Wert erklären, da Bet als Alkohol diese Eigenschaft in nur geringem Maße teilt. Passend zu diesem Wirkungsunterschied beschreiben Kuktovska *et al.* 2020 ebenfalls zytotoxische Effekte von BS und Bet an NSCLC-Zelllinien, wonach für BS unter Hypoxie eine zusätzliche Hemmung des klonogenen Überlebens gefunden wird und für Bet ausbleibt [130]. Die Untersuchungen fanden bisher allerdings ohne Radiatio statt.

Ein Grund für die Radiosensitivierung auf Zellzyklusebene könnte der Umstand sein, dass Zellen, welche sich in der G2/M-Phase befinden, strahlensensibler sind [119, 126]. Die Behandlung mit BS führte an beiden GBM-Zelllinien zur Akkumulation in der G2/M-Phase bzw. zu einem G2/M-Arrest (Abb. 12, 13). Dieser Effekt ist für die U251MG in Konkordanz mit deutlich gesteigerter Radiosensitivität gegenüber der U343MG, welche einen nur sehr geringen G2/M-Arrest zeigte. Für das Derivat Bet trat dieser Effekt unter Hypoxie in deutlich reduziertem Maße auf. Der Zellzyklus-Effekt ist demzufolge derivat- und zelllinienspezifisch zu werten, und blieb ebenfalls in einigen anderen Zelllinien wie z.B. der Mammakarzinomzelllinie MCF7 [126] aus. An bestimmten Gliomzelllinien wurde ebenfalls kein Zellzyklus-Arrest nachgewiesen, allerdings wurde hier eine Ansammlung an p21 gefunden [106], welches zur Einleitung von Reparaturmechanismen eine Rolle spielt, zyklinabhängige Kinasen hemmt und somit einen G1- bzw. G2-Zellzyklusarrest initiiert [23, 106, 160].

Die Befunde dieser Arbeit bestätigen in Betracht auf die Radiosensitivität von schwer zu therapierenden Gliomzelllinien, dass BS ein geeignetes Agens darstellt, die Strahlentherapie zu optimieren. Insbesondere zeigt die erstmalig an hypoxischen Gliomzelllinien deutlich gesteigerte Wirksamkeit und zusätzliche Radiosensitivierung unter Sauerstoffmangel einen hoffnungsvollen Ansatz, die Therapie von strahlenresistenten hypoxischen Tumoren zu verbessern.

## 5.6 Ausblick

Betulinsäure ist als Derivat sehr vielversprechend für die weitere onkologische Forschung. Eigene *Electron Spin Resonance* (ESR)-Spektroskopie-Untersuchungen in der AG Brömme (*Core Facility*, UKH) zur ROS-Generierung durch BS allein zeigten noch keinen

---

Effekt, sodass der biologische Angriffspunkt der Mitochondrien-Doppelmembran mit pH-abhängiger Porenbildung ein zukünftiger näher zu untersuchender Mechanismus bleibt [161], was derzeit via Chemilumineszenzverfahren untersucht wird. Darüber hinaus zeigt sich Potential in der Kombination von BS mit weiteren Chemotherapeutika, wie bspw. an Ösophagus-Ca-Zelllinien untersucht wurde [162]. Die zahlreichen chemischen Alternierungsmöglichkeiten von BS bieten zudem eine breite Palette an Modifikationsoptionen funktioneller Gruppen oder Kombinationen mit klassischen Chemotherapeutika (z.B. Cisplatin) zu semisynthetischen Derivaten, wie in Arbeiten der eigenen AG bspw. mit NVX-207 oder B10 [129, 163, 164] dargelegt wurde. Noch interessanter ist die Kopplung von BS mit CA-IX-Inhibitoren, wie in Untersuchungen an Brustkrebszellen von Bache *et al.* 2015 [132] und Güttler *et al.* 2021 [158] beschrieben. Durch Assoziation an CA-IX-Inhibitoren kann BS gezielt an die hypoxischen Tumorteile gelangen, um dort das volle Wirkungspotenzial zu entfalten [129]. Zudem ist die Kombination mit intrazellulären Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sorafinib denkbar, wie sie Kutkowska *et al.* 2017 an Pankreaskarzinom-Zelllinien mit synergistischen Effekten auf Zellzyklus und klonogenes Überleben beschreiben.

In zukünftigen Studien sollten die Effekte an Organismen mit bisher nicht kurablen Tumorleiden getestet werden. Erste Ergebnisse an onkologischen Hunde-Patient\*innen, vor allem mit Plattenepithel-HNO-Tumoren nach Behandlung mit BS als auch dem BS-Esterderivat NVX-207, zeigten positive Ausblicke auf die lokale Tumorkontrollrate und das Gesamtüberleben [165]. Weitere Studien demonstrierten die topische Anwendbarkeit von BS auf Grundlage des Durchdringens von Pferdehaut *in vitro* bei erhaltener Zytotoxizität gegen vorhandene maligne Melanomzellen, wozu zukünftig *in vivo* Studien geplant sind [166]. Zur Optimierung der begrenzten Löslichkeit von BS wäre die Einbettung von BS in Liposomen, Dextrinen bzw. Nanopartikeln eine Option. Zudem wären Arbeiten mit der Kombination einer Radiatio und BS auch im Tiermodell mit hypoxischen Tumoren aufschlussreich, wobei die Aufklärung des Wirkmechanismus unter Hypoxie eine fortzuführende molekularbiologische Aufgabe darstellt. In der klinischen Anwendung könnte die Standardtherapie aus GBM-OP und anschließender Radio-Chemotherapie durch zusätzliche intrakavitäre Injektion von BS oder BS-Derivaten ergänzt werden.

## 6 Zusammenfassung

BS wirkt selektiv zytotoxisch auf diverse Tumor- inklusive GBM-Zelllinien. Aufbauend auf diese Arbeit wurde erstmalig publiziert, dass die Zytotoxizität des Naturstoffes unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie in beiden GBM-Zelllinien deutlich zunahm. Dieser Sachverhalt geht mit gesteigertem gespaltenen PARP- und verringertem Proteingehalt von Hypoxie-induziertem Hif-1 $\alpha$  und SVV einher. Auch die Hypoxie-induzierte Genexpression ist nach BS-Behandlung assoziiert mit einer Reduktion von Hif-1 $\alpha$ , SVV, CA-XI ohne Reduktion der GLUT-1 Expression. Andere Autoren zeigten bspw. an Adenokarzinom-Zellen ebenfalls die Abnahme von Hif-1 $\alpha$  durch verminderte Expression. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe beschrieben, dass die siRNA- bzw. Chetomin-vermittelte Inhibierung von Hif-1 $\alpha$  in den selbigen untersuchten Gliomzelllinien mit Abnahme des klonogenen Zellüberlebens verbunden ist. Weiterhin konnte neben einer konzentrations- und zeitabhängigen Aktivierung der Apoptose mittels Annexin-V/PI-Test die Hemmung der Migration unter Hypoxie in beiden GBM-Zelllinien nach BS-Behandlung nachgewiesen werden. In beiden Zelllinien zeigte BS unter Normoxie kaum, jedoch unter Hypoxie einen deutlichen Einfluss auf den Zellzyklus mit G2/M-Arrest und SubG1-Zunahme.

Diese Arbeit stellt die erste dar, welche sich mit der Bedeutung einer Radiatio in simultaner Behandlung mit BS an hypoxischen Tumoren befasst. Die Kombination von BS und Radiatio führte unter Normoxie als auch Hypoxie zu additiven Effekten in der Zelllinie U343MG. In der U251MG konnte im klonogenen Überleben eine Strahlensensitivierung beobachtet werden. Diese korrelierte mit den ebenfalls stärkeren Wirkungen auf den Zellzyklus in der strahlensensibleren G2/M-Phase. Bet hatte insgesamt vergleichbare, aber schwächere Wirkungen auf beide Zelllinien. In der Arbeit wurden zwei Mechanismen und synergistische Therapieansätze beschrieben, welche bei der Apoptose-Induktion maligner chemo- und strahlenresistenter Hirntumoren eine tragende Rolle spielen. Die gesteigerte Zytotoxizität unter Hypoxie in GBM-Zelllinien stellt einerseits einen Ansatz dar, die hypoxischen und damit strahlenbiologisch resistenten zentralen Tumoreale zu bekämpfen. Andererseits bietet die zusätzliche Eigenschaft zur Radiosensitivierung für jene verbleibende Tumorzellen (U251MG), welche nach alleiniger BS-Behandlung oder Chemotherapie überleben würden, ein bedeutendes Therapieziel. Fortführende Untersuchungen sind essenziell, um die Zelllinien-abhängigen Effekte von BS und BS-Derivaten in Kombination mit einer Strahlentherapie genauer zu verstehen und die molekulargenetischen Ursachen zu beschreiben. Neben verbesserter Bioverfügbarkeit neuer Derivate sollte die Erforschung *in vivo* erfolgen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Zülch K J, Bailey P 1986 *Brain tumors: their biology and pathology* (Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer) **3** 38-54
- [2] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. 2021 Gliome im Erwachsenenalter *Onkopedia Leitlinien* [www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter/@@guideline/html/index.html](http://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter/@@guideline/html/index.html) (abgerufen 02.03.2022) **1** 4-50
- [3] Farrell C J, Plotkin S R 2007 Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes *Neurol Clin* **25** 925–46
- [4] Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Treml K, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Gurung-Schönfeld I, Haberland J, Imhoff M, Kraywinkel K, Starker A, Von Berenberg-Gossler P, Wienecke A 2021 *Krebs in Deutschland für 2017/2018* (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.) **13** 122-25
- [5] Glantz M J, Burger P C, Herndon J E, Friedman A H, Cairncross J G, Vick N A, Schold S C 1991 Influence of the type of surgery on the histologic diagnosis in patients with anaplastic gliomas *Neurol* **41** 1741–1741
- [6] Weller M, van den Bent M, Tonn J C, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, Rhun E L, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld J C, Dhermain F, French P, Marosi C, Watts C, Oberg I, Pilkington G, Baumert B G, Taphoorn M J B, Hegi M, Westphal M, Reifenberger G, Soffietti R, Wick W 2017 European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas *Lancet Oncol* **18** e315–29
- [7] Ohgaki H, Kleihues P 2013 The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma *Clin Cancer Res* **19** 764–72
- [8] Ohgaki H, Kleihues P 2007 Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma *Am J Pathol* **170** 1445–53
- [9] Louis D N, Ohgaki H, Wiestler O D, Cavenee W K, Burger P C, Jouvett A, Scheithauer B W, Kleihues P 2007 The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System *Acta Neuropathol* **114** 97–109.
- [10] Louis D N, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee W K, Ohgaki H, Wiestler O D, Kleihues P, Ellison D W 2016 The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary *Acta Neuropathol* **131** 803–20
- [11] Folstein M F, Folstein S E, McHugh P R 1975 “Mini-mental state” *J Psychiatr Res* **12** 189–98
- [12] Nasreddine Z S, Phillips N A, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings J L, Chertkow H 2005 The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening Tool For Mild Cognitive Impairment *J Am Geriatr Soc* **53** 695–9

- 
- [13] Douw L, Klein M, Fagel S S, van den Heuvel J, Taphoorn M J, Aaronson N K, Postma T J, Vandertop W P, Mooij J J, Boerman R H, Beute G N, Sluimer J D, Slotman B J, Reijneveld J C, Heimans J J 2009 Cognitive and radiological effects of radiotherapy in patients with low-grade glioma: long-term follow-up *Lancet Neurol* **8** 810–8
- [14] Taphoorn M J B, Henriksson R, Bottomley A, Cloughesy T, Wick W, Mason W P, Saran F, Nishikawa R, Hilton M, Theodore-Oklotka C, Ravelo A, Chinot O L 2015 Health-Related Quality of Life in a Randomized Phase III Study of Bevacizumab, Temozolomide, and Radiotherapy in Newly Diagnosed Glioblastoma *J Clin Oncol* **33** 2166–75
- [15] Wick W, (federführend) 2021 *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Gliome, S2k-Leitlinie, Kapitel: Hirntumoren* (Deutsche Gesellschaft für Neurologie) Online: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien) (abgerufen am 09.01.2022) **1** 14-55
- [16] Rachinger A 2012 *Dreidimensionale Darstellung der motorischen Hirnnervenkerne von Nervus facialis und Nervus abducens, sowie des Colliculus facialis im humanen Hirnstamm*. Dissertation (Halle/Saale: Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) **1** 1-36
- [17] Stummer W, Reulen H-J, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn J-C, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T 2008 Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme ALA-Glioma Study Group *Neurosurg* **62** 564–76
- [18] Walker D A, Punt J A G, Sokal M 1999 Clinical management of brain stem glioma *Arch Dis Child* **80** 558–64
- [19] Kreth F W, Muacevic A, Medele R, Bise K, Meyer T, Reulen H-J 2001 The Risk of Haemorrhage after Image Guided Stereotactic Biopsy of Intra-Axial Brain Tumours - A Prospective Study *Acta Neurochir* **143** 539–46
- [20] Guerra D A P, Paiva A E, Sena I F G, Azevedo P O, Silva W N, Mintz A, Birbrair A 2018 Targeting glioblastoma-derived pericytes improves chemotherapeutic outcome *Angiogenesis* **21** 667–75
- [21] Lacroix M, Abi-Said D, Fourney D R, Gokaslan Z L, Shi W, DeMonte F, Lang F F, McCutcheon I E, Hassenbusch S J, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R 2001 A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival *J Neurosurg* **95** 190–8
- [22] Hennequin C, Favaudon V 2002 Biological basis for chemo-radiotherapy interactions *Eur J Cancer* **38** 223–30
- [23] Sauer R 2012 *Strahlentherapie und Onkologie* (München Jena: Elsevier, Urban & Fischer) **5** 135-65; 333-36
- [24] Braun L C 2020 *Einfluss der miRNA-26a Expression auf das Ansprechen einer Therapie mit Carmustin-Wafer Implantaten bei Patienten mit Glioblastoma multiforme* Dissertation (Homburg/Saar: Medizinische Fakultät, Universität des Saarlandes) **1** 16
- [25] Stupp R, Mason W P, van den Bent M J, Weller M, Fisher B, Taphoorn M J B, Belanger K, Brandes A A, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer R C, Ludwin S K, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross J G, Eisenhauer E, Mirimanoff R O 2005 Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma *N Engl J Med* **352** 987–96
- [26] Stupp R, van den Bent M J, Hegi M E 2005 Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas *Curr Neurol Neurosci Rep* **5** 198–206

- [27] Zhang J, F.G. Stevens M, D. Bradshaw T 2012 Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance *Curr Mol Pharmacol* **5** 102–14
- [28] Stupp R, Hegi M E, Mason W P, van den Bent M J, Taphoorn M J, Janzer R C, Ludwin S K, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes A A, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht C J, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross J G, Mirimanoff R-O 2009 Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial *Lancet Oncol* **10** 459–66
- [29] Hegi M E, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros J M, Hainfellner J A, Mason W, Mariani L, Bromberg J E C, Hau P, Mirimanoff R O, Cairncross J G, Janzer R C, Stupp R 2005 *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma *N Engl J Med* **352** 997–1003
- [30] Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach J P, Sabel M, Combs S E, 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 *Lancet Oncol* **13** 707–15
- [31] Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G 2002 Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review *Radiother Oncol* **64** 259–73
- [32] Piette C, Munaut C, Foidart J-M, Deprez M 2006 Treating gliomas with glucocorticoids: from bedside to bench *Acta Neuropathol* **112** 651–64
- [33] Galicich J H, French L A, Melby J C 1961 Use of dexamethasone in treatment of cerebral edema associated with brain tumors *J Lancet* **81** 46–53
- [34] Böker D-K, Winking M 1997 Die Rolle von Boswellia-Säuren in der Therapie maligner Gliome *Dtsch Arztebl International* **94** A-1197
- [35] Diaz R J, Ali S, Qadir M G, De La Fuente M I, Ivan M E, Komotar R J 2017 The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma *J Neurooncol* **133** 455–67
- [36] de Groot J F, Yung W K A 2008 Bevacizumab and Irinotecan in the Treatment of Recurrent Malignant Gliomas *Cancer J* **14** 279–85
- [37] Batchelor T T, Byrne T N 2006 Supportive Care of Brain Tumor Patients *Hematol Oncol Clin North Am* **20** 1337–61
- [38] Hamilton M G, Hull R D, Pineo G F 1994 Prophylaxis of venous thromboembolism in brain tumor patients *J Neuro-Oncol* **22** 111–26
- [39] Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D M, Lhermitte B, Toms S, Idbah A, Ahluwalia M S, Fink K, Di Meo F, Lieberman F, Zhu J-J, Stragliotto G, Tran D D, Brem S, Hottinger A F, Kirson E D, Lavy-Shahaf G, Weinberg U, Kim C-Y, Paek S-H, Nicholas G, Bruna J, Hirte H, Weller M, Palti Y, Hegi M E, Ram Z 2017 Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial *JAMA* **318** 2306
- [40] Mahmoudi K, Bouras A, Bozec D, Ivkov R, Hadjipanayis C 2018 Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans *Int J Hyperthermia* **34** 1316–28

- [41] Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, Westphal M, Schackert G, Meyermann R, Pietsch T, Reifenberger G, Weller M, Loeffler M, von Deimling A 2010 Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas *Acta Neuropathol* **120** 707–18
- [42] Komori T 2017 The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision *Neurol Med Chir (Tokyo)* **57** 301–11
- [43] Eckel-Passow J E, Lachance D H, Molinaro A M, Walsh K M, Decker P A, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel M L, Smirnov I V, Sarkar G, Caron A A, Kollmeyer T M, Praska C E, Chada A R, Halder C, Hansen H M, McCoy L S, Bracci P M, Marshall R, Zheng S, Reis G F, Pico A R, O'Neill B P, Buckner J C, Giannini C, Huse J T, Perry A, Tihan T, Berger M S, Chang S M, Prados M D, Wiemels J, Wiencke J K, Wrensch M R, Jenkins R B 2015 Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors *N Engl J Med* **372** 2499–508
- [44] Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici R M 2009 Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents *Anticancer Res* **29** 5171–84
- [45] Hau P, Jachimczak P, Schlingensiepen R, Schulmeyer F, Jauch T, Steinbrecher A, Brawanski A, Proescholdt M, Schlaier J, Buchroithner J, Pichler J, Wurm G, Mehdorn M, Strege R, Schuierer G, Villarrubia V, Fellner F, Jansen O, Straube T, Nohria V, Goldbrunner M, Kunst M, Schmaus S, Stauder G, Bogdahn U, Schlingensiepen K-H 2007 Inhibition of TGF- $\beta$  2 with AP 12009 in Recurrent Malignant Gliomas: From Preclinical to Phase I/II Studies *Oligonucleotides* **17** 201–12
- [46] Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Larocca L M, Peschle C, De Maria R 2006 Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells *Cell Death Differ* **13** 1238–41
- [47] Eisele G, Weller M 2013 Targeting apoptosis pathways in glioblastoma *Cancer Lett* **332** 335–45
- [48] Haar C P, Hebbar P, Wallace G C, Das A, Vandergrift W A, Smith J A, Giglio P, Patel S J, Ray S K, Banik N L 2012 Drug Resistance in Glioblastoma: A Mini Review *Neurochem Res* **37** 1192–200
- [49] Vaupel P, Thews O, Hoeckel M 2001 Treatment Resistance of Solid Tumors *Med Oncol* **18** 243–60
- [50] Spiro I J, Rice G C, Durand R E, Stickler R, Ling C C 1984 Cell killing, radiosensitization and cell cycle redistribution induced by chronic hypoxia *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **10** 1275–80
- [51] Kirkpatrick J P, Rabbani Z N, Bentley R C, Hardee M E, Karol S, Meyer J, Oosterwijk E, Havrilesky L, Secord A A, Vujaskovic Z, Dewhirst M W, Jones E L 2008 Elevated CAIX Expression is Associated with an Increased Risk of Distant Failure in Early-Stage Cervical Cancer *Biomark Insights* **3** BMI.S570
- [52] 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 Res* **51** 3316–22
- [53] 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 Res* **56** 4509–15

- 
- [54] Rampling R, Cruickshank G, Lewis A D, Fitzsimmons S A, Workman P 1994 Direct measurement of pO<sub>2</sub> distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **29** 427–31
- [55] Brizel D M, Scully S P, Harrelson J M, Layfield L J, Bean J M, Prosnitz L R, Dewhirst M W 1996 Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma *Cancer Res* **56** 941–3
- [56] Vaupel P, Mayer A, Höckel M 2004 Tumor Hypoxia and Malignant Progression *Methods Enzymol* (Elsevier) **381** 335–54
- [57] Moulder J E, Rockwell S 1987 Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy *Cancer Metast Rev* **5** 313–41
- [58] Hanahan D, Weinberg R A 2000 The hallmarks of cancer *Cell* **100** 57–70
- [59] Semenza G L 2009 Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1 *Sem Cancer Biol* **19** 12–6
- [60] Semenza G L 2012 Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression, targets for cancer therapy *Trend Pharmacol Sci* **33** 207–14
- [61] Wang G L, Semenza G L 1995 Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 *J Biol Chem* **270** 1230–7
- [62] Denko N C 2008 Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour *Nat Rev Cancer* **8** 705–13
- [63] Wenger R H, Marti H H, Schuerer-Maly C C, Kvietikova I, Bauer C, Gassmann M, Maly F E 1996 Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease-derived B-cell lines: oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-containing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase *Blood* **87** 756–61
- [64] Gray L H, Conger A D, Ebert M, Hornsey S, Scott O C A 1953 The Concentration of Oxygen Dissolved in Tissues at the Time of Irradiation as a Factor in Radiotherapy *Br J Radiol* **26** 638–48
- [65] Sedlakova O 2014 Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors *Front Physiol* **4** 1-9
- [66] Eiznhamer D A, Xu Z-Q 2004 Betulinic acid: a promising anticancer candidate *IDrugs* **7** 359–73
- [67] Said H M, Supuran C T, Hageman C, Staab A, Polat B, Katzer A, Scozzafava A, Anacker J, Flentje M, Vordermark D 2010 Modulation of Carbonic Anhydrase 9 (CA9) in Human Brain Cancer *Curr Pharm Des* **16** 3288–99
- [68] Sweeney P J, Nicolae D, Ignacio L, Chen L, Roach M, Wara W, Marcus K C, Vijayakumar S 1998 Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in cancer patients receiving radiotherapy: final report of a randomized, open-labelled, phase II trial *Br J Cancer* **77** 1996–2002
- [69] Herrmann T, Baumann M, Dörr W 2006 *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig* (München Jena: Elsevier, Urban & Fischer) **4** 55-72
- [70] Hall E J, Giaccia A J 2012 *Radiobiology for the radiologist* (Philadelphia, London: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins) **7** 5-15



- [71] von Pawel J, von Roemeling R, Gatzemeier U, Boyer M, Elisson L O, Clark P, Talbot D, Rey A, Butler T W, 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 *J Clin Oncol* **18** 1351–9
- [72] Bache M, Zschornak M P, Passin S, Keßler J, Wichmann H, Kappler M, Paschke R, Kaluđerović G N, Kommera H, Taubert H, Vordermark D 2011 Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions *Radiat Oncol* **6** 111
- [73] 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* **10** 605
- [74] Brown J M 2007 Tumor hypoxia in cancer therapy *Methods Enzymol* **435** 297–321
- [75] Liu Y, Li Y, Tian R, Liu W, Fei Z, Long Q, Wang X, Zhang X 2009 The expression and significance of HIF-1 $\alpha$  and GLUT-3 in glioma *Brain Res* **1304** 149–54
- [76] Mullauer F B, Kessler J H, Medema J P 2010 Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects *Anti-Cancer Drugs* **21** 215–27
- [77] Ali-Seyed M, Jantan I, Vijayaraghavan K, Bukhari S N A 2016 Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms of a Promising Anticancer Therapy *Chem Biol Drug Des* **87** 517–36
- [78] Harborne J B 2003 *Introduction to ecological biochemistry* (Amsterdam Boston Heidelberg: Elsevier Academic Press) **4** 265–285
- [79] Boryczka S, Bębenek E, Wietrzyk J, Kempieńska K, Jastrzębska M, Kusz J, Nowak M 2013 Synthesis, Structure and Cytotoxic Activity of New Acetylenic Derivatives of Betulin *Molecules* **18** 4526–43
- [80] Hausmann U, Beiträge Zur Kenntniss des Betulins, Auszug aus Verfassers Inaugural-Dissertation, Göttingen 1876, *Justus Liebig's Annalen der Chemie*, **182** 368–80
- [81] Kommera H, Kaluđerović G N, Kalbitz J, Paschke R 2010 Synthesis and Anticancer Activity of Novel Betulinic acid and Betulin Derivatives *Arch Pharm* **343** 449–57
- [82] Krasutsky P A 2006 Birch bark research and development *Nat Prod Rep* **23** 919–42
- [83] Ghaffari Moghaddam M, Bin H. Ahmad F, Samzadeh-Kermani A 2012 Biological Activity of Betulinic Acid: A Review *Pharmacol Pharm* **03** 119–23
- [84] Chojnacka K, Witek-Krowiak A, Skrzypczak D, Mikula K and Młynarz P 2020 Phytochemicals containing biologically active polyphenols as an effective agent against Covid-19-inducing coronavirus *J Funct Foods* **73** 104146
- [85] Cichewicz R H, Kouzi S A 2004 Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection *Med Res Rev* **24** 90–114
- [86] Domínguez-Carmona D B, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Ruiz-Pinell G, Gutierrez-Yapu D, Chan-Bacab M J, Giménez-Turba A, Peña-Rodríguez L M 2010 Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives *Phytomedicine* **17** 379–82

- [87] Recio M C, Giner R M, Máñez S, Gueho J, Julien H R, Hostettmann K, Ríos J L 1995 Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas* *Planta Med* **61** 9–12
- [88] Costa J F O, Barbosa-Filho J M, Maia G L de A, Guimarães E T, Meira C S, Ribeiro-dos-Santos R, de Carvalho L C P, Soares M B P 2014 Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia *Int Immunopharmacol* **23** 469–74
- [89] Karna E, Szoka L, Palka J A 2010 Betulinic acid inhibits the expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells *Mol Cell Biochem* **340** 15–20
- [90] 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. *Chem Pharm Bull* **45** 1665–70
- [91] Zuco V, Supino R, Righetti S C, 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 Lett* **175** 17–25
- [92] Kessler J H, Mullauer F B, de Roo G M, Medema J P 2007 Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types *Cancer Lett* **251** 132–45
- [93] Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nuñez G, Krammer P H, Peter M E, Debatin K M 1997 Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors *Cancer Res* **57** 4956–64
- [94] 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* **25** 732–40
- [95] Eder-Czembirek C, Czembirek C, Erovic B M, 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 *Oncol Rep* **14** 667–71
- [96] Eder-Czembirek C, Erovic B M, Czembirek C, Brunner M, Selzer E, Pötter R, Thurnher D 2010 Betulinic Acid a Radiosensitizer in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines *Strahlenther Onkol* **186** 143–8
- [97] Ehrhardt H, Fulda S, Führer M, Debatin K M, Jeremias I 2004 Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells *Leukemia* **18** 1406–12
- [98] Fulda S, Debatin K-M 2000 Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors *Med Pediatr Oncol* **35** 616–8
- [99] Pisha E, Chai H, Lee I S, Chagwedera T E, Farnsworth N R, Cordell G A, Beecher C W, Fong H H, Kinghorn A D, Brown D M 1995 Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis *Nat Med* **1** 1046–51
- [100] 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 *J Invest Dermatol* **114** 935–40
- [101] Kim D S, Pezzuto J M, Pisha E 1998 Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma *Bioorg Med Chem Lett* **8** 1707–12

- 
- [102] Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah S K, Safe S 2007 Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors *Cancer Res* **67** 2816–23
- [103] Jeremias I, Steiner H H, Benner A, Debatin K-M, Herold-Mende C 2004 Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells *Acta Neurochir* **146** 721–9
- [104] Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin K 1999 Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors *Klin Padiatr* **211** 319–22
- [105] Schmidt M L, Kuzmanoff K L, Ling-Indeck L, Pezzuto J M 1997 Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines *Eur J Cancer* **33** 2007–10
- [106] 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 *J Pharmacol Exp Ther* **289** 1306–12
- [107] Galgon T, Wohlrab W, Dräger B 2005 Betulinic acid induces apoptosis in skin cancer cells and differentiation in normal human keratinocytes *Exp Dermatol* **14** 736–43
- [108] Kwon H J, Shim J S, Kim J H, Cho H Y, Yum Y N, Kim S H, Yu J 2002 Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells *Cancer Science* **93** 417–25
- [109] Weber L A, Meißner J, Delarocque J, Kalbitz J, Feige K, Kietzmann M, Michaelis A, Paschke R, Michael J, Pratscher B, Cavalleri J-M V 2020 Betulinic acid shows anticancer activity against equine melanoma cells and permeates isolated equine skin in vitro *BMC Vet Res* **16** 44
- [110] Mullauer F B, van Bloois L, Daalhuisen J B, Ten Brink M S, Storm G, Medema J P, Schiffelers R M, Kessler J H 2011 Betulinic acid delivered in liposomes reduces growth of human lung and colon cancers in mice without causing systemic toxicity *Anti-Cancer Drugs* **22** 223–33
- [111] Udeani G O, Zhao G-M, Geun Shin Y, Cooke B P, Graham J, Beecher C W W, Kinghorn A D, Pezzuto J M 1999 Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice *Biopharm Drug Dispos* **20** 379–83
- [112] Fulda S, Susin S A, Kroemer G, Debatin K M 1998 Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells *Cancer Res* **58** 4453–60
- [113] 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 *J Transl Med* **7** 13
- [114] Fulda S, Susin S A, Kroemer G, Debatin K M 1998 Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells *Cancer Res* **58** 4453–60
- [115] Jung G-R, Kim K-J, Choi C-H, Lee T-B, Han S I, Han H-K, Lim S-C 2007 Effect of Betulinic Acid on Anticancer Drug-Resistant Colon Cancer Cells *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **101** 277–85
- [116] Fulda S, Debatin K-M 2005 Sensitization for Anticancer Drug-Induced Apoptosis by Betulinic Acid *Neoplasia* **7** 162–70
- [117] Zhuang W, Qin Z, Liang Z 2009 The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy *Acta Biochim Biophys Sin* **41** 341–51

- [118] 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 - Chin J Mat Chin Med* **35** 3056–9
- [119] 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 *J Clin Oncol* **23** 2411–22
- [120] Rzeski W, Stepulak A, Szymański M, Sifringer M, Kaczor J, Wejksza K, Zdzisińska B, Kandefer-Szerszeń M 2006 Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **374** 11–20
- [121] Ganguly A, Das B, Roy A, Sen N, Dasgupta S B, Mukhopadhyay S, Majumder H K 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 Res* **67** 11848–58
- [122] Liang B C 1996 Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines *J Neurooncol* **29** 149–55
- [123] Matsui T, Nuryadi E, Komatsu S, Hirota Y, Shibata A, Oike T, Nakano T 2019 Robustness of Clonogenic Assays as a Biomarker for Cancer Cell Radiosensitivity *Int J Mol Sci* **20** 4148
- [124] Jain M V, Paczulla A M, Klonisch T, Dimgba F N, Rao S B, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla V R, Maddika S, Łos M 2013 Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development *J Cell Mol Med* **17** 12–29
- [125] Koopman G, Reutelingsperger C P, Kuijten G A, Keehnen R M, Pals S T, van Oers M H 1994 Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis *Blood* **84** 1415–20
- [126] Pawlik T M, Keyomarsi K 2004 Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59** 928–42
- [127] Gao M, Lau P M, Kong S K 2013 Mitochondrial toxin betulinic acid induces in vitro eryptosis in human red blood cells through membrane permeabilization *Arch Toxicol* **88** 755–68
- [128] Ding W-X, Chen X, Yin X-M 2012 Tumor cells can evade dependence on autophagy through adaptation *Biochem Biophys Res Commun* **425** 684–8
- [129] 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 *Int J Mol Sci* **15** 19777–90
- [130] Kutkowska J, Strzadala L, Rapak A 2021 Hypoxia increases the apoptotic response to betulinic acid and betulin in human non-small cell lung cancer cells *Chem-Biol Interact* **333** 109320
- [131] Bernhardt S 2012 *Betulinsäure und Betulinsäurederivate als potentielle Effektoren einer strahlentherapeutischen Behandlung in Glioblastomzelllinien*, Diplomarbeit (Halle/Saale: Naturwissenschaftliche Fakultät I-Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) **1** 1-97

- 
- [132] Bache M, Münch C, Güttler A, Wichmann H, Theuerkorn K, Emmerich D, Paschke R, Vordermark D 2015 Betulinyl Sulfamates as Anticancer Agents and Radiosensitizers in Human Breast Cancer Cells *Int J Mol Sci* **16** 26249–62
- [133] Bache M, Hein A, Petrenko M, Güttler A, Keßler J, Wichmann H, Kappler M, Emmerich D, Paschke R, Vordermark D 2019 Evaluation of the Betulinic Acid–Cisplatin conjugate APC and its precursor DE9B for the treatment of human malignant glioma *Chem-Biol Interact* **314** 108841
- [134] Wen P Y, Kesari S 2008 Malignant Gliomas in Adults *N Engl J Med* **359** 492–507
- [135] Baldin V, Lukas J, Marcote M J, Pagano M, Draetta G 1993 Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* **7** 812–21
- [136] Åmellem Ø, Löffler M, Pettersen E 1994 Regulation of cell proliferation under extreme and moderate hypoxia: the role of pyrimidine (deoxy)nucleotides *Br J Cancer* **70** 857–66
- [137] Fulda S 2009 Betulinic acid: A natural product with anticancer activity *Mol Nutr Food Res* **53** 140–6
- [138] 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 V J 2016 An intrinsic DFF40/CAD endonuclease deficiency impairs oligonucleosomal DNA hydrolysis during caspase-dependent cell death: a common trait in human glioblastoma cells *Neuro Oncol* **18** 950–61
- [139] Ferris S P, Hofmann J W, Solomon D A, Perry A 2017 Characterization of gliomas: from morphology to molecules *Virchows Arch* **471** 257–69
- [140] Emdad L, Qadeer Z A, Bederson L B, Kothari H P, Uzzaman M, Germano I M 2011 Is there a common upstream link for autophagic and apoptotic cell death in human high-grade gliomas? *Neuro Oncol* **13** 725–35
- [141] Kondo Y, Kondo S 2006 Autophagy, Cancer Therapy *Autophagy* **2** 85–90
- [142] Gonzalez P, Mader I, Tchoghandjian 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 Differ* **19** 1337–46
- [143] Ellert-Miklaszewska A, Ciechomska I, Kaminska B 2013 Cannabinoid Signaling in Glioma Cells *Glioma Signaling Advances in Experimental Medicine and Biology*, ed J Barańska (Dordrecht: Springer Netherlands) **986** 209–20
- [144] Chadalapaka G, Jutooru I, Burghardt R, Safe S 2010 Drugs that Target Specificity Proteins Downregulate Epidermal Growth Factor Receptor in Bladder Cancer Cells *Mol Cancer Res* **8** 739–50
- [145] Fischer S, Ronellenfitch M W, Thiebold A-L, Harter P N, Reichert S, Kögel D, Paschke R, Mittelbronn M, Weller M, Steinbach J P, Fulda S, Bähr O 2014 Hypoxia Enhances the Antiglioma Cytotoxicity of B10, a Glycosylated Derivative of Betulinic Acid *PLoS ONE* **9** e94921
- [146] Zhang Y, He N, Zhou X, Wang F, Cai H, Huang S H, Chen X, Hu Z, Jin X 2021 Betulinic acid induces autophagy-dependent apoptosis via Bmi-1/ROS/AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells *Aging* **13** 21251–67

- [147] Wichmann H 2016 *Bedeutung von EGFR und HER2 in Glioblastomen und Weichteilsarkomen: tumorbiologische und prognostische Untersuchungen* Dissertation (Halle/Saale: Naturwissenschaftliche Fakultät I-Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) **1** 1-98
- [148] Potze L, Mullauer F B, Colak S, Kessler J H, Medema J P 2014 Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response *Cell Death Dis* **5** e1169–e1169
- [149] Shin J, Lee H-J, Jung D-B, Jung J H, Lee H-J, Lee E-O, Lee S G, Shim B S, Choi S H, Ko S G, Ahn K S, Jeong S-J, Kim S-H 2011 Suppression of STAT3 and HIF-1 Alpha Mediates Anti-Angiogenic Activity of Betulinic Acid in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells *PLoS ONE* **6** e21492
- [150] Li C, Zhang C, Zhou H, Feng Y, Tang F, Hoi M P M, He C, Ma D, Zhao C, Lee S M Y 2018 Inhibitory Effects of Betulinic Acid on LPS-Induced Neuroinflammation Involve M2 Microglial Polarization via CaMKK $\beta$ -Dependent AMPK Activation *Front Mol Neurosci* **11** 98
- [151] Song T-J, Park C-H, In K-R, Kim J-B, Kim J H, Kim M, Chang H J 2021 Antidiabetic effects of betulinic acid mediated by the activation of the AMP-activated protein kinase pathway *PLoS ONE* **16** e0249109
- [152] Kim H-J, Cho H-S, Ban H S, Nakamura H 2020 Suppression of HIF-1 $\alpha$  accumulation by betulinic acid through proteasome activation in hypoxic cervical cancer *Biochem Biophys Res Commun* **523** 726–32
- [153] Kim S J, Rabbani Z N, Dewhirst M W, Vujaskovic Z, Vollmer R T, Schreiber E-G, Oosterwijk E, Kelley M J 2005 Expression of HIF-1 $\alpha$ , CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer *Lung Cancer* **49** 325–35
- [154] Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda J M, Pilar G-D, Supuran C T, Pastorekova S, Barros-Angueira F, Gándara-Rey J M, García-García A 2012 Expression of CA-IX is associated with advanced stage tumors and poor survival in oral squamous cell carcinoma patients: CA-IX in oral squamous cell carcinoma *J Oral Pathol Med* **41** 667–74
- [155] 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 *Oncol Lett* **11** 75–80
- [156] Yoon J J, Lee Y J, Kim J S, Kang D G, Lee H S 2010 Betulinic acid inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration *J Cell Biochem* **111** 1501–11
- [157] Lai Y-J, Tsai J-C, Tseng Y-T, Wu M-S, Liu W-S, Lam H-I, Yu J-H, Nozell S E, Benveniste E N 2017 Small G protein Rac GTPases regulate the maintenance of glioblastoma stem-like cells *in vitro* and *in vivo* *Oncotarget* **8** 18031–49
- [158] Güttler A, Eiselt Y, Funtan A, Thiel A, Petrenko M, Keßler J, Thondorf I, Paschke R, Vordermark D, Bache M 2021 Betulin Sulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors and Anticancer Agents in Breast Cancer Cells *Int J Mol Sci* **22** 8808
- [159] Petrenko M, Güttler A, Pflüger E, Serbian I, Kahnt M, Eiselt Y, Keßler J, Funtan A, Paschke R, Csuk R, Vordermark D, Bache M 2021 MSBA-S - A pentacyclic sulfamate as a new option for radiotherapy of human breast cancer cells *Eur J Med Chem* **224** 113721

- 
- [160] Hoeflerlin L A, Oleinik N V, Krupenko N I, Krupenko S A 2011 Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress *Genes Cancer* **2** 889–99
- [161] Sultani H N, Morgan I, Hussain H, Roos A H, Haeri H H, Kaluđerović G N, Hinderberger D, Westermann B 2021 Access to New Cytotoxic Triterpene and Steroidal Acid-TEMPO Conjugates by Ugi Multicomponent-Reactions *Int J Mol Sci* **22** 7125
- [162] 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* *Int J Cancer* **125** 952–60
- [163] Vanchanagiri K 2017 *Investigation of novel antitumor agents for new approaches in cancer therapy*, kumulative Dissertation (Halle/Saale: Naturwissenschaftliche Fakultät I-Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) **1** 1-66
- [164] Emmerich D 2012 *Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Anti-Tumor-Wirkung von Acetylbetulinsäure-cis-Platin-Konjugaten*. Masterarbeit (Halle/Saale: Naturwissenschaftliche Fakultät I-Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) **1** 49
- [165] Willmann M, Grösslinger K, Wolfesberger B, Pagitz M, Shibly S, Hassan J, Paschke R, Jansen B, Selzer E: Intratumoral Cisplatin in Combination with Betulinic Acid in a Radiation, Chemoresistant Squamous Cell Carcinoma - Case Report 2004 *World Small Anim Vet Assoc World Congr Proc* **1** 1
- [166] Weber L A, Meißner J, Delarocque J, Kalbitz J, Feige K, Kietzmann M, Michaelis A, Paschke R, Michael J, Pratscher B, Cavalleri J-M V 2020 Betulinic acid shows anticancer activity against equine melanoma cells and permeates isolated equine skin *in vitro* *BioMed Cent Vet Res* **16** 44
- [167] Vordermark D, Horsman M R 2016 Hypoxia as a Biomarker and for Personalized Radiation Oncology *Molecular Radio-Oncology Recent Results in Cancer Research* vol, ed M Baumann, M Krause and N Cordes (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg) **198** 123–42

---

## 8 Thesen

1. Betulinsäure stellt ein potentes zytoselektives Antitumor-Agens dar und zeigt starke zytotoxische Effekte an den Gliomzelllinien U251MG und U343MG.
  2. Betulinsäure weist unter Hypoxie eine gesteigerte Zytotoxizität auf. Für die mit einer Strahlentherapie schlecht therapierbaren hypoxischen Tumoreareale, besonders in GBM, kann dies ein wichtiges therapeutisches Angriffsziel sein.
  3. Betulinsäure beeinflusst den Zellzyklus der Gliomzelllinien verbunden mit einer Ansammlung von Tumorzellen in der strahlensensiblen G2/M-Phase unter Hypoxie deutlich stärker als unter Normoxie. In der durch Betulinsäure radiosensitivierten Zelllinie U251MG ist dieser Effekt bei gleichzeitiger Zunahme an Zelltrümmern in der SubG1-Phase besonders ausgeprägt zu beobachten.
  4. Die Gliomzelllinien U251MG und U343MG zeigen geringe morphologische Veränderungen (z.B. Kernpyknosen) in der DAPI-Färbung. Mittels Durchflusszytometrie (Annexin-V/PI-Färbung) bzw. Westernblot (enzymatisch gespaltene PARP) lässt sich die Betulinsäure-induzierte Apoptose zusätzlich detektieren.
  5. Betulinsäure löst in U251MG und U343MG Zelltodmechanismen wie Apoptose und Nekrose unter Hypoxie eher und bei geringeren Konzentrationen aus als unter Normoxie. Eine additive Radiatio führt zusätzlich zum Zelltod, besonders unter Hypoxie.
  6. Die Behandlung von Gliomzelllinien U251MG und U343MG mit Betulinsäure führt unter Normoxie und Hypoxie zur Reduktion der Migration.
  7. Die Betulinsäure-Behandlung der Gliomzelllinien U251MG und U343MG reduziert unter Normoxie und Hypoxie den Proteingehalt des Apoptose-Inhibitors SVV. Betulinsäure vermindert unter Hypoxie zusätzlich den Hif-1 $\alpha$ -Proteingehalt. In der Zelllinie U251MG wird die Induktion von Hif-1 $\alpha$ , SVV und CA-IX auf mRNA-Ebene gehemmt.
  8. Betulinsäure und Betulin verbessern die Effekte einer Strahlentherapie an Gliomzelllinien, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen.
-



## Erklärungen

(1) Ich erkläre gemäß § 7 (2) der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vom 09.12.2008 hiermit, keine früheren Promotionsversuche unternommen zu haben und, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

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

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



Halle/Saale, 14.06.2022, .....

Ort, Datum, Unterschrift

## Danksagung

Meinen herzlichen Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Matthias Bache und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dirk Vordermark für die Überlassung des spannenden Themas, die wissenschaftliche Unterstützung in der AG Molekulare Strahlenbiologie und fortwährende Motivation.

Vielen Dank an Prof. Dr. rer. nat. Paschke von BioSolutions Halle GmbH für die Bereitstellung der Betulinsäure und Betulinderivate sowie Frau Dr. rer. nat. Jutta Kalbitz für die Beratung zur Aufarbeitung und Verwendung.

Ich bedanke mich bei Dr. rer. nat. Thomas Müller und Mitarbeiter\*innen der AG Experimentelle Onkologie für die Einarbeitung und Betreuung am FACS-Calibur zu den Zellzyklus-Messungen und Möglichkeit zur Etablierung des Annexin-V/PI-Assays in unserer AG.

Von Herzen sei gedankt Gabriele Thomas und Kathrin Spröte für die Einarbeitung in Zellkultur, Western Blot und PCR sowie Anleitung zum gründlichen Arbeiten unter der Laminarbox bei positiver Stimmung.

Ich danke den wunderbaren Mitarbeiter\*innen der AG Molekulare Strahlenbiologie Dr. rer. nat. Antje Güttler, Dr. rer. nat. Swetlana Rot, Dr. rer. nat. Jacqueline Kessler, Dr. rer. nat. Henri Wichmann und Dr. rer. nat. Matthias Kappler für ihre fundierten Ratschläge und Diskussionen und die familiäre Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren sei jedem gedankt, der einen kleinen Beitrag zum Gelingen dieser Doktorarbeit geleistet hat.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern und besonders meinem Bruder Dr. rer. nat. Matthias Zschornak für die positive Energie in der Schlussphase der Dissertationsarbeiten.