

Neue Strategien für den Einsatz von Betulinsäurederivaten in zwei unterschiedlichen Tumorentitäten

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau Anne Funtan, geb. Michaelis
geb. am 01.10.1991 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter:

1. Prof. Dr. Reinhard Paschke (Martin-Luther-Universität Halle -Wittenberg)
2. Prof. Dr. Rainer Schobert (Universität Bayreuth)

Halle (Saale), den 21.09.2021

Datum der Verteidigung: 03.03.2022

- *Für meine Eltern* -

Danksagung

In den letzten vier Jahren habe ich sehr viel gelernt und konnte mich persönlich weiterentwickeln, wofür ich sehr dankbar bin. Viele Menschen haben mich während der Erarbeitung dieser Dissertation unterstützt und begleitet. Aus diesem Grund möchte ich die Gelegenheit nutzen, ihnen zu danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Reinhard Paschke, der sowohl in fachlichen, als auch allgemeinen Angelegenheiten immer ein offenes Ohr für mich hatte. Vielen Dank für die schöne Zeit, das gegenseitige Vertrauen, dieses interessante Thema zu bewerkstelligen und für die vielen konstruktiven Diskussionen während der letzten Jahre. Es hat mir große Freude bereitet, ein Teil der Arbeitsgruppe zu sein.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe sowie der Firma BioSolutions Halle GmbH möchte ich mich für die tolle und angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken. Ich habe nie ein „Nein“ zu hören bekommen, immer nur ein „Ich weiß noch nicht wie, aber wir bekommen das hin!“.

Besonderer Dank gilt hierbei Lia Bluhm. Ich habe die fachlichen Diskussionen zur Lösung von aufgetretenen Problemen mit dir immer sehr zu schätzen gewusst und in dir nicht nur eine Kollegin, sondern auch eine Freundin gefunden. Ein großer Dank gilt auch meiner Laborkollegin Sophie Hoenke. Die Zusammenarbeit und der humorvolle Umgang miteinander im Labor haben das Arbeiten nie monoton werden lassen. Auch möchte ich Frau Dr. Jutta Kalbitz danken; Jutta ist in den letzten Jahren ein Vorbild in Hinsicht auf die Herangehensweise und Lösung von Aufgabenstellungen für mich geworden. Außerdem möchte ich mich bei Katja Mennerich bedanken; sie hat mich nicht nur in allen organisatorischen Dingen unterstützt, sondern mich jeden Morgen mit ihrer guten Laune angesteckt.

Im gleichen Atemzug möchte ich mich bei den beiden Studenten Andreas Thiel und Valentin Schmidt bedanken. Die Betreuung der Bachelor- und Masterarbeiten, sowie die Zusammenarbeit im Labor hat mir durchgängig sehr viel Spaß gemacht.

Ein sehr großer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. Pietzsch, im Besonderen Franziska Seifert, für die Hilfe bei der Erarbeitung des Carboanhydrase IX-Assays und der Beantwortung aller dabei anfallenden Fragen.

Als nächstes möchte ich mich bei den Projektpartnern des Projektes „TopiDrugHorse“ von der Tierärztlichen Hochschule Hannover und der Firma Skinomics GmbH für die unkomplizierte und tolle Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt allerdings Frau Dr. Lisa Weber für die harmonische und sehr inspirierende Zusammenarbeit, dem ständigen Austausch von Ergebnissen, wodurch das Projekt nicht besser hätte funktionieren können und dem großen Vertrauen ineinander, wodurch eine Freundschaft entstanden ist.

Zudem möchte ich mich bei den Projektpartnern des DFG-Projektes „Überwindung einer hypoxischen Strahlenresistenz in Mammakarzinomen“, bei Dr. Iris Thondorf und der Strahlenklinik Halle bedanken.

Auch möchte ich Dr. Kranthi Vanchanagiri für die Einarbeitung in die Zellkultur danken.

Herrn Dr. Ströhl und seinem Team danke ich für die Anfertigung der NMR-Spektren und Theresa Schmidt aus der AG Csuk danke ich für die Messungen der ESI.

Zu guter Letzt gilt ein großer Dank meinem Mann Sebastian Funtan, meiner Familie und meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir stets Rückhalt, sowohl während des Studiums als auch während der Promotion, gegeben haben. Ich habe wohl manche Momente geflucht, als ich dachte, ich könnte nicht noch mehr lernen und Sebl mich vom Gegenteil überzeugt hat. Jetzt kann ich mit Stolz sagen: Ich danke dir dafür.

I. Kurzzusammenfassung

Naturstoffe nehmen immer stärker an Bedeutung zu. Neben der Verwendung als Zusatzstoffe in der Kosmetikindustrie, wie beispielsweise in Cremes und Waschlotionen, haben Naturstoffe große Bedeutung in der Pharmakologie. Spätestens seit der Entdeckung von Penicillin durch Alexander Fleming wurden die Naturstoffe zu einer wichtigen Quelle für die Naturstoffchemie.

In dieser Arbeit soll durch Modifizierung der Naturstoffe Betulin und Betulinsäure ein Konzept entwickelt werden, mit welchen zwei voneinander unabhängige Tumorentitäten (Tumorthérapien) bearbeitet werden können. In einem ersten Projekt, der Hemmung der Carboanhydrase IX als Angriffspunkt für ein *drug-targeting*, mussten zunächst unterschiedliche Inhibitoren, basierend auf Betulin und Betulinsäure, synthetisiert und charakterisiert werden. Bei der Carboanhydrase handelt es sich um ein Metalloenzym mit Zink als aktivem Zentrum, welches eine entscheidende Rolle bei der Umsetzung von Kohlendioxid und Wasser zu Protonen und Bicarbonat-Ionen spielt. Eine besondere Stellung nehmen im Rahmen dieser Arbeit die CA IX und CA XII ein. Die Carboanhydrase IX ist ein membrangebundenes Protein mit extrazellulärem katalytischem Zentrum, welches überwiegend in hypoxischen Bereichen von Tumoren zu finden ist. Für die Inhibierung der CA IX und der damit verbundenen Schwächung von hypoxischen Tumoren und Anreicherung des Wirkstoffes am Wirkort wurden Sulfamate verwendet, welche bereits eine bedeutende Stellung in der Entwicklung neuer Carboanhydrase-Inhibitoren in der Literatur einnehmen, ebenso die Sulfonamide. Eine dritte Stoffklasse sind cyclische Sulfonamide, darunter Saccharin. Als eine weitere inhibierende Gruppe wurde Acetazolamid eingeführt. Acetazolamid gilt als Standardinhibitor für die CA IX, wodurch eine Anbringung an den Naturstoff Betulin sehr vielversprechend war. Neben den inhibierenden Gruppen, wurden auch die verwendeten Linkerlängen variiert. Dies sollte einen Einblick geben, ob der Abstand zwischen dem Wirkstoff und der Enzym-Bindegruppe einen Einfluss auf die Bindung an das Enzym hat. Alle neu synthetisierten Verbindungen wurden einer zytotoxischen Untersuchung unterzogen. Hierfür wurden vier verschiedene humane Tumorzelllinien und eine Normalzelllinie verwendet. Um die These der Carboanhydrase-Inhibierung bestätigen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit (für die Bestimmung der Dissoziationskonstante k_i) ein Enzym-Kinetik-Assay etabliert, welcher auf der Verwendung von *para*-Nitrophenylacetat als Substrat basierte. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sowohl bei der Bestimmung der Zytotoxizität, als auch bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten, die hergestellten Sulfonamide und die Derivate des Acetazolamids die effektivste Wirkung, mit IC_{50} -Werten in einem Bereich von 5 - 10 μM und k_i -Werten in einem Bereich zwischen 0.12 - 1.2 μM , zeigten. Ein zweiter wichtiger Ansatzpunkt für den Einsatz von Naturstoffen, ist die Entwicklung topischer Applikationsmöglichkeiten für die gezielte äußerliche Behandlung von Hauttumoren. Circa 80 % der über 15-jährigen Schimmel erkrankten an Melanomen.

Ein weiteres Ziel in dieser Arbeit lag in der biologischen Evaluierung potentieller Wirkstoffe, um in einem zweiten Schritt eine topische Formulierung zur Behandlung von *equinen* malignen Melanomen entwickeln zu können. Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung wurden sowohl der SRB-, als auch der MTT-Assay verwendet. Auch wurde, zur Bestimmung der Permeationszeit, ein zeitabhängiger SRB-Assay durchgeführt. Hierbei zeigten sich erstaunliche Ergebnisse für den Wirkstoff NVX-207, welcher schon nach einer Behandlungsdauer von drei Stunden einen IC_{50} -Wert von 8 μM liefern konnte. Durchgeführt wurden diese Versuche sowohl an *equinen* Melanom- und Sarkoidzellen, als auch an *equinen* Fibroblasten. Eine zweite wichtige Einschätzung lieferte die Untersuchung der Zelltodmechanismen. Hierfür wurden vier unabhängige Methoden durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl der reine Naturstoff Betulinsäure, als auch deren Derivate in der Lage sind, bei ca. 80 % der Tumorzellen, Apoptose auszulösen (Nekrose konnte dabei zumeist ausgeschlossen werden). Aufgrund der guten Verfügbarkeit und überzeugenden Wirkung, wurden Betulinsäure und NVX-207 für alle nachfolgenden Schritte verwendet.

II. Präambel

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit mit dem Titel „Neue Strategien für den Einsatz von Betulinsäurederivaten in zwei unterschiedlichen Tumorentitäten“ hat zwar Betulin/Betulinsäure als antitumor-aktive Substanz zu Grunde, nutzt jedoch die Fähigkeit des Betulins bzw. der Betulinsäure, Apoptose auszulösen, auf unterschiedlicher Weise. Einmal durch Kombination mit einem Enzyminhibitor zur gezielten Behandlung von Mammakarzinomen durch Hemmung eines Oberflächenenzym von Tumorzellen, welches als Target verwendet wird und zum anderen durch das Nutzen der hydrophoben Eigenschaft zur Behandlung von equinen Melanomen. Aus diesem Grund wurde für die hier vorliegende Arbeit einer anderen Form der Gliederung gewählt. Neben einer allgemeinen Einleitung zum Thema Betulinsäure und der Entstehung/Behandlung maligner Tumore, wird es eine separat Einleitung zu beiden Tumorentitäten geben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung „Naturstoffchemie“	1
1.1 Betulinsäure und deren Derivate	1
1.2 Entstehung und bisherige Behandlung maligner Tumore.....	3
1.3 Apoptose und andere Formen des Zelltodes	4
1.4 Wirkungsweise von Betulinsäure	6
2. Zielstellung.....	7
3. Carboanhydrase IX als <i>Target</i> in der Tumorthherapie	10
3.1 Einleitung	10
3.1.1 Die Carboanhydrase	10
3.1.1.1 Vorkommen und Funktion der α -Carboanhydrase	10
3.1.1.2 Carboanhydrase IX.....	12
3.1.1.3 Verschiedene Arten von Inhibitoren.....	14
3.1.1.4 Sulfamate/Sulfonamide zur Überwindung der hypoxischen Strahlenresistenz	15
3.2 Ergebnisse	21
3.2.1 Synthese und Charakterisierung verschiedener Betulin(säure)-Derivate	21
3.2.1.1 Sulfamate.....	22
3.2.1.2 Sulfonamide.....	25
3.2.1.3 Acetazolamid basierte Konjugate	28
3.2.1.4 Saccharin als funktionelle Gruppe.....	35
3.2.2 Bestimmung der Zytotoxizität.....	38
3.2.2.1 Zytotoxizität an humanen Zelllinien.....	39
3.2.3 Enzymkinetische Untersuchungen	44
3.2.3.1 Theoretische Grundlagen.....	44
3.2.3.2 Michaelis-Menten-Gleichung	45
3.2.3.3 Die reversible Enzymhemmung	47
3.2.3.4 Untersuchung der CA IX - Inhibitoren.....	49
3.2.3.5 Methodenentwicklung Esterase-Assay	50
3.2.3.6 Ergebnisse des Esterase-Assay	53
3.3 Diskussion des Teilgebietes: <i>Drug-Targeting</i> durch Hemmung der CA IX	62
4. Lokale Tumorbehandlung bei <i>equinen</i> Melanomen.....	65
4.1 Einleitung	65
4.1.1 Das <i>equine</i> Melanom	65
4.1.2 Das <i>equine</i> Sarkoid.....	65
4.1.3 Bisherige Behandlungsmöglichkeiten und dessen Erfolgchancen.....	66
4.1.4 Entwicklung eines topischen Applikationssystems	66
4.2 Ergebnisse	68
4.2.1 Zytotoxizität an <i>equinen</i> Zelllinien	68
4.2.1.1 SRB-Assay	68
4.2.1.2 Zeitabhängiger SRB-Assay	70
4.2.1.3 MTT-Assay	71
4.2.2 Untersuchung der Zelltodmechanismen	72
4.2.2.1 AnnexinV-Assay	73
4.2.2.2 Caspase 3-Assay	77

4.2.2.3	DNA-Fragmentierung mittels TUNEL-Assay	80
4.2.2.4	Zellzyklusanalyse	83
4.2.2.5	Untersuchung der Zelltodmechanismen anhand der Zelllinie MelDuWi	87
4.3	Diskussion des Teilgebietes: Lokale Tumorbehandlung bei equinen Melanomen	89
4.4	Ergebnisse des Gesamtprojektes „TopiDrugHorse“	91
5.	Zusammenfassung	93
6.	Experimenteller Teil	95
6.1	Material und Methoden	95
6.2	Synthese	96
6.2.1	Sulfamate	98
6.2.1.1	28-O-Acetylbetulin (1a) und 3,28-O,O'-diacetylbetulin (1b)	98
6.2.1.2	3-O-Acetylbetulin (1c)	98
6.2.1.3	28-O-Acetylbetuliny-3-sulfamat (2)	99
6.2.1.4	3-O-Acetylbetuliny-28-sulfamat (3)	99
6.2.1.5	Betuliny-28-O-sulfamat (4) und Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat (5)	100
6.2.1.6	Octylsulfamat (6)	100
6.2.1.7	Octyldisulfamat (7)	101
6.2.1.8	Triethylenglycol-disulfamat (8)	101
6.2.1.9	3-O-Acetylbetulinsäure (9)	102
6.2.2	Sulfonamide	102
6.2.2.1	Sulfonamid der Acetylbetulinsäure (10)	102
6.2.2.2	3-Hemisuccinat-28-O-acetylbetuliny (11a) und 3-(2-Methyl-hemisuccinat)-28-O-acetylbetuliny (11b)	103
6.2.2.3	28-Hemisuccinat-3-O-acetylbetuliny (12a) und 28-(2-Methyl-hemisuccinat)-3-O-acetylbetuliny (12b)	104
6.2.2.4	3-Hemisuccinat-aurinamid-28-O-acetylbetuliny (13a) und 3-(2-Methyl-hemisuccinat)-aurinamid-28-O-acetylbetuliny (13b)	104
6.2.2.5	28-Hemisuccinat-aurinamid-3-O-acetylbetuliny (14a) und 28-(2-Methyl-hemisuccinat)-aurinamid-3-O-acetylbetuliny (14b)	105
6.2.3	Acetazolamid basierte Konjugate	106
6.2.3.1	5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (15)	106
6.2.3.2	5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid -hemisuccinat (16)	106
6.2.3.3	5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid -hemisuccinat-aminodiethylenglycol (17)	107
6.2.3.4	3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (18)	107
6.2.3.5	3-O-Acetylbetulinsäure- aminodiethylenglycol-amid (19)	108
6.2.3.6	3-O-Acetylbetulinsäure- (aminodiethylenglycol-amid)-hemisuccinat (20)	108
6.2.3.7	Acetylbetulinsäure- (aminodiethylenglycol-amid)-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (21)	109
6.2.4	Saccharin-Derivate ohne Betulin	109
6.2.4.1	2-[2-(3-Methoxyphenyl)-2-oxoethyl]-1,2-benzothiazol-3 (2H)-on-1,1-dioxid (22)	109
6.2.4.2	2-(4-Methylbenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid (23)	110
6.2.4.3	2-(4-Bromobenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid (24)	110
6.2.5	Saccharin-Derivate mit Betulin	111
6.2.5.1	Betuliny-28-propionat (25a) und Betuliny-di-3,28-propionat (25b)	111
6.2.5.2	Betuliny-3-chloracetat-28-propionat (26)	111
6.2.5.3	Betuliny-di-(3,28)-chloracetat (27)	112
6.2.5.4	Betuliny-3-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat (28)	112
6.2.5.5	Betuliny-di-3,28-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat (29)	113

6.3	Zellkulturmethoden.....	114
6.3.1	Verwendete Zelllinien	114
6.3.1.1	Humane Zelllinien	114
6.3.1.2	Equine Primärzellkultur.....	114
6.3.2	Zellkultivierung	114
6.3.3	Passagieren der Zellen.....	114
6.3.4	Einfrieren von Zellen.....	115
6.4	Untersuchung der Zytotoxizität von Wirkstoffen	115
6.4.1	Sulforhodamin B-Assay	115
6.4.2	Zeitabhängiger Sulforhodamin B-Assay.....	116
6.4.3	MTT-Assay	116
6.5	Untersuchung der Zelltodmechanismen.....	117
6.5.1	AnnexinV-Assay.....	117
6.5.2	Caspase 3-Assay	118
6.5.3	TUNEL-Assay	119
6.5.4	Zellzyklusanalyse	120
6.6	Enzymkinetische Untersuchung.....	121
6.6.1	Präparation der Carboanhydrase IX	121
6.6.2	Messung der Enzyminhibierung in der Quarzküvette	121
6.6.2.1	Kalibrierung des Produktes	121
6.6.2.2	Aktivitätsmessung	122
6.6.2.3	Messung der Inhibierung der Carboanhydrase IX	122
6.6.3	Anpassung des Systems an eine 96-well-plate	123
6.6.3.1	Kalibrierung des Produktes	123
6.6.3.2	Aktivitätsmessung	123
6.6.3.3	Messung der Inhibierung der Carboanhydrase IX	123
7.	Literaturverzeichnis.....	124
8.	Anhang	139
8.1	Charakterisierung der Sulfamate (1a - 8)	139
8.2	Charakterisierung der Sulfonamide (9 - 14).....	141
8.3	Charakterisierung der Acetazolamid basierte Konjugate (15 - 21).....	143
8.4	Charakterisierung der Saccharin-Derivate mit und ohne Betulin (22 -29).....	145
8.5	Dosis-Wirkungs-Kurven der Bestimmung der Zytotoxizität an humanen Zelllinien. 148	
8.5.1	Zytotoxizität an humanen Zelllinien.....	148
8.5.2	Zytotoxizität an equinen Zelllinien	152
8.6	Untersuchung der Zelltodmechanismen.....	154
8.6.1	AnnexinV-Assay	154
8.6.1.1	Zelllinie MelDuWi	154
8.6.1.2	Zelllinie sRGO2.....	159
8.6.1.3	Zelllinie PriFri2	163
8.6.1.4	Zelllinie A375.....	167
8.6.2	Caspase 3-Assay	172
8.6.3	TUNEL-Assay	178
8.6.4	Zellzyklusanalyse	183

8.6.4.1	Zelllinie MelDuWi	183
8.6.4.2	Zelllinie sRGO2.....	189
8.6.4.3	Zelllinie PriFri2	193
8.6.4.4	Zelllinie A375.....	197
9.	<i>Curriculum Vitae</i>.....	202
10.	Eigenständigkeitserklärung.....	204

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ANS	1,8-Anilinonaphthalen-sulfonat
apop.	apoptotisch
Asn	Asparagin
AZA	Acetazolamid
bp	Basenpaare
Brd-UTP	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate</i>
CA	Carboanhydrase
CA IX	Carboanhydrase IX
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DMA	Dimethylacetamid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	<i>equines</i> Sarkoid
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	fetales Kälberserum
His	Histidin
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration, bei der 50 % Wachstum vorhanden ist
ICAD	Inhibitor der <i>Caspase Activated DNase</i>
kbp	Kilobasenpaare
Leu	Leucin
MTT	<i>methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium-bromide</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
p-NPA	<i>para</i> -Nitrophenylacetat
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	<i>rotation per minute</i>

RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SRB	Sulforhodamin B
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TdT	<i>terminal desoxynucleotidyl transferase</i>
Tyr	Tyrosin
Tween-80	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat
Val	Valin

1. Einleitung „Naturstoffchemie“

1.1 Betulinsäure und deren Derivate

Eine schonende und effektive Behandlung von verschiedensten Krankheiten, insbesondere der Therapie von Tumoren, bietet seit Langem und auch heute noch die Naturstoffchemie¹⁻⁵. Dieses Wissen wurde bereits im alten Ägypten angewandt. Bereits 3000 v. Chr. wurde der arabische Gummibaum (*Acacia nilotica*) zur äußerlichen Behandlung von Wunden⁶ verwendet oder um „lahme Beine“ mit einem Bad aus Schlehen⁷ zu remobilisieren. Zu den bekanntesten Vertretern von Naturstoffen in der Krebstherapie gehören das Taxan, ein Diterpen, welches aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert werden kann. Die Terpene, darunter auch die genannten Diterpene, sind eine Stoffklasse bestehend aus mehreren Isoprenuntereinheiten, welche einen beträchtlichen Anteil unseres täglichen Lebens ausmachen. Je nach Anzahl der Isopren-Einheiten bzw. Anzahl der Kohlenstoffatome lässt sich eine Einteilung in Hemi-(C₅), Mono-(C₁₀), Sesqui-(C₁₅), Di-(C₂₀), Sester-(C₂₅), Tri-(C₃₀), Tetra-(C₄₀) oder Polyterpene (> C₄₀) vornehmen, wobei jede Gruppe wiederum in azyklische und zyklische Verbindungen unterteilt werden kann. Als Mono- oder Sesqui-Terpene kommen diese in ätherischen Ölen von Pflanzen vor, als Carotinoide in unserer täglichen Nahrung oder als Polyterpene bei der Herstellung von Naturgummis⁸. Viele Vertreter der Terpene, besonders die Triterpene, besitzen neben einer antibakteriellen⁹, antiviralen^{10, 11}, schmerzlindernden und antitumoralen Wirkung, ebenfalls eine nachgewiesene anti-inflammatorische^{12, 13}, anti-HIV¹⁴ und anti-angiogenetische^{15, 16} Wirkung. Auf Grund dieser Wirkung finden Pflanzen mit hohem Triterpengehalt schon seit Jahrhunderten Anwendung als Naturheilstoff in der Volksmedizin⁸. Triterpene bestehen aus genau sechs Isopreneinheiten, welche anhand der Anzahl an Ringsystemen eingeordnet werden können. Hierbei unterscheidet man zwischen linearen (Squalen), tetracyclischen und pentacyclischen Triterpenen. Pentacyclische Triterpene selbst unterscheiden sich zudem, je nachdem, ob es sich um ein System bestehend aus fünf Sechsringen (Ursane oder Oleanane) oder vier Sechsringen und einem Fünfring (Lupane) handelt¹⁷. Vertreter von Triterpenen des Ursan- oder Oleangrundgerüsts sind die Oleanol-, Ursol- oder Maslinsäure (**Abbildung 1**), welche von Csuk *et al.* hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität sehr erfolgreich charakterisiert werden konnten¹⁸⁻²¹.

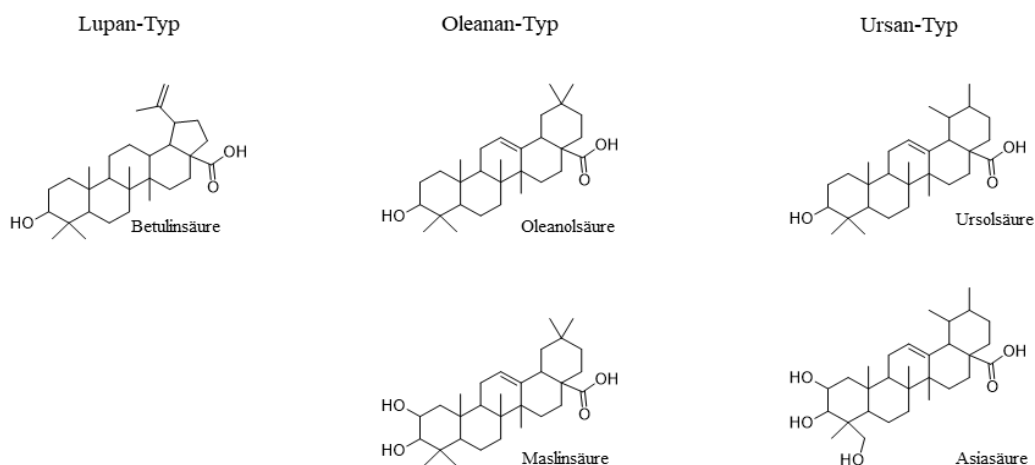


Abbildung 1. Strukturformeln einiger Beispiele von pentacyclischen Triterpenen mit Zuordnung des jeweiligen Typs nach Einordnung des zugrundeliegenden Gerüsts.

Gewonnen werden kann der Naturstoffe Oleanolsäure aus Salbei (genus *Salvia*), Rosmarin (*Salvia rosmarinus*) oder dem gemeinen Efeu (*Hedera helix*). Aus Thymian (genus *Thymus*), Basilikum (genus *Ocimum*) bzw. der echten Katzenminze (*Nepeta cataria*) gewinnt man die Ursolsäure oder aus Oliven (*Olea europaea*) die Maslinsäure. Die Maslinsäure besitzt sehr gute zytotoxische Eigenschaften. Sie ist zwar nicht in der Lage, freie Radikale abzufangen, bewirkt jedoch einen Schutz der DNA vor

Oxidation²². Zudem konnten anti-diabetische Eigenschaften der Maslinsäure nachgewiesen werden²³. Einer der bedeutendsten Vertreter der Lupane ist die Betulinsäure (3- β -Hydroxylup-20(29)-en-28-säure), ein pentazyklisches Triterpenoid, welches in der Rinde von Birken (*Betula alba*) und Platanen (*Platanus sp.*) vorkommt. Schon seit vielen Jahren stehen Betulinsäure und dessen Derivate im Fokus der Naturheilkunde, erstmals isoliert im Jahre 1788 von Johann Tobias Lowitz²⁴. Betulin (3- β -Lup-20(29)-en-3,28-diol), die reduzierte Form der Betulinsäure, war eines der ersten Naturstoffe, das vor mehr als 200 Jahren aus Pflanzen isoliert werden konnte^{25, 26}.

Im Jahr 1995 bestätigte sich erstmals die antitumorale Wirkung von Betulinsäure auf humane Melanomzellen²⁷. In den Folgejahren konnte außerdem belegt werden, dass Betulinsäure eine antitumorale Wirkung auf sehr unterschiedliche Tumorzelllinien aufweist, wobei sich eine selektive Wirkung²⁸ auf ausgewählte Normalzelllinien mit einer weitaus geringen Wirkung herausgestellt hat. Ein großer Nachteil zeigt sich bei der Verwendung von Betulinsäure jedoch durch eine geringe Wasserlöslichkeit, welche sich mit Hilfe der chemischen Struktur des pentacyclischen Triterpens erklären lässt. Zusammengesetzt aus sechs Isopren-Untereinheiten, besitzt Betulinsäure ein stark unpolares Grundgerüst (mit der allgemeinen Formel $C_{30}H_{48}$). In Deutschland ist Betulin als Inhaltsstoff von Hautcremes zugelassen (siehe Imlan Creme Pur). Das Ziel dieser Cremes ist die Behandlung von aktinischer Keratose. Eine Applikation über die Haut soll also gewährleisten, dass eine systemische Anreicherung des Wirkstoffes im Körper nicht stattfinden kann. Im Fall einer intravenösen oder oralen Verabreichung, beispielsweise zur Behandlung von innenliegenden Tumoren, ist es jedoch zwingend notwendig, die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes im Organismus zu erhöhen. Eine Möglichkeit, die hydrophoben Eigenschaften zu verbessern, besteht in der Anbringung hydrophiler Seitenketten. Möglich ist dies an der C3-, C19-, und C28-Position des Betulins/der Betulinsäure, dargestellt in **Abbildung 2**. Durch Anbringung einer polaren Seitenkette (als Beispiel soll eine Sulfamat-Gruppe dienen, da auf diese funktionelle Gruppe später noch genauer eingegangen wird) mit Hilfe eines möglichst labilen Linkers, wahlweise einem Ester, kommt es neben der verbesserten Löslichkeit^{29, 30} auch zum gezielten *drug-targeting* von Zielstrukturen, bspw. der Carboanhydrase IX (**siehe Kap 3.1.1**).

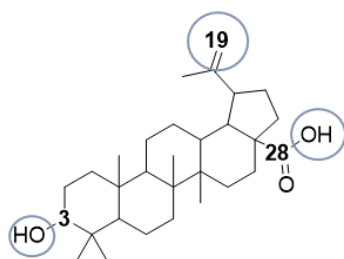


Abbildung 2. Strukturformel von Betulinsäure (BS). Durch das Einführen von polaren Seitenketten an den Positionen C3, C19 und C28 kommt es zur Erhöhung der Polarität und einer daraus folgenden Verbesserung der Wasserlöslichkeit.

In den letzten Jahren konnten ausführliche Untersuchungen von Paschke *et al.* durchgeführt werden, welche die Bedeutung der Betulinsäure zeigen sollen²⁹⁻³⁴. Ein Derivat, welches schon ausführlicher untersucht wurde, ist **NVX-207**, ein Tris-Ester der Betulinsäure (durch Anbringung von Tris(hydroxymethyl)aminomethan). M. Willmann und R. Paschke *et al.* konnten in einem Versuch mit spontan auftretenden Tumoren bei Hunden zeigen, dass eine Injektion von **NVX-207** in den betreffenden Bereich zu einem Rückgang des tumorösen Gewebes führte³⁵. Zudem wurden erfolgreich Untersuchungen mit Hilfe des Wirkstoffes **NVX-207** an Glioblastomazellen durchgeführt³⁶. In einer Zusammenarbeit der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der Tierhochschule Hannover kam es im Jahr 2015 erstmals zu Versuchen an *equinen* Melanomzellen. Nach genaueren Untersuchungen der Zytotoxizität und nach Aufklärung der ablaufenden Zelltodmechanismen, konnten erste Versuchen an ergrauten Pferden, besser bekannt als Schimmel, durchgeführt werden. Hierfür

injizierten Liebscher *et al.* in regelmäßigen Abständen den gelösten Wirkstoff **NVX-207** in *equine* maligne Melanome zweier Patienten der Pferdeklinik Hannover³⁷. Das Ausbleiben von Nebenwirkungen bei beiden Pferden zeigte eine gute Toleranz des injizierten Wirkstoffes, jedoch wurde die Behandlung durch einen sehr großen Aufwand (Transport und Sedierung der Pferde, Verhärtungen in den Tumoren, wodurch eine Injektion kaum möglich war usw.) erschwert. Wie schon bei den zuvor beschriebenen Hautcremes zur Behandlung von aktinischer Keratose, wäre das Einbringen des Wirkstoffes in eine Creme-Formulierung ein neuer Ansatzpunkt in der lokalen Behandlung von *equinen* Melanomen.

1.2 Entstehung und bisherige Behandlung maligner Tumore

Unter dem Begriff Tumor versteht man im weitesten Sinne die unkontrollierte Vergrößerung, Wucherung, Neubildung oder ein Anschwellen von Gewebe. In Hinsicht auf Wachstum, Abgrenzung zum gesunden Gewebe und Verlauf kann eine Einteilung in gutartige (benigne) oder bösartige (maligne) Tumore erfolgen. Benigne Tumore zeichnen sich durch ein langsames und verdrängendes Wachstum aus. Eine Invasion in umliegendes (gesundes) Gewebe tritt in den seltensten Fällen auf, weshalb die Prognosen von therapeutischen Maßnahmen häufig vielversprechend sind. Dem gegenüber besitzen maligne Tumore ein schnelles, invasives Wachstum und sind in der Lage, in benachbartes Gewebe oder andere Organe zu Metastasieren. Eine Mutation der benignen Tumore in maligne Tumore ist jedoch nicht ausgeschlossen, wie beispielsweise die Mutation von Dickdarpolypen, welche häufig zu Adenokarzinomen entarten. Ihre Entstehung haben Tumore oftmals in der Anhäufung von Mutationen bestimmter Gene (Tumorsuppressorgene), oder in der Belastung mit chemischen, biologischen und physikalischen Karzinogenen. Ebenfalls möglich ist das Auslösen von Zellmutationen durch bestimmte Viren, beispielsweise dem humanen Papillomvirus (HPV). Alle Ursachen haben demnach eine Veränderung des Erbgutes gemein. Soliden, malignen Tumoren steht auf Grund ihres schnellen Wachstums und der daraus folgenden unzureichenden Blutversorgung tendenziell weniger Sauerstoff zur Verfügung, sodass es zur Umstellung des Stoffwechsels kommt. Tumore haben auf zellulärer Ebene alle eine Folge von Eigenschaften gemeinsam, welche nach Hanahan und Weinberg als „*The hallmarks of cancer*“ bezeichnet werden³⁸.

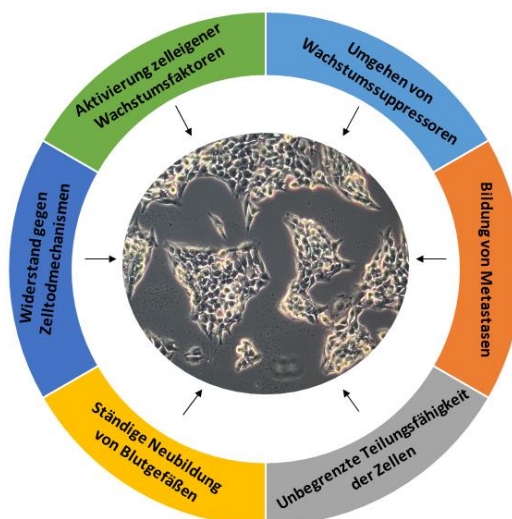


Abbildung 3. Schematische Darstellung der „Hallmark of Cancer“, welche zusammen für das invasive Wachstum von malignen Tumoren sorgen.

Zur Behandlung von benignen und malignen Tumoren stehen zum jetzigen Stand drei wichtige Methoden zur Verfügung. Neben der chirurgischen Entfernung und der lokalen Strahlentherapie, finden zytostatische Chemotherapeutika eine breite und wirksame Anwendung. Mehr als 35 verschiedene

Medikamente (Stand 08.02.2021, © AMBOSS), unterteilt in 5 Hauptgruppen und 16 Untergruppen. Alle bisher verwendeten zytostatischen Chemotherapeutika haben das Ziel gemein, direkt oder indirekt zur Reduktion von schnell proliferierenden Zellen beizutragen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden multiple Nebenwirkungen in Kauf genommen. Ein sehr bekanntes Beispiel stellt Cisplatin dar, welches nach Einführung vor über 40 Jahren als Zytostatika in die klinische Onkologie, noch heute einen wichtigen Stellwert in der Therapie von soliden Tumoren besitzt. Die erste Verbindung der Cisplatin-basierten Wirkstoffe fand bereits 1978 klinische Anwendung^{39, 40}. Nach Einnahme kommt es rasch zum Ligandenaustausch, sodass die kationischen Platinionen in der Lage sind, in den Zellkern einzudringen und mit nucleophilen Molekülen, wie der DNA, zu interagieren. Nach Erreichen der DNA erfolgt ein nucleophiler Angriff des N7 (Stickstoff Position 7) vom Guanin zum Platin. Als Folge dessen treten sowohl Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Quervernetzung), oder zwischen benachbarten DNA-Strängen (Interstrang-Quervernetzung) auf. Des Weiteren führt Cisplatin zu Punktmutationen und hemmt so die Reparatur der DNA^{40, 41}. Da dieser Effekt auch in dem benachbarten, gesunden Gewebe auftritt, kommt es nach Einnahme von Cisplatin zu starken Nebenwirkungen, wie Neurotoxizität, Immunsuppression, Haut- und Schleimhautentzündungen, Übelkeit und Nephrotoxizität (Schädigung der Nieren)³⁹. Ein vielversprechender Ansatz war auf Grund der auftretenden Nebenwirkungen eine Kombination von Cisplatin mit den antitumor Eigenschaften von pentacyclischen Triterpenen, welche im Jahr 2014 von Paschke *et al.* hin untersucht wurde⁴². Dabei zeigten sich *in vitro* ähnliche zytotoxische Eigenschaften, wie die der Betulinsäure, jedoch deutlich größere Selektivitäten⁴². Alle bisher betrachteten zytostatischen Chemotherapien sind jedoch durch ein Zielpunkt gekennzeichnet: dem Auslösen des programmierten Zelltods.

1.3 Apoptose und andere Formen des Zelltodes

In der klassischen Betrachtungsweise werden zwei Formen des Zelltods voneinander unterschieden. Eine Form ist die Apoptose, der programmierte Zelltod, welcher im Normalfall bei Fehlbildung oder Alterung von Zellen einsetzt. Die Aktivierung der Apoptose kann über zwei Wege erfolgen; dem extrinsischen oder dem intrinsischen Weg (**Abbildung 4**). Bei dem extrinsischen Weg wird die Apoptose durch Bindung eines Liganden (Tumornekrose Faktor TNF) an den *death receptor* induziert. Durch die Bindung an diesen Rezeptor kommt es zur Trimerisierung und zur Rekrutierung des *Fas-associated death domain proteins* (FADD) und der Initiatorcaspasen 8 und 10. Im entstandenen *death-inducing signaling complex* (DISC) wird durch die räumliche Nähe, die autokatalytische Aktivierung der Initiatorcaspasen ermöglicht^{43, 44}; bis zur Aktivierung der Caspase 3. Die weiteren Schritte erfolgen vergleichbar zum intrinsischen Weg. Der intrinsische Weg wird in Folge von intrazellulären Signalen aktiviert, resultierend aus zellulärem Stress wie DNA-Schäden, Hypoxie, Schädigung der Mitochondrien, Alterung, zytotoxischen Substanzen oder einem fehlerhaften Zellzyklus. Dabei geht die Aktivierung einher mit der Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP), was zu Folge hat, dass Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien strömt. Aktiviert durch das freigesetzte Cytochrom C kommt es zur Ausbildung von Apoptosomen und zur Aktivierung der Caspase 9 und 3. Bei beiden Wegen der Apoptose kommt es zu morphologisch sichtbaren Änderungen, wie dem Schrumpfen der Zellen verbunden mit der Ausstülpung der Membran (*blebbing*) und dem Abbau der DNA in definierte Bruchstücke. Verantwortlich für die Spaltung der DNA ist die *Caspase-activated DNase* (CAD), eine Nuklease, die Bindungen zwischen den Nukleosomen der DNA spaltet und somit die DNA in oligonukleosomalen Fragmenten von rund 50 oder 300 kbp oder ganzzahligen Vielfachen zerlegt. In **Kapitel 4.2.2.3** soll darauf genauer eingegangen werden.

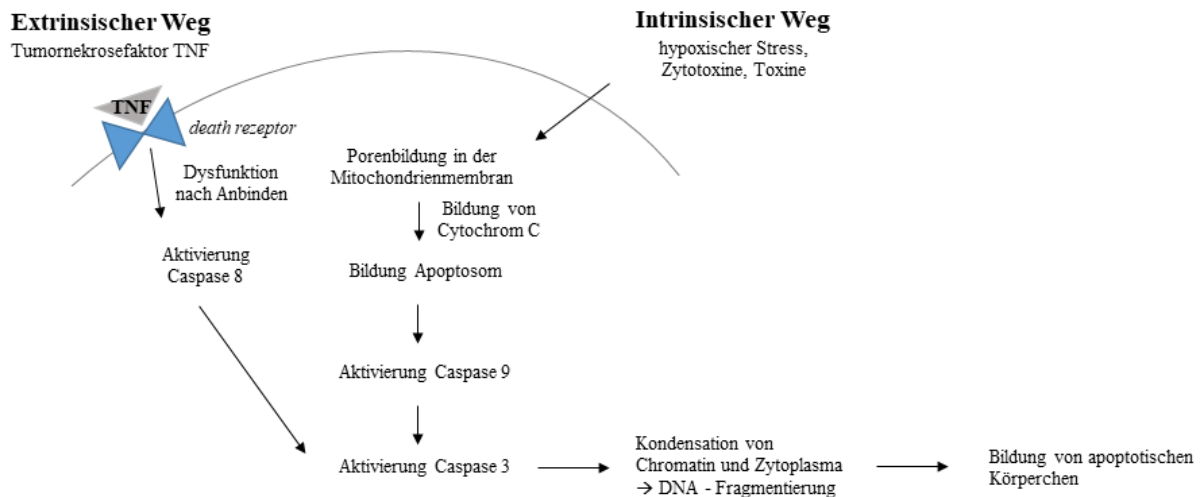


Abbildung 4. Stark vereinfachte Darstellung der extrinsischen und intrinsischen Apoptoseinduktion. Der extrinsische Weg wird über die Aktivierung des *death receptors* durch Anbindung eines Tumornekrosefaktors (TNF) aktiviert. Dabei wird Caspase 8 aktiviert, welche zur Aktivierung der Caspase 3 führt. Die intrinsische Apoptoseinduktion wurde durch Einflüsse, wie hypoxischer Stress oder Toxine ausgelöst, welche über eine weitere Caspase-Kaskade zur Aktivierung der Caspase 3 führt. Es kommt anschließend zur DNA - Fragmentierung und Bildung von apoptotischen Körperchen.

Wenige Minuten nach Induktion der Apoptose kann die Phospholipidasymmetrie der Zellmembran nicht mehr aufrechterhalten werden. Indessen kommt es zur Umverteilung des Phosphatidylserins (PS), welches sich im Normalfall ausschließlich auf der zum Zytosol gewandten Innenseite der Lipiddoppelschicht befindet, sodass dieses ebenfalls auf der nach außen gewandten Seite zu finden ist. Inwieweit dieser Prozess mit der Aktivierung der Caspasen und der mitochondrialen Membranpermeabilisierung zusammenhängt, ist unklar⁴⁵. Die Apoptose wird durch die Bildung apoptotischer Körperchen und deren Erkennung durch Phagozyten abgeschlossen. Dies führt, anders als bei der Nekrose, nicht zur Aktivierung inflammatorischer Prozesse.

Bei der Nekrose, dem nicht-programmierten Zelltod, kommt es durch starke Schädigungen der Zellen zum Anschwellen dieser bis hin zum Aufplatzen und somit zum Verlust der Membranintegrität. Ein Ausströmen der Zellkomponenten in den extrazellulären Raum führt zur Aktivierung des Immunsystems und den damit verbundenen Entzündungsreaktionen.

Weiterhin wird die Rolle von Autophagie für den Zelltod und deren Zusammenspiel mit Apoptose diskutiert. Autophagie hat zur Aufgabe, vor allem im Hungerzustand zytoplasmatische Komponenten wie aggregierte Proteine oder geschädigte Organellen aus dem Zytosol zu entfernen und abzubauen, so dass die dabei erhaltenen Makromoleküle wieder verwendet werden können⁴⁶. Erstmals entdeckt im Jahr 1990 bei einer mikroskopischen Untersuchung von Hefe, welche in einen Hungerzustand gebracht wurde⁴⁶. Bei der Autophagie wird im ersten Schritt das sogenannte Autophagosom gebildet. Es kommt zunächst zur Nukleation von Membranbestandteilen, welche durch Mitwirken von verschiedenen Proteinen zum Doppelmembranvesikel übergehen^{47, 48}. In dieses Autophagosom wird das Protein oder Organell eingelagert. Anschließend erfolgt die Fusion mit dem Lysosom, wodurch der pH-Wert im Autolysosom sinkt und die Hydrolasen des Lysosoms den Abbau des entsprechenden Proteins oder des Organells katalysieren. Morphologisch ist die Autophagie erkennbar an einer Anhäufung von Autolysosomen (Vesikeln) im Zytoplasma⁴⁹. Eine zu hohe Anreicherung von Autolysosomen kann zum Kollaps der Zellfunktionen führen und resultiert in der Aktivierung von Caspasen und DNA-Fragmentierung, den typischen Merkmalen der Apoptose⁵⁰.

1.4 Wirkungsweise von Betulinsäure

Der Wirkmechanismus von Betulinsäure wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert. Wahrscheinlich ist, dass alle genannten Mechanismen eine Rolle spielen, der bekannteste jedoch das Auslösen von Apoptose über den mitochondrialen Weg⁵¹ ist. Charakteristisch ist dabei die Permeabilisierung der Mitochondrialmembran mit vorangeschrittener Änderung des mitochondrialen Membranpotentials, der Freisetzung von Cytochrom C und der Aktivierung der Caspase-Kaskade⁵². Ein zweiter Weg besteht in der Inhibierung von Topoisomerase I, welche bei der Replikation, Rekombination und Transkription der DNA beteiligt ist⁵³. Ebenfalls beschrieben ist die Hemmung der Angiogenese und die starke Verringerung von metastasierendem Gewebe^{16, 54-57}. Als vierter möglicher Weg ist die Aktivierung der Apoptose via Phosphorylierung von *proapoptotic mitogenactivated protein kinase (MAPK)* und den Proteinen *p38* und *SAP/JNK* beschrieben⁵⁸. Im Rahmen dieser Arbeit soll genauer auf die Induktion von Apoptose über den mitochondrialen Weg eingegangen werden. In einer Veröffentlichung von Fulda *et al.* im Jahr 2009 konnte die Induktion von Apoptose durch Betulinsäure an isolierten Mitochondrien, durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, nachgewiesen werden. Ein ähnlicher Effekt konnte nach Zugabe von *bongkreic acid*, einem Inhibitor des *mitochondrial permeability transition pore complex (PTPC)*, beobachtet werden. Zum Vergleich wurde neben diesem auch der Einfluss des Caspase-Inhibitors *zVAD-fmk* untersucht, welcher jedoch deutlich andere Effekte zeigte⁵². Auch in intakten Zellen konnte in Folge dieses Versuches gezeigt werden, dass Betulinsäure die Freisetzung von Cytochrom C beeinträchtigt und somit die Apoptose über einen mitochondrialen Weg auslöst. Die Behandlung mit dem Breitbandinhibitor *zVAD-fmk* der Caspasen vor der Behandlung mit Betulinsäure zeigt zwar auch bei der Verwendung von intakten Zellen eine Reduktion der Apoptoseinduktion, aber schützt die Zellen nicht vor Apoptose. Daraus folgend wurde das Vorhandensein anderer Wege für die Induktion von programmiertem Zelltod untersucht. Vermutlich werden mehrere Wege des programmierten Zelltods bei Behandlung mit Betulinsäure gleichzeitig aktiviert. Dies zeigt die enorme antitumorale und antibakterielle Effizienz von Betulinsäure.

2. Zielstellung

Wie im Titel dieser Dissertation „Neue Strategien für den Einsatz von Betulinsäurederivaten in zwei unterschiedlichen Tumorentitäten“ bereits deutlich gemacht, ist das Ziel dieser Arbeit, die Antitumoreigenschaften des Betulins bzw. der Betulinsäure gezielt gegen unterschiedliche Tumorarten so einzusetzen, dass Nebenwirkungen möglichst minimiert oder ausgeschlossen werden können.

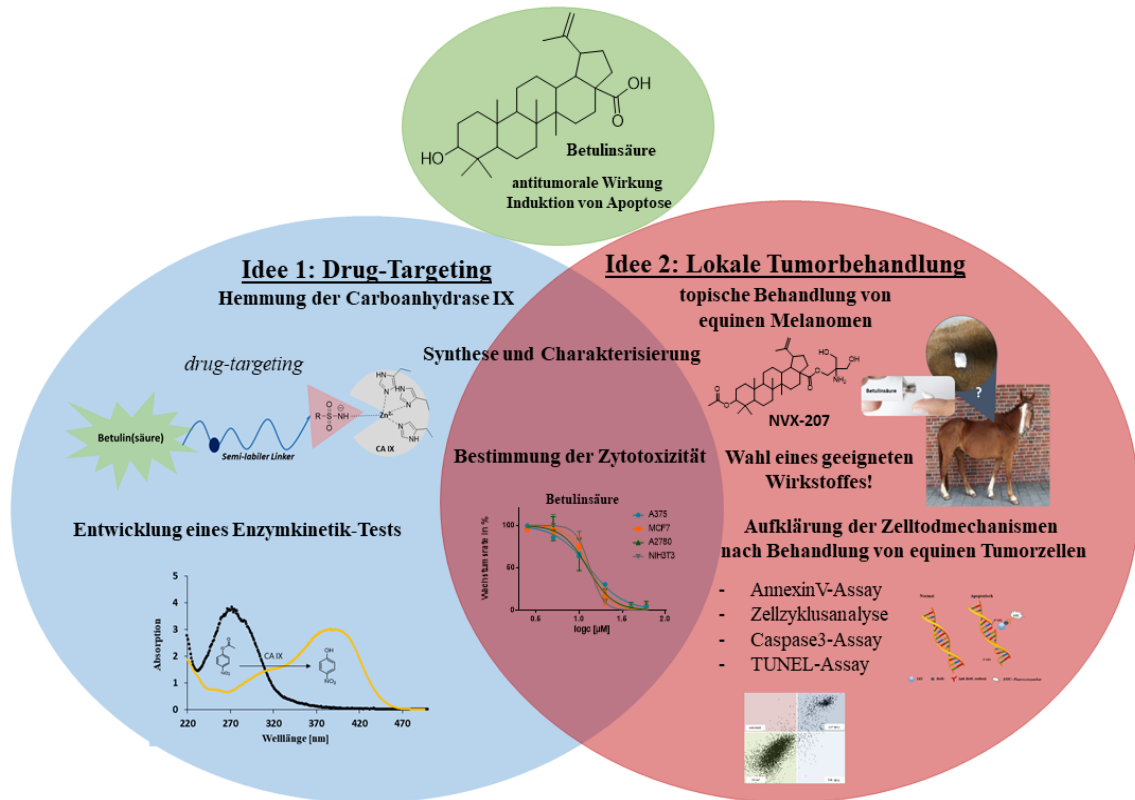


Abbildung 5. Darstellung des Konzeptes dieser Arbeit als Venn-Diagramm. Auf der linken Seite (blau) ist die Herangehensweise des ersten Projektes, der Hemmung der Carboanhydrase IX, gezeigt. Auf der rechten Seite (rot) sind die Erarbeitungen und der Ablauf für die Entwicklung einer topischen Applikationsform für die Behandlung von *equinen* Melanomen dargestellt. In der Mitte (violett) ist der Bereich dargestellt, in dem beide Projekte sich überschneiden.

Wie in **Abbildung 5** dargestellt sind Betulinsäure bzw. deren Derivate das verknüpfende Element zwischen den beiden in dieser Arbeit angestrebten Lösungsansätzen für neue Tumorthapien. Folgende Teilziele standen im Fokus dieser Arbeit:

- A) Die Carboanhydrase IX als *target* in der Tumorthapie (*drug-targeting*)
- B) Die lokale Tumorbehandlung bei *equinen* Melanomen

A) Die Carboanhydrase IX als Target in der Tumorthapie (*drug-targeting*)

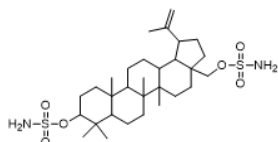
In diesem Teilgebiet der Dissertation wurden neue Erkenntnisse der Medizin für einen *drug-targeting* Effekt ausgenutzt. Tumorzellen sichern ihr Überleben, indem sie das Enzym Carboanhydrase IX auf deren Oberfläche überexprimieren, wodurch die Tumorzelle in der Lage ist, den pH-Wert im Inneren der Zelle konstant zu halten. Dieses Enzym kann als Erkennungsregion (*target*) genutzt werden, um gezielt Wirkstoffe im betroffenen Gewebe zu platzieren.

Hierfür mussten folgende Teilaufgaben erfüllt werden:

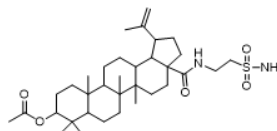
1. Verknüpfung unterschiedlicher Bindegruppen mit Betulin bzw. Betulinsäure

An dieser Stellen soll ausgewählte Beispiele der einzelnen Substanzklassen gezeigt werden. Alle vier gezeigten Substanzklassen besitzen eine Zink-Bindegruppe, mit Hilfe derer es möglich ist, das aktive Zentrum der CA IX zu inhibieren und den Wirkstoff im Tumorgewebe anzureichern.

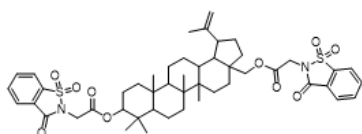
a) Sulfamate



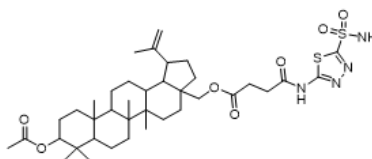
b) Sulfonamide



c) Saccharin-Derivate



d) Acetazolamid-Derivate



2. Analytische Charakterisierung der synthetisierten Substanzen

- a) ^1H -NMR und b) Massenbestimmung (ESI)

3. Biologische Evaluierung aller Verbindungen

- a) SRB-Assay an humanen Tumorzelllinien und einer Normalzelllinie

4. Entwicklung und Anwendung eines Enzym-Kinetik-Assays

- a) Bestimmung optimaler Messbedingungen
b) Bestimmung der Dissoziationskonstanten k_i aller Inhibitoren
c) Vergleich mit literaturbekannten Inhibitoren

B) Die lokale Tumorbehandlung bei equinen Melanomen

Das zweite Teilgebiet dieser Arbeit nutzt die Eigenschaft der Betulinsäure, welche sich bisher als großen Nachteil für eine Anwendung als Chemotherapeutikum zeigte - die sehr schlechte Wasserlöslichkeit. Am Beispiel der Behandlung von Melanomen bei Pferden sollte das hohe zytotoxische Potential der Betulinsäure und deren Derivate, aber auch die starke Lipophilie genutzt werden, um lokale Effekte zu erzielen, ohne, dass der Wirkstoff tiefer in den Organismus eindringt und zu Nebenwirkungen führt. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Forschungsarbeiten hatten das Ziel, eine biologische Charakterisierung der Wirkstoffe an *equinen* Zelllinien durchzuführen und gliedern sich ein in ein Gesamtprojekt, bei dem Formulierung des Wirkstoffes sowie Tierversuche durch Kooperationspartner durchgeführt wurden.

Es mussten folgende Teilaufgaben erfüllt werden:

1. Kultivierung *equiner* Zelllinien

- a) *Equine* Melanomzellen
b) *Equine* Sarkoidzellen
c) *Equine* Fibroblasten

2. Bestimmung der Zytotoxizität an *equinen* Zelllinien

- a) SRB-Assay
- b) Zeitabhängiger SRB-Assay
- c) MTT-Assay

3. Untersuchung der Zelltodmechanismen

- a) AnnexinV
- b) Zellzyklusanalyse
- c) Caspase 3-Assay
- d) TUNEL-Assay

Ziel des Gesamtprojektes war, aufbauend auf den in dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnissen, nicht nur die Entwicklung eines topischen Applikationssystems, sondern ebenso die Durchführung von Tierversuchen in Phase I und II.

3. Carboanhydrase IX als *Target* in der Tumorthherapie

3.1 Einleitung

3.1.1 Die Carboanhydrase

Enzyme spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulierung des Stoffwechsels aller Organismen. Dabei ist die Carboanhydrase (CA), ein Metalloenzym mit Zink als aktivem Zentrum, ein wichtiges Enzym bei der Umsetzung von Kohlenstoffdioxid und Wasser in Bicarbonat-Ionen und Protonen; sie sind daher unabdingbar für Transport, Säure-Base-Regulierung, den Gasaustausch, für die Photosynthese und die CO₂-Fixierung. Bis heute sind fünf verschiedene Carboanhydrase-Genfamilien bekannt (α -, β -, γ -, δ -, ζ -Carboanhydrase), welche sich in den primären Aminosäuresequenzen, der 3D-Tertiärstruktur (α -Carboanhydrasen sind normalerweise Monomere und selten Dimere, β -Carboanhydrasen kommen eher als Dimere, Tetramere oder sogar Octamere vor) und dem Metallion im Zentrum unterscheiden. Demnach besitzen die α -, β -, δ -Carboanhydrase ein Zink(II)-Ion, β -Carboanhydrasen teilweise ein Eisen(II)-Ion und ζ -Carboanhydrase ein Cadmium(II)-Ion als aktives Zentrum^{59, 60}. α -Carboanhydrasen sind an wesentlichen Prozessen des Stoffwechsels in Wirbel- und Säugetieren beteiligt, sodass diese als Hauptklasse der CA den größten Fokus der heutigen Forschung eingenommen haben. Anders als die α -Carboanhydrasen, sind β -Carboanhydrasen in „höheren Pflanzen“ und in wenigen Prokaryoten (Bakterien und Archaeen) zu finden; γ -Carboanhydrase kommen ausschließlich in Archaeen und δ -, bzw. ζ -Carboanhydrase in Kieselalgen vor. Da ein Anwendungsfeld dieser Dissertation die Überwindung der Strahlenresistenz bei Mammakarzinomen war, wurden ausschließlich Untersuchungen an der α -Carboanhydrasen, im Speziellen der Carboanhydrase IX, durchgeführt, sodass diese im Nachfolgenden genauer betrachtet werden sollen.

3.1.1.1 Vorkommen und Funktion der α -Carboanhydrase

α -Carboanhydrasen katalysieren die reversible Hydratisierung von CO₂ (schematische Darstellung des Katalysezyklus in **Abbildung 6b**, gemäß Reaktionsgleichung 1:



wodurch es der CA erlaubt ist, den intrazellulären und extrazellulären pH-Wert zu regulieren. Dies spielt eine wichtige Rolle im menschlichen Organismus. Eine Übersäuerung der Zelle im Inneren hätte lebensbedrohliche Folgen. Im aktiven Zentrum der α -CA befindet sich ein Zn(II)-Ion, welches drei Imidazolringe (His94, 96 und 119) und Wasser/Hydroxidionen tetraedrisch um sich koordiniert hat⁶¹. Die konisch geformte Enzymtasche ist ungefähr 15 Å tief und besitzt eine hydrophobe Region, bestehend aus Val121, Val143, Leu198, Val207, Trp209 und eine hydrophile Region, bestehend aus Tyr7, Asn62, His64, Asn67, Thr199, Thr200⁶². Bis heute sind 15 Isoformen oder CA-verwandte Proteine der α -Carboanhydrase bekannt, welche sich bezüglich ihrer Enzymkinetik, ihrer Gewebeverteilung, ihrem Expressionslevel sowie in ihren subzellulären Lokalisationen unterscheiden. Unter den CA-Isozymen sind CA I, CA II, CA III und CA VII die zytosolischen, wobei die CA II die am stärksten exprimierte Form in Erythrozyten (zusammen mit CA I), den Augen, Nieren, dem zentralen Nervensystem und dem inneren Ohr ist⁶³. Zu den Membran-gebundenen CA gehören die CA IV, CA IX, CA XII, und CA XIV. Außerdem gibt es noch eine sekretorische Form (CA VI) und eine katalytisch nicht aktive Form (CA VIII, CA X, CA XI)^{64, 65}. Zu sehen ist die Verteilung der Carboanhydrasen in der Zelle und deren Aktivitäten, in **Abbildung 6a**.

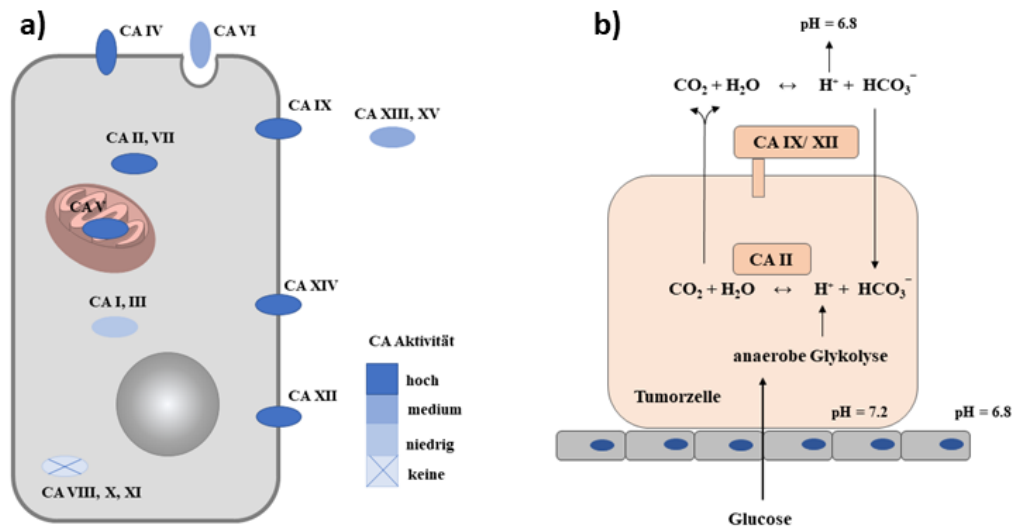


Abbildung 6. Schematische Darstellung a) einer humanen Zelle und die Verteilung bzw. die Aktivitäten der 15 Isoformen der α -Carboanhydrase. Gezeigt sind die zytosolischen CAs (CA I, CA II, CA III und CA VII), die membran-gebundenen CAs (CA IV, CA IX, CA XII, und CA XIV), die mitochondriale CA V, die sekretorische CA VI und eine katalytisch nicht aktive Form der CA (CA VIII, CA X, CA XI). Ebenfalls gezeigt sind die CA XIII und die CA XV, welche nicht direkt zugeordnet werden können. b) der anaeroben Glykolyse einer Tumorzelle und die Umsetzung von CO_2 und H_2O durch die Carboanhydrasen II und IX mit der damit verbundenen Azidose des umliegenden Gewebes.

Bei der Zellatmung fällt eine signifikante Menge an CO_2 an, welches über die Blutbahn zur Lunge transportiert werden muss. An dieser Stelle ist die katalytische Hydratisierung des CO_2 durch die Carboanhydrase (CA I, II) ein entscheidender physiologischer Prozess. Das durch Umsetzung des CO_2 gebildete HCO_3^- kann mit Hilfe des *Hamburger-Shifts* (Austausch von HCO_3^- gegen Cl^-) an die Erythrozyten binden und zur Lunge transportiert werden, wo die Rückreaktion zum CO_2 stattfinden kann. Die in den Zellen stattfindende katalytische Reaktion ist in **Abbildung 7** dargestellt.

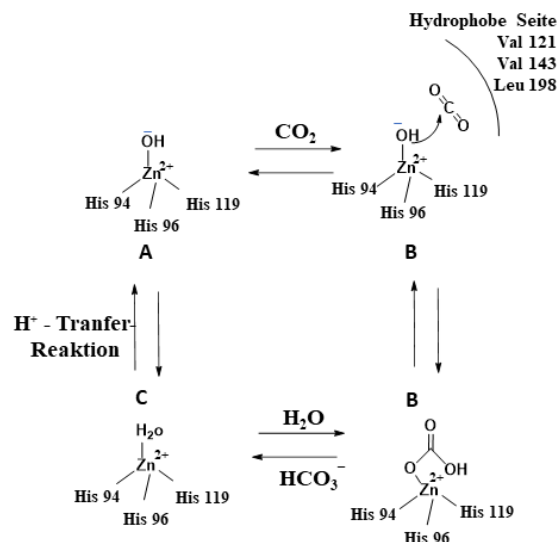


Abbildung 7. Darstellung des Mechanismus der CO_2 -Hydratisierung mit Hilfe der Carboanhydrase am aktiven Zn(II) -Zentrum.

Im ersten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff des am Zinkzentrum gebundenen Hydroxidions auf das vorhandene CO_2 mit der daraus resultierenden Entstehung von HCO_3^- (B), welches im nächsten Schritt durch ein Wassermolekül von der aktiven Stelle verdrängt wird (C). Die dabei entstehende Form in (C) ist jedoch nicht mehr in der Lage, einen nucleophilen Angriff zum CO_2 durchzuführen; eine

Protonentransferreaktion mit Hilfe eines exogenen Protonen-Akzeptors ist nötig, welcher dem Reaktionsgeschwindigkeit-begrenzenden Schritt entspricht, um zurück zu (A) zu gelangen. Trotz dessen ist die Carboanhydrase eines der schnellsten bekannten Enzyme, mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von bis zu 10^6 s^{-1} (für die Isoform CA II)^{66, 67}.

Ebenfalls essentiell ist das Vorhandensein der CA IV im Ziliarkörper des Auges für die Produktion von Kammerwasser und der damit verbundenen Aufrechterhaltung des Augeninnendruckes. Eine zu starke Produktion oder ein gestörter Abfluss des Kammerwassers wird als eine der pathogenetischen Grundlagen des Glaukoms (grüner Star) angesehen. Die medikamentöse Hemmung der Carboanhydrase mit Wirkstoffen wie Acetazolamid ist daher heute eine bewährte Option in der Glaukomtherapie^{68, 69}, worauf jedoch später noch genauer eingegangen werden soll. Weitere wichtige Funktionen der Carboanhydrase liegen in der Regulation des Säure-Base-Haushaltes in den Nieren. Für den Organismus ist diese Regulation von sehr großer Bedeutung, da das im Primärharn filtrierte HCO_3^- durch das Vorhandensein der Carboanhydrase zu etwa 90 % resorbiert wird, anderenfalls entstünde eine Azidose in den Nieren, welches schwere Folgen für den Organismus hätte. Aus den proximalen Tubuluszellen der Niere werden von intrazellulär nach extrazellulär H^+ im Austausch gegen Na^+ ausgetauscht und so ausgeschieden. Durch die Wirkung der CA reagiert filtrierte Hydrogencarbonat mit Protonen zu Kohlensäure, welche dann im nächsten Schritt zu Wasser und CO_2 umgesetzt wird. Das CO_2 kann (im Unterschied zu HCO_3^-) leicht durch die Zellmembran vom Tubuluslumen in die Tubuluszelle gelangen. Dort katalysiert die intrazelluläre CA die umgekehrte Reaktion. Aus dem Kohlenstoffdioxid werden so in der Tubuluszelle Protonen und Hydrogencarbonat gebildet. Das HCO_3^- wird aus der Zelle ins Blut abgegeben und das Proton steht erneut für diesen Mechanismus zu Verfügung. Auch ist die Carboanhydrase bei der Produktion der Magensäure beteiligt. Der Fokus dieser Arbeit liegt jedoch auf dem Überexprimieren der Carboanhydrase in hypoxischen Tumoren. Schnell wachsende Tumore besitzen einen sehr großen Anteil hypoxischer Regionen, also Regionen mit starkem Sauerstoffmangel. Die anaerobe Glykolyse führt im Inneren von Tumoren zu einer übermäßigen Produktion von sauren Metaboliten, wie H^+ oder Lactat⁵⁹ (**Abbildung 6b**). Die Bildung von Lactat ist dabei notwendig, da hierbei NADH zu NAD^+ reoxidiert wird und nachfolgend wieder als Elektronenakzeptor zur Fortführung der Glykolyse zur Verfügung steht⁷⁰. Die sauren Metabolite werden in den extrazellulären Raum transportiert, um die Zelle vor einem zu niedrigen pH-Wert zu schützen. Nach außen transportierte Protonen sorgen zudem für eine Azidose der Mikroumgebung des Tumors. Eine saure Umgebung fördert die Produktion von Wachstumsfaktoren, erhöht die Genominstabilität, begünstigt die Invasion von Tumoren und trägt zu einem reduzierten Ansprechen des Tumors auf eine Chemo- und Radiotherapie bei. Die CA IX fördert diese pH-Wert Regulation, indem sie extrazelluläres Kohlenstoffdioxid zu Bicarbonat und H^+ umwandelt. Das Proton dient der pH-Absenkung, wohingegen Bicarbonat über Bicarbonattransporter ins Zytoplasma transportiert wird, um erneut saure Metabolite abzupuffern.

3.1.1.2 Carboanhydrase IX

Die Carboanhydrase IX wurde erstmal 1986 in einem von der niederländischen Gruppe um Sven Warnaar veröffentlichten Paper als potentiell wichtiger Tumormarker erkannt. Zu dieser Zeit war die eindeutige Identität dieses Tumormarkers nicht bekannt und wurde anfangs nach dem eingesetzten Antikörper G250 benannt⁷¹. Unabhängig dieser Arbeiten, veröffentlichten Zavada, Pastorek und Pastorekova⁷² die Entdeckung eines Antigens namens MN-Antigen, welches sowohl in Mammakarzinomen, als auch in zervikalen HeLa-Zellen überexprimiert vorlag. 1994 wurden beide Marker ausführlicher charakterisiert und dabei zeigte sich, dass es sich bei beiden Entdeckungen um ein Isozym der Carboanhydrase handelt, welche heute als Carboanhydrase IX bezeichnet wird⁷³. Die Carboanhydrase IX ist ein membrangebundenes Protein mit extrazellulärem katalytischem Zentrum, welches überwiegend in hypoxischen Bereichen von Tumoren zu finden ist. Soliden Tumoren steht auf

Grund ihres schnellen Wachstums und der daraus folgenden unzureichenden Blutversorgung tendenziell weniger Sauerstoff zur Verfügung, weshalb in diesen Regionen oftmals hypoxische Bedingungen, und wie oben schon beschrieben, ein niedrigerer extrazellulärer pH-Wert vorzufinden sind. Dieser Effekt wird in der Literatur auch als Warburg-Effekt bezeichnet^{74, 75}. Durch den Sauerstoffmangel im Zytosol sammelt sich das ansonsten bei Normoxie abgebaute Protein HIF-1 α an und kann den Zellkern erreichen⁷⁶. Als Reaktion auf die Tumorphypoxie besitzen Krebszellen ein verändertes Genexpressionsmuster, um den Anforderungen der Mikroumgebung gerecht zu werden. Eine der bedeutsamsten Anpassungen an dieses Milieu ist die Umstellung auf anaerobe Glykolyse, um weiterhin die benötigte Menge an Energie gewährleisten zu können. Dieser onkogene Stoffwechsel wird oft auch in aeroben Zellen aufrechterhalten. Milchsäure, ein metabolisches Endprodukt, interagiert zusammen mit Protonen, was zur Azidose der extrazellulären Umgebung führt. Da die Aufrechterhaltung lebenswichtiger und biologischer Funktionen der Zelle extrem empfindlich auf intrazelluläre pH-Wert-Änderungen reagiert, hängt das Überleben von Krebszellen von ihrer Fähigkeit ab, sich an diese Bedingungen anzupassen. Die Carboanhydrase IX ist das am häufigsten exprimierte Gen als Reaktion auf Hypoxie, und damit ein Schlüsselfaktor für die Anpassungsprozesse bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren. Seine entscheidende Rolle bei der intrazellulären pH-Erhaltung stellt das Mittel dar, mit dem sich Krebszellen an die toxischen Bedingungen des extrazellulären Milieus anpassen. Darüber hinaus stimuliert die Aktivität von CA IX die Migrationswege von Krebszellen und ist mit der Zunahme des aggressiven/invasiven Phänotyps von Tumoren verbunden⁵⁹. Die humane CA IX besteht aus 459 Aminosäuren, unterteilt in einem N-terminalen Signalpeptid, einem extrazellulären Teil, einem Transmembranbereich und einem intrazellulären C-Terminus. Gezeigt ist dieser Aufbau als Modell in **Abbildung 8**.

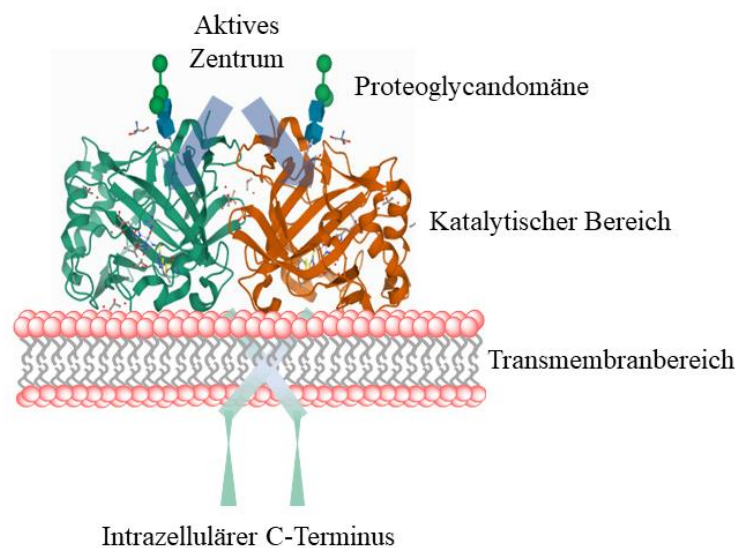


Abbildung 8. Modelldarstellung der strukturellen Anordnung der membrangebundenen CA IX als Dimer. In hellgrün wird die Disulfidbindung der beiden Monomere in der Membran und dem damit verbundenen intrazellulären C-Terminus veranschaulicht. (Kristallstruktur CA IX: PDB-Code: 3IAI)

Das Vorhandensein einer Proteoglycandomäne, wie es die CA IX als einzige Carboanhydrase aufweist, ermöglicht es, auch bei sauren pH-Werten effizient zu wirken. Diese Tatsache konnten De Simone⁷⁷ *et al.* aufzeigen, wonach zwei unabhängige Titrationskurven der CO₂-Hydratisierung mit Hilfe der CA IX gemessen wurden. Bei einem der beiden Versuche handelte es sich ausschließlich um die Katalysedomäne der CA IX (ohne Proteoglycandomäne) und einmal mit Vorhandensein der Proteoglycandomäne. Die Titrationskurve der freien Katalysedomäne der CA IX zeigte einen Wendepunkt bei einem pH-Wert von 7.1, welcher Messungen anderer Proteoglycandomäne-freien Carboanhydrasen ähnelte⁷⁸. Im Gegensatz dazu zeigte die Messung bei gleichen Bedingungen für das

Proteinkonstrukt, das sowohl die Proteoglycandomäne, als auch die CA-Domäne enthält, einen Wendepunkt bei einem pH-Wert von 6.49. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Vorhandensein eines solchen N-terminalen Signalpeptides eine effizientere CO₂-Hydratation bei saureren pH-Werten mit einer optimalen Aktivität bei pH 6.49 bewirkt. Diese Erkenntnis erklärt das starke Überexprimieren der Carboanhydrase IX in soliden Tumoren und deren Einzigartigkeit, auch bei einem pH-Wert von 6.5 eine effiziente und vollständige Hydratation von CO₂ zu gewährleisten. Die Inhibierung eines Enzyms mit einer so enormen Funktion für das Überleben von Tumoren, könnte der Wendepunkt in der Antitumor-Forschung sein.

3.1.1.3 Verschiedene Arten von Inhibitoren

Eine Vielzahl chemischer Verbindungen wurden in der Literatur beschrieben, als Tumor-assoziierte CA IX-Inhibitoren zu fungieren. 1954 konnte erstmals ein Carboanhydrase-Inhibitor namens Acetazolamid als Medikament gegen das Glaukom zugelassen werden^{68, 79}. Die Forschungsarbeiten um Supuran *et al.* haben ein großes Spektrum an Carboanhydrase IX-Inhibitoren entwickelt und untersucht. Dabei konnte zwischen fünf verschiedene Hemmungsmechanismen unterschieden werden: (1) Inhibitoren, welche direkt an das Zinkzentrum des aktiven Zentrums binden; Beispiele dafür sind Sulfamate, Sulfonamide, Dithiocarbamate und Hydroxamate^{80, 81}. (2) Verbindungen, die an das Zink-Zentrum koordiniert sind; Beispiele dafür sind Phenole, Polyamine oder Sulfo-Cumarin⁸²⁻⁸⁶. (3) Inhibitoren, die die aktive Seite des Enzyms verschließen, jedoch nicht direkt an das aktive Zentrum binden, ein Beispiel dafür ist das Cumarin⁸⁷⁻⁸⁹. (4) Inhibitoren, die außerhalb der aktiven Seite binden; wie zum Beispiel Carbonsäurederivate⁹⁰ und (5) Inhibitoren, bei denen die Wirkweise noch nicht abschließend geklärt werden konnte. In dieser Arbeit soll das Hauptaugenmerk auf Inhibitoren gelegt werden, welche direkt an das aktive Zinkzentrum der CA IX binden; genauer auf die Inhibierung mit Hilfe von Sulfamaten und Sulfonamiden. Sulfonamide gehören zu der wichtigsten Klasse von CA IX-Inhibitoren^{60, 80, 91-94}, mit mindestens 20 solcher Verbindungen im klinischen Einsatz oder in klinischen Studien⁹⁵⁻¹⁰². Dabei zu nennen sind Acetazolamid, Methazolamid, Ethoxzolamid, Dichlorphenamid, Dorzolamid, Saccharin und viele weitere; dargestellt in **Abbildung 9a**. Auf den Inhibitor Acetazolamid soll im Späteren noch genauer eingegangen werden.

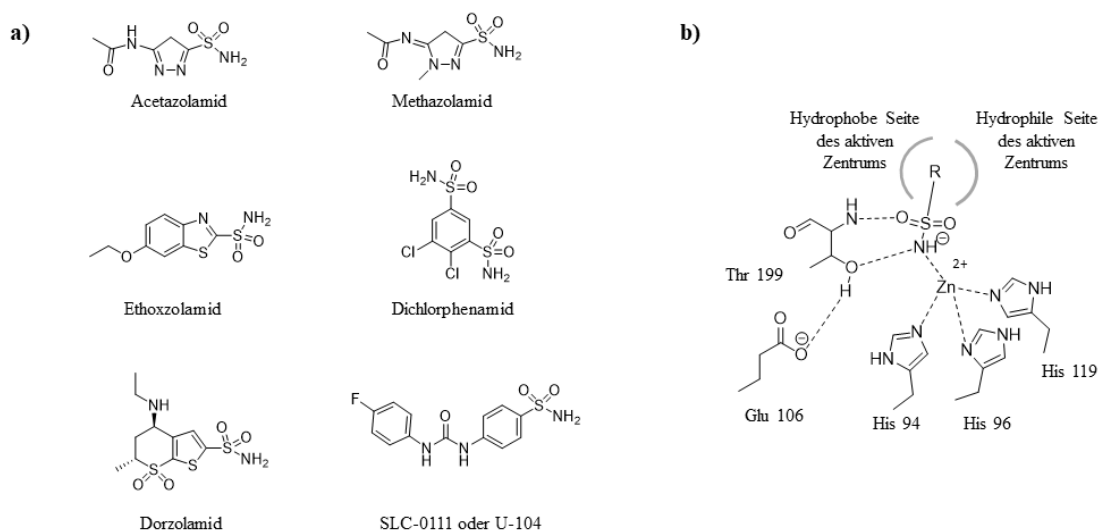


Abbildung 9. a) Gezeigt sind aus der Literatur bekannte CA-Inhibitoren, welche bereits im klinischen Einsatz sind bzw. in klinischen Studien ausführlich untersucht werden und b) die schematische Darstellung der Hemmung des aktiven Zentrums durch Anbindung der Sulfonamid-Gruppe (Hemmmechanismus (1)).

Die Untersuchung der Bindungen unterschiedlicher Sulfonamid-Inhibitoren mit den Isozymen CA I, II und IV mittels Röntgenstrukturanalyse (X-ray) konnten bestätigen, dass bei allen ein gleicher

Hemmmechanismus zu erkennen ist¹⁰³⁻¹⁰⁶. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Sulfamate, als auch Sulfonsäureamide in deprotonierter Form als dianionische Spezies vorliegen, welche, wie in **Abbildung 9** zu sehen, mit einem Zn^{2+} -N Abstand von 2.07 Å an das Zinkzentrum der CA binden, während das vorhandene NH des Inhibitors ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung zu den benachbarten Thr 199 und Glu 106 aufbaut. Eine zweite Wasserstoffbrückenbindung wird von der NH-Gruppe des Thr 199 zum Sauerstoff der Sulfonamid/Sulfamatgruppe ausgebildet, wobei die typische tetraedrische Geometrie zu erkennen ist¹⁰⁷. Zudem zeigt der verwendete Rest R einen großen Einfluss auf die Ausrichtung des Inhibitors in der Enzymtasche, welche sowohl eine hydrophile, als auch eine hydrophobe Seite besitzt. Neben der Sulfonsäureamid/Sulfamat-Gruppe haben demnach auch die Polarität und der Aufbau des Inhibitors einen großen Einfluss auf die Inhibierung. Beruhend auf diesem Wissen, wurde, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um PD Dr. Iris Thondorf von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, eine Masterarbeit von Herrn Andreas Thiel zum Thema „*in silico* Wirkstoffdesign von neuartigen Inhibitoren mittels *docking*, Pharmakophor-Untersuchungen und 3D-QSAR (quantitative Struktur-Wirkungsanalyse im 3-dimensionalen Raum)“ angefertigt. Die dabei entworfenen Inhibitoren konnten erfolgreich synthetisiert und mittels Zytotoxizität und Enzymkinetik charakterisiert werden.

3.1.1.4 Sulfamate/Sulfonamide zur Überwindung der hypoxischen Strahlenresistenz

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Krebserkrankung bei Frauen weltweit. Hierbei liegt der prozentuale Anteil an tödlichen Verläufen bei 24.2 %. Neben der Operation sind Strahlentherapie und Systemtherapie (Chemotherapie, Hormontherapien) die wichtigsten Behandlungsformen. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom – wie auch bei Lungen-, Zervix- und Kopf-Hals-Tumoren, sind hohe CA IX-Expressionslevel konsistent mit einer schlechten Prognose assoziiert¹⁰⁸. Dass azidotische und hypoxische Tumoren eine erhöhte Malignität und Therapieresistenz aufweisen, ist allgemein anerkannt. So nimmt unter azidotischen Bedingungen die Transportleistung des P-Glykoprotein (Pgp) zu, wodurch Tumore eine Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, wie Daunorubicin und Docetaxel, entwickeln. Thews *et al.* konnten anhand eines Versuches an der R3327-AT1, einer p-Glykoprotein positiven Tumorzelllinie, die Zytotoxizität verschiedener chemotherapeutischer Medikamente und ihre Abhängigkeit von der Pgp-Aktivität während der Azidose analysieren. Die Behandlung erfolgte sowohl an Tumorzellen mit einem extrazellulärem pH-Wert von 7.4, als auch bei einem extrazellulärem pH-Wert von 6.6. Die Behandlung mit Daunorubicin oder Docetaxel bei pH = 7.4 führten zu einer ausgeprägten Apoptose-Induktion, bei pH = 6.6 wurde dieser Effekt jedoch signifikant reduziert¹⁰⁹. Auch das Vorhandensein von Hypoxie ist einer der wesentlichsten Faktoren für die vorhandene Strahlenresistenz von Tumoren. Messungen des intratumoralen Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) belegen, dass mit 28 mm Hg der mediane Sauerstoffpartialdruck in humanen Mammakarzinomen um das 2,3 fache niedriger ist als der Sauerstoffpartialdruck des umgebenen Normalgewebes (mittlerer pO_2 hier bei 65 mm Hg)¹¹⁰. Eine Behandlung mittels Strahlentherapie wird dadurch erheblich erschwert. Eine Studie von 2016 detektierte die Carboanhydrase IX (CA IX), einen weiteren endogenen Hypoxiemarker, als exzellenten Marker für den Nachweis von normoxischen Bereichen in Mammakarzinomzellen *in vitro* und *in vivo*¹¹¹. Eine gezielte Inhibierung der CA IX und damit Schwächung des Mammakarzinoms könnte ein potentieller Angriffspunkt für eine verbesserte Strahlentherapie sein. Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Inhibitoren zu synthetisieren und sowohl auf ihre zytotoxische Wirkung zu testen, als auch eine enzymkinetische Betrachtung durchzuführen. Voraussetzung dafür war die Entwicklung eines geeigneten Assays zur Bestimmung der Enzym-Inhibitor-Interaktionen, mit Hilfe dessen die jeweiligen Dissoziationskonstanten der synthetisierten Inhibitoren bestimmt werden konnten. Bestimmung Carboanhydrase-Inhibierung-Interaktion

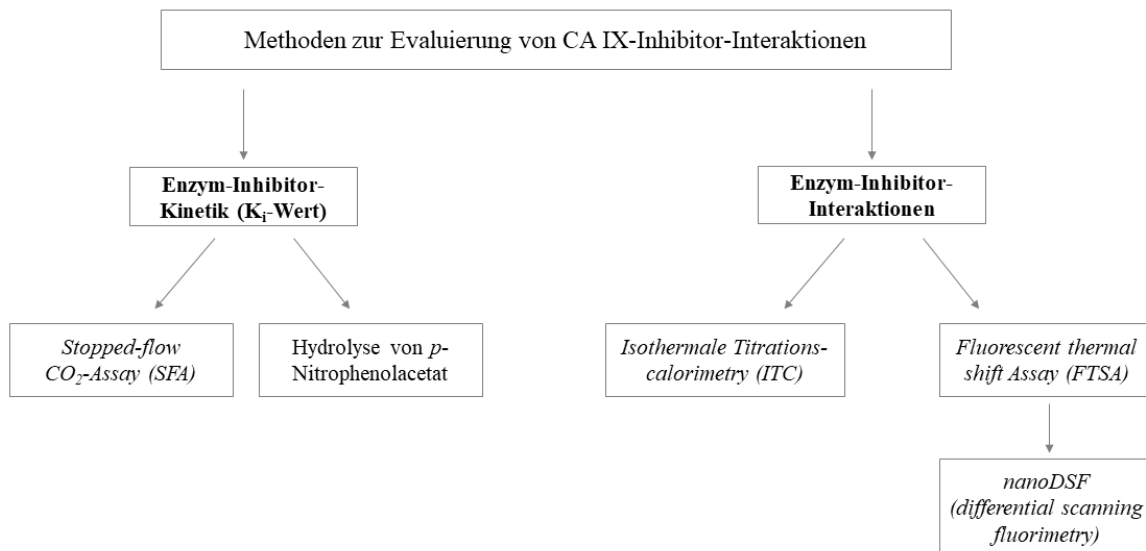


Abbildung 10. Methoden zur Evaluierung von CA IX-Inhibitor-Interaktionen.

In diesem Abschnitt soll ein Einblick in ausgewählte Methoden zur Beurteilung der CA IX-Inhibitor-Interaktionen gegeben werden. Bei diesen Methoden wird zwischen Enzym-Inhibitor-Kinetiken (Bestimmung der Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes k_i) und Enzym-Inhibitor-Interaktionen (Bindungskonstante k_b , Affinität etc.) unterschieden.

Enzym-Inhibitor-Kinetik

Um die Kinetik zwischen der Carboanhydrase IX und dem Inhibitor zu bewerten, wurde vor mehr als 50 Jahren von Gibson *et al.* eine Methode entwickelt, bei der der Verbrauch an vorhandenem CO_2 über die Änderung des pH-Wertes verfolgt werden konnte. Dabei bedienten sie sich der Fähigkeit von Carboanhydrasen, die reversible Hydratisierung von CO_2 zu katalysieren ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). SFA, oder genauer *stopped-flow* CO_2 -Assay, basiert auf der Absorptionsänderung eines Indikators (oftmals ist dies Bromthymolblau mit $\lambda_{\text{max}} = 615 \text{ nm}$) nach Umsetzung des vorhandenen CO_2 in extra dafür angereichertem CO_2 haltigem Wasser. Gemessen wird diese pH-Wert-Änderung mit Hilfe des Applied Photophysics SX, eines der am meisten genutzten *stopped-flow* Systeme. Für die Durchführung der Messung werden zwei voneinander getrennte Reaktionslösungen (in separaten Spritzen) über einen automatisierten Schubmechanismus in einen Homogenisator geleitet und direkt in die eigentliche Messzelle überführt. In der gleichen Zeit wird die schon vermessene Probe aus der Messzelle in Richtung eines weiteren Kolbens gepumpt; beim Erreichen dieses Kolbens kommt es zu einem Stopp-Signal, sodass die Datenerfassung der aktuellen Probe beginnen kann. Dieser Schritt dauert bei neueren Geräten nur ca. 1 ms (SX20 *stopped-flow* System; Applied Photophysics). Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_i (Gleichgewichtskonstante zwischen freiem Enzym und Enzym-Inhibitor-Komplex) wird die Veränderung der Absorption des eingesetzten Indikators mit der Zeit gemessen. Der Verbrauch an CO_2 ergibt dabei eine exponentielle Funktion, wie in **Abbildung 11a** zu sehen ist.

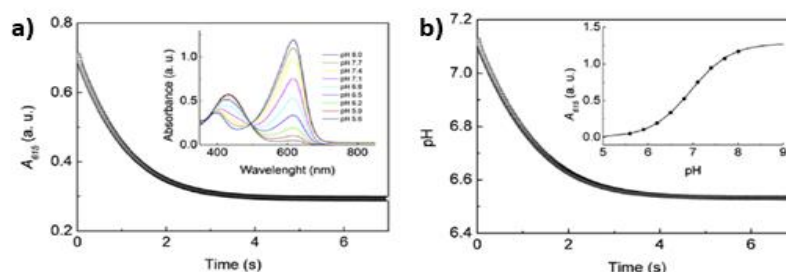


Abbildung 11. Beispiel für die Datenerfassung einer SFA-Messung nach Joana Smirnoviene *et al.*¹¹² a) und b) stellen exemplarisch die Messung einer uninhibierten Katalyse dar, wobei in a) die Absorptionsänderung in Abhängigkeit der Zeit und in b) die pH-Wert-Änderungen gegen die Zeit dargestellt sind.

Der Zusammenhang zwischen verbrauchtem CO₂ und der pH-Wert-Änderung wird deutlich, wenn wie in **Abbildung 11b** anstatt der Absorption des Indikators der pH-Wert gegen die Zeit aufgetragen wird. Für die Erstellung einer Michaelis-Menten-Auftragung werden nun unterschiedliche Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen nach der gleichen Methode gemessen. Aus der anschließenden Auftragung der Absorptionen gegen die Messzeit erhält man eine exponentielle Funktion mit der Gleichung $y = a(1 - e^{-bx}) + c$, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit wie folgt definiert ist: $v_0 = a \cdot b$. Nach Erhalten der Reaktionsgeschwindigkeit v_0 kann diese gegen die Substratkonzentration aufgetragen werden (Michaelis-Menten-Auftragung). Zu sehen ist dies in **Abbildung 12d** und die dazugehörige Lineweaver-Burk Auftragung in **Abbildung 12c**.

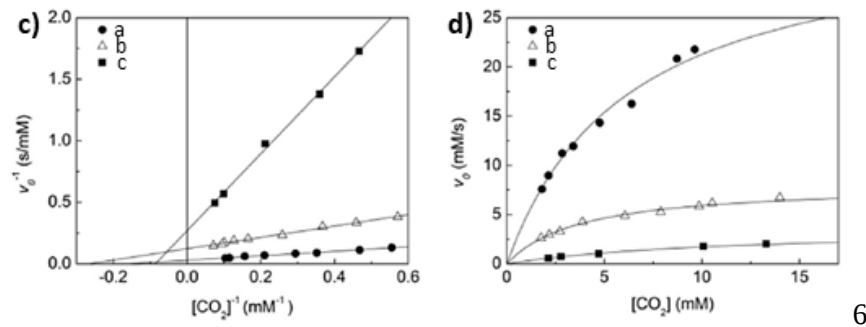


Abbildung 12. Weiterführende Ergebnisse aus den zuvor beschriebenen Darstellungen in **Abbildung 11a** und **11b**: d) nach Messung eines Inhibitors (Konzentrationen a - c) und Auftragung der gemessenen Geschwindigkeiten v_0 (Absorptionsänderung/Zeit) gegen unterschiedliche Substratkonzentrationen (dies entspricht der Michaelis-Menten-Auftragung) und c) dem doppelten Reziproken aus d) (dies entspricht der Lineweaver-Burk-Auftragung).

Ein Nachteil dieser Methode liegt jedoch in der Anreicherung des Wassers mit CO₂. Eine konstante Einstellung der CO₂-Konzentration ist kaum möglich, da es auf Grund der Überführung des Wassers in die Spritze zu schwankenden Verlusten von CO₂ kommt. Zudem ist das Vorhandensein eines *stopped-flow* Systems zwingend notwendig, wodurch die Etablierung und Anschaffung sehr kostenintensiv ist. Jedoch ist schon seit langer Zeit bekannt, dass Carboanhydrase in der Lage ist, die Acetylgruppe von *para*-Nitrophenylacetat abzuspalten, wobei *para*-Nitrophenol (gelber Feststoff mit einer Absorption bei $\lambda_{\max} = 405$ nm) als Produkt entsteht; Voraussetzung für einen zweiten, wichtigen Assay zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_i , dem Esterase-Assay. Gemessen wird zur Nutzung des Esterase-Assays die Absorptionsänderung bei $\lambda_{\max} = 405$ nm, in Abhängigkeit der Zeit und einer variierenden Substratkonzentration. Erstmals erwähnt wurde diese Eigenschaft der Carboanhydrase in den frühen 1960er Jahren durch R. Tashian¹¹³. Seitdem haben mehrere strukturelle und funktionelle Studien gezeigt, dass die Hydrataseaktivität und die Esteraseaktivität der Carboanhydrase einem ähnlichen Mechanismus folgen und an der gleichen katalytischen Stelle binden¹¹⁴⁻¹¹⁸. Da es sich bei dieser Methode um eine sichere, schnelle und kostengünstige Methode handelt, soll diese als Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_i verwendet werden.

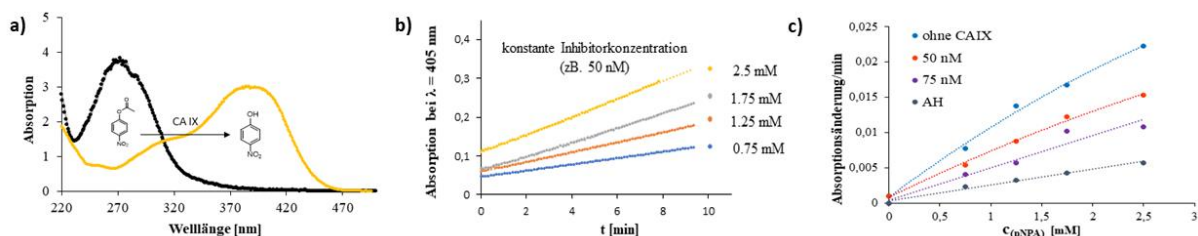


Abbildung 13. a) Absorptionsspektrum von *para*-Nitrophenylacetat und *para*-Nitrophenol in einem Wellenlängenbereich von 220 nm - 500 nm, b) Messung der Absorptionsänderung/min bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer konstanten Inhibitor-Konzentration mit variierenden Substratkonzentrationen und c) Auftragung der in (b) erhaltenen Anstiege (Doppelbestimmung) gegen die Substratkonzentration (Michaelis-Menten), wobei eine Inhibitor-Konzentration (z.B. in rot: $c_1 = 50$ nM, violett: $c_2 = 75$ nM und schwarz: Autohydrolyse) den Anstiegen einer vollständigen Messung aus (b) entspricht.

Da bei dem Esterase-Assay, anders als bei dem SFA, in der Literatur keine einheitlichen Bedingungen (Variation in Puffersystemen, Lösungsmittel zum Lösen der Inhibitoren, Menge an eingesetztem

Enzym, etc.) zur Durchführung vorhanden sind, wurde zur Bearbeitung der aufgezeigten Problemstellung der Arbeit ein eigenes Testsystem entwickelt, auf welches später genauer eingegangen werden soll. Neben der Bestimmung der Dissoziationskonstante K_i ist die Beurteilung von Enzym-Inhibitor-Interaktionen (Bindungskonstante K_b , Affinität etc.) ebenfalls elementar.

Enzym-Inhibitor-Interaktionen

Die Isothermale Titrations-Kalometrie (ITC), welche seit der ersten analogen Version von 1966^{119, 120} als „Goldstandard“ für solche Untersuchungen gilt, bietet die Möglichkeit, neben der Beurteilung der Stöchiometrie von Bindungsreaktionen auch andere thermodynamische Parameter und die Affinitäten zwischen Enzymen und deren Inhibitoren zu betrachten. Mit Hilfe der ITC ist es möglich, die während der Reaktion freiwerdende oder absorbierte Wärmemenge zu messen und somit drei wichtige Parameter (Bindungskonstante K_b , die Enthalpie ΔH und die Entropie ΔS) für eine Struktur-Thermodynamik-Beziehung zu ermitteln¹²¹⁻¹²³. ITC wird mit Hilfe zweier getrennter adiabatischer Messzellen durchgeführt, wobei die zweite Messzelle lediglich mit dem Messpuffer befüllt ist und als Referenzzelle dient. In einer weiteren Messzelle befindet sich das Protein/Enzym, beispielsweise CA IX, gelöst in Puffer, zu welcher die Inhibitorlösung (10-200fache Menge) in mehreren Schritten (typisch sind 18-25 Schritte) bei konstanter Temperatur hinzugegeben wird. Die dabei entstehende kalometrische Titrationskurve ist in **Abbildung 14a** zu sehen. Die experimentellen Messwerte werden als Leistung in $\mu\text{cal/s}$ gegen die Zeit dargestellt, welche diejenige Leistung darstellen, welche zur Aufrechterhaltung der Temperatur im System benötigt wird. Das dabei erhaltene Diagramm enthält eine Reihe von Spikes, welche jeweils einer Injektion des Liganden (Inhibitor) mit anschließender Temperaturänderung und Wiederherstellung der Temperatur (durch einen vorhandenen Rückkoppler) entspricht. Die Fläche unter jedem dieser Spikes entspricht der frei werdenden oder aufgenommenen Wärmemenge, welche durch Integration der Funktion (gegen die Zeit aufgetragen) bestimmt werden kann. Jeder Messpunkt gegen das Molverhältnis von Enzym und Ligand (Inhibitor) aufgetragen, entspricht dann der Auftragung in **Abbildung 14b**. Aus dieser können die Enthalpie ΔH und die Bindungskonstante K_B bestimmt werden.

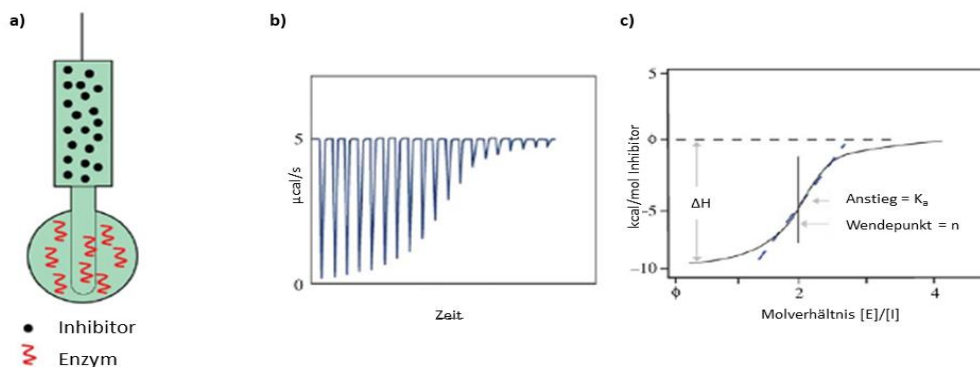


Abbildung 14. a) Schematischer Aufbau der isothermalen Titrations-Kalometrie. Gezeigt ist eine Apparatur, in der das Enzym (in rot) in einer Pufferlösung vorgelegt wird und langsam der Inhibitor (in schwarz) zur Enzymlösung hinzugegeben werden kann. In b) ist der zeitliche Verlauf dieser Messung dargestellt. Zu sehen ist die Leistung ($\mu\text{cal/s}$), die aufgewendet werden muss, um die Temperatur konstant zu halten, aufgetragen gegen die Zeit. Nach Integrieren der einzelnen Peakflächen werden die erhaltenen Daten gegen das Molverhältnis von Enzym und Inhibitor aufgetragen. Der Anstieg der gezeigten Tangente (durch Ableitung der erhaltenen Funktion) entspricht der Affinität (K_D) und der Wendepunkt der Stöchiometrie (hier gezeigt eine 1:1 Bindungsreaktion). Abbildung nach Srivastava¹²⁴.

Trotz der hohen Anzahl an ermittelbaren Parametern ist die ITC eine sehr kostenaufwendige Methode. Um einen messbaren Effekt bei der Zugabe des Inhibitors zum Enzym ermitteln zu können, muss eine große Menge von Enzym und Inhibitor in der Lösung vorliegen. Dies ist je nach untersuchtem Enzym sehr kostenintensiv. Ebenfalls zu beachten ist die Löslichkeitsgrenze von Inhibitoren (in dieser Arbeit Betulin(säure)-Derivate) in den eingesetzten Puffersystemen.

Aus diesem Grund bedient man sich zur Bestimmung der Bindungskonstante K_B einem weiteren Assay, und zwar dem *fluorescent thermal shift assay* (FTSA). Das Prinzip dieser Methode besteht in der Untersuchung der Stabilität des zu untersuchenden Proteins/Enzyms durch thermische Behandlung. Die

zwei am häufigsten verwendeten Methoden sind der nanoDSF (*nano differential scanning fluorimetry*) und die Messung der Fluoreszenzintensität von zusätzlich angebrachten Farbstoffen, dem ThermoFluor, bei dem spezielle fluoreszenzaktive Farbstoffe der Probe zugesetzt werden. Mit Hilfe beider Methoden ist es möglich, das Gleichgewicht eines Proteins zwischen dem gefalteten und ungefalteten Zustand bei stetig steigender Temperatur zu ermitteln. Petruskas *et al.* zeigten, dass die meisten Liganden, in diesem Fall Sulfamate und Sulfonamide, nach Bindung an das aktive Zentrum der Carboanhydrase zu einer Stabilisierung dieser führen und somit eine Erhöhung von T_m (Glasübergangstemperatur, bei der 50 % der Proteinmoleküle entfaltet vorliegen) bewirken¹²⁵. Dies soll am Beispiel von CA II und Acetazolamid gezeigt werden. Ein stark verbreiteter Fluoreszenzfarbstoff ist 1,8-Anilinonaphthalen-sulfonat (ANS), ein Farbstoff, bei welchem erst nach Bindung an die hydrophilen Stellen des halb entfalteten Proteins eine Fluoreszenz auftritt (schematisch in **Abbildung 15a** gezeigt). Petruskas *et al.* verwendeten einen zweiten, ebenfalls in vielen wissenschaftlichen Bereichen etablierten Farbstoff, Sypro Orange, welcher nach dem gleichen Prinzip agiert, jedoch eine höhere Affinität zum Protein aufweist¹²⁶. Die Messung wurde in einem Standardsystem für *real time* PCR (Corbett Rotor-Gene 6000) durchgeführt. Üblicherweise werden bei dieser Methode 8 - 16 verschiedene Konzentrationen des Inhibitors verwendet, gelöst in einem Puffersystem mit 2 % DMSO-Zusatz. Diese wird für die Messung einer bereits vorhandene Proteinlösung hinzugegeben (Menge an Enzym variiert dabei zwischen 1.5 µg und 3 µg pro well) und zwischen 25 °C und 99 °C mit einer Heizrate von 1 °C/min erhitzt. Das Ergebnis solch einer Messung ist in **Abbildung 15b** und **15c** gezeigt. Dabei wurde die Bindungsaffinität von Acetazolamid zur Carboanhydrase II bestimmt. In **Abbildung 15b** ist das Denaturierungsprofil der CA II bei einer Konzentration von 25 µM in 50 mM Phosphatpuffer und 100 mM NaCl (bei einem pH-Wert von 7.5) dargestellt. Es ist sehr gut zu erkennen, dass sich die Glasübergangstemperatur T_m , mit steigender Konzentration an Acetazolamid stetig zu dieser erhöht. Zurückzuführen ist dieser Effekt auf die Stabilisierung der CA II durch den Liganden (Acetazolamid). Führt man diese Messung anschließend bei variierenden Konzentrationen der CA II durch, so erhält man $[c]_{CA II} / [c]_{Liganden}$ - abhängigen Glasübergangstemperaturen K_m , welche gegen die eingesetzte Konzentration an Acetazolamid aufgetragen, eine zweite Möglichkeit der FTSA - Auftragung ergibt (**Abbildung 15c**).

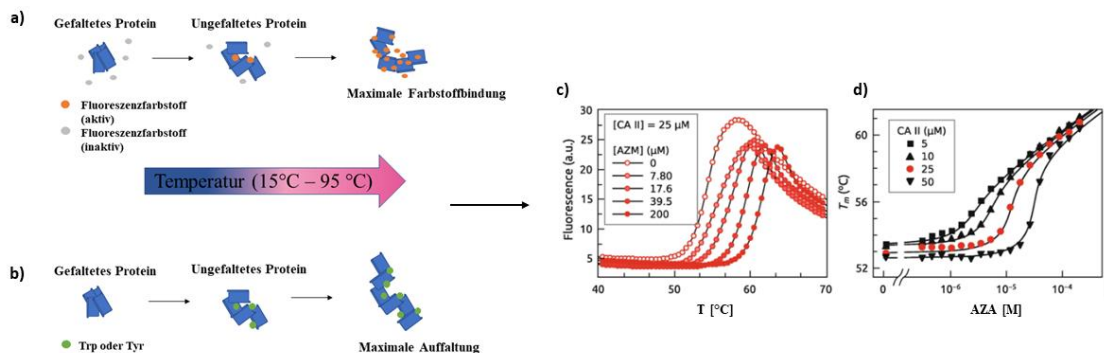


Abbildung 15. a) Verlauf der thermischen Proteinentfaltung, die durch FTSA bestimmt wird. Die in grau dargestellten Kreise zeigen den nicht gebundenen (und nicht fluoreszierenden) Farbstoff, welcher nach Anbindung an das teilweise entfaltete Protein (in orange dargestellt) in der Lage ist, zu fluoreszieren. b) zeigt ein ähnliches Prinzip, jedoch wird die Autofluoreszenz vorhandener Tryptophane (Trp) und Tyrosine (Tyr) genutzt (dargestellt in grün). Je stärker entfaltet das Protein vorliegt, desto höher ist auch die Fluoreszenzintensität bei beiden Methoden. c) Denaturierungsprofil der CA II bei einer Konzentration von 25 µM in 50 mM Phosphatpuffer und 100 mM NaCl (pH-Wert = 7.5). d) $[c]_{CA II} / [c]_{Liganden}$ - abhängigen Glasübergangstemperaturen T_m gegen die eingesetzte Konzentration an Acetazolamid¹²⁵.

Die zweite genannte Methode ist die DSF (*differential scanning fluorimetry*). Diese ist eine modifizierte Differentialscanning-Fluorimetrie-Methode der DSF, welche zur Bestimmung der Proteinstabilität unter Verwendung der intrinsischen Tryptophan- oder Tyrosin-Fluoreszenz unter thermischer Behandlung angewandt wird. Die dabei auftretende Proteinentfaltung führt zur Freigabe der nach innen gelagerten

aromatischen Aminosäuren (Trp und Tyr), sodass die Fluoreszenz bei 330 nm und 350 nm zunimmt. Ein dafür sehr häufig verwendetes Gerät stellt der Prometheus-Nano *Temper* dar. Gleichzeitig ist es bei Verwendung des Prometheus-Nano *Temper* erlaubt, durch Einsatz eines Spiegels, die Bildung von Aggregaten zu untersuchen. Durch Messung des reflektierten Lichtes kann das Maß an gebildeten Aggregaten bestimmt werden, da große Partikel die Rückreflexion reduzieren. Bei der Bestimmung der Bindungskonstante K_B wurde bei dem Beispiel von Petruskas *et al.* auf folgende Gleichung zurückgegriffen^{127, 128}: $K_B(T) = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}$, wobei ΔG einem weiteren experimentell bestimmten Wert für die Gibbs'sche Energie (Freie Enthalpie) entspricht. Vereinfacht bedeutet dies, dass die Bindungsstärke direkt mit der Verschiebung der Proteinschmelztemperatur nach Zugabe eines Ligandens zusammenhängt^{129, 130}. Sind Protein und Ligand in dem benötigten Konzentrationsbereich löslich im eingesetzten Puffersystem und liegen die Schmelztemperaturen unterhalb der Siedetemperatur vom Wasser, gibt es für diese Untersuchung keine Beschränkungen.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Synthese und Charakterisierung verschiedener Betulin(säure)-Derivate

Bei Betulin bzw. der Säure des Betulins handelt es sich um ein pentacyclisches Triterpen, eine Substanzklasse mit sehr lipophilem Charakter. Ziel dieser Arbeit war es, die biologischen Eigenschaften dieser zwei Substanzen durch eine Modifizierung der Struktur zu verändern, und zudem einen positiven Einfluss auf die Wasserlöslichkeit zu erzielen. Da zwei verschiedene Konzepte miteinander verknüpft werden sollten, lag der Fokus der synthetisierten Wirkstoffe neben der Zytotoxizität auch auf der Fähigkeit, an die zuvor beschriebene CA IX zu binden und so eine Anreicherung des Wirkstoffes im Tumor zu gewährleisten. Realisiert werden konnte dies durch Anbringung von Sulfamaten und Sulfonamiden bzw. durch Anknüpfung von Acetazolamid und Saccharin, gezeigt in **Abbildung 16**.

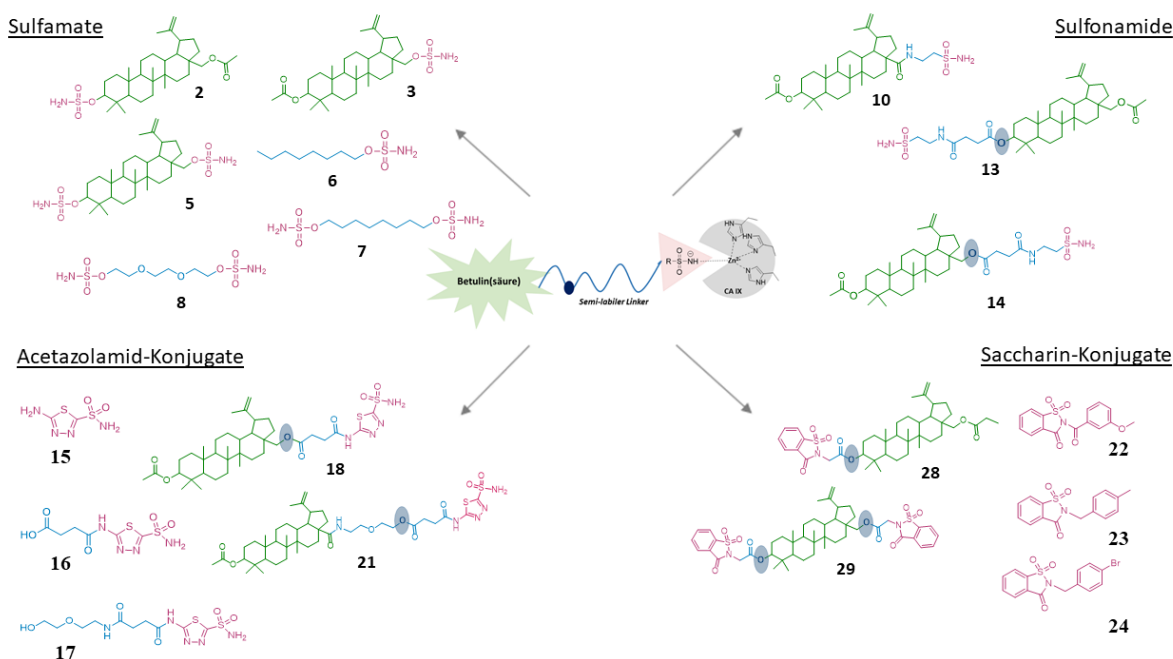


Abbildung 16. Synthesekonzept (eine Auswahl) der hergestellten Betulin(säure)-derivate mit den unterschiedlichen Stoffklassen, welche zur gezielten Inhibition der Carboanhydrase IX verwendet wurden. In grün dargestellt: das Betulin(säure)-Grundgerüst, blau: der semi-labile Linker mit dunkelblauer Hinterlegung für die mögliche Spaltstelle und rot: der Bindungsligand zur Inhibition der CA IX (grau dargestellt).

Auf eine genaue Beschreibung der einzelnen Stoffklassen soll in den folgenden Unterkapiteln eingegangen werden. Jedoch soll in diesem Kapitel kurz die Herangehensweise des Synthesekonzeptes beschrieben werden. Da Sulfamate in Bezug auf der Inhibition der Carboanhydrase in der Literatur stark diskutiert werden, wurden erste Derivate des Betulins und der Betulinsäure analog verschiedener literaturbekannter Inhibitoren konzipiert. Aufgrund der geringen Stabilität dieser Verbindungen, wurden in einem zweiten Schritt Sulfonamide synthetisiert, welche sich durch eine höhere Stabilität auszeichnen und leicht zugänglich sind. Auch konnten bei dieser Stoffklasse das erste Mal unterschiedlich Linker zwischen Bindegruppe und Triterpenfragment realisiert werden. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Länge des Linkers einen Einfluss auf die K_i -Werte hat. Dieses Konzept wurde auch bei der dritten Stoffklasse, den Acetazolamid-basierten Derivaten fortgeführt. Acetazolamid gilt in der Literatur (auf Grund seiner hervorragenden CA-Hemmung) als Standard bei der K_i -Wert-Bestimmung. Aus diesem Grund wurden zwei Systeme entwickelt, welche sowohl den Naturstoff Betulin(säure), als auch Acetazolamid, über unterschiedlich langen und polaren Linker verknüpft, beinhalten. Als eine vierte Stoffklasse, wurden Saccharin-Konjugate hergestellt, welche sich durch ihre selektive Inhibition der

CA IX (in der Literatur) auszeichnen. Dies wurde anschließend mit Hilfe eines eigens dafür etablierten Kinetik-Assay abgeglichen.

3.2.1.1 Sulfamate

Sulfamate stehen schon seit langer Zeit im Fokus der Forschung. Hierbei wird zwischen vier verschiedenen Typen unterschieden, welche alle von der Amidosulfonsäure abgeleitet werden können. Alle in **Abbildung 17** gezeigten Sulfamate besitzen pharmakologische Anwendungen, welche ein sehr breites Spektrum an Eigenschaften abdecken. Bereits 1944 entdeckten Audrieth & Sveda¹³¹, dass N-substituierte Sulfamate (**Abbildung 17c**), welche ein Kation als Gegenion zur deprotonierten Hydroxylgruppe besitzen, als Süßungsmittel verwendet werden können. Eines der ersten Sulfamat-basierten Süßungsmittel ist das Cyclohexylsulfamat, auch als Cyclamat bekannt, mit einer 40-fach höheren Süßkraft als Glucose. Ein breites Anwendungsgebiet zeigen im Gegensatz dazu die O,N-di/trisubstituierten Sulfamate **d** und **e**. Diese besitzen neben antitumoralen^{107, 132}, antibakteriellen¹³³ und antivitalen¹³⁴ Eigenschaften, auch die Fähigkeit bestimmte Enzyme, wie die Aminoacyl-tRNA-Synthetase, zu hemmen¹³⁵. Im Fokus dieser Arbeit sollen jedoch die O-substituierten Sulfamate genauer beschrieben und untersucht werden, da diese in der Lage sind, verschiedene Arten von nicht verwandten Enzymen, wie zum Beispiel die Carboanhydrase oder die Steroidsulfatase (STS), gezielt zu hemmen. Die steroidalen Sulfamate waren aus historischer Sicht die erste Art von potenten Sulfamaten^{136, 137}. Ein Beispiel dafür ist die Entdeckung von Estron-3-O-Sulfamat (EMATE) mit einem IC₅₀-Wert von 100 nM in Bezug auf die Inhibierung von STS in der Mammakarzinomzelllinie MCF7¹³⁷. Von gleicher Bedeutung in der heutigen Forschung ist zudem die Hemmung der Carboanhydrasen mit Hilfe von O-substituierten Sulfamaten, worauf auch in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk gelegt werden soll. Dabei bindet die Sulfamatgruppe koordinativ an das katalytische Zinkzentrum der Carboanhydrase, sodass ein Übergang in die aktive Form nicht mehr stattfindet. Daraus resultierend kommt es zum Verlust der katalytischen Aktivität.

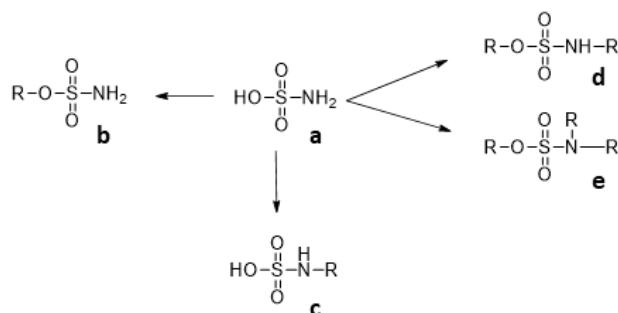
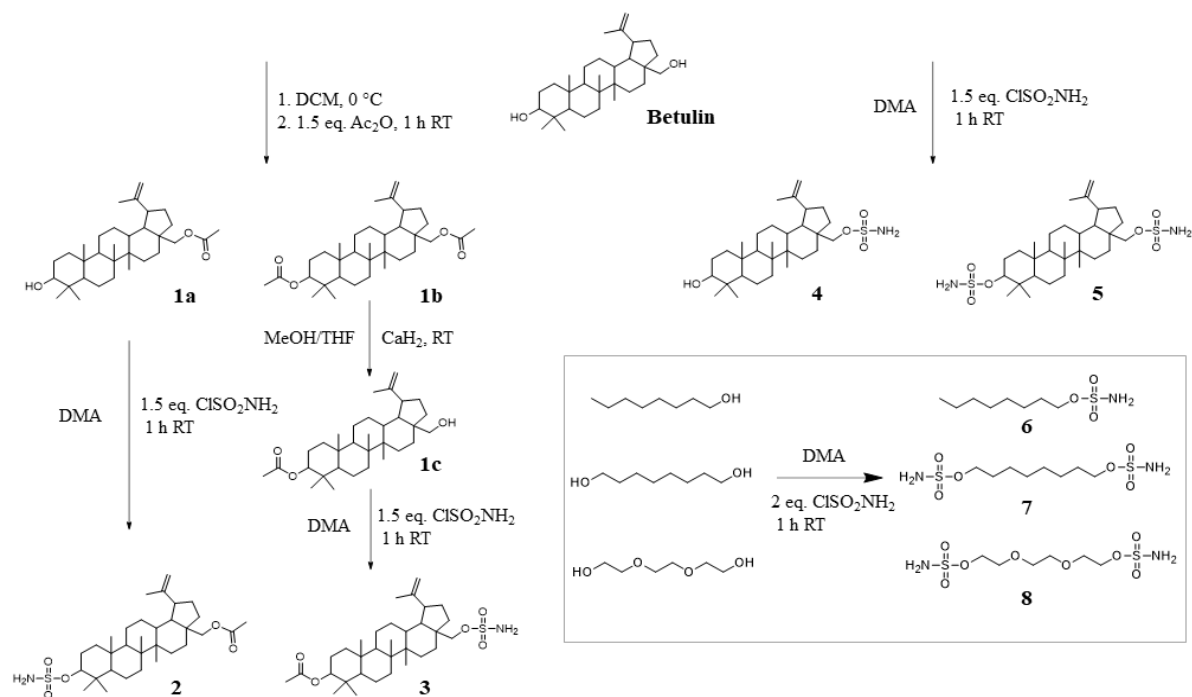


Abbildung 17. Darstellung der vier Bindungsmöglichkeiten von Sulfamaten nach Derivatisierung der a) Amidosulfonsäure, wobei der Rest b) O-substituiert, c) N-substituiert, d) bzw. e) O,N-di/trisubstituiert gebunden werden kann.

Voraussetzung für das Anbringen eines O-substituierten Sulfamates ist das Vorhandensein einer freien Hydroxylgruppe, sodass sich Betulin mit zwei solcher Hydroxylgruppen an der C3- und C28-Position anbietet. Um gezielt eine der beiden Hydroxylgruppen zu schützen, wurde im ersten Schritt eine Acetyl-Schutzgruppe sowohl an die C3-Position, als auch an die C28-Position des Betulins angebracht. Dafür wurde Betulin mit Essigsäureanhydrid umgesetzt, wobei als Ergebnis dieser Reaktion das 28-O-acetylbetulin **1a** und das Di-O,O'-Acetylbetulin **1b** entstanden ist. Bei der anschließenden Reaktion des Di-O-Acetylbetulins mit CaH_2 in Methanol konnte gezielt die Acetyl-Schutzgruppe an der C28-Position abgespalten werden. Sowohl bei der Umsetzung der zuvor geschützten Betulinderivate, als auch bei der Umsetzung des ungeschützten Betulins und der langkettigen Alkohole zu den entsprechenden Sulfamaten konnte die Reaktion mit Sulfamylchlorid unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden.

Das verwendete Sulfamylchlorid wurde zuvor durch Umsetzung von Chlorsulfonylisocyanat mit Ameisensäure hergestellt und unter Schutzatmosphäre bei 4 °C gelagert.



Schema 1. Syntheseweg für die Synthese der O-substituierten Sulfamate **2-5** des Betulins und der Verbindungen **6-8** ohne Betulin/Betulinsäure.

Bei der Reaktion des ungeschützten Betulins mit 1.5 eq. Sulfamylchlorid erhält man ein Gemisch aus Betuliny-28-O-sulfamat **4** (26%) und Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat **5** (74.1%), welches auf Grund der unterschiedlichen Polarität jedoch mittels Säulenchromatographie in zwei Fraktionen aufgetrennt werden konnte. Bei Zugabe höherer Mengen an Sulfamylchlorid ist die Ausbeute stark variierbar, sodass bei Mengen > 2 eq. die Ausbeute fast vollständig auf Seiten des Disulfamates des Betulins verschoben werden kann. Ebenfalls ist es möglich bei kleineren Mengen die Ausbeute auf Seiten des einfach-substituierten Sulfamates zu schieben. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums vom Betulin mit den ¹H-NMR-Spektren der beiden Sulfamate **4** und **5** (**Schema 1**) überprüft. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im **Kapitel 6.2.1** angegeben, während die entsprechenden Spektren im **Anhang 8.1** dargestellt sind.

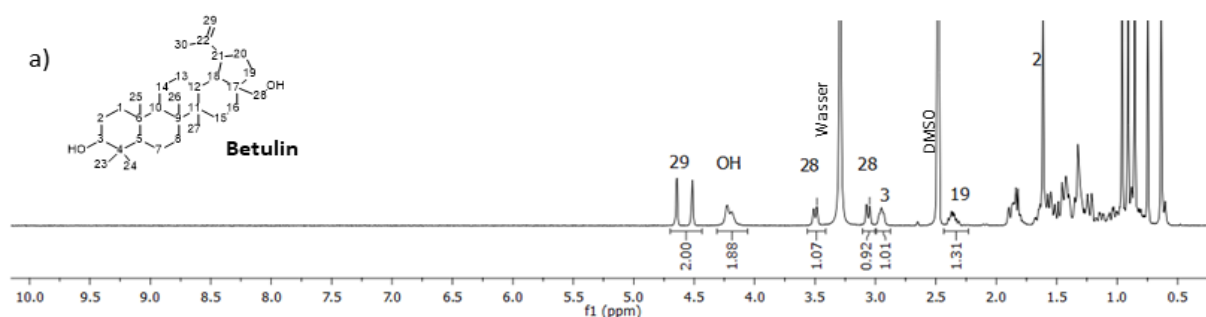


Abbildung 18. ¹H-NMR-Spektrum von a) Betulin.

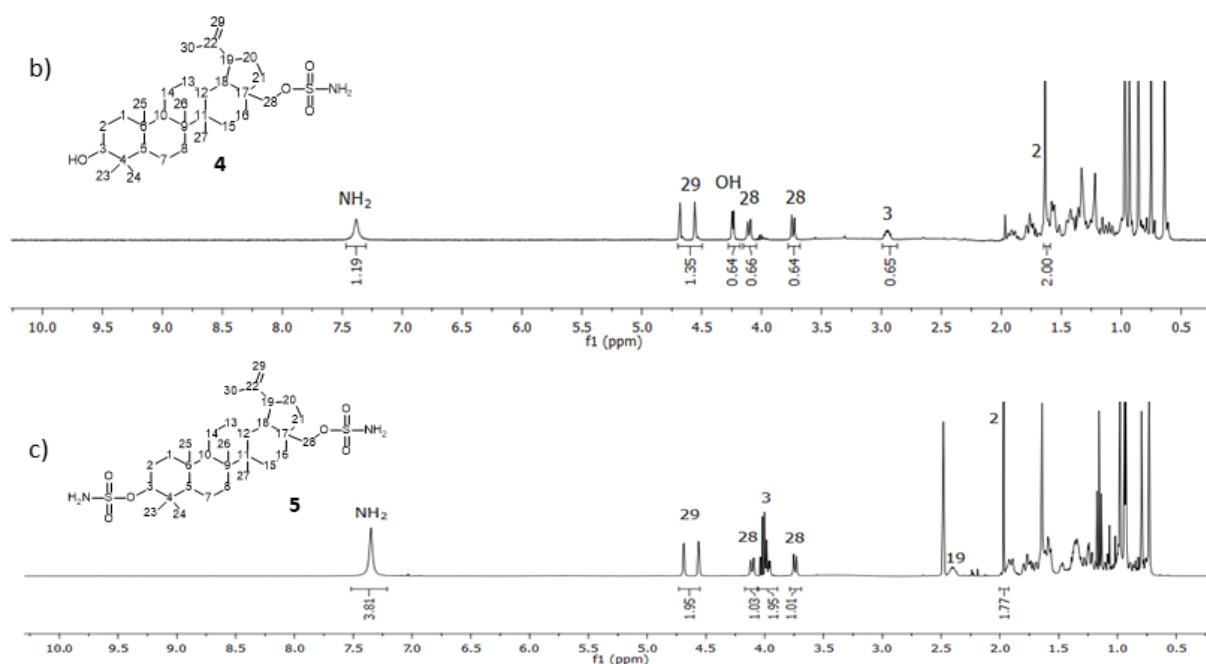


Abbildung 19. ^1H -NMR-Spektrum von a) Betulin, b) Betulinyl-28-*O*-sulfamat **4** und c) Betulinyl-3,28-*O,O'*-disulfamat **5**.

Nach Anbringen einer Sulfamatgruppe am C28 des Betulins ist eine signifikante Verschiebung der Protonen am C28 von ursprünglich 3.05 ppm und 3.48 ppm hin zu 3.73 ppm und 4.08 ppm erkennbar. Dies, die Verkleinerung des Integrals des OH-Peaks von 2 auf 1 und das Hinzukommen eines Peaks bei 7.38 ppm (NH_2) zeigen deutlich die erfolgreiche Synthese von Verbindung **4**. Das Fehlen des OH-Signales bei 4.32 ppm und die Verschiebung des Signales des Wasserstoffes am C3 von 2.93 ppm zu 4.00 ppm in **b)** zeigen zudem deutlich das Vorhandensein einer weiteren Sulfamatgruppe von Verbindung **5**. Des Weiteren wird das Signal des benachbarten H_2 von ursprünglich 1.43 ppm hin zu 1.97 ppm verschoben. Auch findet eine Zunahme des Peaks bei 7.35 ppm statt, welcher der NH_2 -Gruppe der Sulfamatgruppe zugeordnet werden konnte. Die beschriebene Zunahme entspricht dabei ungefähr dem doppelten Integral von a), also einer Zunahme einer weiteren NH_2 -Gruppe.

Ebenfalls möglich ist das vorherige Anbringen einer Schutzgruppe an einer der beiden Hydroxylgruppen. Hierfür wurde eine Acetylenschutzgruppe durch die Umsetzung von Betulin mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Triethylamin und DMAP eingeführt, welche bevorzugt an die C28-Position des Betulins bindet. Für die Bereitstellung einer Acetylenschutzgruppe am C3 und einer freien Hydroxylgruppe am C28, wie in **Abbildung 20a** bei Verbindung **1c**, wird das zweifach acetylierte Betulin in einem Gemisch aus Methanol und Tetrahydrofuran (1:1) mit katalytischen Mengen an Calciumhydrid bei Raumtemperatur für mehrere Stunden gerührt. In einen anschließenden Schritt kann, wie schon bei Verbindung **4** und **5**, durch die Umsetzung mit 1.5 eq. Sulfamylchlorid, eine Sulfamatgruppe an der C28-Position von **1c** angebracht werden. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums von **1c** und dem ^1H -NMR-Spektrum von **3** (**Schema 1**) überprüft. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im **Kapitel 6.2.1** angegeben, während die entsprechenden Spektren im **Anhang 8.1** dargestellt sind.

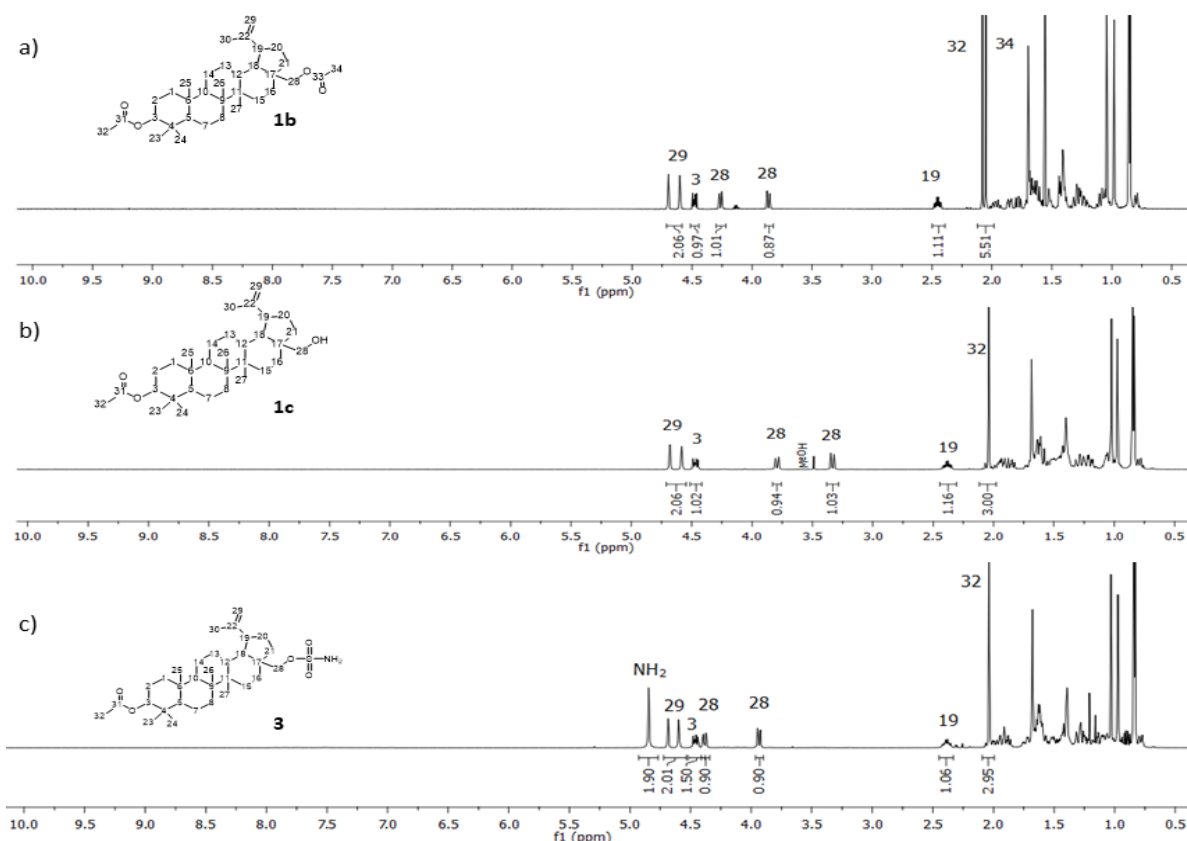


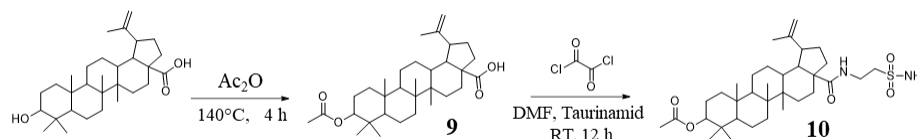
Abbildung 20. ¹H-NMR-Spektrum von a) 3,28-O,O'-diacetylbetulin **1b**, b) 3-O-Acetylbetulin **1c** und c) 3-O-Acetylbetulinyl-28-O-sulfamat **3**.

Alle in **Abbildung 20** gezeigten Spektren wurden für einen besseren Vergleich in deuteriertem Chloroform aufgenommen. Für die gezielte Schützung der Hydroxylgruppe am C3, muss zuvor das zweifach geschützte Derivat **1b** synthetisiert werden. Die erfolgreiche Synthese von **1b** ist in **Abbildung 20a** dargestellt. Hier ist deutlich eine Verschiebung der Signale der Wasserstoffatome am H3 und H28 zu höheren ppm zu erkennen. Vergleicht man das Spektrum von **1b** mit dem vom Betulin (**Abbildung 19**) so ist eine signifikante Verschiebung der Protonen am C28 von ursprünglich 3.35 ppm und 3.78 ppm hin zu 3.48 ppm und 4.23 ppm zu erkennen. Ebenfalls eine Verschiebung ins Hochfeld erfährt das Signal des Wasserstoffes am C3, aufgrund der abschirmenden Effekte der Sauerstoffe, von 2.95 ppm hin zu 4.48 ppm. Des Weiteren sind die Signale der Methylgruppen beider Acetylgruppen bei 2.08 ppm und 2.05 ppm zu erkennen. Im zweiten Schritt der Synthese wurde durch schonendes Hydrieren mit CaH₂ die Acetylschutzgruppe am C28 des Betulins entfernt. Dies ist ebenfalls mittels ¹H-NMR-Spektroskopie zu verfolgen, sodass die Signale der C28-Wasserstoffe wieder zu den ursprünglich 3.35 ppm und 3.78 ppm verschoben werden. Dies und das Ausbleiben des Signales der drei Wasserstoffe am C34 zeigen in **Abbildung 20b** deutlich das Entfernen der Acetylschutzgruppe am C28 des Betulins. Im letzten Schritt wurde eine Sulfamatgruppe an die freie Hydroxylgruppe am C28 des Betulins angebracht, welches eine erneute Verschiebung der beiden Wasserstoffe am C28, hin zu 3.95 ppm und 4.37 ppm, mit sich bringt. Zudem ist in **Abbildung 20c** ein Signal der eingeführten NH₂-Gruppe vom Sulfamat bei 4.85 ppm zu sehen.

3.2.1.2 Sulfonamide

Viele der heute bekannten Sulfonamide zeigen eine antimikrobielle Wirkung. Diese beruht auf der selektiven Hemmung des Enzyms Dihydropteroat-Synthase, welches Grundlage für den Folsäure-Stoffwechsel von Bakterien, Pilzen und Pflanzen ist, jedoch nicht in tierischen Zellen vorkommt¹³⁸⁻¹⁴⁰. Eine Anwendung als Antibiotikum leitet so nicht den direkten Zelltod von Bakterien ein, verhindert

jedoch das Kopieren von Erbinformationen und somit dessen Proliferation. Ebenfalls sind Sulfonamide aufgrund ihrer antitumoralen Wirkung ein vielversprechendes Forschungsgebiet in der Antitumor-Forschung^{62, 63, 93, 107, 141-149}.



Schema 2. Schematische Darstellung des Syntheseweges von 3-O-Acetylbetulinsäure-28-taurinamid **10**, basierend auf der Betulinsäure. Gezeigt ist die Umsetzung von Acetylbetulinsäure mit Taurinamid zum kurzketigen Sulfonamid.

Sulfonamide bieten eine einfache Möglichkeit die Länge des Linkers zwischen dem zytotoxischem Fragment und der Enzymbindegruppe zu variieren. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob es möglich ist, ein Konjugat zu entwickeln, welches zuerst an die Carboanhydrase andockt und anschließend durch Spaltung die zytotoxische Gruppe freisetzt, während die Bindegruppe weiterhin das Enzym blockiert. Zudem sollte der Unterschied der C3-Verknüpfung und C28-Verknüpfung genauer untersucht werden. Für die Herstellung eines möglichst kurzen Linkers wurde Taurinamid über die Herstellung eines aktiven Säurechlorides direkt an die Betulinsäure angebracht. Zu sehen ist dies in **Schema 2**. Für die Anbringung des Sulfonamides an die Carbonsäure der Betulinsäure musste zuvor die Hydroxylgruppe am C3 der Betulinsäure geschützt werden. Hierfür wurde Betulinsäure in Essigsäureanhydrid für mehrere Stunden gekocht und die Reste des Anhydrids durch *quenchen* mit Wasser entfernt. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums von **10** mit dem ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **9** überprüft. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im **Kapitel 6.2.2** angegeben, während die entsprechenden Spektren im **Anhang 8.2** dargestellt sind.

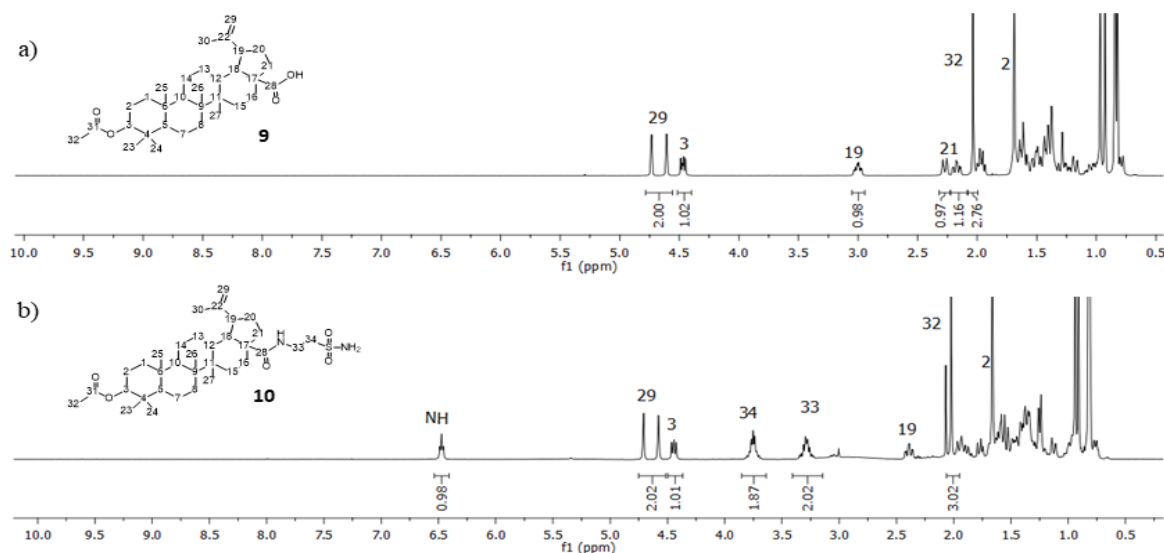
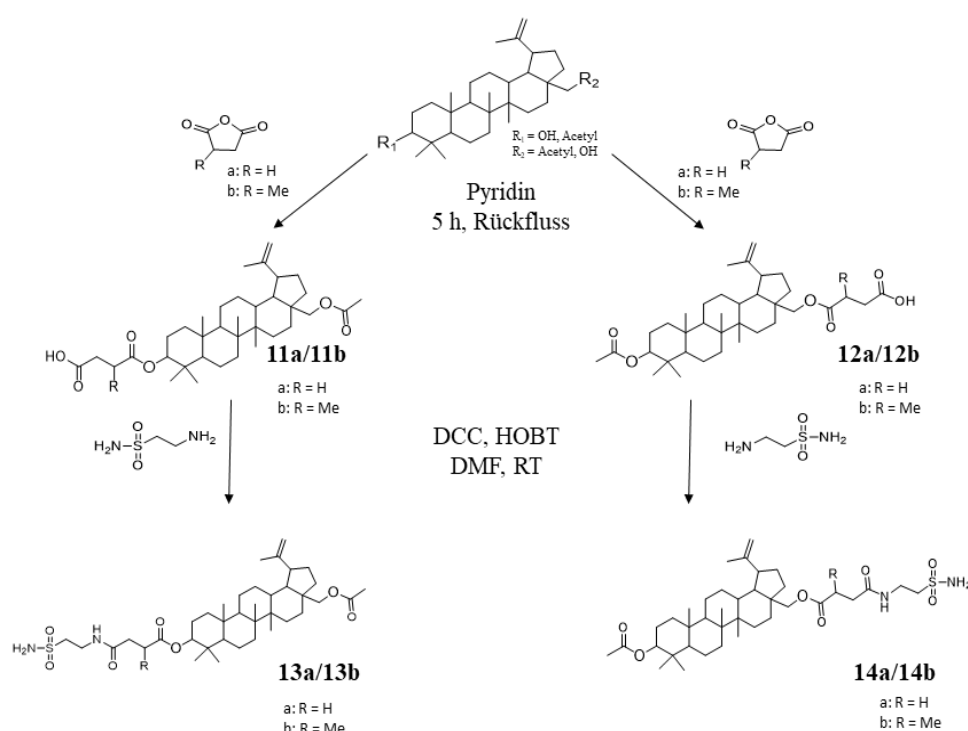


Abbildung 21. ¹H-NMR-Spektrum von a) 3-O-Acetylbetulinsäure **9**, und b) 3-O-Acetylbetulinsäure-28-taurinamid **10**.

Alle in **Abbildung 21** gezeigten Spektren wurden für einen besseren Vergleich in deuteriertem Chloroform aufgenommen. Für die Bestätigung der erfolgreichen Synthese von **9** wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen, dargestellt in **Abbildung 21a**. Aus der Anbringung einer Acetylgruppe an der freien Hydroxylgruppe des Betulins resultiert eine Verschiebung des Wasserstoffs am C3 von 2.94 ppm hin zu 4.5 ppm. Zudem ist das Signal der Wasserstoffatome (Methylgruppe von der angebrachten Acetylgruppe) bei einer Verschiebung von 1.97 ppm zu sehen. Im Anschluss daran wurde **10** über ein

reaktives Säurechlorid mit 2-Aminoethanesulfonamid hergestellt. Die erfolgreiche Synthese konnte ebenfalls mit Hilfe eines ^1H -NMR-Spektrum bestätigt werden. Zu sehen ist das Hinzukommen zweier Signale in **Abbildung 21b**, zum einen bei einer Verschiebung von 3.75 ppm (dies entspricht den zwei Wasserstoffatomen am C34) und bei einer Verschiebung von 3.28 ppm (dies entspricht den zwei Wasserstoffatomen am C33). Ebenfalls deutlich im ^1H -NMR-Spektrum zu sehen ist das Signal des Wasserstoffes am NH der Sulfonamidgruppe bei einer Verschiebung von 6.45 ppm und die Signale der Wasserstoffatome am NH_2 bei einer Verschiebung von 5.38 ppm. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im **Kapitel 6.2.2** angegeben, während die entsprechenden Spektren im **Anhang 8.2** dargestellt sind. Um eine Verlängerung des Linkers zu gewährleisten, wurde an Stelle von Betulinsäure Betulin, verwendet. Da für die Anbringung von 2-Aminoethanesulfonamid eine Carbonsäure zur Verfügung stehen muss, wurde Bernsteinsäure als Linker zwischen Betulin und dem Sulfonamid gewählt. Hier ist eine einfache Veresterung über das Anhydrid der Bernsteinsäure möglich. Zudem hat die verwendete Dicarbonsäure einen minimalen Einfluss auf die verbesserte Wasserlöslichkeit. Der komplette Syntheseweg ist in **Schema 3** gezeigt.



Schema 3. Syntheseweg für die Synthese der langkettigen Sulfonamide 3-Hemisuccinat-taurinamid-28-O-acetylbetulinyll **13a** und 3-(2-Methyl-hemisuccinat-taurinamid-28-O-acetylbetulinyll) **13b** und 3-O-Acetylbetulinyll-28-hemisuccinat-taurinamid **14a** und 3-O-Acetylbetulinyll-28-(2-methyl-hemisuccinat)-taurinamid **14b** über die zuvor hergestellten Zwischenstufen 3-Hemisuccinat-28-O-acetylbetulinyll **11a**, 3-82-Methyl-hemisuccinat)-28-O-acetylbetulinyll **11b** und 28-Hemisuccinat-3-O-acetylbetulinyll **12a** und 28-(2-Methyl-hemisuccinat)-3-O-acetylbetulinyll **12b**.

Für diese Synthesestrategie wurde das schon zuvor beschriebene 3-O-Acetylbetulin **1c** verwendet, welches im ersten Schritt mit Bernsteinsäureanhydrid in Gegenwart von DMAP in Pyridin zu **12** (siehe **Kapitel 6.2.2.2**) umgesetzt wurde. Dabei wurden alle Reaktionspartner für mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt und zum Entfernen des Pyridins, das Gemisch in Essigsäureethylester aufgenommen, bevor die organische Phase mit Wasser gewaschen werden konnte. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums von **14a** mit dem ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **12** überprüft. Zu sehen ist dies in **Abbildung 22**. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im **Kapitel 6.2.2** angegeben, während die entsprechenden Spektren im **Anhang 8.2** dargestellt sind.

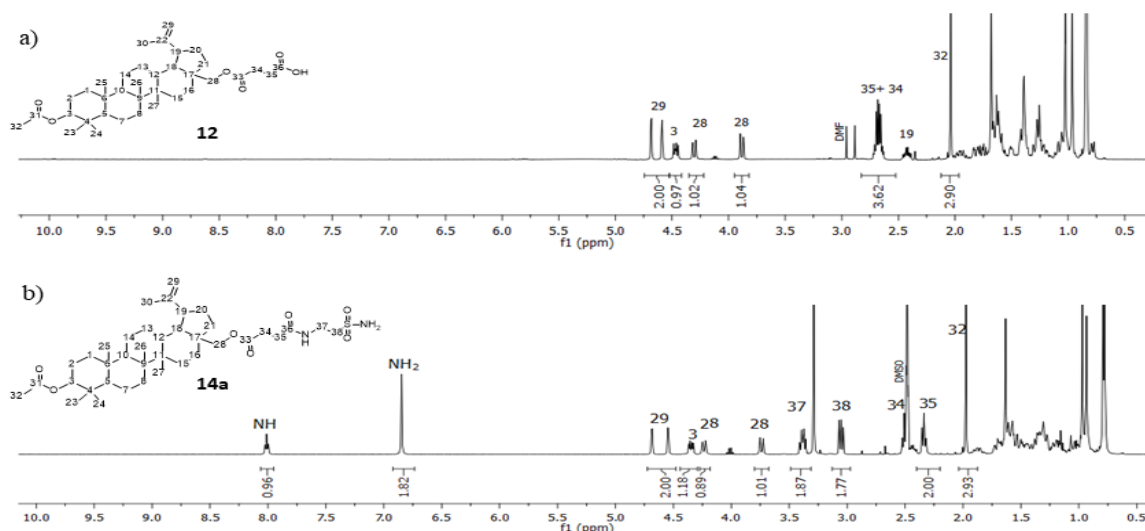


Abbildung 22. ^1H -NMR-Spektrum von a) 3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat **12** und b) dem Sulfonamid 3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-taurinamid **14a**.

Alle in **Abbildung 22** gezeigten Spektren wurden für einen besseren Vergleich in deuteriertem Chloroform aufgenommen. Betrachtet man das ^1H -NMR Spektrum von **12** im Vergleich zu **1c**, so ist eine signifikante Verschiebung der Protonen am C28 von ursprünglich 3.35 ppm und 3.78 ppm hin zu 3.87 ppm und 4.26 ppm erkennbar. Zudem sind die Signale des angebrachten Bernsteinsäureesters deutlich durch das Hinzukommen des Multipletts bei 2.66 ppm zu erkennen. In einem zweiten Schritt wurde die freie Carbonsäure mit 2-Aminoethanesulfonamid über eine Kupplungsreaktion mit Hilfe der Kupplungsreagenzien DCC und HOBT in Anwesenheit der Kupplungsbase DIPEA zum Amid umgesetzt. Das Funktionieren dieser Reaktion konnte ebenfalls durch das Aufnehmen und Auswerten des ^1H -NMR-Spektrums von **14a** im Vergleich zu **12** bestätigt werden. Nach Bildung des Amides kommt es auf Grund der nicht mehr identischen Nachbaratome bei C34 und C35 zu einer Aufspaltung der Signale der Wasserstoffatome am C34 und C35 von 2.66 ppm (für beide) zu einer Verschiebung von 2.49 ppm für die Wasserstoffe am C35 (geringere Abschirmungseffekte durch den Stickstoff im Vergleich zum Sauerstoff) und 2.67 ppm für die Wasserstoffe am C34. Ebenfalls sind die Signale der Wasserstoffatome von C37 bei einer Verschiebung von 3.78 ppm und die des C38 bei 3.36 ppm zu erkennen. Auch die Signale der Wasserstoffatome beider Stickstoffatome sind sehr gut erkennbar, mit einer Verschiebung von 5.07 ppm für die Wasserstoffatome der NH_2 -Gruppe und einer Verschiebung von 6.4 ppm für die Wasserstoffatome der NH-Gruppe. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im **Kapitel 6.2.2** angegeben, während die entsprechenden Spektren im Anhang dargestellt sind.

3.2.1.3 Acetazolamid basierte Konjugate

Eine weitere interessante Verbindung zur Modifizierung des Betulins ist Acetazolamid, ein an ein 1,3,4-Thiadiazol gebundenes Sulfonamid, welches zu den Carboanhydrase-Hemmer der ersten Generation zählt. Acetazolamid findet bereits klinische Anwendung als Antiglaukom^{68, 79, 150}, bei der Behandlung von zu hohem Augeninnendruck und als Antikonvulsiva (Behandlung von epileptischen Anfällen). Außerdem bewiesen Imiela *et al*¹⁵¹, dass eine geringe Zugabe von Acetazolamid bei einer Residenz gegenüber herkömmlichen Diuretika (Arzneimittel zur Förderung der Harnausscheidung bei Einlagerungen von Wasser im Körper) einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung zeigten¹⁵¹⁻¹⁵³. Die Überbelastung des Herzens, welche durch starke Wassereinlagerungen hervorgerufen wird, ist ein oft vorkommendes Problem bei Herzerkrankungen. Ein großer Vorteil der Zugabe von Acetazolamid liegt in der raschen Aufnahme nach oraler Verabreichung. So konnte ein Maximum des Wirkstoffes

2 Stunden nach Gabe im Plasma nachgewiesen werden, die Halbwertszeit lag bei 4 bis 8 Stunden¹⁵³. Schon in den 1940er Jahren berichteten Mann *et al.* von dem harntreibenden Effekt des Acetazolamids, welches sie mit der Hemmung der Carboanhydrase begründen lässt¹⁵⁴. Carboanhydrasen sind in den Nieren in einer beträchtlichen Menge vorhanden, sodass diese in mindestens zwei physiologischen Prozessen eine immense Rolle spielen. So sind sie verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der säurehaltigen Homöostase (durch Aufnahme oder Ausscheidung von Protonen) und der Resorption des Bicarbonates, welches dem Blutkreislauf rückgeführt wird. Gezeigt ist der Mechanismus ohne Einsatz von Diuretika in **Abbildung 23a**.

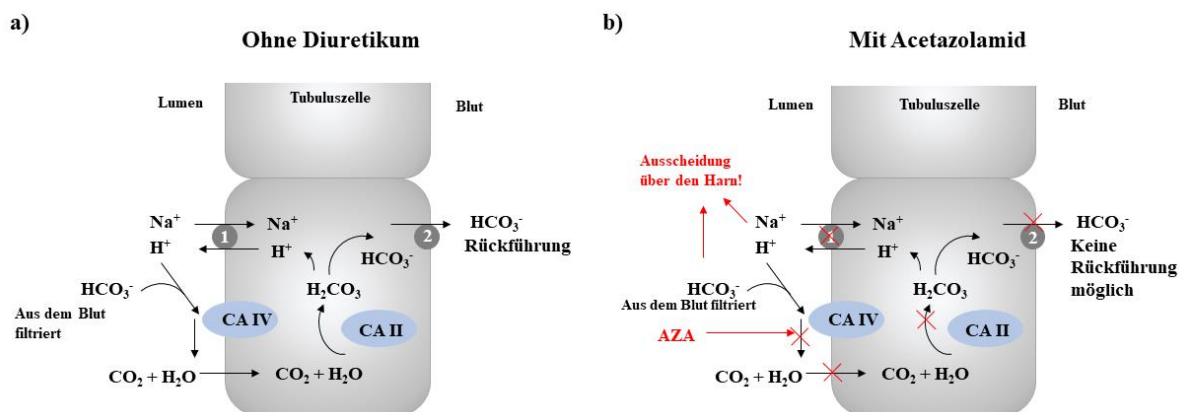
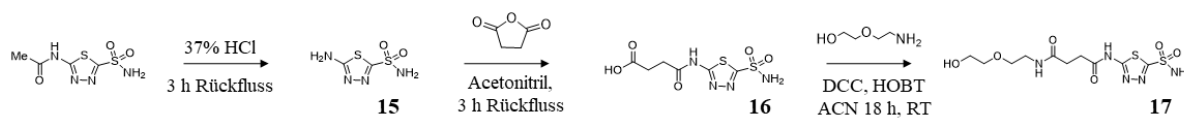


Abbildung 23. Schematischer Transportmechanismus im proximalen Tubulus der Nieren. In a) ist dabei im Speziellen die Umsetzung des aus dem Blut filtrierten Bicarbonates gezeigt, welches mit Hilfe der CA IV und Protonen zu CO_2 und H_2O umgesetzt und in die Tubuluszellen zurückgeführt wird. Dort findet eine zweite, durch die CA II, katalysierte Reaktion zu Protonen, welche im Austausch gegen Na^+ nach Außen transportiert werden und dem Bicarbonat, welche dem Blut zurückgeführt werden, statt. b) nach Zufuhr von Acetazolamid kommt es zur Hemmung der CA IV. In Folge kommt es zu einer deutlichen Senkung von H_2CO_3 in der Tubuluszelle. Weniger Protonen stehen zum Austausch von Na^+ zur Verfügung.

Hemmt man die Carboanhydrase, so kommt es neben einer Erhöhung des pH-Wertes ebenfalls zu einer Erhöhung der Urinmenge. Nach Aufnahme des Diuretikas kommt es rasch zu einer verminderten Bildung von H_2CO_3 in der Tubuluszelle. Als Folge dessen stehen weniger H^+ -Ionen zum Austausch gegen Na^+ -Ionen zur Verfügung; es kommt auf Grund einer erhöhten Natriumkonzentration im Primärharn zu starken Verdünnungseffekten und somit zu einer verstärkten Ausscheidung von Wasser. Die nun im Tubuluslumen fehlenden H^+ -Ionen führen zur verminderten Bildung von Kohlensäure, da eine Reaktion mit dem vorhandenen Bicarbonat ausbleibt. Sowohl das Fehlen von Protonen, als auch eine erhöhte Konzentration an HCO_3^- sorgen anschließend für einen basischeren pH-Wert des Urins. Wie schon zuvor beschrieben, soll das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit jedoch auf der Therapie von Tumoren mit einem erhöhten CA IX-Expressionslevel liegen. Dabei ist bekannt, dass bei Patientinnen mit Mammakarzinomen und anderen Tumorformen ein stark erhöhtes CA IX-Expressionslevel, verbunden mit Hypoxie und einer schlechten Prognose, vorliegt¹⁰⁸. Oftmals damit assoziiert sind Malignität, ein starkes Wachstum des tumorösen Gewebes und eine Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung. Acetazolamid führt unmittelbar nach Verabreichung zu einer Übersäuerung und Schwächung des Tumors. Eine Schwächung mittels CA IX-Inhibierung (durch weniger zytotoxische Wirkstoffe, welche sehr geringe Nebenwirkungen hervorrufen; siehe $\text{LD}_{50}(\text{Maus}) = 4300\text{mg/kg}$ ¹⁵⁵), könnte die Möglichkeit für die Überwindung der zuvor beschriebenen Strahlenresistenz sein. Basierend auf diesem Wissen, war eines der Ziele dieser Arbeit, verschiedene Acetazolamid-verknüpfte Derivate sowohl mit, als auch ohne Betulin zu synthetisieren. Gezeigt ist das Syntheschema der Acetazolamid-basierten Konjugate (ohne Betulin) in **Schema 4**. Um eine reaktive Kupplungsstelle am Acetazolamid zu generieren, wurde im ersten Schritt der Synthese, Acetazolamid in 37 %iger HCl unter Rückfluss erhitzt, um so die Acetamid-Gruppe zu spalten.



Schema 4. Schematische Darstellung der Entschüttung von Acetazolamid zu 5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid **15** und die weitere Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid zu **16**. In einem weiteren Schritt wurde **16** mit Diglycolamin zu **17** umgesetzt.

Das reine Produkt **15** wurde mit einer Ausbeute von rund 60 % aus Essigsäureethylester umkristallisiert. An diese konnte im zweiten Schritt ein Bernsteinsäureester angebracht werden, wobei **16** als Produkt entstanden ist. Dazu wurde **15** mit Bernsteinsäureanhydrid in Acetonitril für 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt, nach Beenden der Reaktion auf Raumtemperatur gekühlt und das entstandene Produkt abfiltriert. In einem letzten Schritt konnte Diglycolamin an die zuvor aktivierte Carbonsäure von **16** (Kupplung mittels DCC, HOBT) angebracht werden. Dafür wurde **16** in Acetonitril gelöst und DIPEA, DCC und HOBT hinzugegeben und für 10 min bei RT gerührt. Die aktivierte Carbonsäure wurde anschließend tropfenweise zu einer Lösung aus Diglycolamin und Acetonitril bei 0 °C gegeben und für weiter 18 Stunden bei RT gerührt. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von AZA mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **15**, **16** und **17** überprüft. Zu sehen ist dies in **Abbildung 24** und **Abbildung 25**.

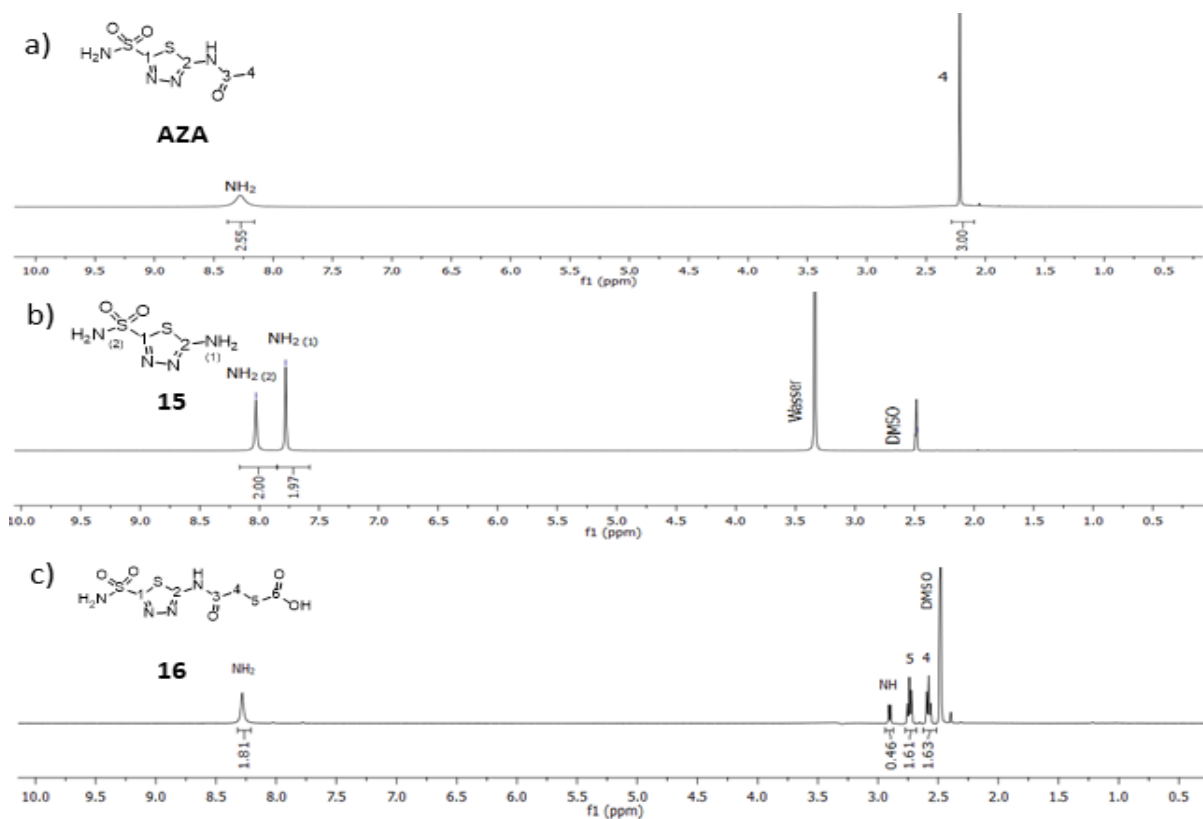


Abbildung 24. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von a) Acetazolamid b) 5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid **15**, c) 5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid-hemisuccinat **16**

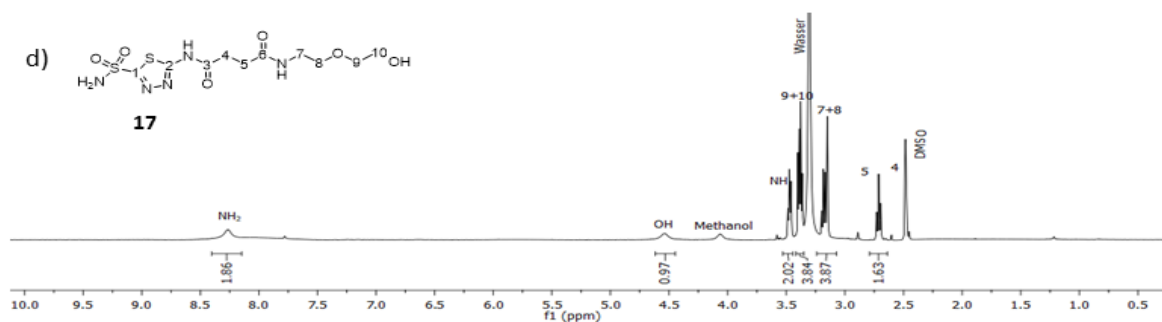
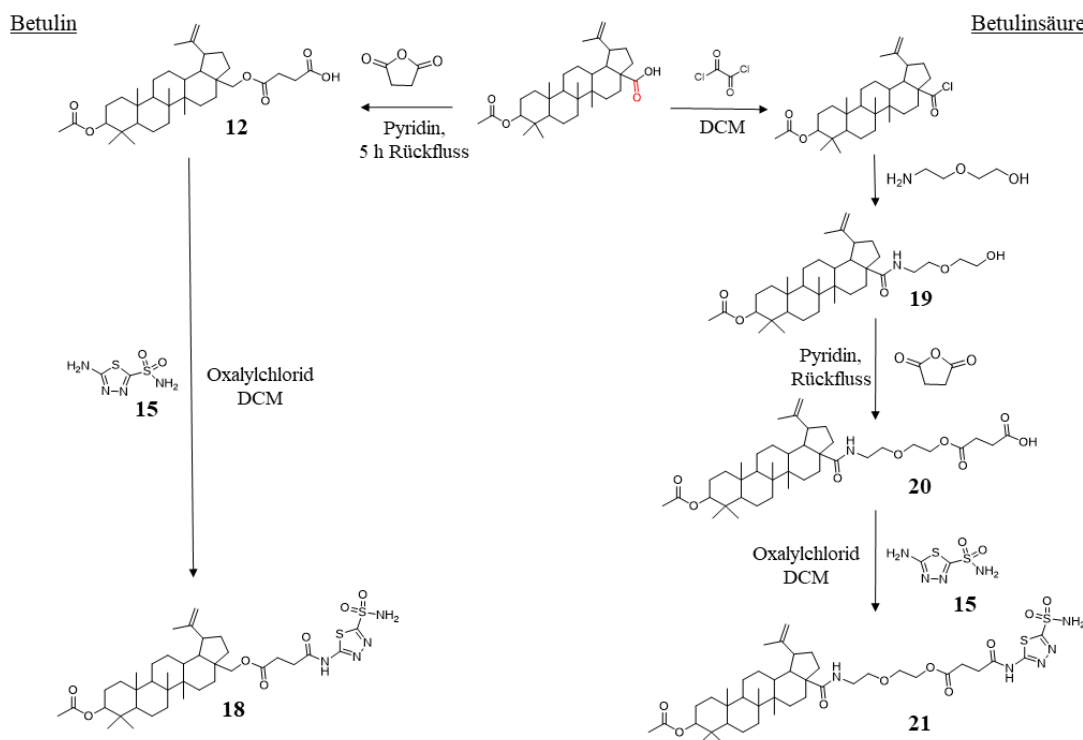


Abbildung 25. ^1H -NMR-Spektrum von d) 5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid-hemisuccinat-aminodiethylenglycol **17**.

Alle in **Abbildung 24** und **Abbildung 25** gezeigten Spektren wurden für einen besseren Vergleich in deuteriertem Dimethylsulfoxid aufgenommen. Nach dem Entfernen der Acetamid-Gruppe im ersten Schritt durch Kochen des Acetazolamids (AZA) in 37 %iger HCl, ist eine deutliche Veränderung im ^1H -NMR-Spektrum von **15** im Vergleich zu **AZA** zu erkennen. Das Signal der Wasserstoffatome der entfernten Methylgruppe bei einer Verschiebung von 2.20 ppm ist gänzlich verschwunden und dafür ist ein Signal bei einer Verschiebung von 7.78 ppm hinzugekommen, welches der nun freien NH_2 -Gruppe entspricht. Im zweiten Schritt wurde das entschützte Acetazolamid mit Bernsteinsäureanhydrid in Acetonitril umgesetzt. Das entstandene Produkt war nur begrenzt in Acetonitril löslich, sodass dieses nach Beenden der Reaktion mit einer Ausbeute von 73 % abfiltriert werden konnte. Das ^1H -NMR-Spektrum von **16** im Vergleich zu **15** bestätigt das Gelingen dieser Synthese; neben der Eliminierung des Signales der zuvor hinzugekommenen NH_2 -Gruppe bei einer Verschiebung von 7.78 ppm, sind auch deutliche Signale bei einer Verschiebung von 2.58 ppm (C4) und bei 2.74 ppm (C5) zu erkennen. Ebenfalls gut zu sehen ist das Signal der entstandenen NH -Gruppe bei einer Verschiebung von 2.90 ppm. Im letzten Schritt dieser Synthese wurde an die zuvor angeknüpfte Bernsteinsäure das Diglycolamin, über eine Kupplungsreaktion mit DCC und HOBT, angebracht. Das entsprechende ^1H -NMR-Spektrum von **17** ist in **Abbildung 25** dargestellt und konnte ebenfalls mit dem Ausgangsstoff **16** verglichen werden. Durch das Anbringen des Diglycolamins an der Bernsteinsäure kommt es zur Bildung eines Amins, spiegelverkehrt zu der Knüpfungsstelle der Bernsteinsäure an **15**. Dadurch kommt es, aufgrund des identischen Umfelds von C4 und C5 zur Verschiebung der Signale der Wasserstoffatome am C4 und C5 ausgehend von einer Verschiebung bei 2.58 ppm (C4) und bei 2.74 ppm (C5) bei **16**, zu einem Multiplett bei einer Verschiebung von 3.15 ppm. Zusätzlich zu den Signalen der Bernsteinsäure, sind bei **17** sowohl die Signale bei einer Verschiebung von 3.40 ppm für die Wasserstoffatome am C9 und C10 erkennbar, als auch das Hinzukommen zweier Signale, zum einen bei 2.71 ppm (C7) und bei 3.47 ppm (C8). Auch sehr deutlich zu sehen ist ein breiten Signals bei einer Verschiebung von 4.54 ppm, welches dem Signal des Wasserstoffes der Hydroxylgruppe zugeordnet werden kann.

Wie im oberen Abschnitt bereits beschrieben, sollte auch bei hier untersucht werden, ob es möglich ist, eine Konjugat zu entwickeln, welches zuerst an die Carboanhydrase andockt und anschließend durch Spaltung die cytotoxische Gruppe freisetzt, während die Bindegruppe weiterhin das Enzym blockiert. Neben der schon zuvor beschriebenen Dicarbonsäure (Bernsteinsäure), wurde zusätzlich Diglycolamin als Verlängerung eingesetzt. Aufgrund der enthaltenen Sauerstoffatome im Linker soll so eine verbesserte Wasserlöslichkeit erzielt werden. Die komplette Synthesestrategie ist in **Schema 5** gezeigt.



Schema 5. Syntheseweg für die gezeigten Acetazolamid-Betulin(säure)-Derivate **3 18** und **21** mit den jeweiligen Vorstufen **12**, **19** und **20**.

Für die Anbringung von **15** an das Betulin, wurde dieses zuvor mit Bernsteinsäureanhydrid zu **12** umgesetzt. Der entstandene Bernsteinsäureester konnte anschließend mit Oxalylchlorid in Dichlormethan (und DMF als Katalysator) bei Raumtemperatur zum Säurechlorid umgesetzt werden, welches durch Zugabe von **15** direkt zu **18** weiterreagieren konnte. Die erfolgreiche Synthese konnte durch den Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums von **18** mit dem von **12** bestätigt werden. Zu sehen ist dies in **Abbildung 26**.

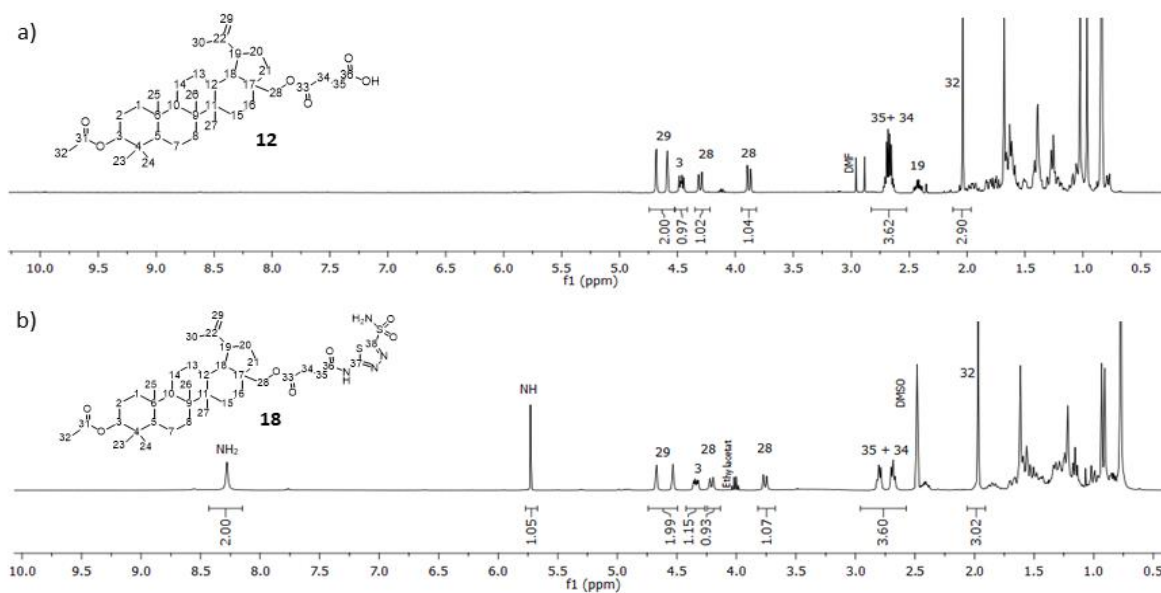


Abbildung 26. ^1H -NMR-Spektrum von a) 3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat **12**, und b) 3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid **18**.

Alle in **Abbildung 26** gezeigten Spektren wurden für einen besseren Vergleich in deuteriertem Dimethylsulfoxid aufgenommen. Nach dem erfolgreichen Anbringen von **15** an die zuvor chlorierte Bernsteinsäure von **12** kommt es auf Grund der nicht mehr identischen Nachbaratome des C34 und C35 zu einer Aufspaltung der Signale der Wasserstoffatome am C34 und C35 von 2.68 ppm (für beide) zu einer Verschiebung von 2.67 ppm für die Wasserstoffe am C35 (geringere Abschirmungseffekte durch den Stickstoff im Vergleich zum Sauerstoff) und 2.82 ppm für die Wasserstoffe am C34. Auch die Signale der Wasserstoffatome beider Stickstoffatome sind sehr gut erkennbar, mit einer Verschiebung von 8.28 ppm für die Wasserstoffatome der NH₂-Gruppe und einer Verschiebung von 5.68 ppm für die Wasserstoffatome der NH-Gruppe. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im **Kapitel 6.2.3** angegeben, während die entsprechenden Spektren im **Anhang 8.3** dargestellt sind.

Eine zweite Möglichkeit für die Entwicklung von Betulin(säure)-Acetazolamid-Konjugaten bestand in der Anbringung des entschützten Acetazolamids (5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid) an die Betulinsäure. Für das Erreichen eines größeren Abstandes zwischen dem Wirkstoff (in diesem Fall die Betulinsäure) und dem CA IX-Inhibitor (Acetazolamid) wurde bei diesem Syntheseweg Diglycolamin als polare Kette eingefügt. Dazu wurde im ersten Schritt die freie Hydroxylgruppe der Betulinsäure durch Acetylierung geschützt. Die isolierte Acetylbetulinsäure konnte anschließend mit Oxalylchlorid in trockenem Dichlormethan zum wesentlich reaktiveren Carbonsäurechlorid umgesetzt werden. Diese wurde anschließend bei T = 0 °C langsam zu Diglycolamin, gelöst in trockenem Dichlormethan, hinzugegeben. Durch das Senken der Reaktionstemperatur und dem langsam Hinzugeben sollte der nicht gewünschte und weniger reaktive nucleophile Angriff des Elektronenpaares der Hydroxylgruppe unterdrückt werden. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums von **19** mit dem ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **9** überprüft. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im **Kapitel 6.2.3** angegeben, während die entsprechenden Spektren im **Anhang 8.3** dargestellt sind.

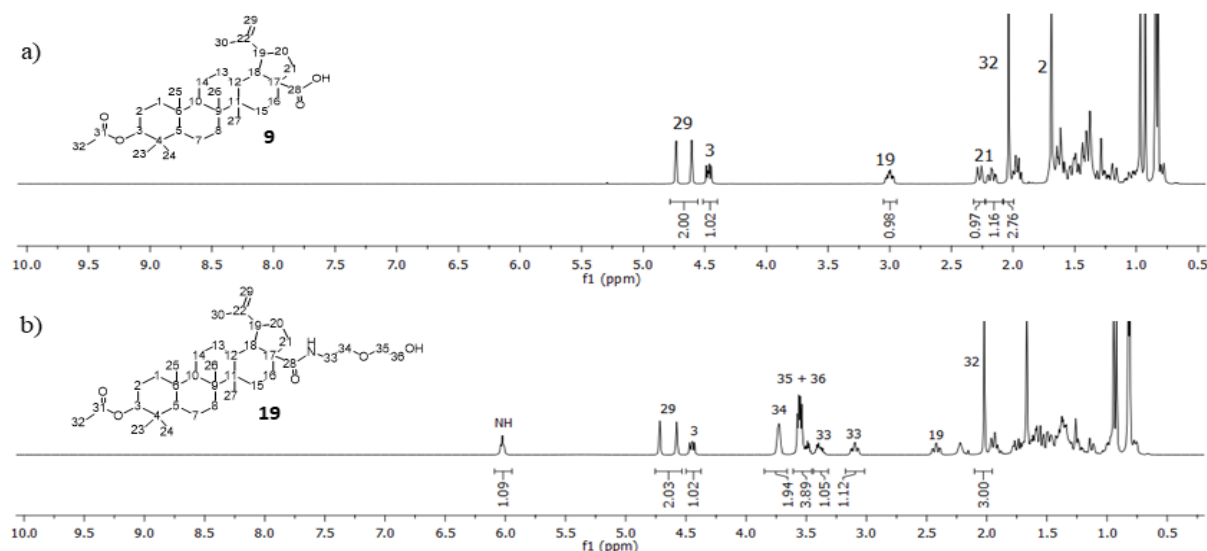


Abbildung 27. ¹H-NMR-Spektrum von a) 3-O-Acetylbetulinsäure **9**, und b) 3-O-Acetylbetulinsäure-aminodiethylenglycol-amid **19**.

Das in **Abbildung 27b** gezeigte ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **19** bestätigt die erfolgreiche Synthese dieser. Bei dem Vergleich von **19** mit dem ¹H-NMR-Spektrum der Acetylbetulinsäure (**9**) fällt deutlich auf, dass in einem Bereich von 3.0 ppm - 4.0 ppm die Signale der vier CH₂-Gruppen vom Diglycolamin hinzugekommen sind. Genauer betrachtet, findet man die Signale der Wasserstoffatome am C33 bei einer Verschiebung von 3.09 ppm und 3.40 ppm. Die Signale der Wasserstoffatome am C34 sind zu deutlich höheren ppm (3.7 ppm) verschoben, da der benachbarte Sauerstoff vom C34 einen stärkeren entschirmenden Effekt auf diese ausübt.

Des Weiteren sind die Signale vom *H35* und *H36* bei einer Verschiebung von 3.55 ppm zu finden, welche durch die auf beiden Seiten benachbarten Sauerstoff keine Aufspaltung erfahren. Auch sehr signifikant ist das Signal bei einer Verschiebung von 6.02 ppm, welches dem Wasserstoff der NH-Gruppe zugeordnet werden kann. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich hauptsächlich das NH-gebundene Derivat gebildet hat. Die nun zur Verfügung stehende Hydroxylgruppe des Diglycolamin konnte in einem nächsten Schritt mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt werden.

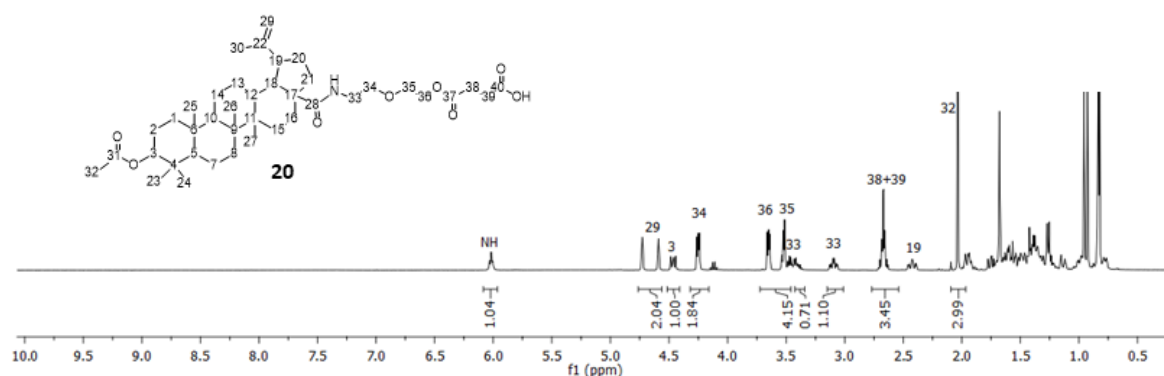


Abbildung 28. ^1H -NMR-Spektrum von 3-O-Acetylbetulinsäure-aminodiethylenglycol-amid-hemisuccinat **20**.

Dazu wurden alle Reaktionspartner für mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt und nach Beenden der Reaktion das Gemisch in Essigsäureethylester aufgenommen, bevor die organische Phase mit Wasser gewaschen werden konnte. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums von **20** mit dem ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **19** überprüft. Neben den schon zuvor beschriebenen Signalen von **19**, sind nach Anbringung der Bernsteinsäure, die Signale der Wasserstoffatome beider CH_2 -Gruppen deutlich zu erkennen, welche bei einer Verschiebung von 2.66 ppm zu finden sind. Dies entspricht dem Signal von *H37* und *H38* in **Abbildung 28**. Im letzten Schritt erfolgte dann das Anbringen von **15** an Verbindung **20**. Auch hier wurde, wie schon bei der Synthese von **18**, zuvor das deutlich reaktivere Carbonsäurechlorid, welches durch Umsetzung von **20** mit Oxalylchlorid in trockenem Dichlormethan (und DMF als Katalysator), hergestellt, an diese im Anschluss **15** angebracht werden konnte. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums von **20** mit dem ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **21** überprüft.

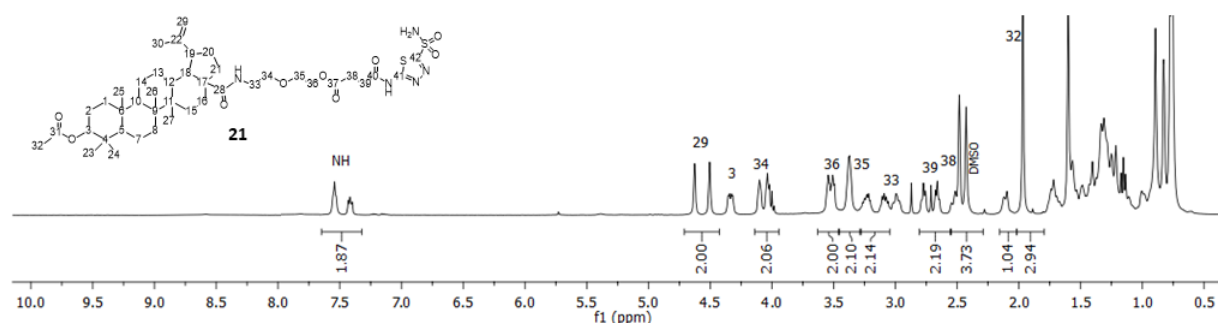


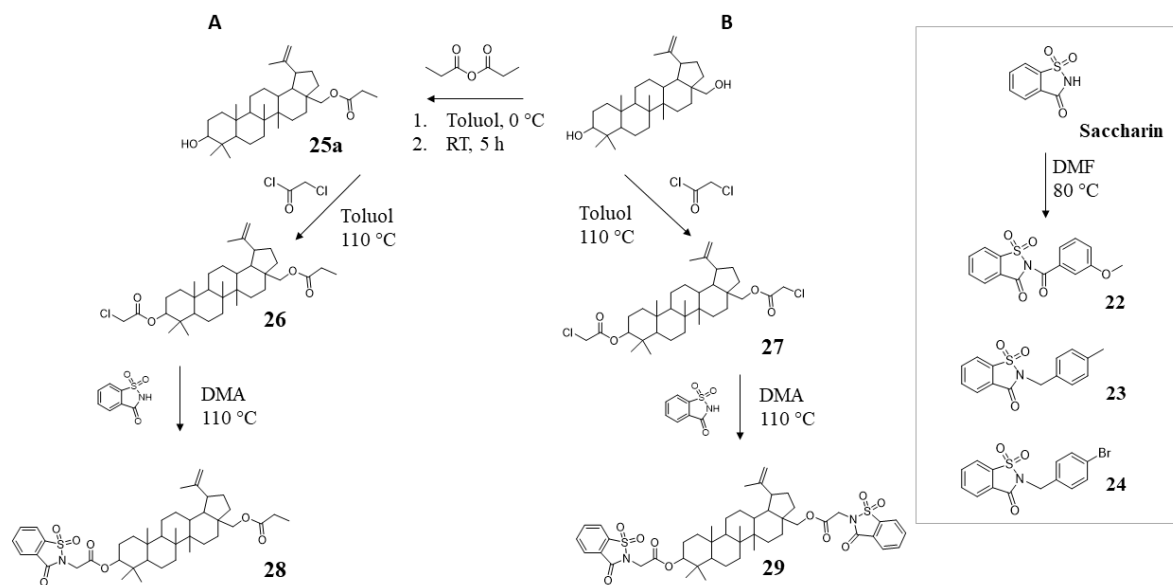
Abbildung 29. ^1H -NMR-Spektrum von 3-O-Acetylbetulinsäure-aminodiethylenglycol-amid-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid **21**.

Auf Grund der erhöhten Polarität von **21**, wurde dieses, anders als Verbindung **20**, in deuteriertem DMSO aufgenommen. Aus diesem Grund sind die Signale der Wasserstoffe beider NH-Gruppen (der bereits vorhandenen von **20** und der bei erfolgreicher Synthese von **21** zusätzlichen) bei einer Verschiebung von 7.53 ppm und 7.40 ppm. Wie schon bei der Untersuchung von **18** mittels ^1H -NMR-Spektroskopie, ist auch bei **21** zu beobachten, dass es nach Anbringung von **15** an **20** zu einer Aufspaltung der Signale der Wasserstoffatome am C38 und C39 kommt. So sind diese bei Verbindung

20 bei einer Verschiebung von 2.79 ppm und bei Verbindung **21** bei einer Verschiebung von 2.79 ppm (C38) und 2.66 (C39) zu finden.

3.2.1.4 Saccharin als funktionelle Gruppe

Saccharin ist bekannt als erster und ältester synthetisch hergestellter Süßstoff. 1878 entdeckten die Chemiker Fahlberg und Remsen die Synthese von Saccharin über eine Oxidation von *o*-Toluolsulfamid, wie im gleichnamigen Artikel beschrieben¹⁵⁶. Neben einer 700fach stärkeren Süßkraft als Glukose, konnte nachgewiesen werden, dass Saccharin eine antimikrobielle Wirkung zeigt¹⁵⁷. Aus diesem Grund findet Saccharin eine breite Anwendung bei der Herstellung von Zahnpasta und anderen Zahnpflegeprodukten. Neben der allgemein geläufigen Verwendung als Süßstoff, steigt zunehmend das Interesse von Saccharin als Carboanhydrase IX und XII-Inhibitor. Saccharin wird in den meistens Fällen als Natriumsalz verwendet, bestehend aus einem Sulfid und einem Lactam, welches ein zyklisches Sulfonamid bilden. Klassische Carboanhydrase-Inhibitoren, wie beispielsweise die zuvor beschriebenen Sulfamate und Sulfonamide interagieren durch Komplexierung des aktiven Zinkzentrums der Carboanhydrase mit dem Enzym⁹³. Carradori *et al.* konnte dem entgegen zeigen, dass die Wirkungsweise von Saccharin auf einem anderen Mechanismus beruht. Ausgehend von ausführlichen *docking* Untersuchungen konnten die Arbeitsgruppe um Carradori zeigen, dass keine der untersuchten Saccharinderivate direkt mit dem Zn^{2+} -Ion der Carboanhydrase IX interagiert¹⁵⁸. Desto erstaunlicher sind die kleinen k_i -Werte im nM-Bereich. Eine Erklärung dafür wären elektrostatische Wechselwirkungen, welche eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums des Enzyms bewirken. Da Saccharin und einige Derivate des Saccharins bei der Inhibierung der Carboanhydrase IX sehr vielversprechende Ergebnisse zeigten, war ein Ziel dieser Arbeit die Synthese eines Saccharin-Betulin-Konjugates, welches sowohl als CA IX Inhibitor, als auch als Zytostatika in Tumorzellen fungiert. Eine Übersicht der hergestellten Saccharin-Betulin-Konjugate ist in **Schema 6** dargestellt.



Schema 6. Syntheseweg für die gezeigten Saccharin-Betulin-Derivate **28** und **29** mit den jeweiligen Vorstufen **25a**, **26** und **27**, sowie der vereinfachte Syntheseweg der modifizierten Saccharin-Derivate ohne Betulin **22**, **23** und **24**.

Für das Anbringen des Saccharins an das Betulin musste für die Bereitstellung eines reaktiven Halogens zuvor Chloressigsäurechlorid angebracht werden. Hierbei wurden zwei verschiedene Synthesestrategien angewandt. Bei der ersten Variante wurde vor der Veresterung mit Chloressigsäurechlorid zuvor die C28-Position des Betulins mit Hilfe eines Propionsäureesters geschützt, sodass die Veresterung des

Chloressigsäurechlorids nur an der C3-Position des Betulins möglich war. Dafür wurde Betulin zusammen mit DMAP als Katalysator und Triethylamin in DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde langsam Propionsäureanhydrid zugegeben und die Reaktion bei RT für weitere 5 Stunden gerührt. Neben Betuliny-28-propionat (**25a**), entstand auch zum geringen Teil das zweifach substituierte Derivat. Durch Verwenden von 1 eq. Propionsäureanhydrid konnte die Reaktion auf Seiten des einfach substituierten Derivates gebracht werden. Für die Synthese von **26** wurde Betulin zusammen mit Chloressigsäurechlorid in DMA gelöst und für zwei Stunden auf 90 °C erhitzt. Aufgrund des Säurechlorids, mit Chlorid als sehr gute Abgangsgruppe, lief die Reaktion sehr schnell und in qualitativen Ausbeuten ab. Auf gleiche Weise wurde auch die zweite Synthesvariante von **27b** durchgeführt, bei der das ungeschützte Betulin mit Chloressigsäurechlorid, umgesetzt wurde. Im letzten Schritt konnte anschließend Saccharin in Gegenwart von Kaliumcarbonat in DMA an **26** bzw. **27b** gekoppelt werden. Bei dem letzten Schritt konnten Ausbeuten zwischen 17 % (**29**) und 52 % (**28**) erreicht werden. Eine Verbesserung der Ausbeute könnte durch den Einsatz eines anderen Lösungsmittels oder einer längeren Reaktionsdauer erzielt werden. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums von **25a** mit dem ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung **26** und **28** (Schema 1) überprüft. Dabei wurde CDCl₃ als Lösungsmittel verwendet. Eine vollständige Charakterisierung aller Verbindungen ist im Kapitel 6.2.5 angegeben, während die entsprechenden Spektren im Anhang 8.4 dargestellt sind.

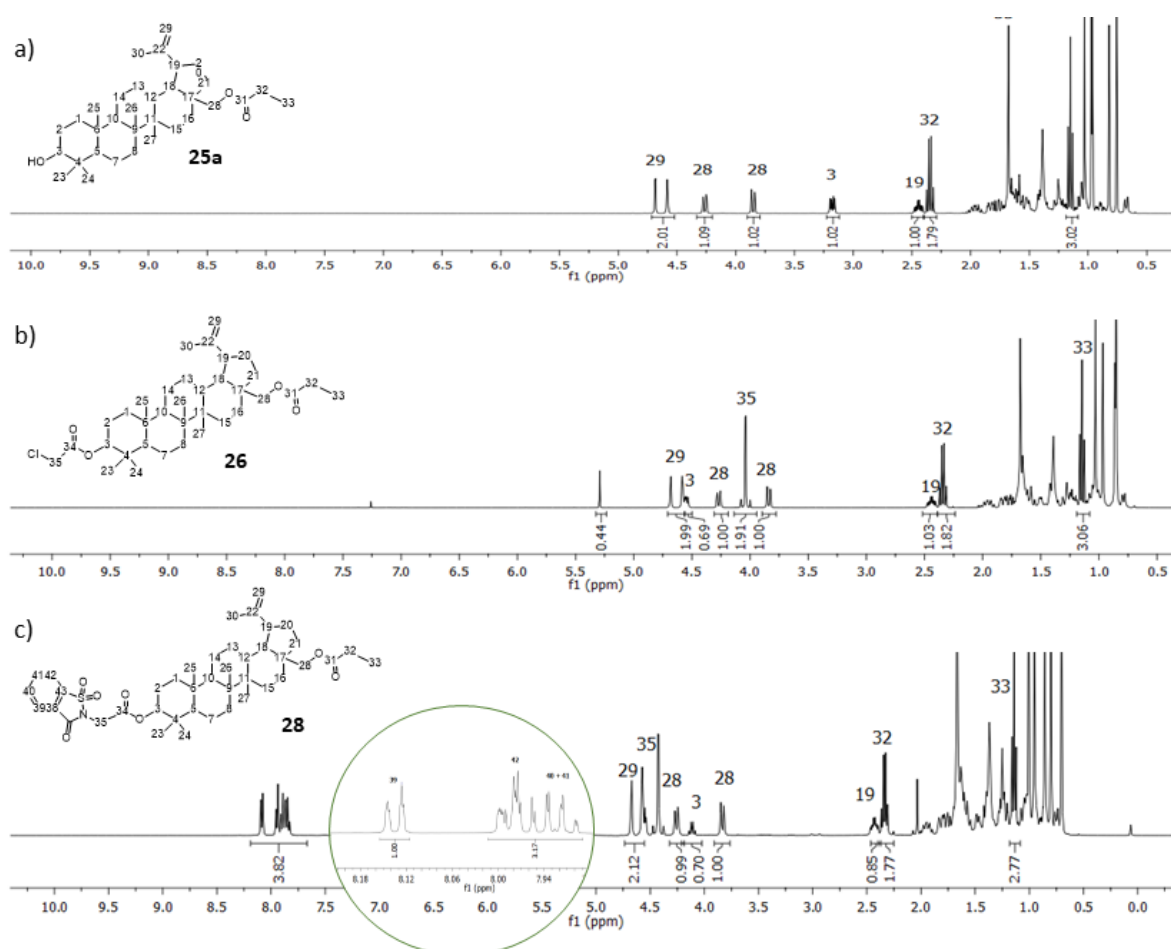


Abbildung 30. ¹H-NMR-Spektrum von a) Betuliny-28-propionat **25a**, b) Betuliny-3-chloroacetat-28-propionat **26** und c) Betuliny-3-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat **28** als Beispiel eines Saccharin-Betulin-Derivates.

Da beide aufgezeigten Varianten (**Schema 6**) der Synthese der Saccharin-Betulin-Konjugate sehr ähnlich ablaufen, wird in diesem Teil der Arbeit nur auf einen der beiden Synthesewege eingegangen. Gezeigt ist dabei in **Abbildung 30** die ^1H -NMR-Analyse des Syntheseweges **A** mit der Einführung einer Schutzgruppe am C28 und der gezielten Anbringung des Saccharins an der C3-Position des Betulins. Nach Anbringung einer Propionatschutzgruppe ist auch bei **25a** eine Tieffeldverschiebung der Wasserstoffsignale am C28 zu höheren Verschiebungen von 3.87 ppm und 4.28 ppm zu erkennen. Auch sind deutlich die Signale (Multipllett bei 2.33 ppm) der Wasserstoffatome vom C32 und die vom C33 (Triplett bei 1.15 ppm) zu sehen. Auch nach der Reaktion von **25a** mit Chloressigsäurechlorid zu **26** sind diese Signale noch zu sehen. Lediglich ein Signal, das der Wasserstoffatome am C35 bei 4.04 ppm, kommt nach der Synthese von **26** hinzu. Dieses ist durch die starke Elektronegativität und der damit verbundene Entschirmung des Chlors stark ins Tieffeld verschoben. Dieser Effekt übt sich ebenfalls auf das Signal des Wasserstoffes am C3 aus, sodass dieses bei chemischen Verschiebungen von 4.59 ppm zu finden ist. Dieser Effekt ist nach Anbringung des Saccharins an **26** nicht mehr zu sehen, sodass das Signal der Wasserstoffe am C3 von **28** bei einer Verschiebung von 4.09 ppm zu finden ist. Ein weiterer Hinweis auf die erfolgreiche Synthese von **28** sind die Signale der vier Wasserstoffe des aromatischen Systems vom Saccharin, welche bei chemischen Verschiebungen von 7.84 - 8.04 ppm zu finden sind. Für einen besseren Abgleich der gemessenen enzymkinetischen Daten, auf welche in **Kapitel 3.2.3** genauer eingegangen werden soll, wurden drei bereits Literatur bekannte Derivate des Saccharins synthetisiert und als Referenz verwendet. Da auch diese Synthesen von **22** - **24** analog ablaufen, wird an dieser Stelle nur auf die Synthese und das ^1H -NMR-Spektrum von **24** genauer eingegangen. Dazu wurde Saccharin in trockenem DMF gelöst und 1 eq. Kaliumcarbonat zu der Lösung hinzugegeben. Nach weiteren 5 Minuten erfolgte anschließend die Zugabe von 2 eq. 4-Bromobenzylbromid. Das Reaktionsgemisch wurde für 72 h auf 80 °C erhitzt und nach Beenden der Reaktion aufgereinigt. Die erfolgreiche Synthese wurde durch den Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums von **Saccharin** mit dem ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **24** (**Schema 6**) überprüft.

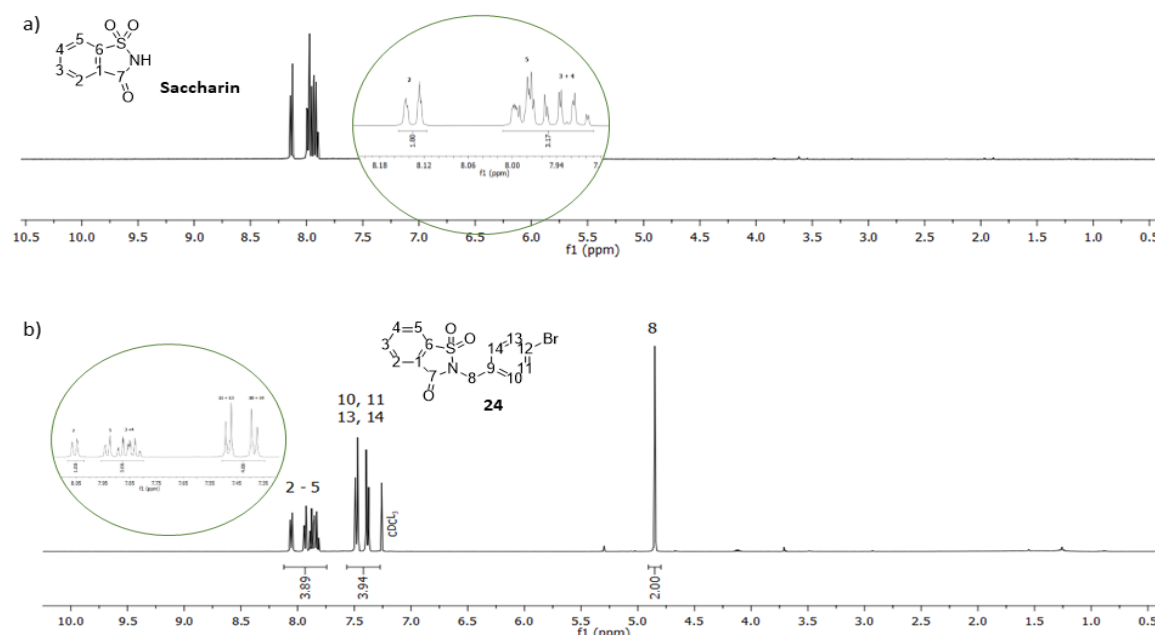


Abbildung 31. ^1H -NMR-Spektrum von a) Saccharin und b) 2-(4-bromobenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid **24**.

Gezeigt ist in **Abbildung 31** das ^1H -NMR-Spektrum der Modifizierung von Saccharin mit 4-Bromobenzylbromide zu Verbindung **24**. Neben den Signalen des Saccharins, welche sich in einem Bereich von 7.9 - 8.2 ppm befinden, sind in b) weitere Signale in einem Bereich von 7.3 - 7.5 ppm zu

sehen. Bei genauerer Betrachtung können diese den Wasserstoffatomen von *C10* - *C14* zugeordnet werden. Durch den abschirmenden Effekt des Broms sind die Signale von *H11* und *H13* minimal zu höheren chemischen Verschiebungen verschoben. Desweiteren kommt bei einer chemischen von 4.85 ppm ein *Singulett* hinzu, welcher den zwei Wasserstoffatomen am *C8* zugeordnet werden konnten.

3.2.2 Bestimmung der Zytotoxizität

Um eine Einschätzung zu bekommen, in welchem Maße Substanzen die Fähigkeit haben, maligne Zelllinien in Ihrem Wachstum zu beeinflussen, musste die Zytotoxizität dieser zunächst getestet werden. Für die *in vitro* Testung wurden immortalisierte, maligne Zellkulturen für einen definierten Zeitraum (96 Stunden) mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Substanzen behandelt und das Wachstum im Vergleich zu einer unbehandelten Probe betrachtet. Zur Identifizierung des Zellwachstums in Abhängigkeit verschiedener Substanzen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene kolorimetrische Methoden verwendet. Bei dem ersten Assay handelt es sich um den MTT-Assay, welcher von Mosmann¹⁵⁹ im Jahre 1983 erstmals veröffentlicht wurde und bis zur Entdeckung des SRB-Assays einer der wichtigsten Tests zur Bestimmung der Zytotoxizität war. Im Gegensatz zum SRB-Assay wird hier der Farbumschlag des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes (MTT) durch die mitochondriale Reduktase zu einem wasserunlöslichen Formazan beobachtet (**Abbildung 32**). Dieser Farbumschlag beruht auf der Fähigkeit der Zellen, den eingesetzten Farbstoff aktiv in den Mitochondrien zu verstoffwechseln, wodurch neben der Aussage, der vital-tot-Unterscheidung, auch eine Aussage über die Funktionalität der Mitochondrien getroffen werden kann. Trotz dieser Erkenntnis ist der MTT-Assay weniger verbreitet, da es zwischen den verwendeten Zelllinien starke Unterschiede in der Fähigkeit, MTT zu reduzieren, gibt. Ein zweiter Test, der SRB-Assay, beruht auf der Feststellung von vitalen Zellen durch Anfärben verbleibender Proteine mit dem Farbstoff Sulforhodamin B, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 565$ nm liegt. Da das Anfärben unabhängig von der Vitalität der Zellen ist, müssen tote Zellen zuvor abgetrennt werden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärenz Zellen. Kommt es zum Tod der Zellen, lösen diese sich ab und können durch Verwerfen des alten Mediums entfernt werden. Der SRB-Assay wurde erstmals 1990 von P. Skehan¹⁶⁰ *et al.* publiziert und ist bis heute einer der meist verwendeten Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität.

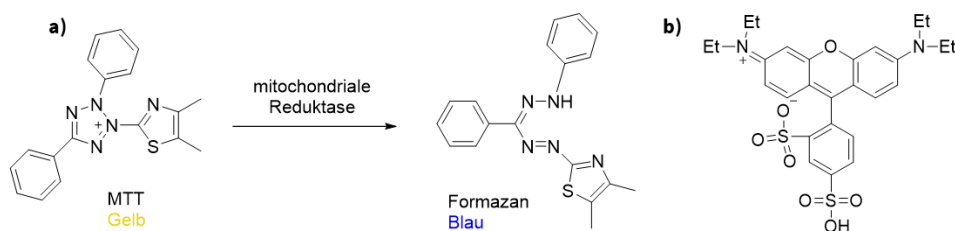


Abbildung 32: Darstellung a) des Umsatzes von MTT zu Formazan nach Zugabe von MTT zu Zellen mit funktionierendem Stoffwechsel und b) die Strukturformel des im sauren Milieu an Proteine bindenden Farbstoffs, Sulforhodamin B (SRB).

Als Ergebnis resultiert bei beiden Methoden ein relatives Zellwachstum in Abhängigkeit der eingesetzten Wirkstoffkonzentration, die sogenannte Dosis-Wirkungs-Beziehung. Anhand dieser Auftragung konnte die IC_{50} -Konzentration ermittelt werden. Die IC_{50} -Konzentration ist die Konzentration, bei der noch 50 % des relativen Zellwachstums vorhanden ist. Neben der Bestimmung der inhibitorischen Konzentration wurde in dieser Arbeit auch die Selektivität der Wirkstoffe untersucht. Die Selektivität zeigt an, ob die getesteten Substanzen eine bevorzugte Wirkung auf die Hemmung des Wachstums von Tumorzelllinien hervorrufen, oder ob sie eher einen ungewollten Einfluss auf das Wachstum von Normalzellen (Fibroblasten) ausüben. Dazu wurden alle Wirkstoffe sowohl an humanen und *equinen* Tumorzelllinien, als auch an Normalzellen, Fibroblasten (Maus/*equine*), getestet.

3.2.2.1 Zytotoxizität an humanen Zelllinien

Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung wurde die IC_{50} -Werte von allen synthetisierten Substanzen nach einer Behandlungsdauer von 96 Stunden, an vier verschiedenen Zelllinien, drei humane Tumorzelllinien und eine Normalzelllinie (Maus Fibroblasten), untersucht. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um die A375 (humanes Melanom), MCF7 (humanes Mammkarzinom), A2780 (humanes Ovarialkarzinom) und NIH3T3 (Mausfibroblast). Das Verwenden einer Normalzelllinie, in diesem Fall das Verwenden der Zelllinie NIH3T3, erlaubt anschließend die Bestimmung der Selektivität der Wirkstoffe. Für die Bestimmung der Zytotoxizität an humanen Zelllinien wurde ausschließlich der SRB-Assay verwendet, bei dem die zuvor ausgesäten Zellen mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen der zu untersuchenden Substanz behandelt wurden. Verwendet wurde dafür eine 20 mM Stammlösung (Wirkstoff wurde dafür in DMSO gelöst), wobei eine Endkonzentration von 0.5 % DMSO während der Behandlung nicht überschritten wurden (genaue Zellzahlen und Konzentrationen siehe **Kapitel 6.3**). Die gemessenen OD-Werte wurden auf die Puffer-OD-Werte normalisiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der IC_{50} -Werte durch Modellierung der erhaltenen Daten in *GraphPad Prism* mit der *dose-response-curve-inhibition*. In **Tabelle 1 - Tabelle 3** sind die gemessenen Konzentrationen halbmaximaler Wachstumsinhibition (IC_{50} -Werte) der gemessenen Substanzen gezeigt. Betulinsäure soll dabei als Vergleich mitgeführt werden. Als Kontrolle wurde die maximale Konzentration an DMSO als Wachstumskontrolle mitgeführt. Gezeigt sind die Werte der untersuchten Sulfamate **1a - 8 (Tabelle 1)**, wobei **1c** nicht löslich in DMSO war und aus diesen Gründen der IC_{50} -Wert nicht bestimmt werden konnte, der Sulfonamiden **9 - 14b** und den dazugehörigen Derivaten des Acetazolamids **15 - 21 (Tabelle 2)** und die der Saccharin-basierten Konjugate **22 - 29 (Tabelle 3)** nach 96 Stunden Behandlungsdauer. Die kompletten Dosis-Wirkungskurven sind im **Anhang 7.1 - 7.4** gezeigt.

a) Zytotoxizität der Sulfamate

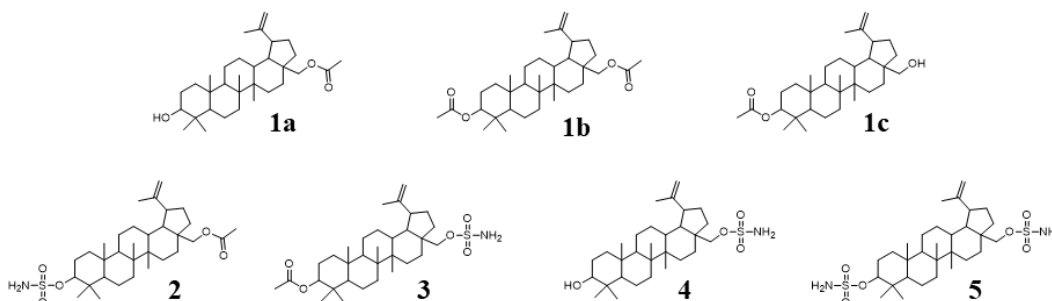


Abbildung 33. Strukturelle Darstellung der getesteten Sulfamate.

Zum besseren Vergleich wurde die Zytotoxizität von Betulin und Betulinsäure ebenfalls an den vier aufgeführten Zelllinien bestimmt und mit angegeben. Bei allen getesteten Zelllinien zeigt sich bei der Behandlung mit Betulinsäure ein IC_{50} -Wert von ca. 13 μ M. Auch das Betulin, zeigt eine sehr gute zytotoxische Wirkung mit IC_{50} -Werten in einem Bereich von 4.5 μ M - 6.5 μ M. Eine Selektivität konnte jedoch bei den verwendeten Tumorzelllinien bei keiner der beiden Substanzen festgestellt werden. Nach Anbringung einer oder mehrerer Acetylschutzgruppen am Betulin (**1a - 1c**) kommt es zu einer Verschlechterung der Löslichkeit in DMSO bzw. zu einer Erhöhung der IC_{50} -Werte im Vergleich zum Betulin. Eine Verbesserung der zytotoxischen Wirkung tritt jedoch nach Überführung der acetylierten Betulinderivate in ein Sulfamat ein.

Tabelle 1. Ermittelte IC₅₀-Konzentration (in µM mit Angabe der Standardabweichung) von Betulin/Betulinsäure und den Sulfamaten **1a** - **8** nach 96 Stunden Behandlungsdauer. Verwendet wurde der SRB-Assay, wobei mindestens drei biologische und 12 technische Replikate angefertigt wurden.

Substanzklasse	Bezeichnung	A375	MCF7	A2780	NIH3T3
Sulfamate	Betulinsäure	13.1 ± 0.9	13.0 ± 1.0	12.5 ± 1.8	13.3 ± 1.3
	Betulin	6.5 ± 0.2	4.9 ± 0.2	5.4 ± 0.2	4.6 ± 0.4
	1a	-	27.1 ± 0.9	25.2 ± 0.9	15.6 ± 0.7
	1b	15.4 ± 0.8	23.9 ± 2.1	26.7 ± 0.3	21.7 ± 1.4
	2	11.2 ± 1.0	11.8 ± 1.0	9.6 ± 0.1	8.9 ± 1.2
	3	8.1 ± 0.3	10.7 ± 0.5	6.8 ± 0.3	9.8 ± 1.4
	4	17.3 ± 1.6	11.4 ± 1.1	13.5 ± 1.1	13.4 ± 1.2
	5	12.5 ± 2.1	14.2 ± 1.2	8.85 ± 1.1	12.1 ± 1.2
	6	-	17.8 ± 3.4	26.7 ± 2.1	27.2 ± 3.1
	7	-	95.1 ± 5.6	> 100	> 100
	8	> 100	> 100	> 100	> 100

Bei Verbindung **3** zeigte sich der deutlichste Effekt an der Zelllinie A2780, mit einer inhibitorischen Konzentration von 6.8 µM. Mit einem IC₅₀-Wert von 9.8 µM bei der Normalzelllinie NIH3T3 zeigt sich im Vgl. zur der A2780 ebenfalls eine Selektivität von 1.44. Sowohl die IC₅₀-Wert von Verbindung **3**, als auch die der Verbindung **2** liegen im Durchschnitt bei einer Konzentration von 10 µM. Nach Umsetzung des ungeschützten Betulins zu **4** und **5**, kommt es zu keiner entscheidenden Veränderung der zytotoxischen Aktivität. Sehr erstaunlich ist hingegen der signifikante Unterschied bei den Verbindungen **6** und **7**, da es sich bei beiden Verbindungen um Octyl-basierte, Betulin(säure)-freie Verbindungen mit entweder einer oder zwei Sulfamatgruppen handelt. Ein deutlich niedrigerer IC₅₀-Wert, von ca. 25 µM, wird durch das einfache Octylsulfamat (**6**) hervorgerufen, wobei die Werte von Octyldisulfamat (**7**) generell über 100 µM lagen. Als Vergleich wurde anschließend Triethylenglycol zum Disulfamat (**8**) umgesetzt; mit daraus resultierenden IC₅₀-Werten von größer 100 µM bei den verwendeten humanen Zelllinien.

Neben der Untersuchung der Sulfamate, erfolgte die Testung der hergestellten Sulfonamide, wozu auch das Acetazolamid gehört.

b) Zytotoxizität der Sulfonamide

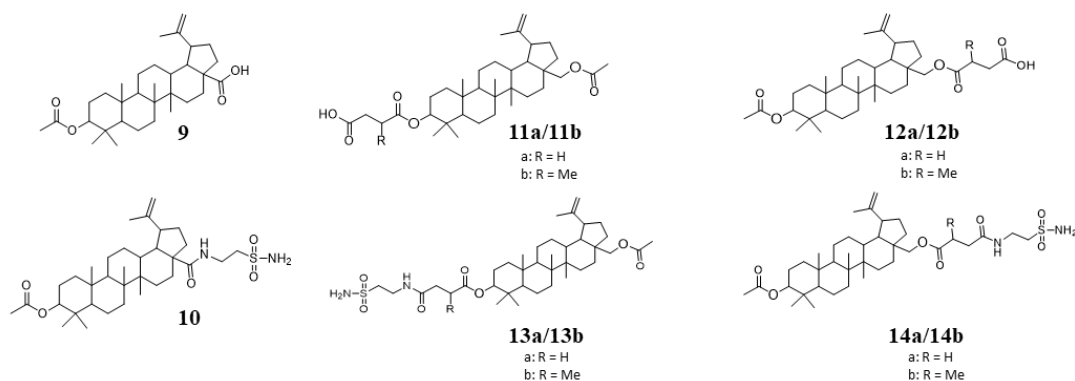


Abbildung 34. Strukturelle Darstellung der getesteten Sulfonamide.

Die mittels SRB-Assay bestimmten IC₅₀-Werte sind in **Tabelle 2** dargestellt. Die untersuchten Sulfonamide **9** - **14** sind Derivate der Betulinsäure (siehe Verbindung **10**) und des Betulins (siehe

Verbindung **11 - 14**). Bei den Derivaten der Betulinsäure zeigt sich schon nach dem Schützen der vorhandenen Hydroxylgruppe mit einer Acetylgruppe (**9**) eine deutliche Verbesserung der Zytotoxizität mit Werten zwischen 8 - 10 μM . Eine Selektivität ist jedoch bei keiner der untersuchten Zelllinien zu beobachten.

Tabelle 2. Ermittelte IC_{50} -Konzentration (in μM mit Angabe der Standardabweichung) der Sulfonamide **9 - 14b** nach 96 Stunden Behandlungsdauer. Verwendet wurde der SRB-Assay, wobei mindestens drei biologische und 12 technische Replikate angefertigt wurden.

Substanzklasse	Bezeichnung	A375	MCF7	A2780	NIH3T3
Sulfonamide	9	10.5 ± 0.8	9.2 ± 0.9	7.8 ± 0.7	7.9 ± 1.5
	10	6.4 ± 0.7	7.5 ± 0.7	10.4 ± 0.8	13.9 ± 1.1
	11a	15.6 ± 1.2	10.6 ± 0.4	12.45 ± 0.2	11.9 ± 0.6
	11b		10.5 ± 1.0	12.1 ± 0.5	14.1 ± 1.3
	12a	12.1 ± 1.5	9.8 ± 0.6	12.3 ± 3.9	10.8 ± 2.6
	12b		7.2 ± 1.5	8.5 ± 0.3	11.6 ± 0.6
	13a	10.7 ± 1.8	11.8 ± 0.6	14.1 ± 0.9	11.5 ± 0.8
	13b		7.3 ± 1.5	10.6 ± 1.7	9.3 ± 1.1
	14a	9.4 ± 0.5	8.6 ± 0.7	11.4 ± 1.4	11.3 ± 2.6
	14b		5.7 ± 0.9	7.8 ± 0.6	11.5 ± 1.6

Das Sulfonamid der Acetylbetulinsäure **10** zeigt die effektivste Wirkung auf die humane Melanomzelllinie A375 mit einem IC_{50} -Wert von 6.4 μM und einer Selektivität von 2.2 (NIH3T3 mit einem IC_{50} - Wert von 13.9 μM). Auch nach Umsetzung der Verbindungen **11a/11b** und **12a/12b** zum Sulfonamid **13a/13b** und **14a/14b** (sowohl C3, als auch C28 verknüpft) zeigt sich ein positiver Effekt auf die Zytotoxizität. Zeigte die Behandlung mit **11a** und **12a** halbmaximale Wachstumshemmung in einen Bereich von 11 - 25 μM , so sinkt diese nach Anbringung des Sulfonamids bei **13a** und **14a** auf einen Konzentrationsbereich von 8 - 14 μM . Der stärkste Effekt wurde durch die Behandlung der Zelllinie MCF7 mit **14b** erreicht. Hier konnte ein IC_{50} -Wert von 5.7 μM bestimmt werden. Auch ist eine leichte Selektivität zur Normalzelllinie NIH3T3 mit einem IC_{50} - Wert von 11.5 μM (Selektivität von 2.0) zu erkennen. Bei den nachfolgenden Verbindungen **15 - 21** handelt es sich um Derivate des Acetazolamids (AZA), sowohl mit, als auch ohne Betulin(säure).

c) Zytotoxizität der Acetazolamid-Konjugate

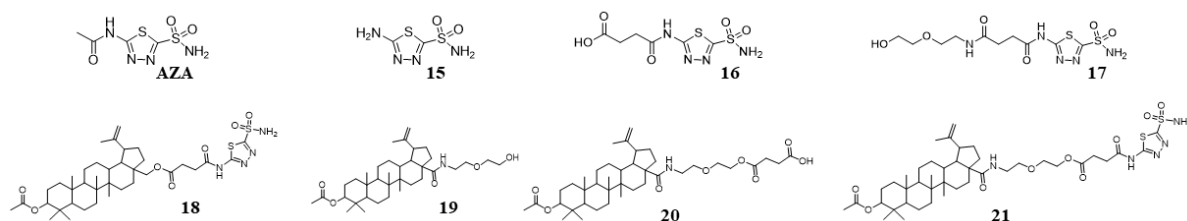


Abbildung 35. Strukturelle Darstellung der getesteten Acetazolamid-Konjugate.

Acetazolamid selbst zeigt mit Werten über 100 μM keine Zytotoxizität auf die verwendeten Zelllinien, ist jedoch ein literaturbekannter CA IX - Inhibitor. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Derivate trotz der geringen zytotoxischen Wirkung des Ausgangsstoffes AZA hergestellt.

Tabelle 3. Ermittelte IC₅₀-Konzentration (in µM mit Angabe der Standardabweichung) der Derivate des Acetazolamids **15** - **21** nach 96 Stunden Behandlungsdauer. Verwendet wurde der SRB-Assay, wobei mindestens drei biologische und 12 technische Replikate angefertigt wurden

Substanzklasse	Bezeichnung	A375	MCF7	A2780	NIH3T3
Derivate des Acetazolamids	AZA	> 100	> 100	> 100	> 100
	15	> 100	> 100	> 100	> 100
	16	> 100	> 100	> 100	> 100
	17	> 100	> 100	> 100	> 100
	18	7.2 ± 0.6	6.2 ± 0.2	8.7 ± 2.0	7.6 ± 0.9
	19	4.3 ± 0.2	5.9 ± 0.2	9.5 ± 0.9	7.5 ± 1.3
	20	10.5 ± 0.6	7.3 ± 0.4	12.3 ± 1.5	7.4 ± 0.2
	21	> 100	> 100	35.1 ± 3.4	52 ± 2.3

Nach Entfernen der Schutzgruppe zu **15** trat keine Änderung der Zytotoxizität auf; ähnlich war dies auch bei Verbindung **16** und **17** mit einem IC₅₀ - Wert größer 100 µM. Wie schon bei den Sulfonamiden **9** - **14**, wurden bei **18** - **21** ebenfalls zwei unterschiedliche Synthesestrategien verwendet. Verbindung **18**, basiert auf dem Bernsteinsäureester des 3-O-Acetylbetulins **12**, an welches Verbindung **15** direkt angebracht werden konnte, zeigt IC₅₀-Werte in einem Bereich von 7 µM. Eine weitere Möglichkeit für das Anbringen von **15** an eines der verwendeten Triterpene, war das Anknüpfen von **15** an der Carboxylgruppe der Betulinsäure. Durch die Reaktion mit Diglycolamin zu **19** konnte ein hydrophiler Linker angebracht werden. Die IC₅₀-Werte der dabei entstandenen Verbindung **19** waren sehr vielversprechend, mit Werten zwischen 4 µM - 9.5 µM. Auch die anschließende Reaktion von **19** mit Bernsteinsäureanhydrid zu **20** zeigt noch sehr effektive IC₅₀ - Werte zwischen 7 µM für die Zelllinie MCF und 12.3 µM für die Zelllinie A2780. Allerdings ist bei den hier untersuchten Zelllinien keine Selektivität feststellbar. Nach Anbringen von **15** kommt es jedoch zu einer starken Erhöhung der inhibitorischen Konzentration mit IC₅₀ - Werten für **21** zwischen 35 µM für die Zelllinie A2780 und Werten weit über 100 µM bei den Zelllinien MCF7 und NIH3T3. Geht man jedoch davon aus, dass eine mögliche Azidose im benachbarten Gewebe von Tumoren und vorhandene Esterasen zu einer Spaltung von labilen Estern, wie der des Bernsteinsäureesters, führen, so könnte eine gezielte Zytotoxizität erst bei Erreichen des Tumors stattfinden. Bis zum Erreichen des Wirkortes besteht zudem eine geringe Zytotoxizität für das gesunde Gewebe; Nebenwirkungen könnten so stark eingeschränkt werden. Konkret würde dies bedeuten, dass Verbindung **21** (IC₅₀ - Wert MCF7: > 100 µM) nach Erreichen eines Tumors, als Beispiel soll die MCF7 als Mammakarzinom verwendet werden, an dem Bernsteinsäureester gespalten wird, wodurch es zu Rückbildung von **19** (IC₅₀ - Wert MCF7: 5.9 µM ± 0.2 µM) kommt.

d) Zytotoxizität der Saccharin-Konjugate

Ein ähnliches Konzept sollte durch Anbindung von Saccharin an Betulin(säure) erzielt werden. In **Tabelle 4** sind die ermittelten IC₅₀-Werte der Saccharin-Konjugate sowohl mit, als auch ohne Betulin nach 96 Stunden Inkubation gezeigt, wobei von den Vorstufen **25b** und **26**, auf Grund der geringen Löslichkeit in DMSO, kein IC₅₀-Wert bestimmt werden konnte.

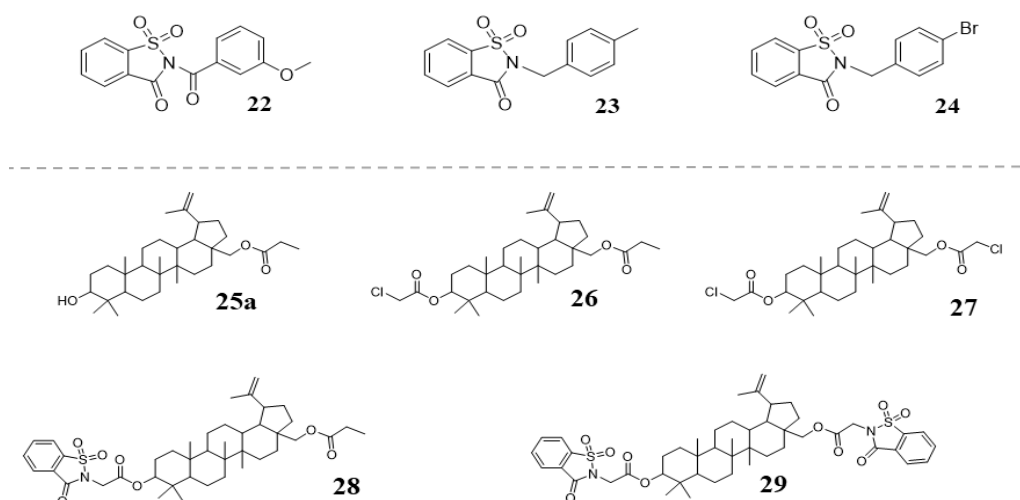


Abbildung 36. Strukturelle Darstellung der getesteten Saccharin-Konjugate.

Allgemein ist bekannt, dass Saccharin eine breite Anwendung als Zuckerersatz findet. Aus diesem Grund ist eine ausbleibende Zytotoxizität nicht verwunderlich.

Tabelle 4. Ermittelte IC_{50} -Konzentration (in μM mit Angabe der Standardabweichung) den Saccharin-basierenden Konjugaten 22 - 29 nach 96 Stunden Behandlungsdauer. Verwendet wurde der SRB-Assay, wobei mindestens drei biologische und 12 technische Replikate angefertigt wurden.

Substanzklasse	Bezeichnung	A375	MCF7	A2780	NIH3T3
Saccharin-Derivate ohne Betulin	Saccharin	> 100	> 100	> 100	> 100
	22	> 100	> 100	57.5 ± 7.1	> 100
	23	> 100	> 100	28.1 ± 1.5	> 100
	24	> 100	> 100	> 100	> 100
Saccharin-Derivate mit Betulin	25a	20.3 ± 1.0	-	20.8 ± 2.0	19.1 ± 1.3
	27	12.5 ± 1.3	> 100	7.8 ± 1.2	21.1 ± 2.4
	28	> 100	> 100	> 100	> 100
	29	58.5 ± 2.5	75.0 ± 3.7	72.0 ± 2.5	73.9 ± 3.2

Allgemein ist bekannt, dass Saccharin eine breite Anwendung als Zuckerersatz findet. Aus diesem Grund ist eine ausbleibende Zytotoxizität nicht verwunderlich. Auch das Anbringen des Saccharins an die zuvor bereitgestellten Betulinderivate 25a - 27b verringert die Zytotoxizität erheblich. Wie schon zuvor beschrieben, ist Saccharin jedoch in der Lage, Carboanhydrase gezielt zu inhibieren. Denkbar wäre so eine Inhibierung von Carboanhydrasen zur Überwindung der hypoxischen Strahlenresistenz, ohne umliegendes Gewebe zu schädigen. Ein Ausbleiben von Nebenwirkungen wäre so denkbar.

3.2.3 Enzymkinetische Untersuchungen

3.2.3.1 Theoretische Grundlagen

Enzymreaktionen können zum besseren Verständnis in verschiedene Reaktionsordnungen eingeteilt werden.¹⁶¹ Die Bezeichnung erfolgt nach der Anzahl der beteiligten Reaktionspartner, demnach ist an einer Reaktion erster Ordnung nur ein Edukt $[A \rightarrow P]$ beteiligt, welches zum Produkt umgesetzt wird. Jedoch ist es bei einer Reaktion erster Ordnung unabhängig, ob das Substrat in ein oder zwei Produkte zerfällt. Im Falle einer Rückreaktion von zwei entstandenen Produkten wäre hierfür jedoch die Betrachtung einer Reaktion zweiter Ordnung nötig.

Reaktion erster Ordnung

Reaktionen, die durch ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung beschrieben werden, können beispielsweise irreversible Zerfallsreaktionen oder Umwandlungen sein. Ein anschauliches Beispiel dafür ist die Denaturierung von Proteinen, oder der radioaktive Zerfall von Uran, hierbei handelt es sich in den meisten Fällen um eine irreversible Reaktion. Als Gleichung ausgedrückt würde dies folgendermaßen beschrieben werden (im Fall einer irreversiblen Reaktion):



$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = [A]k_1 \quad 1.2$$

Die Abnahme des Substrates ist demnach gleich zu setzen mit der Zunahme des Produktes. Um jeden möglichen Zeitpunkt dieser Reaktion betrachten zu können, ist es möglich, die Konzentration des Substrates mit der Gleichgewichtskonstante (k_1) mit der Einheit s^{-1} zu multiplizieren. Beide Reaktionen, sowohl die Abnahme des Eduktes, als auch die Zunahme des Produktes verlaufen bei einer Reaktion erster Ordnung exponentiell, gemäß Gleichung 1.3.

$$[A] = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad 1.3$$

In der folgenden **Abbildung 37** (A) ist dieser Verlauf graphisch dargestellt. Dabei ergibt sich die Geschwindigkeitskonstante k_1 aus dem Anstieg des Graphen. Deutlicher wird dies, wenn man die exponentielle Funktion umstellt und integriert, sodass man eine logarithmische Gleichung erhält und diese gegen die Zeit aufträgt (**Abbildung 37b**).

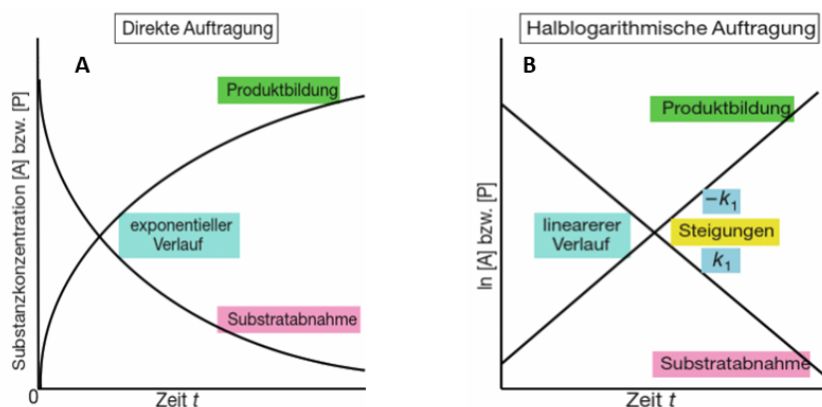


Abbildung 37. Graphische Darstellung eines Beispiels einer Reaktion erster Ordnung in a) der direkten, exponentiellen Auftragung und b) in der halblogarithmischen Auftragung.¹⁶¹

Reaktion zweiter Ordnung

Wie der Name schon sagt, findet bei dieser Reaktion ein Zusammentreffen von zwei Edukten statt. Dabei reagieren beide Edukte ([A] und [B]) mit einer Geschwindigkeitskonstante k_2 unter Bildung eines Produktes [P].



Auch bei der Reaktion zweiter Ordnung kann die Reaktionsgeschwindigkeit wie folgt definiert werden (Gleichung 6):

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = [A][B]k_2 \quad 2.2$$

Da bei der Reaktion zwei verschiedene Substratkonzentrationen betrachtet werden müssen, folgt die Reaktion zweiter Ordnung keinem einfachen exponentiellen Verlauf mehr, welcher jedoch graphisch nur schwer von einem eigentlichen Exponentialverlauf zu unterscheiden ist. Die größere Schwierigkeit liegt in der linearen Auftragung zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_2 , da diese nicht möglich ist. Um trotzdem eine Möglichkeit zu finden, Reaktionen zweiter Ordnung analysieren zu können, legt man die Konzentration einer von beiden Edukten sehr viel höher an, als die des anderen. Bei einer möglichen Messung ändert sich so nur die Konzentration des im Unterschuss vorliegenden Eduktes und die zweite Konzentration kann als konstant angesehen werden. Man spricht in diesem Fall von einer Reaktion pseudoerster Ordnung.

$$v = k_2[A][B]_0 = k'_2[A]; k'_2[B]_0 \quad 2.3$$

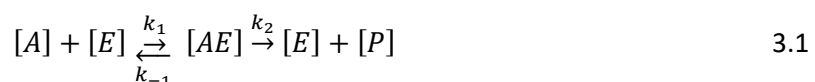
Beide Betrachtungen sind nun Grundlagen für das Erarbeiten einer Theorie zur Substrat-spezifischen Aktivität und der daraus folgenden Inhibierung von Enzymen. Im folgenden Teil dieser Arbeit soll genauer auf die Herleitung der Michaelis-Menten-Konstante eingegangen werden, mit der prinzipiell drei Aussagen getroffen werden können:

- Welche Substrat-spezifische Aktivität kann durch die Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden?
- Wie hoch ist die Affinität des eingesetzten Substrates zum Enzym (k_m -Wert)?
- Wie hoch ist die Affinität des Inhibitors zum Enzym (k_i -Wert)?

All diese Fragen sollen in diesem Teil der Arbeit beantwortet werden. Ansatz dafür ist die Betrachtung der Michaelis-Menten-Gleichung.

3.2.3.2 Michaelis-Menten-Gleichung

Bei der hier verwendeten Enzymkinetik handelt es sich um den einfachsten Fall einer enzymatisch katalysierten Reaktion, wobei zwei Reaktionspartner im ersten Schritt einen instabilen Komplex bilden, welcher, entweder zu einem Produkt und dem enzymatischen Katalysator oder dem Edukt und dem enzymatischen Katalysator, zerfällt. Außen unberücksichtigt bleibt, ob dabei nur ein oder mehrere Produkte entstehen, da dieser Schritt als irreversibel angenommen wird. Dies ist zwar nicht komplett korrekt, da in thermodynamischer Sichtweise jede Reaktion reversibel abläuft, jedoch ist der Energieaufwand derart groß, dass diese Rückreaktion nicht berücksichtigt wird und man von einer quasi irreversiblen Reaktion spricht. In Gleichung 3.1 ist die vollständige Reaktion gezeigt.



Bei der Betrachtung dieser Reaktionsgleichung ist nun also zu beachten, dass sowohl die Reaktion zweiter Ordnung mit der Bildung des Komplexes [AE], als auch die Reaktion erster Ordnung mit dem

Zerfall dieses Komplexes in beiden Richtungen betrachtet werden muss. Im ersten Schritt der Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung wird für alle beteiligten Komponenten eine Differenzialgleichung aufgestellt.

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][E] + k_{-1}[EA] \quad 3.2$$

Das Gleiche gilt auch für das eingesetzte Enzym, jedoch ist dieses als Katalysator ebenfalls bei der Reaktion zum Produkt beteiligt und muss daher mit in der Gleichung beachtet werden.

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[A][E] + (k_{-1} + k_2)[EA] \quad 3.3$$

Für den Komplex gilt die Gleiche Formel, wie für das Enzym, jedoch mit umgekehrten Vorzeichen.

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1[A][E] - (k_{-1} + k_2)[EA] \quad 3.4$$

Im letzten Schritt wird die Bildung des Produktes betrachtet. Diese setzt man gleich der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion, da eine Rückreaktion zum Substrat thermodynamisch nicht möglich ist.

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = v \quad 3.5$$

Eine Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit mit Hilfe dieser Gleichung (Gleichung 3.5) ist jedoch nicht möglich, da die Menge an bestehendem Enzym-Substrat-Komplex so gering ist, dass diese nicht bestimmbar ist. Betrachtet man jedoch die graphische Darstellung der Reaktion erster Ordnung in **Abbildung 37**, so kann man etwas beobachten, was 1925 bereits E. Briggs und S. Haldane¹⁶² beobachteten. Es konnte gezeigt werden, dass in einem kleinen Zeitbereich der Reaktion sowohl das Substrat linear abnimmt, als auch das Produkt linear zunimmt. Die Annahme ist, dass in diesem Bereich die Reaktionsgeschwindigkeit konstant bleibt, und somit auch die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes konstant ist. Dies würde bedeuten, dass sowohl die Änderung von [EA], als auch die Änderung der Enzymkonzentration gleich Null ist. E. Briggs und S. Haldane erkannten diesen Zusammenhang und benannten diesen Bereich als *Steady-State-Kinetik*.

$$\frac{d[EA]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = -k_1[A][E] + (k_{-1} + k_2)[EA] = 0 \quad 3.6$$

Nach ersetzen der Konzentration [E] durch $[E] = [E]_0 - [EA]$ und umstellen der Gleichung nach [EA] erhält man die Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit (Gleichung 3.7).

$$v = k_2[EA] = \frac{k_2[E]_0[A]}{[A] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad 3.7$$

Zur Vereinfachung der Gleichung 3.7 werden noch folgende Annahmen getroffen. Zum einen werden die Geschwindigkeitskonstanten im Nenner der Gleichung zu einer Konstante, der Michaelis-Menten-Konstante K_m zusammengefasst. Des Weiteren wird angenommen, dass die Enzymkonzentration im Zähler während der Reaktion annähernd gleich bleibt, jedoch für jeden unabhängigen Versuch die Enzymkonzentration variieren kann. Aus diesem Grund fasst man den Term $k_2[E]_0$ als Maximalgeschwindigkeit v (oder v_{max}) zusammen, sodass man folgende Gleichung als Ergebnis herausbekommt:

$$v = \frac{v[A]}{K_m + [A]} \quad 3.8$$

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung kann die Affinität des Substrates zum Enzym bestimmt werden. Dies erfolgt wie in **Abbildung 38** dargestellt.

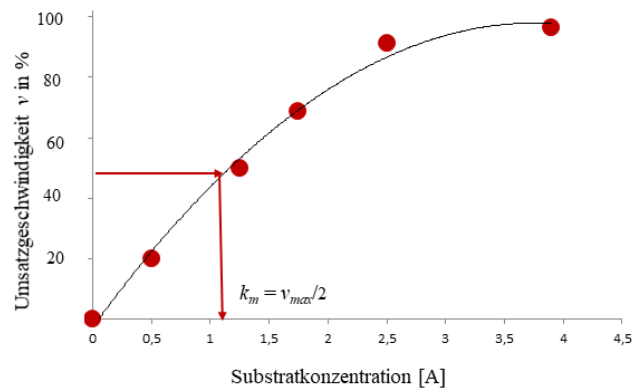


Abbildung 38. Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung. Gezeigt ist die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante nach Ermittlung von $v_{\max}$ und der anschließenden Auftragung gegen die eingesetzte Substratkonzentration. Die Enzymkonzentration ist bei jedem Messpunkt konstant.

Neben der Bestimmung von k_m und $v_{\max}/2$ hat die Michaelis-Menten-Gleichung eine weitere wichtige Bedeutung bei der Auswertung Enzym-kinetischer Messungen. Üblicherweise werden drei einfache, unabhängige Umformungen zu Geradengleichungen angewandt, welche schon 1932 von B. Woolf erwähnt wurden¹⁶³, um eine Aussage über die Art der Enzymhemmung treffen zu können. Im **Kapitel 3.2.3.3** soll darauf später genauer eingegangen werden. Gibt man einen Hemmstoff, auch Inhibitor genannt, zu dem aktiven Enzym, so kommt es zum Verlust der Enzymaktivität bzw. zur Abnahme der Umsatzgeschwindigkeit. Dabei unterscheidet man zwischen zwei Arten der Hemmung – der reversiblen und der irreversiblen Hemmung. Da in dieser Arbeit der Fokus auf der reversiblen Hemmung der Carboanhydrase IX liegt, soll die irreversible Hemmung nur erwähnt, aber nicht ausführlicher diskutiert werden. Unterscheiden kann man beide im zeitlichen Verlauf der Enzymhemmung. Findet bei der irreversiblen Hemmung bei höheren Hemmkonzentrationen ein abrupter Abfall der Aktivität statt, so bleibt die Aktivität im Gegensatz dazu bei der reversiblen Hemmung auch bei höheren Hemmkonzentrationen bei zeitlichen Betrachtungen noch konstant.

3.2.3.3 Die reversible Enzymhemmung

Man unterscheidet je nach Bindung des Hemmstoffes zwischen drei verschiedenen reversiblen Enzymhemmungen. In **Abbildung 39** sind die drei unterschiedlichen Hemmungen schematisch dargestellt. Der erste Schritt jeder Enzymhemmung ist die Bindung des Inhibitors an das Enzym. Je nach Struktur kann der Inhibitor an die Bindestelle des Substrates binden, sodass es zu einer Konkurrenz zwischen Substrat und Inhibitor kommt. Diese Form der Hemmung wird kompetitive Hemmung genannt. Wie in **Abbildung 39a** zu sehen, kann bei dieser Form der Hemmung nur einer der beiden konkurrierenden Stoffe binden, entweder das Substrat oder der Hemmstoff. Ein großer Überschuss von einer der beiden Komponenten verdrängt die zweite, wodurch es bei sehr hoher Substratkonzentration zum Erreichen der Maximalgeschwindigkeit $v_{\max}$, also zum Zustand der ungehemmten Reaktion, kommt. Die Stärke der Hemmung wird über die Affinität des Enzyms zum Substrat/Hemmstoff bestimmt. Liegt die Reaktion auf Seiten von k_3 , so ist die Bindung des Inhibitors größer und die Reaktion liegt auf Seiten der gehemmten Reaktion. Um eine Solche Bindung eingehen zu können, muss der Hemmstoff jedoch dem Substrat in struktureller und elektrostatischer Sicht sehr ähnlich sein, weshalb sie auch als Substratanaloga bezeichnet werden.

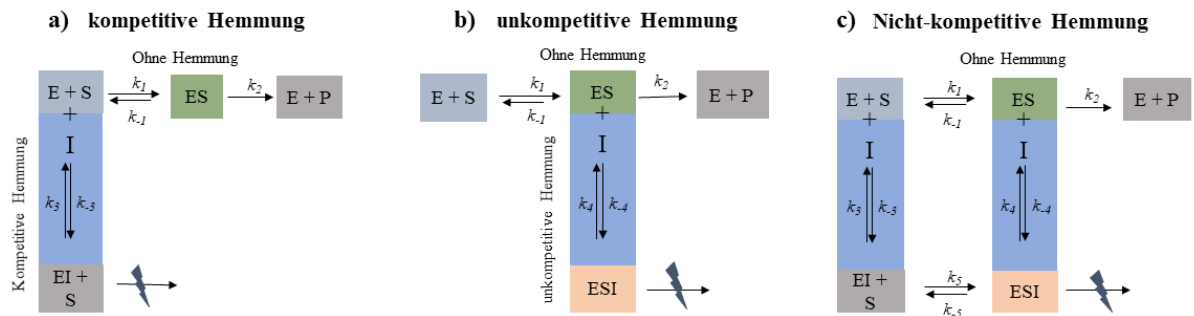


Abbildung 39. Übersicht der reversiblen Enzymhemmung. Schematisch gezeigt sind die Reaktionsschemata mit **a)** die kompetitive Hemmung, **b)** die unkompetitive Hemmung und **c)** zeigt die nicht-kompetitive Hemmung, welche die kompetitive und unkompetitive Hemmung vereint.

Moleküle, welche die Aktivität von Enzymen in biologischen Systemen, beispielsweise Zellen, steuern, sind selten dem Substrat ähnlich. Sie können aus dem Grund in den wenigsten Fällen an die Bindestelle des Substrats binden und so direkt die katalytische Reaktion beeinflussen. Für diesen Fall wird eine zweite Bindungsstelle benötigt, man spricht hier von einer nicht-kompetitiven Hemmung. Kommt es zur Bindung des Hemmstoffes an der zweiten Bindestelle, auch als *allosterische* Bindestelle bezeichnet, wird ein Signal an das aktive Zentrum des Enzyms ausgesendet und eine Konformationsänderung kann stattfinden, sodass auch weitere Reaktionen mit dem Substrat ausbleiben. Beide Komponenten können bei dieser Art der Hemmung gleichzeitig binden ($k_3 = k_4$), wodurch es zur Bildung eines sehr stabilen Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes kommt, auch als *Dead-End-Komplex* bezeichnet, welcher nicht mehr in der Lage ist, gespalten zu werden. Gezeigt ist die Schematische Darstellung in **Abbildung 39c**. Die dritte und seltenste Form der Enzymhemmung ist die unkompetitive Hemmung. Bei dieser Form der Hemmung ist der Inhibitor nicht in der Lage an das freie Enzym zu binden, sondern bindet ausschließlich an den zuvor gebildeten Enzym-Substrat-Komplex. Grund dafür ist die Ausbildung einer Bindestelle für den Inhibitor durch sterische und elektrostatische Effekte nach Bindung des Substrates am Enzym. Gezeigt ist diese Form der Hemmung ebenfalls in **Abbildung 39b**. Die unkompetitive Hemmung ist die am wenigsten vertretene Form der Hemmung, jedoch tritt in vielen Systemen eine Nebenerscheinung auf, die mit dieser Art der Hemmung vergleichbar ist. Die Rede ist von der sogenannten Substratüberschusshemmung, welche auftritt, sobald ein zweites Substratmolekül (der gleichen Sorte) an das Enzym bindet und die Reaktion stört. Wie unterscheidet man nun die drei unterschiedlichen Hemmarten voneinander? Hier hilft die in **Kapitel 3.2.3.2** erwähnte Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung. Die am häufigsten verwendete Linearisierung erfolgt mit der Lineweaver-Burk-Auftragung, wobei die reziproke Umsatzgeschwindigkeit v gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen wird. Veranschaulicht wird diese in **Abbildung 40**.

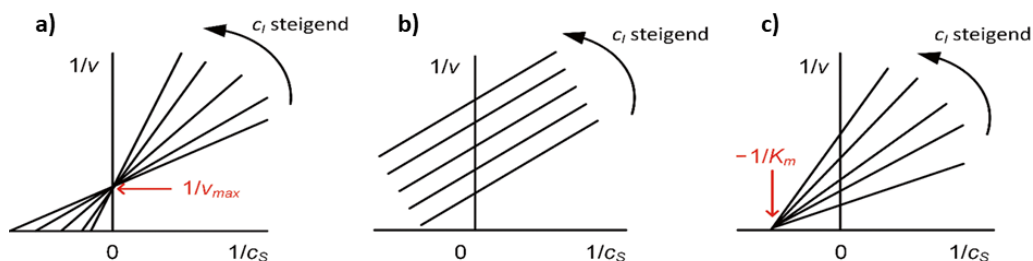


Abbildung 40. Schematische Darstellung der Lineweaver-Burk-Auftragung nach Umstellen der Michaelis-Menten-Gleichung. Gezeigt sind die drei verschiedenen Hemmtypen mit **a)** kompetitive Hemmung, **b)** unkompetitive Hemmung und **c)** nicht-kompetitive Hemmung.

3.2.3.4 Untersuchung der CA IX - Inhibitoren

Mit Hilfe der zuvor beschriebenen Grundlagen wurden die für diese Arbeit neu synthetisierten Carboanhydrase IX – Inhibitoren auf Ihre Fähigkeit, die Aktivität der CA IX zu senken, getestet. Um eine Struktur-Wirkungs-Analyse durchführen zu können, wurden Inhibitoren mit unterschiedlichem Aufbau und Polarität gewählt. Gezeigt sind die wichtigsten Strukturen in **Abbildung 42**. Unterschieden wurde dabei die Anzahl vorhandener Sulfamatgruppe am Betulin am Beispiel von Betuliny-28-sulfamat (**4**) und Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat (**5**), der möglichen Anbindung am C3- oder C28- vom Betulin sowohl am Beispiel von 28-O-Acetylbetuliny-3-sulfamat (**2**) und 3-O-Acetylbetuliny-28-sulfamat (**3**), als auch durch den Vergleich der C3-verknüpften Sulfonamide 3-hemisuccinat-aurinamid-28-O-acetylbetuliny **13a** und 3-(2-Methyl-hemisuccinat-aurinamid-28-O-acetylbetuliny) **13b** mit den C28-verknüpften Sulfonamiden 3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-aurinamid **14a** und 3-O-Acetylbetuliny-28-(2-methyl-hemisuccinat)-aurinamid **14b**. Ebenfalls wurde der längenabhängige Einfluss des Linkers zwischen Betulin bzw. Betulinsäure und der funktionellen Gruppe (dem Sulfonamid) untersucht. Neben dem Vergleich von Verbindung **10** und **13a/13b**, wurde auch der Einfluss der Linkerlänge bei Verbindung **14a/14b** untersucht. Abgeleitet vom bereits bekannten Wirkstoff **Acetazolamid**, welcher in der Literatur als Standard-Inhibitor verwendet wird, wurden sowohl Derivate des Acetazolamids mit Betulin(säure) (**18** und **21**) als auch ohne Betulin (**15** - **17**) hergestellt und auf ihre inhibierende Wirkung getestet. Neben **Saccharin**, als weiterer bekannten und selektiver CA IX-Inhibitor wurden außerdem zwei weitere Derivate synthetisiert (**24** und **29**), welche mit Hilfe des Esterase-Assays genauer charakterisiert werden sollten. Die dabei erzielten Ergebnisse sollten im Anschluss daran mit bereits literaturbekannten Inhibitoren (**5,6**, **U104** und **Acetazolamid**) verglichen werden. Sowohl die bereits bekannten Inhibitoren, als auch die Sulfamate und Sulfonamide sind in **Abbildung 41** gezeigt. In **Abbildung 42** sind zudem die Betulinkonjugate des Acetazolamids und Saccharins zu sehen. Alle Inhibitoren wurden mit Hilfe des nachfolgend beschriebenen Esterase-Assays vermessen.

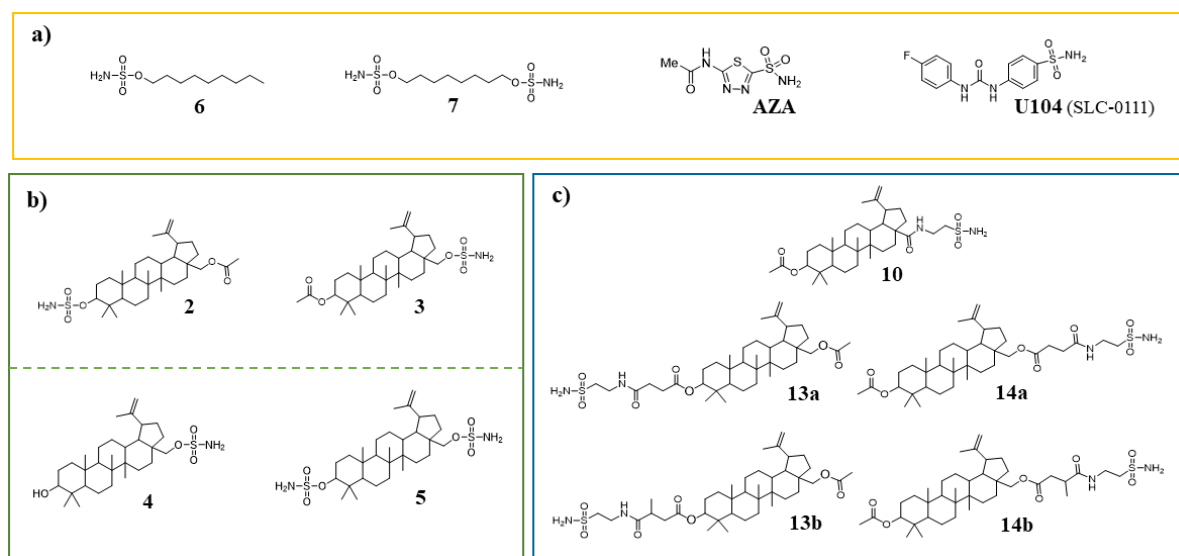


Abbildung 41. Strukturen der untersuchten CA IX - Inhibitoren. **a)** zeigt vier bekannte Verbindungen aus der Literatur, welche in dieser Arbeit als Referenz dienen sollen, **b)** Zusammen mit den in a) gezeigten literaturbekannten Sulfamaten, soll bei den Verbindungen **4** und **5** der Einfluss der Anzahl der inhibierenden Sulfamatgruppen untersucht werden. Zusammen mit den Messungen von Verbindung **2** und **3** soll zudem die Inhibierung von Sulfamaten genauer untersucht werden und **c)** ebenfalls untersucht wurden die Inhibierungen von Sulfonamiden und der Einfluss der Anknüpfung an der C3- oder C28-Position des Betulins (**13a**, **13b** und **14a**, **14b**). Untersucht wurde auch der Einfluss der Kettenlänge anhand des Vergleiches der Sulfonamide **10** mit **14a** und **14b**.

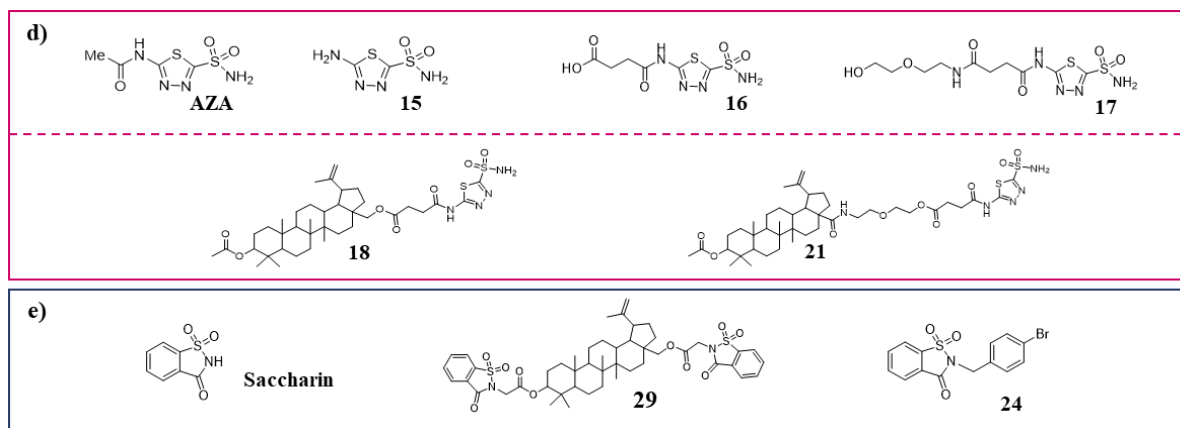
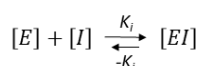


Abbildung 42. Strukturen der untersuchten CA IX - Inhibitoren. In **d)** sind die synthetisierten Acetazolamid-Derivate gezeigt, sowohl mit als auch ohne Betulin, bei denen ebenfalls der K_i -Wert bestimmt wurde. In **e)** ist eine Auswahl der synthetisierten und getesteten Saccharin-Derivate gezeigt.

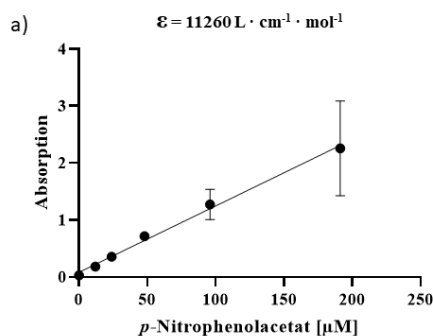
3.2.3.5 Methodenentwicklung Esterase-Assay

Wie schon eingangs beschrieben, sollte für die Messung der enzymkinetischen Daten eigens ein Testsystem, für die Bestimmung der k_i -Werte, etabliert werden.



Der Hersteller, der in dieser Arbeit verwendeten Carboanhydrase IX (Sino Biological; Katalognummer 10107-H08H), gibt einen Aktivitätstest an, mit deren Hilfe die Aktivität des Enzym vorab getestet wurde. Angegeben ist dabei lediglich die verwendete Substratkonzentration ($pNPA$), die verwendete Enzymmenge und das Puffersystem, in dem die Messung stattgefunden hat. Da das Substrat selbst jedoch sehr schlecht wasserlöslich ist und kein Lösungsvermittler (Aceton, Methanol, DMSO oder ähnliches) verwendet wurde, eignete sich das angegebene Testsystem nicht für enzymkinetische Messungen mit höheren Substratkonzentrationen. Im ersten Schritt der Etablierung musste demnach ein geeignetes System gefunden werden, in dem die Aktivität des Enzyms weder verloren geht noch das Substrat auf Grund der Löslichkeit ausfällt. Da PBS ein etablierter Puffer mit einem $pH = 7.4$ ist, welcher bei allen Zellkulturversuchen in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat, sollte dieser neben dem vom Hersteller verwendeten Tris-Puffer ($pH = 7.5$) getestet werden. Alle nachfolgenden Messungen wurden in einer 100 μL Quarzküvette durchgeführt. Nach der Kalibrierung des (während der Katalyse entstehenden) Produktes *para*-Nitrophenol (zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten ϵ) in beiden Puffersystemen, wurde die Aktivität des Enzyms in beiden Systemen getestet. Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ϵ wurden die gemessenen Absorptionen gegen die entsprechenden *p*-Nitrophenol-Konzentrationen aufgetragen, die daraus resultierende Auftragung ist in **Abbildung 43** dargestellt.

Extinktionskoeffizient in PBS- Puffer mit 4 % Acetonitril



Extinktionskoeffizient in Tris Puffer mit 4 % Acetonitril

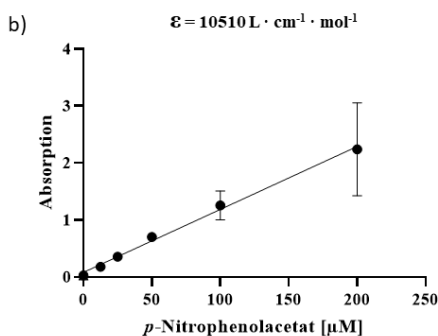


Abbildung 43. Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ϵ unter Verwendung a) eines PBS-Puffers (pH = 7.4; Zusatz von 4 % ACN) mit $\epsilon = 11260 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und b) eines Tris-Puffers (pH = 7.5; Zusatz von 4 % ACN) mit $\epsilon = 10510 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Für den Vergleich der Aktivitäten des Enzyms unter variierenden Bedingungen (Puffer, pH-Wert), wurde die Absorptionsänderung/min mit einer konstanten Substratkonzentration [1 mM] und einer konstanten Enzymmenge [3.9 µg] gemessen. Für eine bessere Löslichkeit des Substrates wurde dieses in Acetonitril gelöst und als 4 % Zusatz zum Messsystem hinzu gegeben. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von $T = 20^\circ \text{C}$ durchgeführt. Es wurde aller 3 Sekunden für insgesamt 3 Minuten die Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ gemessen und diese gegen die Zeit aufgetragen. Die erhaltenen Messdaten der Absorptionsänderung/min sind in **Abbildung 44a** zu sehen.

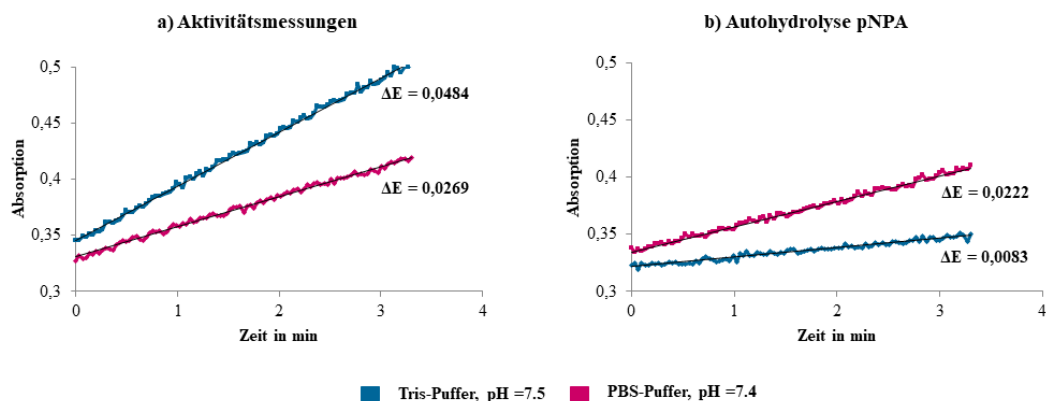


Abbildung 44. a) Bestimmung der Enzymaktivität in 100 µL Reaktionslösung bei einer Substratkonzentration (pNPA) von 1 mM, einer Menge an CA IX von 3.9 µg, einem Zusatz von 4% ACN und einer Messtemperatur von 20°C . Gemessen wurde dabei die Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ mit einer Messzeit von 3 min. Die orangefarbenen Messpunkte entsprechen dabei der Umsetzung des Substrates in Tris-Puffer (pH = 7.5) und blau der Umsetzung des Substrates in PBS-Puffer (pH = 7.4) b) Messung der Autohydrolyse des Substrates unter gleichen Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von CA IX.

Aus den gemessenen Anstiegen konnte so die spezifische Aktivität des Enzyms im jeweiligen Puffer nach folgender Gleichung berechnet werden: der hier verwendete Extinktionskoeffizient wurde aus den zuvor durchgeführten Kalibrierungen des Produktes berechnet (siehe **Abbildung 43**); ΔE ist die Absorptionsänderung in Abhängigkeit der Zeit und $c_{\text{Enzym}} = 3.9 \text{ mg/mL}$. Die spezifische Aktivität ist dabei ein Maß für die Wirksamkeit eines Enzyms. Sie gibt an, wie viel Substrat in einer Minute durch 1 mg an Enzym umgesetzt wird.

$$A_{\text{sepz}} = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d \cdot c_{\text{Enzym}}} = \frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \quad 4.1$$

Die berechneten Aktivitäten lagen für die Messung in PBS-Puffer bei $43.1 \frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}}$ und für die Messung in Tris-Puffer bei $58.9 \frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}}$. Somit zeigt die Carboanhydrase IX in Tris-Puffer mit einem Zusatz von

4 % Acetonitril bei 20 °C, im Vergleich zum PBS-Puffer, eine deutlich höhere Aktivität. Im Anschluss daran wurde die Autohydrolyse, also die Zersetzung des Substrates in Abwesenheit des Enzyms, in beiden Puffersystemen untersucht. Das Ergebnis dieser Messung ist in **Abbildung 44b** gezeigt. Beim Vergleich beider Diagramme fällt auf, dass der Anstieg der Autohydrolyse im Tris-Puffer, anders als der Anstieg bei der Aktivitätsmessung, deutlich kleiner zu dem der Messung in PBS-Puffer ist. Eine hydrolytische Zersetzung findet demzufolge zu einem deutlich kleineren Anteil im Tris-Puffer statt. Es kann zusammengefasst gesagt werden, dass im verwendeten Tris-Puffer sowohl die Eigenzersetzung des Substrates (unerwünschte Nebenreaktion) kleiner ist, als im PBS-Puffer, als auch die spezifische Aktivität der CA IX deutlich höhere Umsätze des Substrates zeigt. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche in Tris-Puffer durchgeführt; wobei der Anteil an Acetonitril noch genauer untersucht werden musste. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Substrates wurden anschließend weitere Aktivitätsmessungen in Abhängigkeit der eingesetzten Acetonitril - Konzentration durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität bei einem Zusatz von 4 % ACN und 6 % stabil blieb, nach Zusatz von 8 % ACN die Aktivität jedoch um 35 % der ursprünglich gemessenen Aktivität sank. Aus diesem Grund wurde die Konzentration an Acetonitril auf 6 % angepasst, um eine möglichst gute Löslichkeit des Substrates zu erzielen.

Auch die Enzymmenge hat einen erheblichen Einfluss auf die späteren Ergebnisse. Schaut man in der Literatur nach geeigneten Enzymmengen, findet man sehr verschiedene Aussagen. So verwendeten Barrese *et al.*¹⁶⁴ beispielsweise eine Reaktionslösung, welche 1 µM CA II enthält. In einer anderen Veröffentlichung von Shank *et al.*¹⁶⁵ wurde für die Durchführung des Esterase-assays 0.002 µg – 0.2 µg CA II verwendet (eine Umrechnung in µM ist an dieser Stelle leider nicht möglich, da keine Angabe der verwendeten Molekülmasse vorhanden ist). Neben der bisher genannten Durchführung des Esterase-assays durch die Umsetzung des Substrates durch die Isoform CA II, wird in der Veröffentlichung von Uda *et al.*¹⁶⁶ die Verwendung der CA IX und CA XII beschrieben. Die eingesetzten Enzymmengen entsprechen dabei 5 µg/mL CA IX (93 nM) und 5 µg/mL CA XII (114 nM). Aufgrund dieser signifikanten Unterschiede in den eingesetzten Enzymmengen und den Reaktionsbedingungen, beispielsweise in der Durchführung des Versuches bei 37 °C (Uda *et al.*), anstelle der in dieser Arbeit verwendeten 20 °C, musste eine geeignete Enzymkonzentration gefunden werden, bei der sowohl ein deutlicher Unterschied der uninhibierten und inhibierten Reaktion möglich war, das Enzym jedoch noch in katalytischen Mengen vorlag. Dies wurde durch Messung der Absorptionsänderung pro Minuten bei $\lambda = 405$ nm, einer konstanten Substratkonzentration von 2.5 mM Substrat in Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7.5, einem Zusatz von 6 % ACN, einer Messtemperatur von $T = 20$ °C und drei verschiedenen Enzymkonzentrationen (156 nM, 312 nM und 917 nM) durchgeführt. Gezeigt sind die dabei erhaltenen Messdaten und die dazugehörige Auswertung in **Abbildung 45**. Es ist sehr gut zu erkennen, dass bei höheren Enzymkonzentrationen auch die Absorptionsänderungen/min (ΔE) stark zunimmt (**Abbildung 45a**), auf Grund des leichten Verlustes an Enzymaktivität bei Erhöhung der CA IX (**Abbildung 45b**), wurde jedoch für alle nachfolgenden Messungen eine Enzymkonzentration von 300 nM verwendet. Bei dieser Konzentration ist ein deutlicher Unterschied der Anstiege (ΔE) zwischen der Autohydrolyse des Substrates (vergleichbar mit einer vollständigen Hemmung der CA IX durch einen Inhibitor) und der uninhibierten Reaktion zu beobachten.

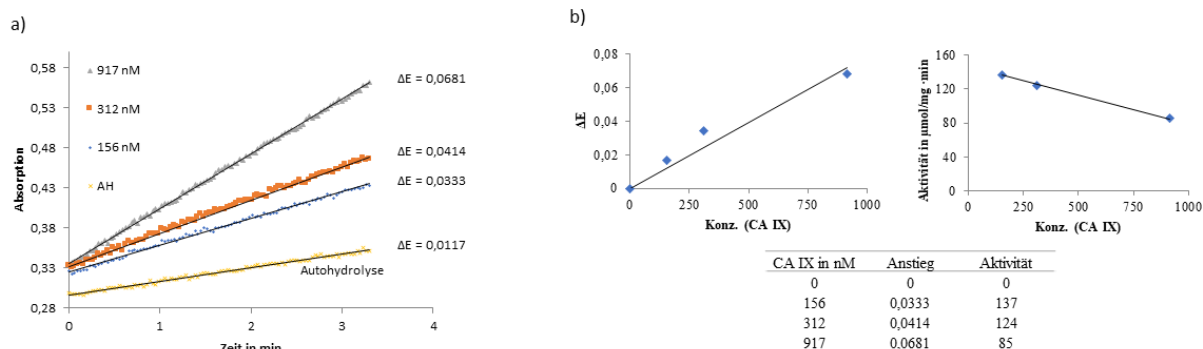


Abbildung 45. Bestimmung der Enzymaktivität in 100 μL Reaktionslösung mit einer Substratkonzentration (pNPA) von 2.5 mM in Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7.5, einem Zusatz von 6 % ACN, einer Messtemperatur von $T = 20^\circ\text{C}$ und drei verschiedenen Enzymkonzentrationen. a) Gelb dargestellt ist die Autohydrolyse des Substrates ohne zugesetztem Enzym, blau die Absorptionsänderung bei einer verwendeten Enzymmenge von 156 nM, orange 312 nM und grau mit einer Enzymmenge von 917 nM. In b) sind anschließend sowohl die gemessenen Absorptionsänderungen/min (ΔE) gegen die verschiedenen Enzymkonzentrationen, als auch die daraus berechneten spezifischen Aktivitäten gegen die Enzymkonzentrationen aufgetragen.

Die so entstandenen Bedingungen für die Testung auf eine mögliche Inhibierung der CA IX in einer 100 μL Quarzküvette waren also wie folgt: Verwendet wurde ein Reaktionsvolumen von 100 μL , bestehend aus einem Tris-Puffer (12.5 mM, 75 mM NaCl, pH = 7.5), versetzt mit 6 % ACN, eine Enzymkonzentration von $c_{\text{Enzym}} = 300 \text{ nM}$ und fünf verschiedene Substratkonzentrationen in einem Bereich von 0.5 mM - 2.5 mM. Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden für den jeweiligen Inhibitor durch Messungen eines großen Konzentrationsbereiches des Inhibitors (100 nM - 4 μM) anhand einer Substratkonzentration bestimmt. Nachfolgend wurden mindestens drei der verwendeten Konzentrationen (hier lag ΔE zwischen der uninhibierten Reaktion und der Autohydrolyse des Substrates) mit fünf verschiedenen Substratkonzentrationen untersucht. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Michaelis-Menten-Auftragung ausgewertet und die k_i -Werte der jeweiligen Inhibitoren bestimmt. Nach erfolgreicher Etablierung des Esterase-Assays in einer 100 μL Quarzküvette, wurde das System, zur effizienteren Durchführung, auf die Verwendung einer 96-well-plate angepasst. Dabei fanden spezielle *half area* - 96-well-plate Anwendung, da bei diesen, im Gegensatz zu herkömmlichen 96-well-plates, schon bei einem Arbeitsvolumen von 170 μL eine Schichtdicke von 1 cm erreicht wird. Anstelle von 100 μL Reaktionslösung, wurde unter Verwendung der *half area* - 96-well-plates ein Volumen von 170 μL Reaktionslösung verwendet. Die genaue Durchführung beider Methoden ist in **Kapitel 6.6** gezeigt. Alle im Anschluss gezeigten Daten wurden in einer *half area* - 96-well-plate unter Verwendung eines Plattenlesegeräts (Infinite F200 PRO von Tecan Deutschland GmbH) gemessen und mit Hilfe des Programmes *GraphPad Prism 9* über die Michaelis-Menten-Auftragung ausgewertet.

3.2.3.6 Ergebnisse des Esterase-Assay

Die Synthese und das Designen von Enzyminhibitoren gewinnt zunehmend Bedeutung im *drug targeting*. Um herauszufinden, ob die synthetisierten Betulinsäure-Derivate gezielt an Tumore mit einer Überexpression von Carboanhydrase IX binden, müssen die Inhibitoreigenschaften zuvor an der CA IX charakterisiert werden. Mit der Bestimmung des k_i -Wertes kann die Eigenschaft der Inhibitoren, das Enzym zu inhibieren, beschrieben und verglichen werden. Zunächst musste die Affinität (k_m -Wert) des Enzyms zum Substrat (*p*-Nitrophenylacetat) und die Maximalgeschwindigkeit V_{max} ermittelt werden. Um optimale Versuchsbedingungen festzulegen, wurden wie schon zuvor beschrieben, unterschiedliche Bedingungen (Puffer, pH -Wert) untersucht. Dabei hat der verwendete Puffer einen sehr großen Einfluss auf die Affinität (k_m -Werte) des Enzyms zum Substrat, wie der Vergleich zwischen beiden verwendeten Puffern in der, in **Abbildung 46** gezeigten, Michaelis-Menten-Auftragung deutlich macht. Hierfür

wurde die Reaktionsgeschwindigkeit v (oder Absorptionsänderung/min) mit einer Menge von $m_{\text{CA IX}} = 3,9 \mu\text{g}$ nach drei Minuten für fünf verschiedene Substratkonzentrationen in und unter Verwendung beider Puffer bei einer Messtemperatur von $T = 20^\circ\text{C}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$ bestimmt und gegen die Substratkonzentration [mM] aufgetragen.

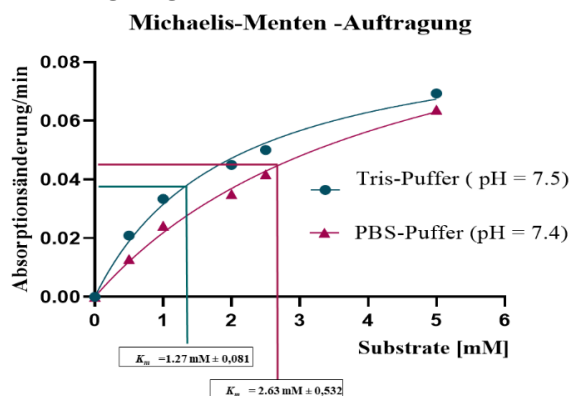


Abbildung 46. Michaelis-Menten-Auftragung der durch die CA IX katalysierten Reaktion von *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden parallel in Tris-Puffer (blau) und PBS-Puffer (rot) mit einer Messdauer von 3 min bei $T = 20^\circ\text{C}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$ gemessen. Die errechnete (Programm: GraphPad Prism) Maximalgeschwindigkeit lag für beide Reaktionen bei $V_{\text{max}} = 0,076 \text{ mM/min}$.

Die so ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten liegen bei Verwendung des Tris-Puffers ($\text{pH} = 7.5$) bei $K_m = 1.27 \text{ mM} \pm 0,081$ und bei Verwendung von PBS-Puffer ($\text{pH} = 7.4$) bei $K_m = 2.63 \pm 0,532$. Unter Verwendung eines Tris-Puffers ($\text{pH} = 7.5$) steigt die Affinität des Enzyms zum Substrat (kleiner K_m -Wert im Vergleich zu PBS) und somit auch die spezifische Aktivität oder Fähigkeit der CA IX, *p*-Nitrophenylacetat in *p*-Nitrophenol und einem Acetatrest zu spalten. Auf Grund des kleineren K_m -Werten und den wie in **Kapitel 3.2.3.5** ausführlich beschriebenen Kriterien, wurden auch bei der Bestimmung der K_i -Werte in der *half area* - 96-well-plate Tris-Puffers ($\text{pH} = 7.5$) als Standard für alle weiteren Messungen verwendet.

a) Untersuchung literaturbekannter Inhibitoren als Referenzen

Als erstes erfolgte die Messung bereits bekannter CA IX-Inhibitoren, wozu die Substanzen Octylsulfamat (6), Octyldisulfamat (7) das Acetazolamid und U104/SLC-0111 zählen.



Abbildung 47. Strukturen zweier bekannter CA IX-Inhibitoren aus der Literatur, welche in dieser Arbeit als Referenz dienen sollen. Dargestellt sind die Strukturformeln von Octylsulfamat **6**, Octyldisulfamat **7**, Acetazolamid und dem CA IX Inhibitor **U104** (oder SLC-0111).

Um einen Vergleich zu bekannten CA IX-Inhibitoren zu haben, welche zumeist ausschließlich mittels SFA (*Stopped-flow CO₂-Assay*) untersucht werden, wurden die in **Abbildung 47** gezeigten Substanzen ebenfalls an dem neuen Testsystem vermessen. Auf Grund eines stark abweichenden Testsystems, beispielsweise durch Einsatz eines anderen Substrates oder einer unterschiedlichen Enzymmenge, kommt es zu stark variierenden K_i -Werten. Um trotzdem einen Vergleich der neu synthetisierten Inhibitoren mit denen der aktuellen Forschung, zur Inhibierung der CA IX weltweit, erlauben zu können, sollen die ermittelten K_i -Werte in **Abbildung 48** als Referenz dienen. Mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 9 erfolgte die Bestimmung der K_i -Werte durch Auswertung der erhaltenen Messdaten. Da die hier verwendeten Inhibitoren alle ähnliche K_i -Werte aufweisen, wurden die kinetischen Messungen bei den vier untersuchten Substanzen in einem Konzentrationsbereich $c_{\text{Inhibitor}} = 25 \text{ nM} - 200 \text{ nM}$ durchgeführt.

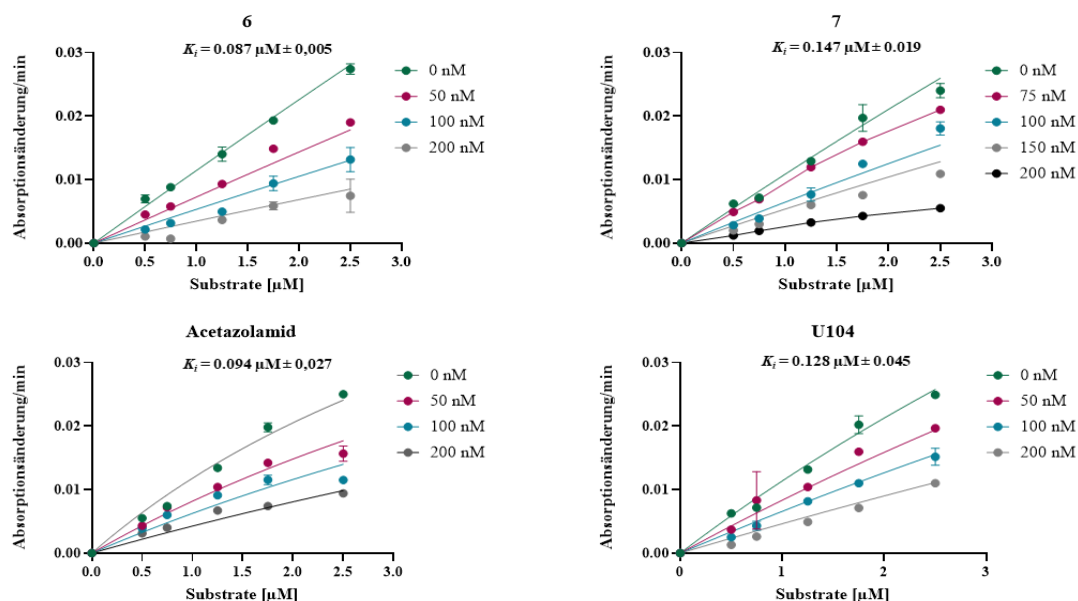


Abbildung 48. Michaelis-Menten-Aufragung der Inhibitoren **6**, **7**, **Acetazolamid** und **U104**. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in zwei unabhängigen Versuchen bei einer Messdauer von 10 Minuten bei $T = 20^\circ\text{C}$ für verschiedene Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gemessen.

Die durch den Esterase-Assay ermittelten K_i -Werte der vier untersuchten Substanzen **6**, **7**, Acetazolamid und **U104** liegen in einem Bereich zwischen $0.087 \mu\text{M}$ - $0.147 \mu\text{M}$. Die stärkste Inhibierung der Carboanhydrase IX wird durch **6** mit einem $K_i = 0.087 \mu\text{M}$ erzielt, ebenso wie Acetazolamid mit einem $K_i = 0.094 \mu\text{M}$. Vergleicht man diesen Wert (für AZA) mit K_i -Werten aus der Literatur, so fällt auf, dass dieser um das Vierfache größer ist ($K_i = 25 \text{ nM}$; bestimmt mit Hilfe des *Stopped-flow CO₂-Assay*)^{107, 142, 145}. Ebenfalls zeigt ein Zusatz von **U104** im nanomolaren Konzentrationsbereich sehr effiziente Inhibierungen der CA IX mit einem $K_i = 0.128 \mu\text{M}$. Auch diese Verbindung wurde bereits ausführlich in der Literatur untersucht. So findet man auch bei diesem Inhibitor einen ca. dreimal so kleinen k_i -Wert ($K_i = 45 \text{ nM}$; bestimmt mit Hilfe des *Stopped-flow CO₂-Assay*)¹⁶⁷. Die untersuchten Sulfamate **6** und **7** zeigten ein ähnliches Verhalten bei Verwendung des Esterase-Assay. Der durch den Esterase-Assay bestimmte K_i -Wert von **6** liegt bei $K_i = 0.087 \mu\text{M}$, wobei ein ca. vierfach kleinerer Wert mit etwa $K_i = 25 \text{ nM}$ ¹⁶⁸ in der Literatur zu finden ist. Ein weiterer sehr interessanter Sachverhalt zeigt sich im Vergleich des Mono- und Disulfamates **6** und **7**. Erwartungsgemäß sollten zwei inhibierende Bindestellen eine doppelt so hohe Inhibierung der Esteraseaktivität zeigen, welches in diesem Fall nicht bestätigt werden konnte. Eine Erklärung dafür könnten inhomogene Polaritäten innerhalb der Bindetasche der CA IX sein, weshalb es zu ungleichen Ausrichtung der Inhibitoren in der Bindetasche kommt. Betrachtet man beide Substanzen, dann besitzt **7** eine sehr polare Endgruppe, **6** hingegen eine unpolare Alkylkette am Ende, wodurch es (durch Wechselwirkungen der unpolaren Kette mit der hydrophoben Seitentasche) zu stabilisierenden Effekten bei der Bindung an das aktive Zentrum kommen kann. Dies und der ermittelte Faktor von 4 (Faktor zwischen Esterase-Assay und *Stopped-flow CO₂-Assay*) soll veranschaulichen, wie wichtig der Vergleich von bekannten Referenz-Inhibitor mit neu entwickelten Substanzen, bei Verwendung eines neu-etablierten Systems, ist. Anschließend sollten die beobachteten Effekte von **6** und **7** anhand unterschiedlicher Betulinderivate untersucht und bestenfalls belegt werden.

b) Untersuchung der Inhibierung von Sulfamaten und speziell der Anzahl der Sulfamatgruppen

Zusammen mit den in **a**) gezeigten literaturbekannten Sulfamaten, soll die inhibitorische Wirkung von Sulfamat-Betulin-Derivaten und anhand derer der Einfluss der Anzahl von Sulfamatgruppen untersucht

werden. Untersucht wurden dabei sowohl ein Mono- und Disulfamat des Betulins ohne einer weiteren polaren Gruppe am Betulin, und zwei enantiomere Sulfamate des Acetylbetulins (**Abbildung 49**).

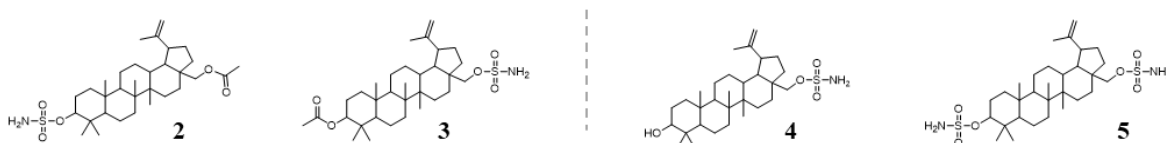


Abbildung 49. Untersuchung des Einflusses, abhängig von der Anzahl der inhibierenden Gruppen, auf die Inhibierung der CA IX anhand der Sulfamatgruppen von Betulinyl-28-O-sulfamat **4** und Betulinyl-3,28-O'-disulfamat **5**, welche zudem mit den C3- oder C28-verknüpften Sulfamaten 28-O-Acetylbetulinyl-3-O-sulfamat **2** und 3-O-Acetylbetulinyl-28-O-sulfamat **3** verglichen werden sollten.

In **Abbildung 50** sind die Michaelis-Menten-Auftragungen der untersuchten Inhibitoren **4**, **5**, **6** und **7** gezeigt, wobei bei den Betulinderivaten **4** und **5** ein Konzentrationsbereich zwischen $c_{\text{Inhibitor}} = 500 \text{ nM} - 10 \text{ }\mu\text{M}$ gewählt wurde und auf Grund der deutlich besseren inhibierenden Eigenschaften der beiden nicht Betulinderivate, diese in einem Konzentrationsbereich zwischen $c_{\text{Inhibitor}} = 50 \text{ nM} - 200 \text{ nM}$ getestet wurden. Die Messung erfolgte am Plattenlesegerät (Infinite F200 PRO) von Tecan, bei einer konstanten Temperatur von $T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, einer Messzeit von 10 min und einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$. Unter Hilfenahme von GraphPad Prism 9 erfolgte die Bestimmung der K_i -Werte durch Auswertung der erhaltenen Messdaten.

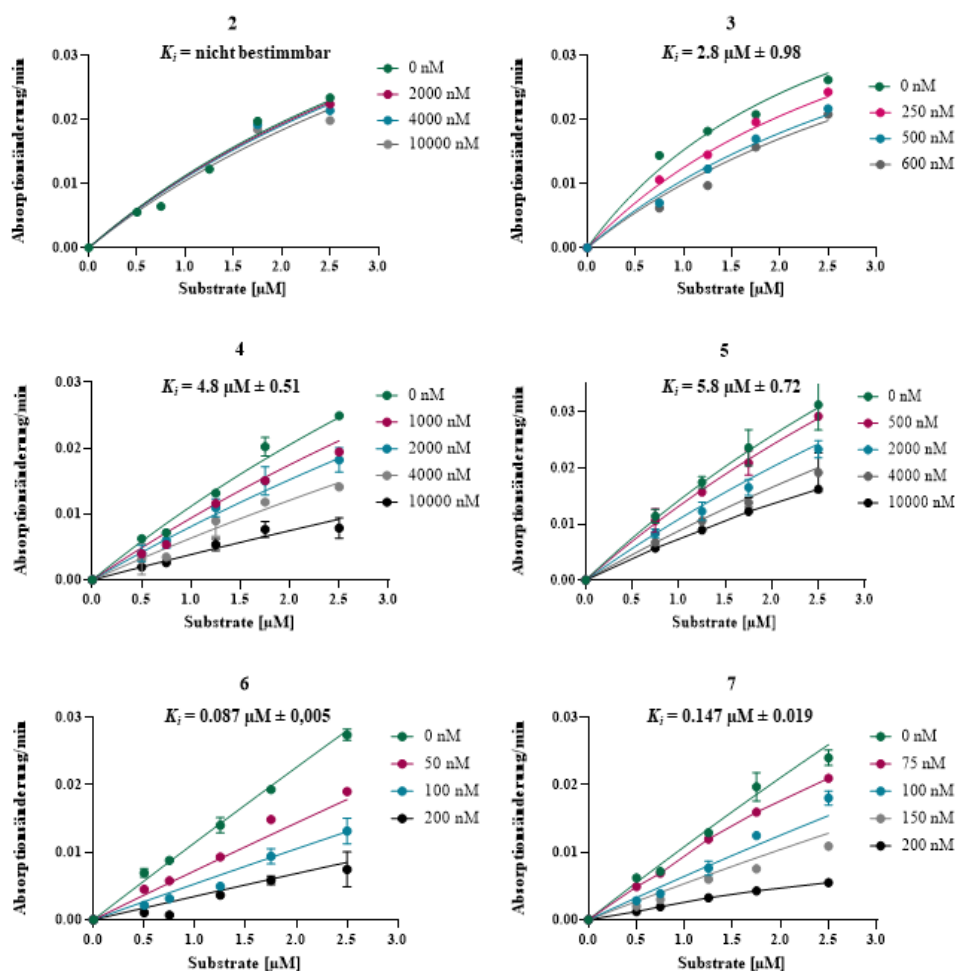


Abbildung 50. Michaelis-Menten-Auftragung der Inhibitoren **2**, **3**, **4** und **5**. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in zwei unabhängigen Versuchen bei einer Messdauer von 10 Minuten bei $T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für verschiedene Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gemessen.

Bis auf Verbindung **2** zeigen alle Sulfamate eine Inhibierung der CA IX-Aktivität. Wie schon bei den zuvor untersuchten Sulfamaten **6** und **7**, zeigte auch bei dieser Messung das Monosulfamate (Inhibitor **4**) eine stärkere Inhibierung der Carboanhydrase IX im Vergleich zu dem Disulfamate des Betulins (Inhibitor **5**). Im Vergleich zu den literaturbekannten Sulfamaten **6** und **7**, zeigt die Inhibierung der CA IX mit den Sulfamaten des Betulins **4** und **5** deutlich schwächere Effekte. Jedoch ist auch hier deutlich zu sehen, dass die einfachsubstituierten Derivate **3** und **4** einen stärkeren inhibierenden Effekt mit Werten von $K_i = 2.8 \mu\text{M}$ (für **3**) und $K_i = 4.8 \mu\text{M}$ (für **4**) zeigt. Das Disulfamat des Betulins **5** zeigt die kleinste Inhibierung mit einem $K_i = 5.8 \mu\text{M}$. Eine mögliche Begründung wäre die Ausrichtung der Substanz in der Enzymtasche. Da die Enzymtasche der CA IX sowohl über eine hydrophile, als auch eine hydrophobe Seite verfügt, wäre es denkbar, dass eine höhere Hydrophobie an der C3-Position zu einer begünstigten Ausrichtung des Inhibitors beiträgt und so eine effektivere Inhibierung des aktiven Zentrums erlaubt. Dies bestätigt die Annahme, dass polare und unpolare Wechselwirkungen innerhalb der Enzymtasche zu signifikanten Unterschieden im Bindungsvermögen und der Stabilität führen.

c) Untersuchung des Einflusses der Knüpfungsstelle am Betulin (C3- oder C28-Position) und dem Einfluss der Linkerlänge anhand verschiedener Sulfonamide

Neben den gezeigten Sulfamaten sollten anschließend unterschiedliche Sulfonamide auf ihre Fähigkeit hin, die CA IX zu inhibieren, getestet werden. Hierfür wurde zum einen ein Sulfonamid-Betulinsäure-Konstrukt gewählt, welches einen kurzen Linker zwischen der Betulinsäure und dem Sulfonamid besitzt. Dies entspricht **10** aus **Abbildung 51**. Anschließend erfolgte ein Vergleich des Sulfonamid-Betulinsäure-Konstrukten (**10**) mit Konjugaten, welche einen verlängerten Linker zwischen der Betulinsäure und dem Sulfonamid besitzen. Gezeigt sind diese (**13b**, **13b**, **14a**, **14b**) ebenfalls in **Abbildung 51**.

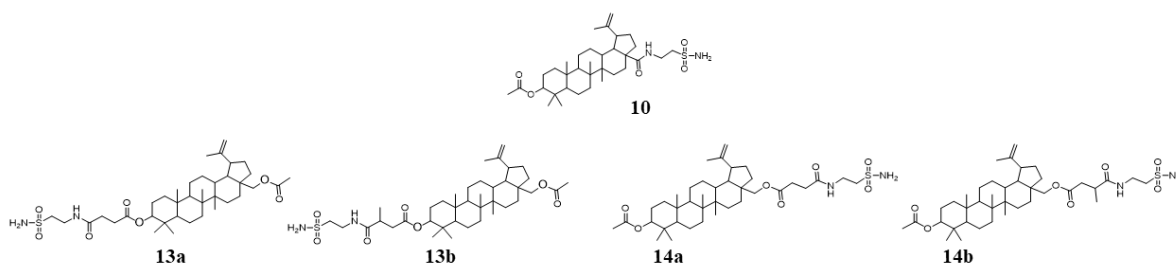


Abbildung 51. Untersuchung des Einflusses der Position am Betulin (C3- oder C28-Position) der inhibierenden Gruppen anhand zweier Enantiomere (**13a** und **14a**, sowie **13b** und **14b**). Zudem soll eine Einschätzung des Einflusses der Kettenlänge durch den Vergleich von **10** und **14a** erfolgen.

In **Abbildung 52** und **Abbildung 53** sind die Michaelis-Menten-Auftragungen der untersuchten Inhibitoren **10**, **13a**, **13b** und **14a** und **14b** gezeigt, wobei bei den Betulinderivaten **13a** und **13b** ein Konzentrationsbereich zwischen $c_{\text{Inhibitor}} = 2000 \text{ nM}$ - $10 \mu\text{M}$ gewählt wurde und auf Grund der deutlich besseren inhibierenden Eigenschaften der beiden C28-substituierte Sulfonamide **10**, **14a** und **14b**, diese in einem Konzentrationsbereich zwischen $c_{\text{Inhibitor}} = 200 \text{ nM}$ - 2000 nM getestet wurden. Die Messung erfolgte am Plattenlesegerät (Infinite F200 PRO) von Tecan, bei einer konstanten Temperatur von $T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, einer Messzeit von 10 min und einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$. Unter Hilfenahme von GraphPad Prism 9 erfolgte die Bestimmung der K_i -Werte durch Auswertung der erhaltenen Messdaten.

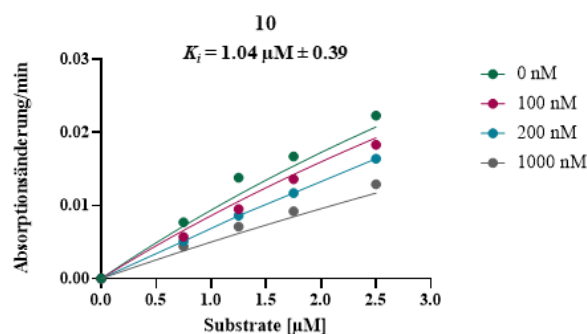


Abbildung 52. Michaelis-Menten-Auftragung des Inhibitors 3-O-Acetylbetulinsäure-28-taurinamid **10**. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in zwei unabhängigen Versuchen bei einer Messdauer von 10 Minuten bei $T = 20\text{ °C}$ für verschiedene Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gemessen.

Beim Vergleich der getesteten Betulin-Sulfamatderivate mit dem Sulfonamid **10** ist eine deutliche Steigerung der CA IX-Hemmung mit einem $K_i = 1.04\text{ µM}$ (Vgl.: $K_i = 4.8\text{ µM}$ für **4**) zu erkennen. Neben dem Vergleich zwischen Sulfamat- und Sulfonamid-Betulinderivaten, soll auch der Einfluss der Kettenlänge zwischen der Betulinsäure und dem Sulfonamid untersucht werden. Vergleicht man **10** mit **14a**, fällt auf, dass die Hemmung der CA IX-Aktivität beim Hinzufügen des verlängerten Linkers bei **14a** geringfügig abnimmt ($K_i = 1.14\text{ µM}$ bei **14a**). Beim Einführen einer Methylgruppe innerhalb des Linkers, wie es bei **14b** zu sehen ist, erhöht sich der K_i -Wert erneut, sodass **14b** nur noch einen $K_i = 2.3\text{ µM}$ aufweist. Auch hat die Position am Betulin einen erheblichen Einfluss auf die Inhibierung der CA IX. C3-verknüpfte Sulfonamide verlieren abrupt die Fähigkeit der CA IX-Inhibierung. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnten die zwei benachbarten Methylgruppen sein, wodurch es zu einer sterischen Hinderung bei der Bindung der Sulfonamidgruppe am aktiven Zentrum kommt. Ebenfalls möglich sind Wechselwirkungen mit der polaren Seite der Enzymtasche, welche eine effektive Bindung an das aktive Zentrum der CA IX verhindern.

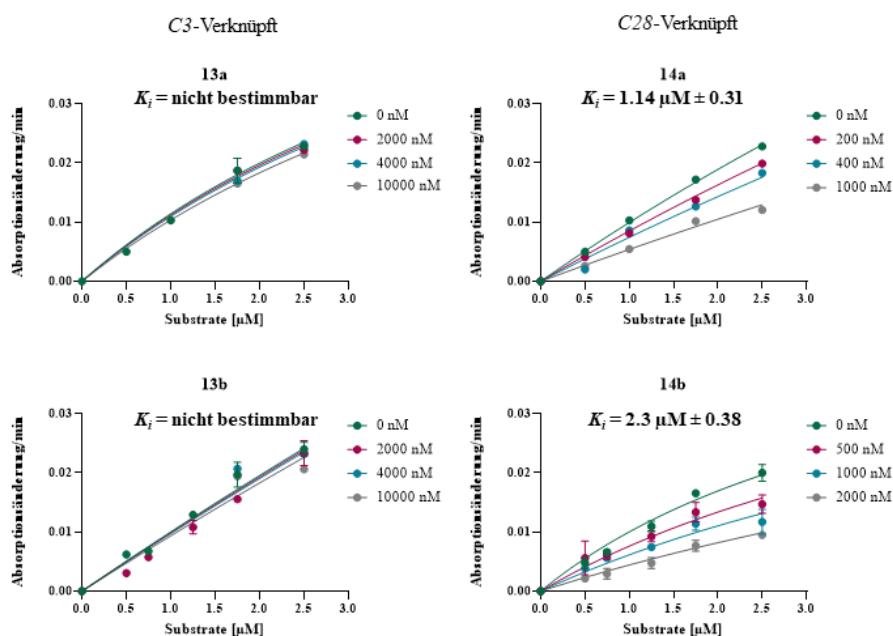


Abbildung 53. Michaelis-Menten-Auftragung der Inhibitoren **13a**, **13b**, **14a** und **14b**. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in zwei unabhängigen Versuchen bei einer Messdauer von 10 Minuten bei $T = 20\text{ °C}$ für verschiedene Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gemessen.

Da auch das C3-substituierte Sulfamat **2** ähnliche Effekte zeigte, wie die C3-verknüpften Sulfonamide **13a** und **13b**, sollte dieser Effekt noch genauer untersucht werden. Zudem wäre ein Abgleich dieser Messungen mit einem zweiten Testsystem (z. B. *Stopped-flow CO₂-Assay*) von großem Interesse.

d) Enzymkinetische Untersuchung der Acetazolamid-Derivate

Bei den zuvor durchgeführten *in silico* Untersuchungen durch Andreas Thiel konnte zudem gezeigt werden, dass Acetazolamid einer der effektivsten und etabliertesten Inhibitoren der CA IX ist. Hinzu kommt, dass eine Verknüpfung von Wirkstoff (Betulin) und Bindegruppe (Acetazolamid) über einen möglichst polaren Linker, einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit in wässrigen Medien und somit auf die Inhibierung der CA IX haben könnte. Bei der Entwicklung der Acetazolamid basierten Verbindungen entstanden zwei verschiedenen Acetazolamid-Betulin(säure)-Derivat. Diese unterschieden sich, wie schon bei Verbindung **10** und **14a**, in der variierenden Linkerlänge. So soll auch bei diesen Inhibitoren neben dem Einfluss der Bindegruppe eine Aussage über den Einfluss der Linkerlänge getroffen werden. Zudem wurden verschiedene Betulin-freie Derivate synthetisiert. Neben den Vorstufen **15** und **16**, wurde Verbindung **17**, welche dem Linker und der Bindegruppe von Verbindung **21** entspricht, Vergleich zu den Betulinderivaten verwendet und alle nicht Betulin-Derivate ebenfalls enzymkinetisch untersucht. Die dazugehörigen Strukturen sind in **Abbildung 54** zu sehen.

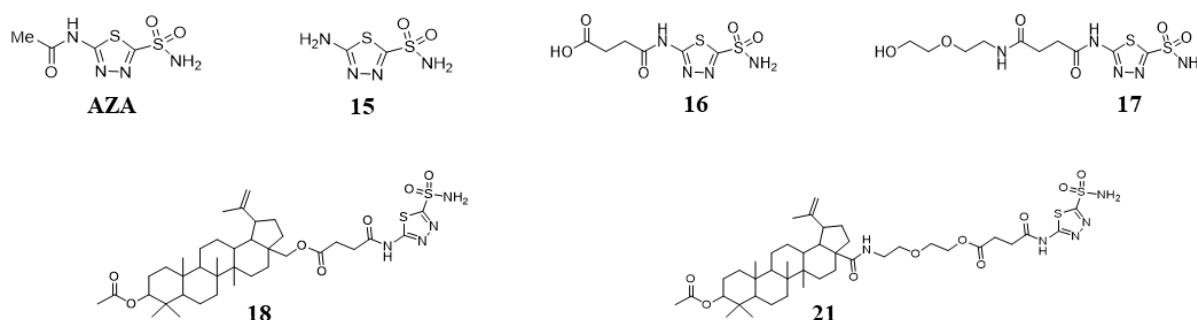


Abbildung 54. Gezeigt sind die Strukturformeln ausgewählte Beispiele der hergestellten Acetazolamid-Derivate, welche mit Acetazolamid verglichen werden sollen. Die enzymkinetischen Untersuchungen wurden sowohl an einem Betulin-Acetazolamid-Derivat (**18**), einem Betulinsäure-Acetazolamid-Derivat (**21**), als auch an einem nicht-Betulin-Derivat (**17**) durchgeführt.

In **Abbildung 55** sind die Michaelis-Menten-Auftragungen der untersuchten Inhibitoren **15,16, 17, 18**, und **21** gezeigt, wobei bei den Betulinderivaten **18** und **21** ein Konzentrationsbereich zwischen $c_{\text{Inhibitor}} = 250 \text{ nM} - 1 \text{ }\mu\text{M}$ gewählt wurde und auf Grund der deutlich besseren inhibierenden Eigenschaften der nicht Betulinderivate **15,16** und **17**, diese in einem Konzentrationsbereich zwischen $c_{\text{Inhibitor}} = 100 \text{ nM} - 500 \text{ nM}$ getestet wurden. Die Messung erfolgte am Plattenlesegerät (Infinite F200 PRO) von Tecan, bei einer konstanten Temperatur von $T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, einer Messzeit von 10 min und einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$. Unter Hilfenahme von GraphPad Prism 9 erfolgte die Bestimmung der k_i -Werte durch Auswertung der erhaltenen Messdaten. Vergleicht man die fünf untersuchten Derivate des Acetazolamids, so wird direkt ein großer Unterschied zwischen den nicht-Betulinderivaten **15, 16** bzw. **17** und den Betulinderivaten **18** und **21** deutlich. Alle drei hergestellten und untersuchten Acetazolamid-Derivate ohne Betulin(säure) zeigen einen sehr guten Effekt auf die Hemmung der CA IX mit k_i -Werten zwischen $0.129 \text{ }\mu\text{M} - 0.19 \text{ }\mu\text{M}$. Die effektivste Hemmung konnte durch **16** erreicht werden mit einem $K_i = 0.129 \text{ }\mu\text{M}$. Anschließend wurden auch die Acetazolamid-Derivate mit Betulin(säure) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Esterase-Aktivität der CA IX zu hemmen. Verbindung **18** zeigte dabei eine Hemmkonstante im einstelligen μM -Bereich mit einem $K_i = 1.25 \text{ }\mu\text{M}$, ähnlich wie die zuvor untersuchten Sulfonamide des Betulins (siehe **10**). Erstaunlicher ist jedoch die ermittelte Dissoziationskonstante von **21**. Sowohl **21**, als auch **17** besitzen neben der gleichen Bindegruppe auch einen identischen Linker. Umso erstaunlicher ist der große Unterschied in den Hemmkonstanten mit einem $K_i = 0.146 \text{ }\mu\text{M}$ für **17** und einem $K_i > 10 \text{ }\mu\text{M}$ für **21**.

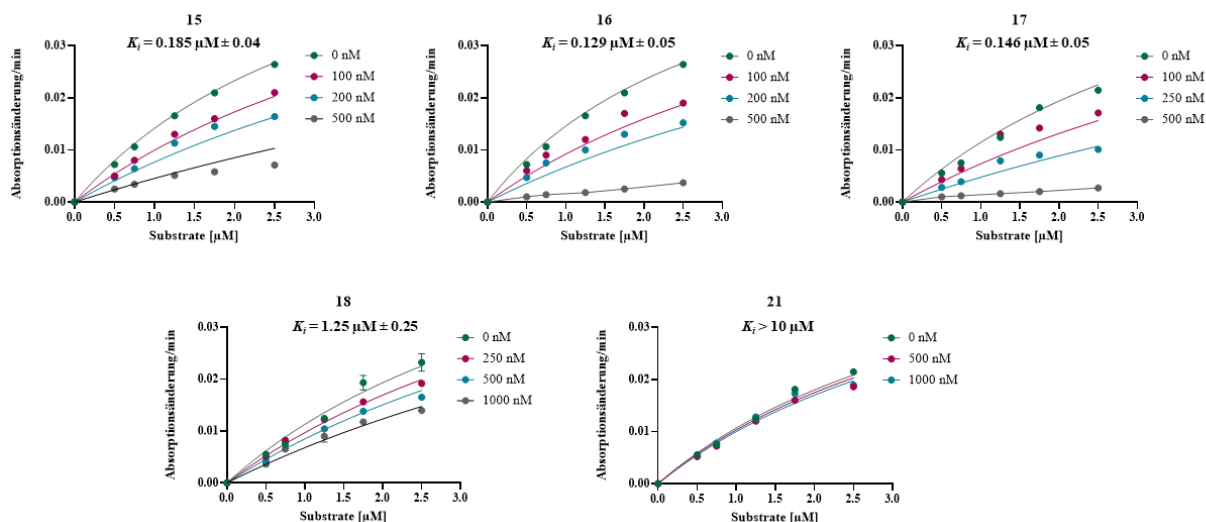


Abbildung 55. Michaelis-Menten-Auftragung der nicht-Betulinderivate **15**, **16** und **17** des Acetazolamids. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in zwei unabhängigen Versuchen bei einer Messdauer von 10 Minuten und $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für fünf verschiedene Substrat- und 3 verschiedene Inhibitorkonzentrationen gemessen.

Faktoren, wie beispielsweise eine schlechte Wasserlöslichkeit, können einen großen Einfluss auf die Dissoziationskonstante K_i haben. Bei dem verwendeten Esterase-Assay wurden Inhibitor und Enzym (CA IX) für 3 Minuten bei $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Eine Erhöhung der Inkubationszeit, wie in Shank *et al.* beschrieben¹⁶⁵, könnte eine Möglichkeit sein, ein Gleichgewicht zwischen Enzym und Inhibitor einzustellen und so eine bessere Hemmung zu erzielen. Auch wäre die Verwendung eines zweiten Testsystems, wie beispielsweise dem schon mehrfach erwähnten *Stopped-flow CO₂-Assay*, eine Möglichkeit, genauere Aussagen über diesen Inhibitor zu treffen.

e) Enzymkinetische Untersuchung der Saccharin-Derivate

Auch zyklische Sulfonamide, wie das Saccharin und dessen Derivate, sollen im Zusammenhang mit der Inhibierung der CA IX genauer untersucht werden. Carradori *et al.* zeigten in einer Veröffentlichung im Jahr 2016 die selektive Inhibierung der Carboanhydrase I, II, IX und XII mit Hilfe verschiedener Saccharin-Derivate¹⁵⁸. Die hierfür verwendeten Substanzen sind in **Abbildung 56** gezeigt. Dabei handelt es sich um das reine Saccharin, sowohl ein Derivat des Betulins, als auch eines ohne.

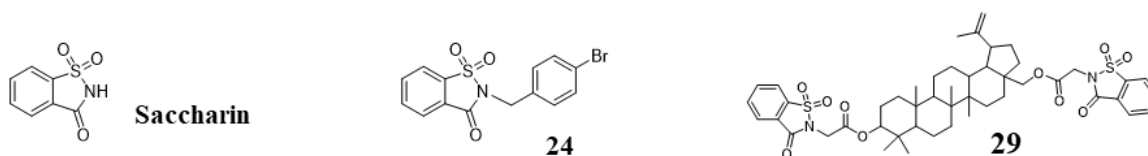


Abbildung 56. Gezeigt sind die Strukturformeln ausgewählte Beispiele der hergestellten Saccharin-Derivate und Saccharin selbst. Die enzymkinetischen Untersuchungen wurden sowohl an einem Betulin-Saccharin-Derivat (**29**), als auch an einem nicht-Betulin-Derivat (**24**) durchgeführt.

In **Abbildung 57** sind die Michaelis-Menten-Auftragungen von Saccharin und den Inhibitoren **24** und **29** gezeigt. Da die, im ersten Schritt durchgeführte, Restaktivitätsmessung bei $c_{\text{Inhibitor}} = 4\text{ }\mu\text{M}$ ausschließlich bei **24** einen minimalen Effekt gezeigt hat, wurde einzig bei diesem Inhibitor eine weitere Konzentration von $c_{\text{Inhibitor}} = 10\text{ }\mu\text{M}$ verwendet.

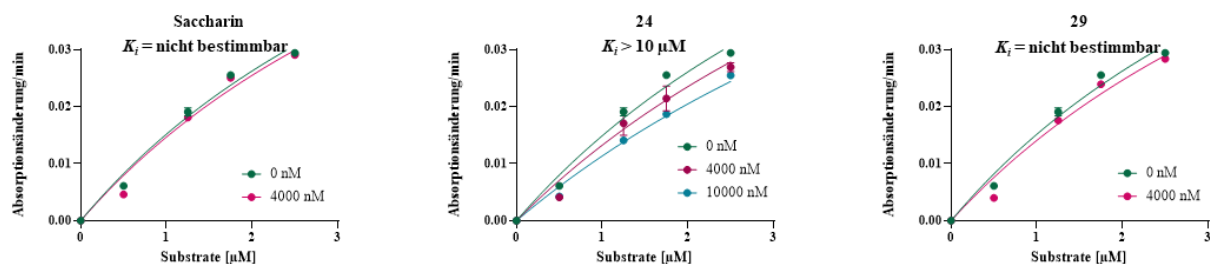


Abbildung 57. Michaelis-Menten-Auftragung von **Saccharin** und den Inhibitoren **24** und **29**. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in zwei unabhängigen Versuchen bei einer Messdauer von 10 Minuten bei $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für verschiedene Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gemessen.

Bei den hier gezeigten Saccharin-Derivaten konnte keine inhibierende Wirkung der CA IX unter Verwendung des Esterase-Assays nachgewiesen werden. In der Literatur, auf die sich die Synthese der neuen Saccharin-Betulin-Konjugate bezogen hat, zeigte Verbindung **24** eine sehr vielversprechende selektive Wirkung auf die Hemmung der CA IX mit einem $K_i = 22\text{ nM}$. Die ebenfalls mittels SFA (*Stopped-flow CO₂-Assay*) getesteten humanen CA I und CA II zeigten hingegen Werte von $K_i = 10\text{ }\mu\text{M}$ (hCA I und hCA II)¹⁵⁸. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten die Werte aus der Literatur bedauerlicherweise nicht bestätigt werden. Ein Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass Saccharin nicht direkt an das aktive Zn^{2+} -Zentrum der CA IX bindet und so eine Veränderung des Substrates (in Hinsicht auf das in der Literatur verwendete CO_2) einen großen Einfluss auf die ermittelten K_i -Werte hat. Auch hier wäre die Verwendung einer zweiten Methode unabdingbar, um eine genaue Aussage treffen zu können.

3.3 Diskussion des Teilgebietes: *Drug-Targeting* durch Hemmung der CA IX

Aufgrund der vielseitig auftretenden Residenz von normoxischen Tumoren gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, wie Daunorubicin und Docetaxel, oder der Behandlung mittels Strahlentherapie, ist es von großer Wichtigkeit, einen neuen Ansatz zur Behandlung von Krebs zu finden. Eine Studie von 2016 detektierte die Carboanhydrase IX (CA IX) als exzellenten Marker für den Nachweis von normoxischen Bereichen in Mammakarzinomzellen *in vitro* und *in vivo*. Eine gezielte Inhibierung der CA IX und damit Schwächung des Mammakarzinoms könnte ein potentieller Angriffspunkt für eine verbesserte Strahlentherapie sein. Zudem ist der Einsatz einer CA IX-Bindegruppe eine vielversprechende Möglichkeit für die Anreicherung des Wirkstoffes im Tumorgewebe. Ein Ansatz für die Entwicklung eines *drug-targeting* Systems war die Entwicklung eines Konjugat-Systems, welches Wirkstoffe und Enzymbindegruppen (bezogen auf CA IX) über einen leicht spaltbaren Linker miteinander verbindet. Realisiert wurde dies durch die Synthese unterschiedlicher Sulfamat- bzw. Sulfonamid-Betulin-Derivate. Hierbei wurde sowohl die Betulinsäure an der C28-Position, als auch das Betulin an der C3- und C28-Position modifiziert. Bei der Entwicklung der Sulfonamide wurden unterschiedlich lange Linker eingesetzt, um einen Einfluss, bezogen auf den Abstand zwischen Wirkstoff und Enzymbindegruppe (Sulfonamid), herleiten zu können. Anschließend wurde Saccharin als Enzymbindegruppe an das Betulin gebracht, da Saccharin als sehr selektiver Inhibitor für die CA IX bekannt ist. Zudem zeigten die verwendeten Enzymbindegruppe und deren Reste einen großen Einfluss auf die Ausrichtung des Inhibitors in der Enzymtasche, welche sowohl eine hydrophile, als auch eine hydrophobe Seite besitzt. Neben der Sulfonsäureamid/Sulfamat-Gruppe haben demnach auch die Polarität und der Aufbau des Inhibitors einen großen Einfluss auf die Inhibierung. Beruhend auf diesem Wissen, wurde, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Iris Thondorf von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, eine Masterarbeit von Herrn Andreas Thiel „zum *in silico* Wirkstoffdesign von neuartigen Inhibitoren mittels *docking*, Pharmakophor-Untersuchungen und 3D-QSAR (quantitative Struktur-Wirkungsanalyse im 3-dimensionalen Raum)“ angefertigt. Die erfolgreichen Synthesen der Betulin(säure)-konjugate (Sulfamate/Sulfonamide/Saccharine und Derivate des Acetazolamids) konnten mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Außerdem konnte die Zytotoxizität von der hergestellten Substanzen getestet und miteinander verglichen werden. Von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer CA IX-Inhibitoren war die Entwicklung eines einfachen und schnell durchführbaren Enzym-Kinetik-Tests, welcher bei Bestimmung der Dissoziationskonstanten k_i von einigen konkreten Inhibitoren eingesetzt werden konnte. Um einen Vergleich zu bereits publizierten CA-IX Inhibitoren anstellen zu können, wurden vier literaturbekannte Inhibitoren mit Hilfe des Esterase-Assays vermessen, der k_i -Wert bestimmt und mit den Werten der SFA (*Stopped-flow CO₂-Assay*) verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein konstanter Faktor von vier (vierfach höhere K_i -Werte nach Verwenden des Esterase-Assays) bei dem Vergleich von K_i -Werten aus der Literatur mit denen, in dieser Arbeit gemessenen K_i -Werte, beachtet werden muss. Nach Untersuchung der neu synthetisierten Verbindungen, konnte die überzeugendste Wirkung in Hinsicht auf Zytotoxizität, Selektivität und Inhibierung der CA IX von 3-O-Acetylbetulinsäure-28-taurinamid **10** mit einem IC_{50} -Werte, bezogen auf die Zelllinie MCF7, von $\text{IC}_{50} = 7.5 \mu\text{M}$ und einer Selektivität zur Normalzelllinie NIH3T3 mit einem Faktor von 2 erbracht werden. Auch überzeugte diese Verbindung bei der Inhibierung der CA IX, sodass ein $K = 1.04 \mu\text{M}$ erzielt werden konnte. Ähnlich gute Ergebnisse konnte durch 3-O-Acetylbetuliny-28-O-sulfamat **3**, mit einem $\text{IC}_{50} = 10.7 \mu\text{M}$ und einem $K_i = 2.8 \mu\text{M}$ erbracht werden. Trotz der beinahe identischen IC_{50} -Konzentration von $\text{IC}_{50} = 11.8 \mu\text{M}$, zeigt das spiegelbildliche Enantiomer von **3**, 28-O-Acetylbetuliny-3-O-sulfamat **2**, auch bei höheren Konzentrationen keine Inhibierung der CA IX-Aktivität. Vergleichbar verhält es sich bei den Enantiomeren **13a** und **14a**, wobei bei **13a** die inhibierende Enzymbindegruppe an der C3-Position des Betulins und bei **14a** die inhibierende Enzymbindegruppe an der C28-Position des Betulins gebunden

ist. Hier ist schon bei der Betrachtung der IC_{50} -Konzentrationen ein minimaler Unterschied zu erkennen. Das C3-verknüpfte Sulfonamid **13a** erreicht bei der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 einen $IC_{50} = 11.8 \mu M$, das C28-verknüpfte Sulfonamid **14a** sogar einen $IC_{50} = 8.6 \mu M$. Ein deutlich größerer Unterschied zeigt sich jedoch in der Fähigkeit, die CA IX-Aktivität zu hemmen. So ließ sich mit Hilfe von **14a** die Enzymaktivität schon mit einer Konzentration von 200 nM merklich vermindern ($K_i = 1.14 \mu M$ bei **14a**); **13a** hingegen erbrachte auch bei einer Konzentration von 10 μM keine Änderung der CA IX-Aktivität. Eine Übersicht der ermittelten K_i -Werte ist zusammenfassend in **Tabelle 5** gezeigt.

Tabelle 5. Ermittelte K_i -Werte und IC_{50} -Werte an der Zelllinie MCF7 (in μM mit Angabe der Standardabweichung) von vier literaturbekannten Substanzen (**U104**, **AZA**, **6** und **7**), den Sulfamaten **2-5**, den Sulfonamiden **10** und **13a-14b**, den Acetazolamid-Derivaten **17**, **18** und **21** und den Saccharin-Derivaten **24** und **29**.

	Substanz	K_i in μM	IC_{50} in μM (MCF7)
Vergleich aus der Literatur	Acetazolamid	0.094 ± 0.027	> 100
	U104	0.128 ± 0.045	> 100
	6	0.087 ± 0.005	17.8 ± 3.4
	7	0.147 ± 0.019	95.1 ± 5.6
Sulfamate	2	$K_i > 10$	11.8 ± 1.0
	3	2.8 ± 0.98	10.7 ± 0.5
	4	4.8 ± 0.51	11.4 ± 1.1
	5	5.8 ± 0.72	14.2 ± 1.2
Sulfonamide	10	1.04 ± 0.39	7.5 ± 0.7
	13a	$K_i > 10$	11.87 ± 0.6
	13b	$K_i > 10$	7.3 ± 1.5
	14a	1.1 ± 0.31	8.6 ± 0.7
	14b	2.3 ± 0.38	5.7 ± 0.9
Acetazolamid-Derivate	15	0.185 ± 0.04	> 100
	16	0.129 ± 0.05	> 100
	17	0.146 ± 0.05	> 100
	18	1.25 ± 0.25	6.2 ± 0.2
	21	$K_i > 10$	> 100
Saccharin-Derivate	Saccharin	$K_i > 10$	> 100
	24	$K_i > 10$	> 100
	29	$K_i > 10$	75.0 ± 3.7

Auch die Untersuchung der hergestellten Saccharin-Derivate konnte im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt werden, jedoch lagen die bestimmten IC_{50} -Konzentration aller Saccharin-Derivate (ohne Betrachtung der Vorstufen) über einem Wert von $IC_{50} = 50 \mu M$. Eine Ausnahme ist Verbindung **23** mit einem Wert von $IC_{50} = 28.1 \mu M$ (MCF7). Auch eine Inhibierung der CA IX-Aktivität konnte, durch einen Zusatz der Saccharin-Derivate, nicht erzielt werden. Dies könnte jedoch dadurch begründet werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Esterase-Assay zur Bestimmung der K_i -Werte verwendet wurde. Bei allen Vergleichswerten aus der Literatur wurde der *Stopped-flow* CO_2 -Assay mit CO_2 als Substrat verwendet, wodurch es zu erheblichen Unterschieden kommen kann.

Aufgrund der vielversprechenden zytotoxischen Wirkung von **18** für die Zelllinie MCF7 mit $IC_{50} = 6.2 \mu M$, war eine enzymkinetische Betrachtung der synthetisierten Acetazolamid-Derivate von großem Interesse. Vier der fünf untersuchten Acetazolamid-Derivate zeigten mit K_i -Werten von

$K_i = 0.129 \mu\text{M} - 1.25 \mu\text{M}$ sehr gute bis gute Inhibierung der Carboanhydrase IX. Lediglich bei **21** konnte in dem verwendeten Konzentrationsbereich keine Inhibierung festgestellt werden, sodass der ermittelte K_i - Wert in einem Konzentrationsbereich größer $10 \mu\text{M}$ lag. Betrachtet man die Struktur von **21**, so fällt auf, dass diese Verbindung aus einem sehr unpolarem Grundgerüst und einem dem gegenüber sehr polarem Linker und einer polaren Bindegruppe besteht. Dies könnte ein Grund für die geringe Enzymhemmung sein, da auf Grund der unzureichenden Löslichkeit die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen dem freiem Enzym bzw. Inhibitor und dem gebildeten Enzym-Inhibitor-Komplex nach einer Inkubationsdauer von 3 Minuten noch nicht vollständig stattgefunden hat. Dies wäre auch ähnlich denkbar bei den Saccharin-Derivaten **24** und **29**. Um eine genaue Aussagen über die Fähigkeit der Substanzen, die CA IX-Aktivität zu senken, treffen zu können, wäre es von großem Interesse, eine zweite Methode, beispielsweise den schon mehrfach erwähnten *Stopped-flow CO₂-Assay* zu verwenden und beide Methoden miteinander zu vergleichen. Mit einem großen Teil der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen ist es jedoch sehr gut möglich, die Aktivität der CA IX zu verringern und dies mit dem eigens dafür etablierten Esterase-Assay nachzuweisen. Durch Verwendung dieser Substanzen wäre neben einer Senkung der CA IX-Aktivität und der damit verbundenen Schwächung des Tumors auch eine Anreicherung des Wirkstoffes (Betulin oder Betulinsäure) in der räumlichen Nähe des Tumors möglich.

4. Lokale Tumorbehandlung bei *equinen* Melanomen

4.1 Einleitung

4.1.1 Das *equine* Melanom

Schätzungsweise beträgt die Zahl der in Deutschland gehaltenen Pferde und Ponys rund eine Million, weltweit liegt die Zahl sogar bei über 60 Millionen Tieren.¹⁶⁹ In dieser Arbeit nehmen Schimmel eine besondere Stellung ein, da 80 % der über 15-jährigen Schimmel an Melanomen erkranken^{170, 171}. Bei 60 % der Melanome handelt es sich zudem um maligne Tumore, die in benachbartes Gewebe, Lymphknoten und andere Organe metastasieren können³⁷. Das *equine* maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor der Pigment-bildenden Melanozyten³². Melanozyten stammen von neuroektodermalen Melanoblasten ab und befinden sich hauptsächlich in der Haut, insbesondere innerhalb der *Stratum Basale* der Epidermis und in der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel¹⁷². Obwohl Melanome bei Pferden und Maultieren aller Art und Haarfarbe auftreten können, sind sie in erster Linie eine Krankheit bei ergrauenden Pferden, mit 50 % der gesamten Population. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde erstmals von McFadyean der Zusammenhang zwischen der grauen Fellfarbe und der Melanombildung bei Pferden beobachtet¹⁷³. Auch wenn die Ätiologie von Melanomen bei Pferden noch nicht vollständig geklärt ist, deuten aktuelle Daten auf eine genetische Mutation des Melaninstoffwechsels hin. Grund für diese Korrelation ist, dass der Phänotyp des schnellen Ergrauens bei Schimmeln verbunden ist mit einer Genduplikation im Intron 6 des *Syntaxin17*-Gens. Diese Mutation sorgt dafür, dass aus einem schwachen *enhancer* Element ein starkes Melanozyten-spezifisches Motiv wird. Daraus folgend wird das benachbarte *Syntaxin17* und *NR4A3*-Gen vermehrt exprimiert. Dies führt wiederum zur Ausbildung von Melanomen¹⁷⁴. Ergraute Pferde werden mit einer braunen bis schwarzen Fellfärbung geboren. Durch eine autosomal dominante Vererbung zeigt sich schon in den ersten Lebensjahren eine Erhellung des Felles. Im Vergleich zu heterozygoten Pferden (G/g-Genotyp) weisen homozygote Pferde (G/G-Genotyp) einen viel schnelleren und zudem vollständigen Ergrauungsprozess auf. Ebenfalls leiden homozygote Pferde, also reinerbige Pferde mit zwei gleichen Allelen (G/G-Genotyp) unter einer höheren Wahrscheinlichkeit und Schwere von Melanomen¹⁷⁵. Auch zeigen Schimmel oftmals eine hohe Inzidenz für Vitiligo-ähnliche Depigmentierung^{175, 176}. Anders als beim humanen Melanom, ist eine starke Exposition von UV-Strahlung beim Pferd nicht der hauptsächliche Grund für das *equine* Melanom. Auf Grund ihrer dunklen, pigmentreichen Haut und den meist UV geschützten Stellen, an denen das *equine* Melanom häufig zu finden ist (Schweifunterseite, Genitalbereich, After), ist es sehr unwahrscheinlich, dass die UV-Strahlung eine signifikante Rolle bei der Entstehung von Melanomen beim Pferd spielt¹⁷⁴.

4.1.2 Das *equine* Sarkoid

Erstmals erwähnt wurde die Ausbildung von Sarkoiden bei Pferden 1936 durch Jackson¹⁷⁷. Sarkoide sind lokalinvasive, fibroblastische Hauttumore und stellen die weltweit häufigste Tumorart bei Pferden dar^{178, 179}, mit einer Auftrittsrate von 12.5 - 67 % aller Neoplasmen^{180, 181}. Bei Neoplasmen handelt es sich um Neubildungen vom Gewebe in Form einer Geschwulst. Das *equine* Sarkoid (ES) kann einzeln oder multipel auftreten und besitzt die Fähigkeit des lokal infiltrativen Wachstums in die Haut, Unterhaut und manchmal auch in das Muskelgewebe. Heutzutage kann zwischen sechs verschiedenen Formen des ES unterschieden werden^{181, 182}. Zum einen die okkulte Form, welche sich durch Bildung einer haarlosen und rauen Hautveränderung bemerkbar macht. Dieser Typ kommt vor allem an Kopf- und Halsregionen vor, zum Teil aber auch an den Innenschenkeln der Hinterbeine. Die zweite Form, das verruköse ES zeigt sich durch Bildung einer trockenen, schuppigen und warzenartig-erscheinenden Oberfläche. Verruköse ES können sich lange Zeit ruhig verhalten. Sie transformieren sich aber leicht in

den fibroblastischen Typ, sobald sie durch ein Trauma (Verletzung, chirurgische Entfernung) gereizt werden. Die fibroblastische Form erscheint als harte, Bindegewebs-artige, knotige Massen in der Dermis, oft blutig und eitrig entzündet. Das fibroblastische ES ist der am häufigsten vorkommende Sarkoid-Typ. Bei der vierten möglichen Form handelt es sich um das noduläre ES (aus dem lateinischen für Knoten), ein vollständig subkutan (unter der Haut) liegender Tumor. Diese Form des *equinen* Sarkoids kann klinisch starke Deformationen hervorrufen. Die invasivste Form bilden die bösartigen ES, welche, wie der Name schon andeutet, ein stark invasives Wachstum besitzt, wodurch multiple Tumore entstehen können. Als sechste Form ist in der Literatur eine gemischtes ES beschrieben, welches Merkmale von mehreren Formen aufweisen kann¹⁸³. Die häufigsten Orte für die Sarkoid-Entwicklungen sind der Kopf (periorbitale Region, Ohrnadel und Lippen) und Hals (39%), an den Extremitäten (35%) und der Unterseite des Rumpfes (26%)¹⁸¹. Hauptsächlich Auslöser für die Entstehung von Sarkoiden sind Hautverletzungen^{184, 185} (Traumata) und das bovine Papillomavirus (BPV)-Typen 1 und 2, das einzig bekannte artübergreifende Papillomavirus^{182, 186, 187}. Aus pathologischer Sicht handelt es sich bei dem *equinen* Sarkoid um einen gutartigen Tumor der Fibroblasten, welcher keine Metastasen ausbildet, jedoch eine ausgeprägte Rezidivneigung nach deren Behandlung aufweist. Trotz des meist positiven Befundes, kann das Wohlbefinden, die Lebensqualität und Ästhetik von betroffenen Pferden stark eingeschränkt sein¹⁸⁸.

4.1.3 Bisherige Behandlungsmöglichkeiten und dessen Erfolgchancen

Derzeit verfügbare Therapien sind entweder sehr ineffizient oder mit einem großen Risiko für Tier und den behandelnden Tierarzt verbunden. Behandlungen mittels Immuntherapie sind vielversprechend, erfordern jedoch noch enorm viel Forschung¹⁸⁹. Aus diesem Grund werden kleinere Tumore heute häufig chirurgisch entfernt oder durch chemotherapeutische Medikamente, wie Cisplatin, behandelt. Allerdings kann eine ungünstige Tumorumlage oder das Vorhandensein von Tumoren an wichtigen anatomischen Strukturen wie Nerven oder Gefäßen, die Nähe zum Schließmuskel des Analbereiches oder andere wichtige Organe, die chirurgische Entfernung erschweren. Das zytotoxische Mittel Cisplatin birgt ein hohes toxisches Expositionsrisiko^{39, 190-192} für den behandelnden Tierarzt und jede andere Person, die mit der Substanz in Berührung kommt. Zudem ist eine intraläsionale Verabreichung durch das verhärtete Gewebe des Tumors sehr erschwert. In jedem Fall müssen die Tiere in einer Tierklinik behandelt und zuvor anästhesiert werden, was mit zusätzlichem Aufwand, Kosten und Risiken verbunden ist. Eine kommerziell erhältliche topische Behandlungsmöglichkeit für das *equine* maligne Melanom ist derzeit noch nicht vorhanden, welche jedoch die Möglichkeit einer schonenden und einfachen Behandlung bieten könnte.

4.1.4 Entwicklung eines topischen Applikationssystems

Auf Grund der oben genannten Probleme, sollte im Rahmen eines vom BMWi geförderten Verbundprojektes (Biozentrum MLU, Tierhochschule Hannover (TiHo), BioSollutions Halle GmbH, Skinomics GmbH) eine topische Behandlungsmöglichkeit von *equinen* malignen Melanomen entwickelt werden. Grundlage waren die in der AG Paschke entwickelten Wirkstoffe auf Betulinsäurebasis. Ein Arzneimittel, das dermal verabreicht werden kann, d.h. eine medizinisch wirksame Creme, die der Tierhalter in Absprache mit dem Tierarzt selbst anwenden kann, ist in vieler Hinsicht eine enorme Erleichterung. So soll eine einfache Verabreichung durch den Pferdehalter gewährleistet werden, welches eine geringe Belastung des tierischen Organismus bietet und den Stressfaktor des Pferdes, durch wegfallende Transporte, minimiert. Zudem würde eine topische Anwendung in der eigenen Stallung deutlich weniger Kosten für den Halter bedeuten, da ein teurer Aufenthalt in Tierkliniken entfällt. Aufbauend auf der Veröffentlichung von Liebscher *et al.* aus dem Jahr 2016 konnte gezeigt werden, dass die natürlich vorkommende Betulinsäure (BS) und das synthetisch modifizierte Betulinsäurederivat NVX-207, *in vitro* antiproliferative und zytotoxische

Wirkungen gegen *equine* Melanomzellen ausüben, die durch die Induktion von Apoptose vermittelt wird³⁷. Zudem konnte durch eine direkte, intraläsionale Applikation von NVX-207 in Tumore zweier Patienten (Pferd 1 war eine 13-jährige Warmblutstute mit einem Gewicht von 695 kg und Pferd 2 war eine 18-jährige Warmblutstute mit einem Gewicht von 587 kg) gezeigt werden, dass während und nach der Behandlung keine Nebenwirkungen aufgetreten sind³⁷. Allerdings hat sich die Applikation der Testsubstanz in das derbe Tumorgewebe als schwierig dargestellt, da ein hoher Injektionsdruck notwendig war, um die Substanz intratumoral zu injizieren. Diese Applikation birgt das Risiko, dass ein Teil des Medikaments durch das Interstitium (Zwischenraum von Tumor und Normalgewebe) direkt wieder aus dem Tumorgewebe heraus gepresst wird und ist für die Patienten (betroffene Pferde) mit Schmerzen verbunden. Ziel des Projektes „TopiDrugHorse“ war die Entwicklung einer topischen Behandlungsform von *equinen* Melanomen und *equinen* Sarkoiden, welche eine zielgerichtete und vereinfachte Applikation ermöglichen soll. Bisher ist keine Therapie mit Aussicht auf vollständiger Heilung bekannt, sodass die heute konventionellen Behandlungsmethoden, wie beispielsweise das chirurgische Entfernen von kleinen Tumoren, die Gabe von Cisplatin und anderen Chemotherapeutika, zum Beispiel Cimetidine¹⁹³⁻¹⁹⁵ oder eine Immuntherapie lediglich helfen können die Ausbreitung des Tumors zu verlangsamen. Eine Verabreichung von Cisplatin führt in den häufigsten Fällen zu starken Nebenwirkungen und stellt eine gesundheitliche Gefahr für den behandelten Tierarzt dar^{39, 192, 196}. Des Weiteren führt die oftmals auftretende Angiogenese zu schlechten Prognosen, da das oral verabreichte Medikament so nur in unzureichenden Mengen seinen Zielort erreicht¹⁹⁷. Ein weiterer Aspekt für die Entwicklung einer topischen Behandlungsform ist die Applikation durch den Halter. Bei bisherigen Behandlungsmethoden konnte oftmals die Applikation ausschließlich von dem behandelten Tierarzt oder speziellen Tierkliniken vorgenommen werden, sodass der Stressfaktor der Tiere bei häufig benötigten Transporten zum Behandlungsort sehr groß war. Auch waren bei solchen Eingriffen die Behandlungskosten sehr hoch. Durch Einbringung der untersuchten Wirkstoffe in eine speziell dafür hergestellte Formulierung (von der Firma Skinomics GmbH) kann eine schmerzfreie/schmerzarme, mehrfach täglich wiederholte, lokale Applikation des Wirkstoffs zu anhaltenden und ausreichend hohem Wirkstoffkonzentration im Tumor führen. Die Anwendung kann selbst von nicht-medizinischem Personal (Besitzern) risikofrei angewendet werden. Eine Anwendung als Hautcreme, die vom Besitzer des Pferdes selbst wiederholt aufgetragen werden kann, erleichtert somit die Therapie und erhöht durch eine höhere Akzeptanz der Besitzer auch den Therapieerfolg. Zu Beginn einer solchen Entwicklung stand die Wahl des verwendeten Wirkstoffes. Die Entscheidung, welcher Wirkstoff für die Herstellung des topischen Applikationssystems für die Behandlung von *equinen* Melanomen verwendet wurde, soll anhand unterschiedlicher Methoden in dieser Arbeit genauer aufgezeigt werden.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Zytotoxizität an equinen Zelllinien

Im ersten Schritt der Entwicklung einer topischen Behandlungsform war die Testung potentieller Wirkstoffe an verschiedenen *equinen* Zelllinien erforderlich. Zur Bestimmung und Beurteilung der zytotoxischen Wirkung wurden die zwei verschiedenen Assays (SRB- und MTT-Assay) an der *equinen* Melanomzelllinien MelDuWi (HoMel-A1)¹⁹⁸, *equinen* Sarkoidzellen (sRGO2) und an *equinen* Fibroblasten (PriFri2) durchgeführt. Als Vergleich dazu wurden die Versuche ebenfalls an der humanen Melanomzelllinie A375 erbracht. Alle potentiellen Wirkstoffe wurden zudem in DMSO gelöst und eine Endkonzentration von 0,5 % bei den Assays nicht überschritten. Als Kontrolle wurde die maximale Konzentration an DMSO als Wachstumskontrolle mitgeführt.

4.2.1.1 SRB-Assay

Die Zytotoxizität von Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, NVX-207, Betuliny-3,28-O'-disulfamat **5** und 3-O-Acetylbetulinsäure-28-taurinamid **10** wurde an den *equinen* Melanomzellen MelDuWi, den Sarkoidzellen sRGO1 und sRGO2 und einer *equinen* Normalzelllinie PriFri2 bestimmt. Diese fünf Substanzen wurden auf Grund ihrer guten Verfügbarkeit, schon zuvor durchgeführten Vorversuchen und den daraus resultierenden Ergebnissen für alle weiteren Untersuchungen gewählt. Als Vergleich diente die humane Melanomzelllinie A375. Die verwendete Zellzahl pro well der entsprechenden Zelllinien wurde vorab durch Auftragung unterschiedlicher Zellzahlen auf einer 96-well-plate bestimmt. Es wurde die Zellzahl verwendet, bei der nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden eine Absorption von 2 erreicht wurde. Alle gemessenen IC₅₀-Werte sind in **Tabelle 6** dargestellt.

Tabelle 6. Ermittelte IC₅₀-Konzentration (in µM mit Angabe der Standardabweichung) von Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, NVX-207, **5** und **10** bei Behandlung von *equinen* Melanomzellen MelDuWi, den Sarkoidzellen sRGO1 und sRGO2, einer *equinen* Normalzelllinie PriFri2 und einer humanen Melanomzelllinie A375 nach 96 Stunden Behandlungsdauer. Verwendet wurde der SRB-Assay, wobei mindestens drei biologische und zwölf technische Replikate angefertigt wurden.

	Betulinsäure	Extrakt	NVX-207	5	10
MelDuWi	23.4 ± 1.9	18.4 ± 2.0	3.7 ± 0.3	16.3 ± 2.4	10.7 ± 0.6
sRGO1	29.7 ± 10.2	19.9 ± 1.9	3.8 ± 2.3	17.9 ± 2.3	13.4 ± 1.4
sRGO2	45.9 ± 5.0	27.3 ± 27	3.5 ± 0.6	21.1 ± 5.0	19.4 ± 7.2
PriFri	27.2 ± 3.8	18.4 ± 5.7	3.4 ± 0.8	11.7 ± 3.6	11.3 ± 1.4
A375	14.0 ± 1.0	7.4 ± 1.4	2.7 ± 0.2	12.5 ± 2.1	6.4 ± 0.7

Die Behandlung mit Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, NVX-207, **5** und **10** führten zu IC₅₀-Werten zwischen 3 µM und 46 µM, abhängig von Substanz und Zelllinie. Die vielversprechendsten Ergebnisse erzielte der Wirkstoff NVX-207 mit einer medianen halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von 3 µM bei allen untersuchten *equinen* Zelllinien. Ein ähnlich gutes Ergebnis erzielte **10** mit ca. 10 µM, bei der humanen Melanomzelllinie A375 erreicht diese Substanz sogar eine halbmaximale Wirkung mit einer Konzentration von 6,4 µM. Auffallend ist die Zelllinie sRGO2, da hier eine Vielfach höher Konzentration an Wirkstoff benötigt wird, um den gleichen Effekt zu erzielen. Besonders fällt diese Tatsache bei den Sarkoidzellen sRGO2 nach Behandlung mit Betulinsäure auf. Eine hohe Selektivität konnte allerdings bei keiner der getesteten Substanzen nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Selektivitätsindizes in **Tabelle 7**. Bei den verwendeten Sarkoidzellen könnte dies an der starken Ähnlichkeit der Sarkoidzellen zu Fibroblasten liegen. Bei dem *equinen* Sarkoid, 1936 von Jackson *et al.* beschrieben¹⁷⁷, handelt es sich um einen lokalen, aggressiven fibroblastischen Tumor

der Dermis¹⁷⁹, welcher durch ein dem bovinem Papillom-Virus ähnlichen Virus hervorgerufen wird¹⁹⁹. Betulinsäure und das Borkenextrakt der Platane (enthält ca. 40 % Betulinsäure, Konzentration auf Betulinsäure bezogen) zeigen bei der Behandlung der *equinen* Zelllinien eine ähnliche Tendenz, jedoch zeigt das Borkenextrakt bei den Zelllinien sRGO2 und A375 nur eine halb so große inhibitorische Konzentration, um den gleichen Effekt zu erzielen, wie Betulinsäure. Die verbesserte Wirkung ist damit zu begründen, dass es sich bei dem Borkenextrakt um ein Gemisch verschiedener Naturstoffe handelt, welche einen Einfluss auf Löslichkeit und Wirkung haben.

Tabelle 7. Ermittelte Selektivitätsindizes der Pferdezelllinien durch Berechnung des Quotienten aus IC₅₀-Wert der *equinen* Fibroblasten und dem IC₅₀-Wert der entsprechenden Tumorzelllinie. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte von mindestens drei biologischen und zwölf technischen Replikaten.

Zelllinie	Betulinsäure	Extrakt	NVX-207	5	10
MelDuWi	1.2	1.0	0.9	0.7	1.1
sRGO1	0.9	0.9	0.9	0.7	0.8
sRGO2	0.6	0.7	1.0	0.6	0.6

Nach Auftragung der Dosis-Wirkungskurven (**Abbildung 58**) kann man diese in drei Abschnitte einteilen. Bei geringeren Konzentrationen kommt es zu keinem zytotoxischen Effekt und die Überlebensrate ist bei 100 %. Am stärksten ist dieser Abschnitt bei der Behandlung mit Betulinsäure zu erkennen. Nach Überschreiten einer bestimmten Konzentration kommt es zu einem plötzlichen und starken Abfall der Überlebensrate auf nahezu 0 %. Je kleiner der Bereich im ersten Abschnitt (Überleben entspricht 100 %), desto kleiner ist die Toleranz der Zellen auf die verwendete Substanz. Dies ist am deutlichsten bei der Substanz **NVX-207** zu erkennen. Nach Durchführung des verwendeten SRB-Assays konnte bei allen fünf verwendeten Wirkstoffen eine inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden. Beim Vergleich dieser ist jedoch deutlich ersichtlich, dass **NVX-207** die effektivste inhibitorische Konzentration mit durchschnittlich 3,5 µM zeigt. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlungsdauer von 96 Stunden bei allen eingesetzten Substanzen eine Wirkung auf das Wachstum der *equinen* Tumorzellen zu beobachten war. Da sich eine Behandlungsdauer von 96 Stunden am Pferd als problematisch darstellen könnte, wurde im nachfolgenden Teil ein zeitabhängiger SRB-Assay durchgeführt.

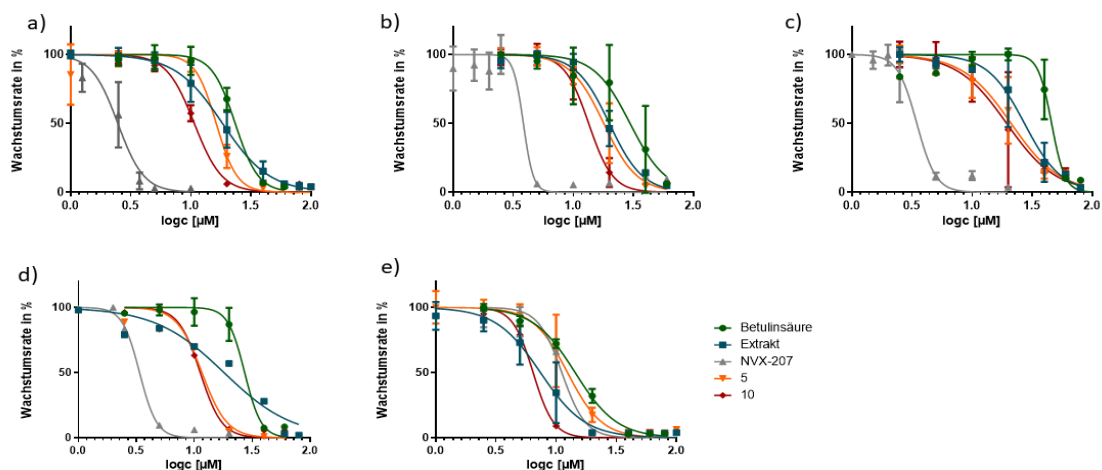


Abbildung 58. Dosis-Wirkungskurve aller (mit dem SRB-Assay) getesteten *equinen* Zelllinien. Für jede der fünf Zelllinien a) MelDuWi, b) sRGO1, c) sRGO2, d) PriFri2 und e) A375 sind die Dosis-Wirkungskurven der Substanzen Betulinsäure (grün), Borkenextrakt der Platane (blau), **NVX-207** (grau), **5** (orange) **10** (rot) dargestellt. Die Dargestellten Kurven zeigen die Mittelwerte von mindestens 3 biologischen und 12 technischen Replikaten.

4.2.1.2 Zeitabhängiger SRB-Assay

Zur Beurteilung der zeitabhängigen Wirkung wurde die *equine* Melanomzelllinie MelDuWi verwendet, da die geplante topische Wirkstoffverabreichung in erster Hinsicht für die Behandlung vom *equinen* Melanom zur Verfügung gestellt werden sollte. Untersucht wurde die zytotoxische Wirkung nach 3, 6, 12 und 24 Stunden. Zum Vergleich wurden ebenfalls die Werte der 96 Stunden-Messung mit aufgeführt. Nach dem jeweiligen Zeitpunkt nach Behandlung der Zellen wurde das Medium von den 96-well-plates entfernt und durch Medium ohne Wirkstoff ersetzt. Die Inkubation erfolgte anschließend bis zum Erreichen von 96 Stunden. Die weitere Ausarbeitung erfolgte wie in dem zuvor durchgeführten SRB-Assay (**Kapitel 6.4.1**). Die dazugehörigen Werte sind in **Tabelle 8** aufgelistet.

Tabelle 8. Ermittelte zeitabhängige IC₅₀-Werte (in μM mit Angabe der Standardabweichung) von Betulinsäure, Borkenextrakt der Platane, NVX-207, **5** und **10** bei der Behandlung von *equinen* Melanomzellen MelDuWi nach einer Behandlungsdauer von 3, 6, 12, 24 und 96 Stunden. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte von mindestens drei biologischen und zwölf technischen Replikaten.

Zeit in h	Betulinsäure	Borkenextrakt	NVX-207	5	10
3	112.0 $\pm$ 14.9	76.6 $\pm$ 12.1	8.4 $\pm$ 0.5	166.8 $\pm$ 42.3	32.2 $\pm$ 3.4
6	85.2 $\pm$ 9.3	53.8 $\pm$ 5.1	6.4 $\pm$ 0.4	94.8 $\pm$ 39.1	21.6 $\pm$ 1.5
12	69.7 $\pm$ 5.6	36.6 $\pm$ 4.4	5.7 $\pm$ 0.4	50.9 $\pm$ 4.0	18.2 $\pm$ 0.9
24	39.8 $\pm$ 3.6	26.9 $\pm$ 4.3	4.6 $\pm$ 0.3	25.1 $\pm$ 1.3	16.1 $\pm$ 0.9
96	23.4 $\pm$ 1.9	18.4 $\pm$ 2.0	3.7 $\pm$ 0.3	16.3 $\pm$ 2.4	10.7 $\pm$ 0.6

Nach einer Behandlungsdauer von drei Stunden zeigt sich für **5** die größte IC₅₀-Konzentration von 167 μM . Nach einer Behandlungsdauer von 12 Stunden kommt es jedoch zu einer großen Steigerung der zytotoxischen Wirkung, nach 96 Stunden erzielt **5** sogar eine IC₅₀-Konzentration von 16,3 μM .

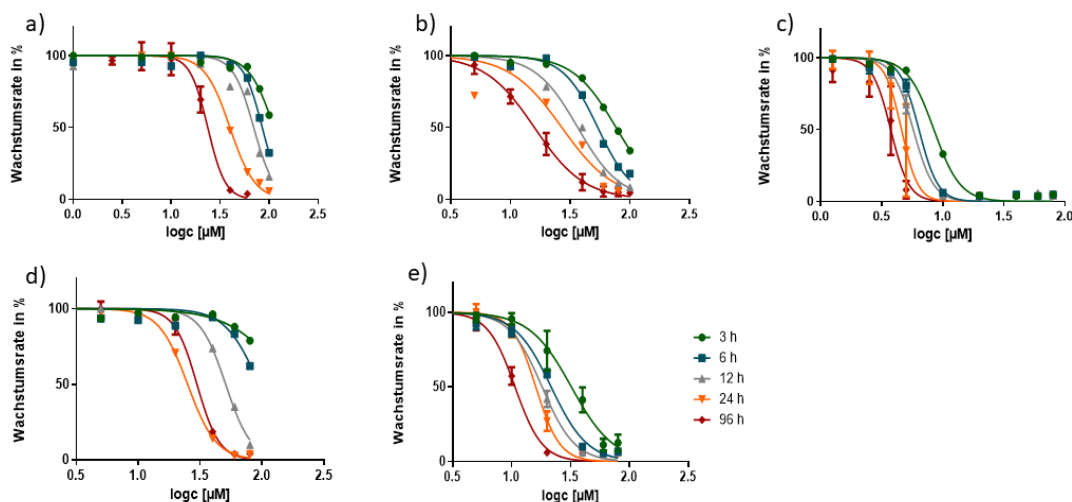


Abbildung 59. Dosis-Wirkungskurven der zeitabhängigen SRB-Messung an der Zelllinie MelDuWi nach einer Behandlungsdauer von 3 (grün), 6 (blau), 12 (grau), 24 (orange) und 96 Stunden (rot) mit den Substanzen a) Betulinsäure, b) Borkenextrakt der Platane, c) NVX-207, d) **5** und e) **10**. Die dargestellten Kurven zeigen die Mittelwerte von mindestens 3 biologischen und 12 technischen Replikaten.

Dies macht deutlich, dass zu Beginn der Behandlung eine Anreicherung des Wirkstoffes in der Zellmembran stattfindet und erst nach Überschreiten einer bestimmten Konzentration dieser in die Zelle gelangt. Eine Erklärung dafür wäre das Vorhandensein der polaren Seitenketten, die das Durchdringen der hydrophoben Zellmembran erschweren. Eine ähnlich hohe Konzentration zeigt Betulinsäure nach einer Dauer von drei Stunden mit 112 μM . Bei der Behandlung mit Betulinsäure zeigte sich jedoch auch

nach 96 Stunden Behandlungsdauer die größte inhibitorische Konzentration von 23.4 μM . Die beachtlichste Wirkung zeigte die Behandlung mit **NVX-207**. Schon bei einer Dauer von drei Stunden erreichte **NVX-207** eine IC_{50} -Konzentration von 8,4 μM . Dieser Wert liegt noch deutlich unter den 96 Stunden-Werten der restlichen Substanzen. Eine längere Inkubation ändert die halbmaximale Konzentration kaum, sodass nach einer Inkubation von 96 Stunden ein Wert von 3,7 μM erreicht wurde. Eine Behandlung der Pferdehaut mit dem Wirkstoff **NVX-207** könnte nach diesen Erkenntnissen schon zu sehr vielversprechenden Ergebnissen führen. Sehr gut erkennbar ist die gute Wirkung auch in **Abbildung 59**. Alle Kurven sind bei einer Behandlungsdauer zwischen 3 und 96 Stunden mit den Wirkstoffen **10** und **NVX-207** in der Auftragung der Dosis-Wirkungskurve beinahe deckungsgleich. Anders ist dies bei den Substanzen Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane und **5**. Hier liegen die Kurven der drei- und sechsständigen Behandlung aufeinander und verschieben sich erst bei Verlängerung der Behandlungsdauer zu kleineren Konzentrationen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Unterschied zwischen einer Behandlungsdauer von 24 Stunden und 96 Stunden unerheblich groß ist, sodass eine Behandlung der Melanome schon nach einer Dauer von 24 Stunden einen Effekt zeigen könnte. Dies ist von großer Bedeutung, da eine lange Verweildauer der Formulierung an der gleichen Stelle der Pferdehaut durch Bewegung und Reibung nicht immer gewährleistet werden kann.

4.2.1.3 MTT-Assay

Da bei dem zuvor beschriebenen SRB-Assay kein Unterschied zwischen lebend und toten Zellen getroffen wird, sondern die toten Zellen auf Grund Ihrer Beschaffenheit (Ablösen bei adhären Zellen) von lebenden Zellen separiert werden, wurde für eine bessere Aussagekraft ein zweiter Zytotoxizitätstest durchgeführt. Der MTT-Assay beruht, wie schon zuvor beschrieben, auf einen funktionierenden Stoffwechsel in der Zelle. Mit Hilfe des MTT-Assay wurde ebenfalls die Zytotoxizität von Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** an den *equinen* Melanomzellen MelDuWi, den Sarkoidzellen sRGO1 und sRGO2 und einer *equinen* Normalzelllinie PriFri2 bestimmt. Als Vergleich für die Wirkung auf humane Zelllinien diente die humane Melanomaomzelllinie A375. Die verwendete Zellzahl pro *well* der entsprechenden Zelllinien wurde vorab durch Auftragung unterschiedlicher Zellzahlen auf einer 96-*well-plate* bestimmt. Es wurde die Zellzahl verwendet, bei der nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden eine Absorption von zwei erreicht wurde. Alle gemessenen IC_{50} -Werte sind in **Tabelle 9** dargestellt und die dazugehörigen Dosis-Wirkungskurven in **Abbildung 60** gezeigt.

Tabelle 9. Ermittelte IC_{50} -Werte (in μM mit Angabe der Standardabweichung) von Betulinsäure, Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** bei der Behandlung von *equinen* Melanomzellen MelDuWi, den Sarkoidzellen sRGO1 und sRGO2, einer *equinen* Normalzelllinie PriFri2 und einer humanen Melanomzelllinie A375 nach 96 Stunden Behandlungsdauer. Verwendet wurde der MTT-Assay, wobei mindestens drei biologische und zwölf technische Replikate angefertigt wurden.

Zelllinie	Betulinsäure	Borkenextrakt	NVX-207	5	10
MelDuWi	18.2 $\pm$ 6.5	9.4 $\pm$ 6.5	4.7 $\pm$ 0.3	12.7 $\pm$ 0.2	11.5 $\pm$ 1.6
sRGO1	19.5 $\pm$ 4.4	18.7 $\pm$ 2.5	3.6 $\pm$ 0.6	14.4 $\pm$ 1.4	10.7 $\pm$ 1.2
sRGO2	18.7 $\pm$ 8.8	17.2 $\pm$ 3.7	4.0 $\pm$ 1.7	21.6 $\pm$ 4.3	17.8 $\pm$ 7.5
PriFri2	18.7 $\pm$ 3.4	22.6 $\pm$ 9.0	1.5 $\pm$ 0.1	15.2 $\pm$ 4.1	12.3 $\pm$ 4.6
A375	8.9 $\pm$ 1.5	6.5 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.6	11.2 $\pm$ 2.8	8.3 $\pm$ 1.3

Die Behandlung mit Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** führten zu IC_{50} -Werten zwischen 2 μM und 20 μM . Auch bei diesem Test zeigten sich die kleinsten IC_{50} -Konzentrationen, und somit die effektivste Wirkung auf das Zellwachstum, bei dem Wirkstoff **NVX-207** mit einem IC_{50} -Wert von 1.5 μM - 5 μM . Es ist allerdings sehr gut ersichtlich, dass die hier

aufgeführten IC_{50} -Werte um das Zweifache kleiner sind, als die mit dem SRB-Assay gemessenen Werte. Der größte Unterschied ist bei der Behandlung mit Betulinsäure zu vermerken, mit IC_{50} -Konzentrationen von 45,9 μM (sRGO2, SRB) und 18,7 μM (sRGO2, MTT). Ähnliche Abweichungen sind auch bei den Zelllinien sRGO1, PriFri2 und MelDuWi zu sehen. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse liegt in der Art der Zytotoxizitätsbestimmung. Werden bei dem SRB-Assay die verbliebenen Proteine der noch adhären (lebenden) Zellen gemessen, so wurde im Gegensatz dazu bei dem MTT-Assay die vorhandene Aktivität der Mitochondrien durch Verstoffwechselung des eingesetzten Farbstoffes gemessen. Demzufolge kann eine Zelle adhären und damit lebend mit dem SRB-Assay nachgewiesen werden, jedoch schon geschädigte Mitochondrien besitzen und somit unfähig für die Umsetzung des MTT-Farbstoffes sein.

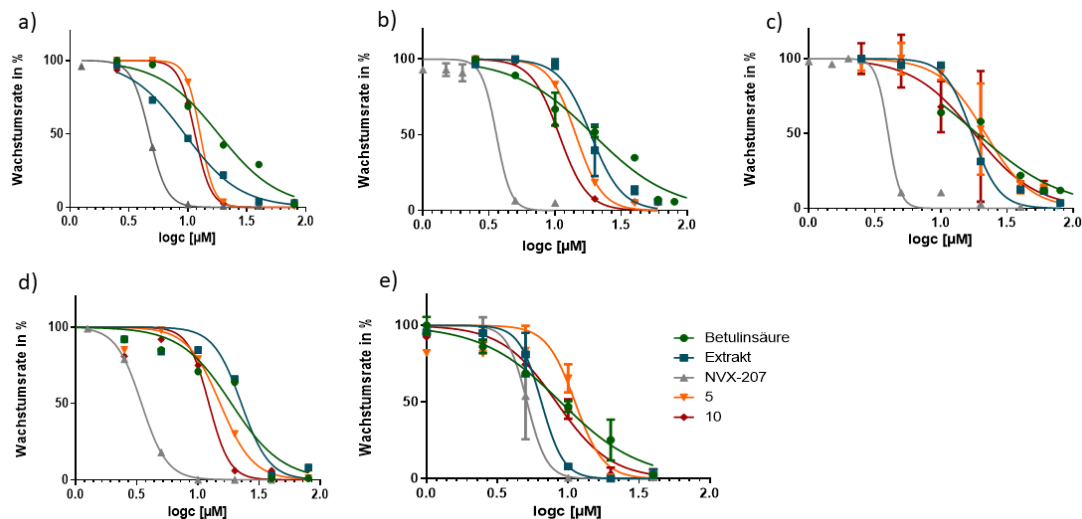


Abbildung 60. Dosis-Wirkungskurve aller (mit dem MTT-Assay) getesteten *equinen* Zelllinien. Für jede der fünf Zelllinien a) MelDuWi, b) sRGO1, c) sRGO2, d) PriFri2 und e) A375 sind die Dosis-Wirkungskurven der Substanzen Betulinsäure (grün), Borkenextrakt der Platane (blau), NVX-207 (grau), 5 (orange) und 10 (rot) dargestellt. Die Dargestellten Kurven zeigen die Mittelwerte von mindestens drei biologischen und 12 technischen Replikaten.

Demnach konnte mit Hilfe der beiden unterschiedlichen Methoden bestätigt werden, dass Betulinsäure in Tumorzellen zu einer Membranpermeabilisierung der Mitochondrien und dem anschließenden Einleiten des programmierten Zelltods führt.^{25, 200, 201} Eine genauere Aussage kann jedoch erst nach Durchführung weiterer Untersuchungen des Zelltodmechanismus, welche im **Kapitel 4.2.2** dargestellt sind, getroffen werden.

4.2.2 Untersuchung der Zelltodmechanismen

Zu verstehen, welche Mechanismen bei dem programmierten Zelltod eine Rolle spielen, ist ein wichtiger Faktor in der Forschung und Entwicklung von Zytostatika für die Therapie von Krebs. Wie schon in **Kapitel 1.3** beschrieben, sind heute viele unterschiedliche Zelltodmechanismen bekannt, darunter die Apoptose, welche erstmals 1972 als eine morphologisch andere Form des Zelltodes beschrieben wurde²⁰². Neben dieser gewünschten Form des Zelltodes, kann eine geschädigte Zelle ebenfalls über die Nekrose den Zelltod einleiten. Dabei kommt es zum Anschwellen, bis hin zum Platzen der Zelle, wodurch es zu nicht erwünschten Entzündungsreaktion der betroffenen Stellen kommt. Um eine mögliche Nekrose ausschließen zu können, soll im nachfolgenden Teil eine Einführung in die (in dieser Arbeit) verwendeten Untersuchungen der Zelltodmechanismen gegeben werden und die damit erbrachten Ergebnisse gezeigt werden.

4.2.2.1 AnnexinV-Assay

Zur Beurteilung des Zelltodes kann eine Eigenschaft genutzt werden, die nur für apoptotische nicht jedoch nekrotische Zellen charakteristisch ist. Bei der Apoptose kommt es neben dem Schrumpfen der Zellen, der Chromatinkondensation²⁰³ und der Bildung von *apoptotic bodies*²⁰⁴, auch zur Verlagerung des ursprünglich innenliegenden Phosphatidylserins an die Außenseite der Membran. Es kommt zu einer schnellen Änderung der Phospholipidsymmetrie²⁰⁵ in der Zellmembran, welches ein so rascher Prozess ist, dass die Barriere-Funktion der Zellmembran zunächst noch vorhanden ist²⁰⁶. An das nach Außen verlagerte Phosphatidylserin kann im Beisein von Calcium ein zelluläres Protein, das AnnexinV, binden²⁰⁷. Um das Vorhandensein der Barriere-Funktion der Zellmembran untersuchen zu können, wurde zusätzlich der nichtmembrangängige, in die DNA interkalierende Farbstoff Propidiumiodid zugegeben. Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten werden diese in 4 Bereiche eingeteilt. Lebende Zellen zeigen weder ein positives AnnexinV, noch ein positives Propidiumiodid-Signal, da weder Phosphatidylserin an die Außenseite der Membran gelangt, noch kommt es zur Aufhebung der Barriere-Funktion der Zellmembran. Früh apoptotische Zellen weisen ein positives Signal für AnnexinV auf, jedoch ist hier die Zellmembran noch intakt, sodass kein positives Signal für Propidiumiodid nachweisbar ist. Dies ändert sich allerdings bei spät apoptotischen Zellen, da nun auch die Barriere-Funktion der Zellmembran verloren geht. Nekrotische Zellen hingegen zeichnen sich durch ein positives Propidiumiodidsignal aus, besitzen jedoch kein positives Signal für AnnexinV. Die Einordnung dieser vier Untergruppen ist in **Abbildung 61** dargestellt.

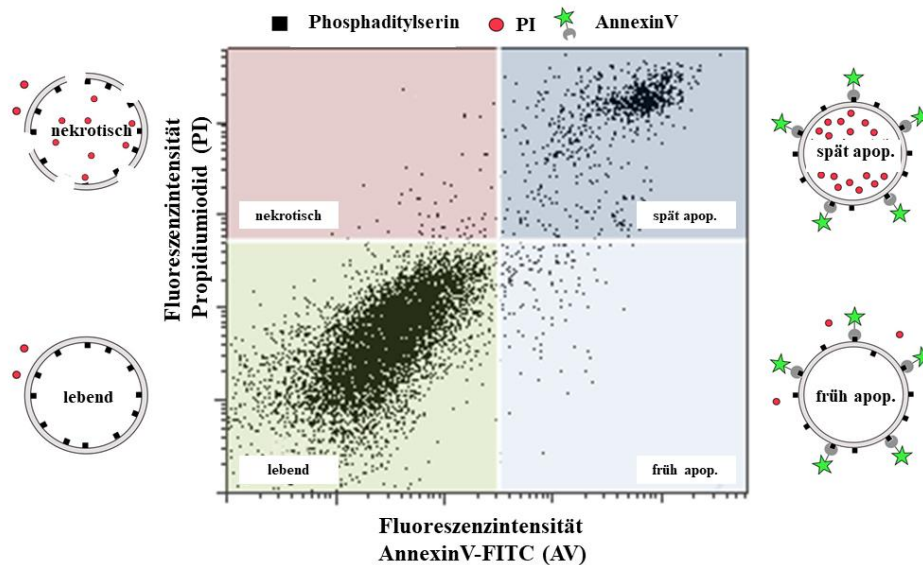


Abbildung 61. Schematische Darstellung des AnnexinV-Assays. Mit Hilfe des Durchflusszytometers können behandelte Zellen nach Inkubation mit PI (rot) und AnnexinV (grün) in vier Subpopulationen eingeteilt werden. Für lebende Zellen (grüner Bereich) ist weder ein Fluoreszenzsignal von PI, noch ein Fluoreszenzsignal von AnnexinV-FITC messbar. Früh apoptotische Zellen (hellblauer Bereich) besitzen durch das außenliegende Phosphatidylserin ein positives Signal für AnnexinV-FITC, jedoch durch die bestehende Membran kein Signal für PI. Dies ändert sich bei spät apoptotischen Zellen, da nun auch die Barriere-Funktion der Zellmembran verloren geht. Die letzte Population, nekrotische Zellen (roter Bereich), weisen lediglich ein positives Signal für PI auf.

Die Analyse wurde, wie schon bei der Bestimmung der Zytotoxizität, an den drei *equinen* Zelllinien MelDuWi, sRGO2 und PriFri2, als auch zum Vergleich an der humanen Zelllinie A375 durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit den Substanzen Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** erfolgte für 24 Stunden und 48 Stunden (für die Zelllinie MelDuWi wurde dieser Versuch auch nach 72 Stunden Behandlungsdauer durchgeführt) mit der doppelten IC₅₀-Konzentration (in µM). Außerdem wurde für jeden Zeitpunkt und Zelllinie eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Bei der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi (**Abbildung 62**) liegen in der unbehandelten Kontrolle ca. 84 %

der Zellen im lebenden Bereich. Weitere 2 % der Zellen befinden sich in der früh apoptotischen Phase und die restlichen 13 % sind in der spätapoptotischen Phase zu finden. Betrachtet man die Ergebnisse nach einer Inkubation von 24 Stunden, zeigt sich einzig bei der Behandlung mit **NVX-207** ein Effekt auf die Zellverteilung. Konnten in der Kontrolle über 80 % lebende Zellen gemessen werden, so sind nach der Behandlung mit **NVX-207** nur noch ca. 50 % der Zellen leben. Zugleich nimmt die Anzahl der früh apoptotischen Zellen auf 20 % und die spät apoptotischen Zellen auf 30 % zu, dies entspricht einer Veränderung von 18 % in der früh apoptotischen und 17 % in der spät apoptotischen Phasen. Nach einer Dauer von 48 Stunden ist neben **NVX-207** auch ein deutlicher Effekt bei der Behandlung mit **5** und Betulinsäure zu erkennen, sodass bei der Behandlung mit Betulinsäure noch 46 % der Zellen als lebende Zelle vorliegen, ca. 30 % früh apoptotischen und 23 % spätapoptotisch sind. Eine ähnliche Verteilung zeigt sich nach einer 48 stündigen Behandlung mit **5**. Hier sind im Schnitt 47 % lebende Zellen, 14 % früh apoptotischen und 36 % spät apoptotisch.

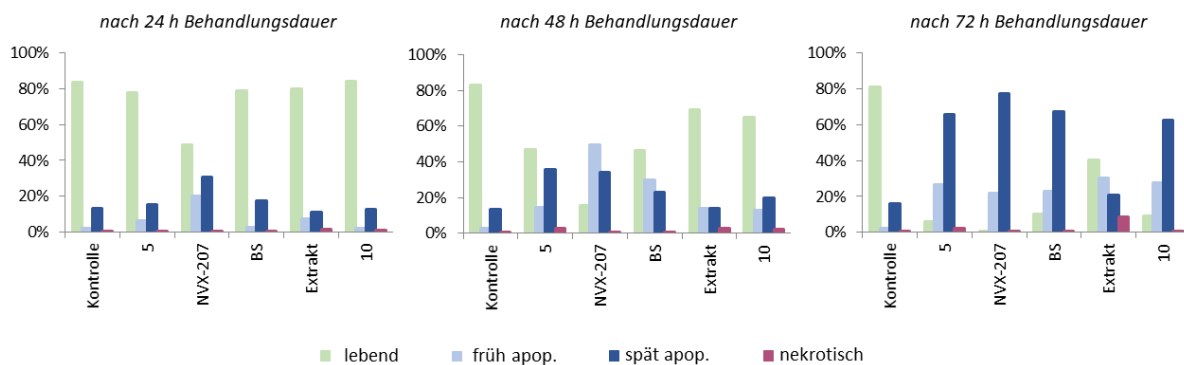


Abbildung 62. Graphische Darstellung der AnnexinV-Analyse der Zelllinie MelDuWi nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links), 48 Stunden (Mitte) und 72 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5**. Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Sehr vielversprechende Ergebnisse lieferte die Behandlung von **NVX-207** mit der doppelten IC₅₀-Konzentration nach 48 Stunden, so liegen nur noch ca. 16 % der Zellen vital vor. Der größte Teil mit ca. 50 % liegt im früh apoptotischen Bereich und die restlichen 34 % im spät apoptotischen Bereich. Sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 48 Stunden war unabhängig von der verwendeten Substanz keine Nekrose nachweisbar. Da nur bei der Behandlung mit **NVX-207** nach 48 Stunden eine Reduktion der vitalen Population von 84 % (Kontrolle) auf 16 % zu beobachten war, wurde der Einfluss der jeweiligen Wirkstoffe auf die Zellen ebenfalls nach 72 Stunden untersucht. Nach dieser Behandlungsdauer ist ein deutlicher Unterschied der eingesetzten Substanzen zur Kontrolle erkennbar. Nach 72 Stunden liegen in der Kontrolle 81 % der Zellen vital, 2,5 % früh apoptotischen und 16 % spät apoptotisch vor. Eine mit einander vergleichbare Wirkung konnte nach 72 Stunden bei den Substanzen **5**, Betulinsäure und Verbindung **10** mit einer vitalen Rate von 5 % - 10 %, 25 % früh apoptotischen und rund 65 % spät apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Die geringste Wirkung erzielte die Behandlung mit dem Borkenextrakt der Platane. Hier liegt der größte Teil der Zellen auch nach dreitägiger Behandlung noch im vitalen Bereich (mit ca. 40 %). Außerdem ist ein deutlicher Anstieg der nekrotischen Zellen auf 9 % erkennbar. Deutlich vielversprechender ist dagegen die Behandlung mit **NVX-207** oder Betulinsäure, da hier nach 48 Stunden schon deutliche Unterschiede zu der mitgeführten Kontrolle gezeigt werden konnten und kaum Nekrose in den Zellen induziert wurde. In früheren Arbeiten von Liebscher *et al*³⁷ konnte die gute Wirkung von **NVX-207** bestätigt werden, jedoch wurden in dieser Arbeit auch deutlich höhere Zellzahlen (in Liebscher *et al* wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen gesät, in dieser Arbeit wurde der Versuch mit $7.5 \cdot 10^5$ Zellen durchgeführt, siehe Kapitel 6.5.1) bei der Durchführung der Versuche verwendet. Aus diesem Grund und zur besseren Vergleichbarkeit der verwendeten

Zellpassagen wurde **NVX-207** und Betulinsäure in dieser Arbeit ebenfalls mitgeführt, sodass diese gewonnen Ergebnisse für die Auswertung, Beurteilung und den Vergleich der neuen Wirkstoffe verwendet werden konnten. Neben der beschriebenen Melanomzelllinie MelDuWi, wurde eine zweite malige *equine* Zelllinie, eine Sarkoidzelllinie (im Weiteren bezeichnet mit sRGO2) ausführlicher auf die eingeleiteten Zelltodmechanismen untersucht. Betrachtet man anschließend die ausgewerteten Daten der AnnexinV-Untersuchung an der Zelllinie sRGO2 nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden und 48 Stunden mit den oben genannten Substanzen, so ist ein deutlicher Unterscheid zu der zuvor untersuchten *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi zu beobachten. Die Aufteilung in die jeweiligen Zellpopulationen ist in **Abbildung 63** dargestellt.

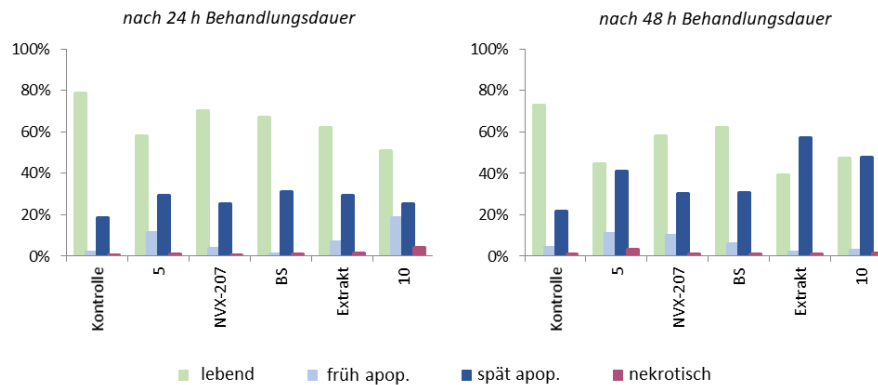


Abbildung 63. Graphische Darstellung der AnnexinV-Analyse der Zelllinie sRGO2 nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Die Behandlung erfolgte bei der verwendeten Sarkoidzelllinie ebenfalls mit der doppelten IC₅₀-Konzentration. Die Sarkoidzellen wurden, anders als die Melanomzellen, nicht in RPMI 1640 mit stabilem Glutamin, sondern in DMEM Medium mit einer erhöhten Konzentration an Glucose kultiviert. Nach 24 stündiger Behandlung sind bei allen fünf Substanzen geringe Unterschiede zur Kontrolle zu sehen. Am wirksamsten zeigten sich die Substanzen **5** und **10** mit einer Zunahme der spät apoptotischen Zellen auf 25 % (Steigerung von 7 %) bei Verbindung **10** und einer Zunahme der spät apoptotischen Zellen auf 30 % (Steigerung von 11 %) bei der Behandlung mit **5**. Erst nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zeigen sich auch deutliche Unterschiede bei der Behandlung mit dem Borkenextrakt der Platane. Hier ist eine Verschiebung der Prozentzahlen von ursprünglich 80 % vitalen Zellen (nach 24 h Behandlung) hin zu 40 % vitalen Zellen nach 48 Stunden Behandlung zu sehen. Auch bei **5** steigt der Anteil an spät apoptotischen Zellen nach 48 Stunden signifikant an. So liegen nach 48 Stunden 41 % der Zellen, und somit fast die Hälfte, im spät apoptotischen Bereich. Bei **10** zeigt sich eine ähnliche Verteilung der Zellen, mit fast 50 % spät apoptotischen Zellen. Die schwächste Wirkung wurde bei der Behandlung mit **NVX-207** und Betulinsäure hervorgerufen. Hier befindet sich nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden bei beiden Substanzen der größte Anteil, mit 60 % der Zellen, als vitale Zellen. Anders als bei der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi, wurden keine genaueren Zelltotuntersuchungen nach 72 Stunden Behandlungsdauer durchgeführt, da der Anteil an apoptotischen Zellen in der Kontrolle zu hoch und die daraus folgende Untersuchung der behandelten Zellen nicht mehr aussagekräftig war. Abschließend konnte bei der Untersuchung der *equinen* Sarkoidzellen sRGO2 festgestellt werden, dass diese deutlich sensibler auf die Behandlung mit dem Borkenextrakt und **10** reagieren, dieser Effekt jedoch bei der Behandlung der *equinen* Melanomzellen ausgeblieben ist. Da nicht nur die Wirkung der Substanzen auf die einzelnen *equinen* Tumorzelllinien betrachtet werden sollte, sondern auch eine Aussage über die Selektivität von Bedeutung ist, wurde der AnnexinV-Assay ebenfalls an einer *equinen* Normalzelllinie (Fibroblasten) mit den Substanzen Betulinsäure, dem

Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** nach 24 Stunden und 48 Stunden Behandlungsdauer durchgeführt. Die Aufteilung der Zellen ist in **Abbildung 64** dargestellt. Wie schon bei den beiden zuvor beschriebenen Zelllinien MelDuWi und sRGO2, liegen bei der PriFri2 erwartungsgemäß 80 % der Kontrollzellen als lebende Zellen vor. Nach 24 Stunden zeigt sich auch bei dieser Zelllinie **NVX-207** als sehr wirksam mit noch rund 50 % vitalen, 10 % früh apoptotischen und 38 % spät apoptotischen Zellen. Eine noch stärkere Wirkung zeigt Betulinsäure nach 24 Stunden mit weniger als 25 % lebenden Zellen und einer Verschiebung dieser in den spät apoptotischen Bereich (mit 62 %). Eine weniger ausgeprägte Wirkung zeigte hingegen die Behandlung mit **5**, **10** und das Borkenextrakt der Platane mit Lebensraten von ca. 70 %.

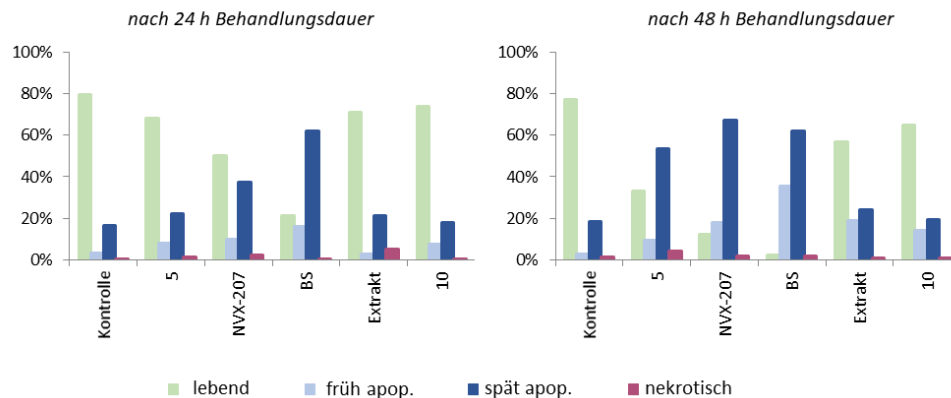


Abbildung 64. Graphische Darstellung der AnnexinV-Analyse der Zelllinie PriFri2 nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Eine deutliche Änderung ist allerdings nach 48 Stunden nach Zugabe von **5** zu den Fibroblasten zu vernehmen, von ursprünglich rund 70 % lebenden Zellen und 22 % spät apoptotischen Zellen hin zu 33 % lebenden und 54 % spät apoptotischen Zellen. Den größten Effekt zeigte auch nach 48 Stunden eine Behandlung mit Betulinsäure und **NVX-207**. Hier sinkt der Anteil lebender Zellen auf 12 % bei **NVX-207** und sogar auf nur noch 2 % bei Betulinsäure. Bei der Behandlung mit Verbindung **10** wird der Unterschied erst bei dem Vergleich mit den zuvor untersuchten *equinen* Melanom- und Sarkoidzellen deutlich. Liegt der Anteil an apoptotischen Zellen bei den Melanomzellen bei über 80 % (72 Stunden) und den Sarkoidzellen bei über 50 %, so sind nur ca. 34 % der Normalzellen nicht mehr vital. Dies deutet nach den ersten Untersuchungen auf eine limitierte Selektivität der Verbindung **10** hin, jedoch sind weitere Methoden nötig, um diese Wirkung zu bestätigen. Zuvor soll, wie schon bei den zuvor durchgeführten Zytotoxizitätstest, ein Vergleich zur Humanmedizin durchgeführt werden. Dazu wurde die humane Melanomzelllinie A375 mitgeführt und alle zuvor durchgeführten Behandlungen analog der *equinen* Zellen durchgeführt. Ein weiterer Grund für das Mitführen dieser Zelllinie war die Handhabbarkeit. So kam es auf Grund ihrer Robustheit kaum zu früh oder spät apoptotischen Zellen nach Durchlaufen der Methode in der Kontrolle. Die Aufteilung der Zellen ist in **Abbildung 65** dargestellt.

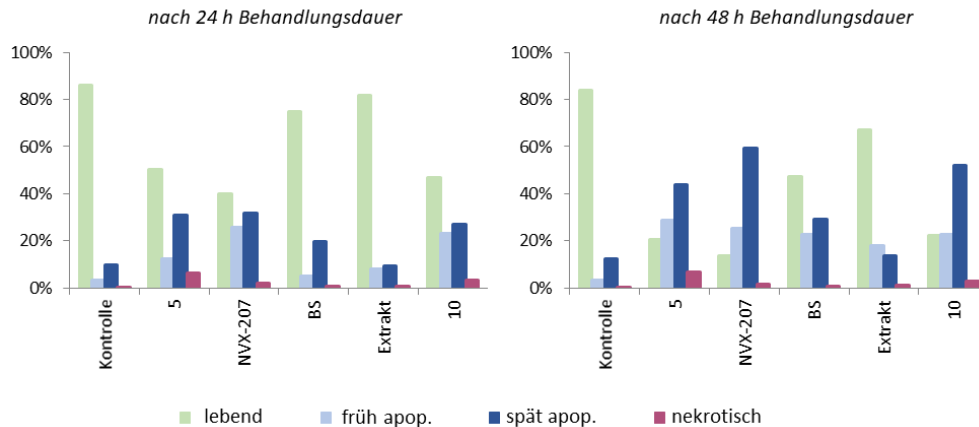


Abbildung 65. Graphische Darstellung der AnnexinV-Analyse der humanen Zelllinie A375 nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Die Behandlung der humanen Zelllinie erfolgte ebenfalls mit der doppelten IC₅₀-Konzentration. Die humane Melanomzelllinie A375 wurden, anders als die *equinen* Melanomzellen (MelDuWi), nicht in RPMI 1640 mit stabilem Glutamin, sondern in RPMI 1640 mit L-Glutamin kultiviert. Des Weiteren handelt es sich bei der A375 um eine stark invasiv wachsende Zelllinie, sodass die eingesetzte Zellzahl enorm reduziert werden musste. Wurden bei den *equinen* Zelllinien beispielsweise eine Zellzahl zwischen $7.5 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen pro 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät, so konnte bei der A375 eine Zellzahl von $3 \cdot 10^5$ nicht überschritten werden, da bei Überschreiten dieser Zellzahl die Kontrolle nach 48 Stunden Inkubationszeit begann, sich von der Wachstumsfläche abzulösen. Bei der verwendeten Zellzahl liegen erwartungsgemäß über 85 % der Zellen sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 48 Stunden im lebenden Bereich. Wie schon bei der Behandlung der *equinen* Zelllinien, zeigt sich auch bei der Behandlung der humanen Melanomzelllinie A375 nach 24 Stunden der stärkste Effekt bei **NVX-207** (lebend: 40.1 %, früh apoptotisch: 25.8 %, spät apoptotisch: 32 %), **10** (lebend: 46.7 %, früh apoptotisch: 23.2 %, spät apoptotisch: 27.1 %) und **5** (lebend: 50.5 %, früh apoptotisch: 12.2 %, spät apoptotisch: 32 %). Kaum bis keinen Einfluss zeigen hingegen die Behandlung mit Betulinsäure oder dem Extrakt der Platanenborke nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Auch nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden zeigten sich die geringsten Effekte auf das Auslösen von Apoptose durch die Behandlung mit Betulinsäure und dem Borkenextrakt der Platane mit 50 % - 70 % vitalen Zellen in den untersuchten Proben. Nach 48 Stunden Inkubation mit **NVX-207** (lebend: 13.5 %, früh apoptotisch: 25 %, spät apoptotisch: 60 %), **10** (lebend: 22.4 %, früh apoptotisch: 23 %, spät apoptotisch: 52 %) und **5** (lebend: 21 %, früh apoptotisch: 29 %, spät apoptotisch: 44 %) ist eine deutliche Induktion von Apoptose festzustellen. Nach Untersuchung der Apoptoseinduktion mittels dem AnnexinV-Assay der unterschiedlichen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass schon nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden bei den meisten eingesetzten Wirkstoffen Apoptose ausgelöst wird. Dabei am wirksamsten erwies sich die Behandlung mit NVX-207. Den schwächsten Effekt erzielte die Behandlung mit dem Borkenextrakt der Platane, welche neben der geringen apoptotischen Wirkung auch vermehrt Nekrose auslöste.

4.2.2.2 Caspase 3-Assay

Ein weiterer Nachweis für das Auslösen von Apoptose durch Behandlung der Zellen mit Betulinsäure und dessen Derivaten ist die Messung der Aktivität von Caspase 3. Die Aktivierung der Apoptose kann, wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, über zwei verschiedene Wege erfolgen, dem intrinsischen

und dem extrinsischen Weg. Caspase 3 steht am Ende beider Aktivierungswege und soll aus diesem Grund genauer untersucht werden. Ausgehend vom intrinsischen Weg, wird die inaktive ProCaspase 3 mit Hilfe von Cytochrom C, welches selbst erst nach Bindung an ein Adapterprotein Apaf-1 „*apoptotic protease-activating factor 1*“ und der Caspase 9 aktiv vorliegt, aktiviert. Die Aktivität von Caspase 3 kann mit Hilfe eines Inhibitors (DEVD-FMK), funktionalisiert mit dem Farbstoff FITC, gemessen werden. Der Assay beruht darauf, dass ein für eine Caspase spezifischer Inhibitor zu den Zellen gegeben wird, welcher nur im Zentrum aktiver Caspasen binden kann. Aufgrund des gebundenen Farbstoffes kann anhand der Fluoreszenzintensität zwischen Caspase 3 aktiven und inaktiven (vitalen) Zellen unterschieden werden. Durchgeführt wurde der Caspase 3-Assay an der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi, da diese Zelllinie im Fokus bei der Entwicklung eines topischen Systems zur Behandlung von Hautkrebs bei Pferden stand. Für die Untersuchung wurden die zuvor schon beschriebenen Substanzen (Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10**) nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72 Stunden und der doppelten inhibitorischen Konzentration (in μM) untersucht.

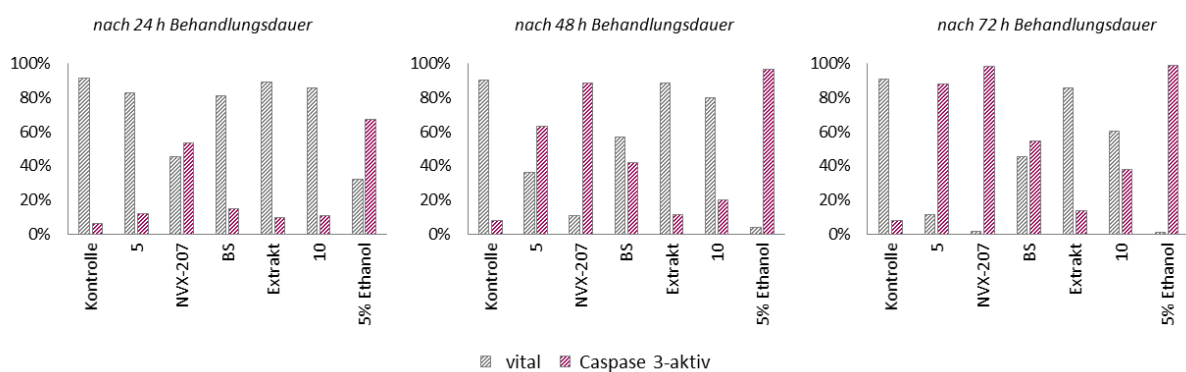


Abbildung 66. Graphische Darstellung der Ergebnisse des Caspase 3-Assays der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links), 48 Stunden (Mitte) und 72 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC_{50} -Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Bei der Untersuchung der Caspase 3-Aktivität wurde eine mit Ethanol (5 v%) behandelte Probe als Positivkontrolle mitgeführt. Bei dieser zeigten bereits nach einer Dauer von 24 Stunden mehr als 65 % der Zellen eine Aktivität der Caspase 3, nach 48 und 72 Stunden liegt die Anzahl der Caspase 3-aktiven Zellen sogar bei über 95 %. Bei der unbehandelten Kontrolle liegen im Gegensatz dazu mehr als 90 % der untersuchten Zellen als vitale und nur ca. 5 % als Caspase 3-aktive Zellen vor. Neben der Positivkontrolle weist einzig die Behandlung mit **NVX-207** nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden ein Effekt auf die Zellverteilung auf. Konnten in der Kontrolle über 90 % lebende Zellen gemessen werden, so sind nach der Behandlung mit **NVX-207** nur noch rund 45 % der Zellen vital. Wie schon bei dem zuvor durchgeführten AnnexinV-Assay, konnten bei der Zelllinie MelDuWi ähnliche Ergebnisse gezeigt werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen des Caspase 3-Assays, so hat die Behandlung mit **5**, Betulinsäure, dem Extrakt der Platanenrinde und Verbindung **10** nach 24 Stunden nur eine eingeschränkte Wirkung auf die Vitalität der behandelten Zellen. Eine effektive apoptotische Wirkung von **5** konnte auch bei anderen Versuchen erst nach 48 Stunden Behandlungsdauer gezeigt werden. So liegen die Zellen nach einer 48-stündigen Behandlung mit **5** zu 63 % apoptotisch und nur noch zu 36 % als vitale Zellen vor. Ähnlich gute Effekte sind nach identischer Behandlungszeit mit Betulinsäure festzustellen. Hier liegen rund 42 % der Zellen apoptotisch, mit aktiver Caspase 3, und 58 % vital vor. Die effektivste Wirkung konnte jedoch auch nach 48 Stunden mit **NVX-207** (11 % vital; 89 % Caspase 3 aktiv) nachgewiesen werden. Anders ist dies bei Behandlung mit Verbindung **10**, mit 20 % Caspase 3 aktiven Zellen zeigt Verbindung **10** eine mäßige Wirkung nach 48 Stunden Behandlung,

ebenfalls gezeigt wurde dieser Effekt auch bei weiteren Zelltoduntersuchungen, wie dem AnnexinV-Assay, der Zellzyklusanalyse und dem TUNEL-Assay (beide letztgenannten sollen im Nachfolgenden noch ausführlich diskutiert werden). Lediglich das Borkenextrakt der Platane zeigt auch nach 48 Stunden noch unwesentliche Veränderungen zur mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Dies ändert sich auch nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden kaum mit ca. 14 % Caspase 3-aktiven Zellen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lagen bei dieser nach 72 Stunden rund 8 % der Zellen mit aktiver Caspase 3 vor. Dies entspricht einer Zunahme von 6 % Caspase 3-aktiver Zellen. Eine erstaunliche Wirkung zeigt hingegen **NVX-207** auch nach 72 Stunden mit einer erneuten Zunahme von 10 % Caspase 3-aktiver Zellen, sodass gerade noch 2 % der Zellen keine Caspase 3-Aktivität aufweisen (98 % apoptotisch). Neben dieser Substanz zeigt auch **5** eine überzeugende Wirkung gegenüber den verwendeten *equinen* Melanomzellen mit 88 % apoptotischen und restlichen 12 % vitalen Zellen. Auch Verbindung **10** und Betulinsäure wirken sich positiv auf das Einsetzen von Apoptose aus, mit nur noch ca. 50 % Vitalität der untersuchten Zellen. Um diesen Verlauf einmal in Form der gemessenen Histogramme zu zeigen, sind ausgewählte Beispiele in **Abbildung 67** im zeitlichen Verlauf von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden dargestellt.

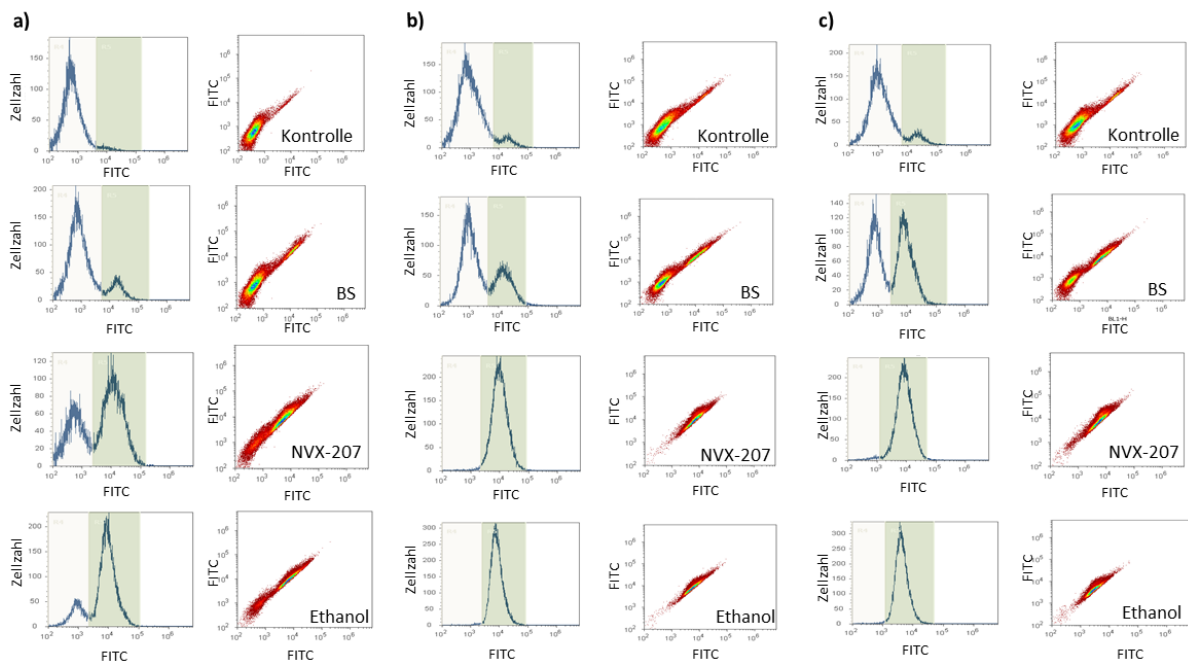


Abbildung 67. Beispielhafte Darstellung der gemessenen Histogramme (links) und Dotplots (rechts) vom Caspase 3-Assay, gemessen an der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi nach einer Behandlungsdauer von a) 24 Stunden, b) 48 Stunden und c) 72 Stunden mit BS (Betulinsäure), NVX-207 und der Positivkontrolle Ethanol (5%). Gezeigt wird eine von 2 gemessenen biologischen Replikaten.

Zu sehen sind auf der linken Seite von **Abbildung 67** die gemessenen Histogramme (gemessene Zellzahl gegen die FITC-Fluoreszenzintensität) und rechts die dazugehörigen Dotplots (Fluoreszenzintensität-Fläche gegen Fluoreszenzintensität-Höhe) mit zwei sehr gut abtrennbaren Populationen (Zellen ohne Caspase 3-Aktivität (untere Population) und Zellen mit Caspase 3-Aktivität (obere Population)). Außerdem sind die Untersuchungen nach 3 unterschiedlichen Zeitpunkten, nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden, gezeigt. Für eine bessere Überschaubarkeit sollen zudem nur ausgewählte Beispiele gezeigt werden. Hierfür wurde zum einen die unbehandelte Kontrolle und die Positivkontrolle mit Ethanol gewählt, da hier ein sehr deutlicher Unterschied zwischen vitalen und apoptotischen Zellen zu sehen. Auch ist bei Ethanol schon nach 24 Stunden Behandlungsdauer ein sehr starker Effekt zu erkennen. Desweiteren ist **NVX-207** gezeigt, da dieser Wirkstoff die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte. Es ist so sehr gut erkennbar, dass nach 24 Stunden ein Verhältnis von ca. 40 % vitalen und 60 %

apoptotischen Zellen vorliegt, da eine Zellpopulation deutlich kleinere Fluoreszenzintensitäten aufweist. Schon nach 48 Stunden Behandlungsdauer ist eine komplette Verschiebung der Zellen zu höheren Fluoreszenzintensitäten mit über 95 % apoptotischen Zellen messbar. Bei der zweiten gezeigten Substanz, der Behandlung mit Betulinsäure, ist der Verlauf deutlich langsamer. So sieht man nach 24 Stunden den größten Teil der Zellen in kleinen Fluoreszenzbereichen und nur eine minimale Zunahme dieser. Nach 48 Stunden ist sehr gut zu erkennen, dass die Anzahl der Zellen mit sehr kleiner Fluoreszenzintensität zum gleichen Teil abnimmt, wie die Anzahl an Zellen mit höherer Fluoreszenzintensität zunimmt, bis zum Erreichen einer Gleichverteilung nach 72 Stunden. Würde man den Verlauf bei Betulinsäure für weitere 24 Stunden verfolgen, so könnte man einen vollständigen Übergang der vitalen Zellen zu höheren Fluoreszenzintensitäten (apoptotischen Zellen) beobachten. Abschließend konnte bei allen eingesetzten Substanzen spätestens nach 72 Stunden Behandlungsdauer ein Anstieg von Caspase 3 beobachtet werden. Den stärksten Effekt zeigte dabei **NVX-207**, jedoch war ebenfalls die Behandlung mit Betulinsäure, **5** und Verbindung **10** sehr überzeugend. Als einen weiteren Angriffspunkt für den Nachweis von Apoptose soll im nachfolgenden Teil dieser Arbeit auf die DNA-Fragmentierung eingegangen werden.

4.2.2.3 DNA-Fragmentierung mittels TUNEL-Assay

Weiterhin ist bekannt, dass die morphologisch sichtbare Fragmentierung der DNA durch ein Substrat der Caspase 3 ausgelöst wird.²⁰⁸⁻²¹¹ Das Enzym, das für die apoptotische DNA-Fragmentierung verantwortlich ist, ist die *Caspase-Activated DNase* (CAD). CAD wird normalerweise durch ein zweites Protein, dem Inhibitor der *Caspase Activated DNase* (ICAD), gehemmt. Nach Einleitung des programmierten Zelltods spaltet der apoptotische Effektor, Caspase 3, ICAD und bewirkt so, dass CAD aktiviert wird und es zur Fragmentierung der DNA kommt. In intakten eukaryotischen Zellen liegt das Erbgut als großes Genom im Zellkern, aufgeteilt in einzelne Chromosomen, vor. Diese bestehen wiederum aus Nukleosomen, welche einer Spule ähneln, bei der sich die DNA um einen Proteinkomplex wickelt. Um diesen Proteinkomplex, bestehend aus acht einzelnen Histonen, ist die DNA etwa 1,65-mal gewickelt, was einer Länge von etwa 146 Basenpaaren²¹² entspricht. Zwischen zwei solchen benachbarten Nukleosomen liegt ein weiteres Histon, umwickelt von DNA, welche auch Linker-DNA genannt wird. Zur Veranschaulichung ist dies in **Abbildung 68a** dargestellt.

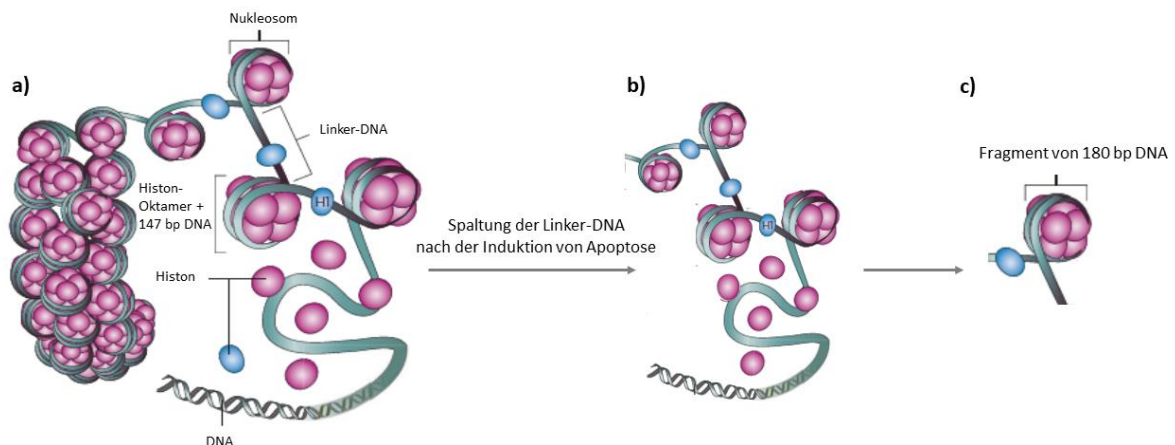


Abbildung 68. a) Struktur des Chromatins mit den Nukleosomen als Untereinheiten. Jedes Nukleosom ist über eine Linker-DNA miteinander verbunden. b) Beginn der Fragmentierung mit 50-300 kbp c) nach vollständiger Fragmentierung findet eine Trennung der Nukleosomen in Fragmente mit einer Länge von ca. 180 bp statt. Abbildung modifiziert aus²¹².

Kommt es durch Alterungsprozessen, veränderten Umwelteinflüssen oder durch Behandlung mit zytotoxischen Substanzen zur Einleitung von Apoptose, beginnt die Zelle Apoptose-spezifische

Proteasen, die oben genannten Caspasen, auszuschütten. Man unterscheidet dabei zwischen zwei Gruppen, zum einen gibt es die Initiatorcaspasen (Caspase -2, -8, -9 und Caspase 10) welche maßgeblich für den extrinsischen Weg sind, und die Effektorcaspasen. Hierzu gehören die Caspasen 3, 6 und 7, welche charakteristisch für den intrinsischen Weg sind. Zu Beginn des programmierten Zelltods beginnt die DNA-Spaltung mit Fragmenten von rund 50 – 300 kbp oder ganzzahligen Vielfachen²¹³. Im Anschluss daran kommt es zur Spaltung einzelner DNA-Fragmente mit einer Größe von rund 180 bp, welche genau dem Umfang der DNA um einem Histonoctamer und der dazwischen liegenden Linker-DNA entspricht. Eine solche Fragmentierung kann mit Hilfe unterschiedlicher Methoden nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kondensation des Zellkerns und die damit verbundene DNA-Fragmentierung mittels TUNEL-Assay untersucht.

Die Induktion von Apoptose nach Behandlung der *equinen* Zellen mit den Substanzen Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** konnte erfolgreich anhand der Bindung von FITC-gelabelten AnnexinV an nach außen verlagerten Phosphatidylserin gezeigt werden. Wie schon zuvor beschrieben kommt es bei der Einleitung von Apoptose neben der Umverteilung des Phosphatidylserin in der Zellmembran auch zur Fragmentierung der DNA. Der Begriff TUNEL, abgeleitet von *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*, bezeichnet eine Methode zur Kennzeichnung vorhandener Doppelstrangbrüche der DNA, welche bei der Fragmentierung entstehen. Dabei nutzt man TdT, die terminale Desoxyribonukleotidyl-transferase, ein Enzym, welches in der Lage ist die 3-Hydroxyl-Endruppen der Doppelstrangbrüche durch Bindung von bromodeoxyuridine triphosphate (Br-dUTP) zu markieren. Im zweiten Schritt kann ein passender Antikörper (antiBrdU), gelabelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC, an das zuvor angebrachte Br-dUTP geknüpft werden. Zu sehen ist die vereinfachte Darstellung dieses Prinzips in **Abbildung 69**.

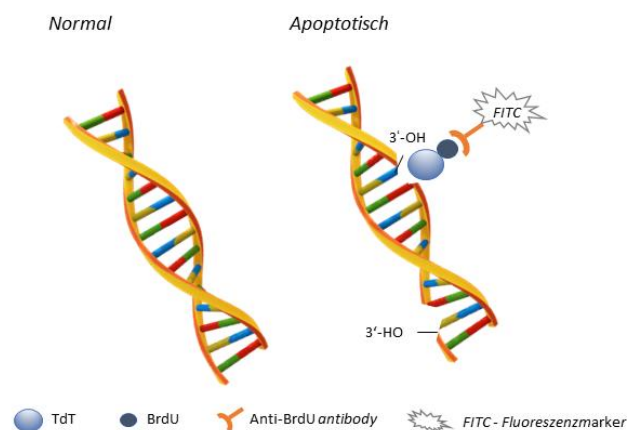


Abbildung 69. Vereinfachte Darstellung des Prinzips des TUNEL-Assays. *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* ist eine Methode zum Nachweis der DNA-Fragmentierung durch Kennzeichnung der 3-Hydroxyl-Endgruppen, welche das Ergebnis von DNA-Doppelstrangbrüchen bei Eintritt der Apoptose sind.

Mit Hilfe dieser Methode kann die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der gebundenen Farbstoffmoleküle an den vorhandenen Doppelstrangbrüchen am Durchflusszytometer gemessen werden. Ergänzend dazu ist zudem die optische Darstellung der markierten Doppelstrangbrüche mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich. Wie schon bei dem zuvor beschrieben Caspase 3-Assay wurde bei dem TUNEL-Assay ausschließlich die *equine* Melanomzelllinie MelDuWi verwendet, da diese Zelllinie im Fokus bei der Entwicklung eines topischen Systems zur Behandlung von Hautkrebs bei Pferden stand. Für die Untersuchung wurden die zuvor schon beschriebenen Substanzen Betulinsäure, das Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** nach einer Inkubationszeiten von 24, 48 und 72 Stunden untersucht. Als Positivkontrolle wurde auch bei diesem Versuch Ethanol (5 v%) eingesetzt, da diese Substanz eine sehr gute apoptotische Wirkung bei den zuvor beschriebenen Zelltoduntersuchungen gezeigt hat. Die mitgeführte unbehandelte Kontrolle zeigt erwartungsgemäß nach allen drei

Behandlungszeitpunkten sehr gute Ergebnisse mit über 95 % vitalen Zellen. Einzig die Positivkontrolle (Ethanol) und die Behandlung mit **NVX-207** zeigen nach 24 Stunden eine signifikante apoptotische Wirkung auf die *equinen* Melanomzellen. Im direkten Vergleich hat man nach 24 Stunden noch rund 25 % vitale und 74 % apoptotische Zellen bei der Behandlung mit **NVX-207** und ca. 28,5 % vitale und rund 72 % apoptotische Zellen in der Positivkontrolle.

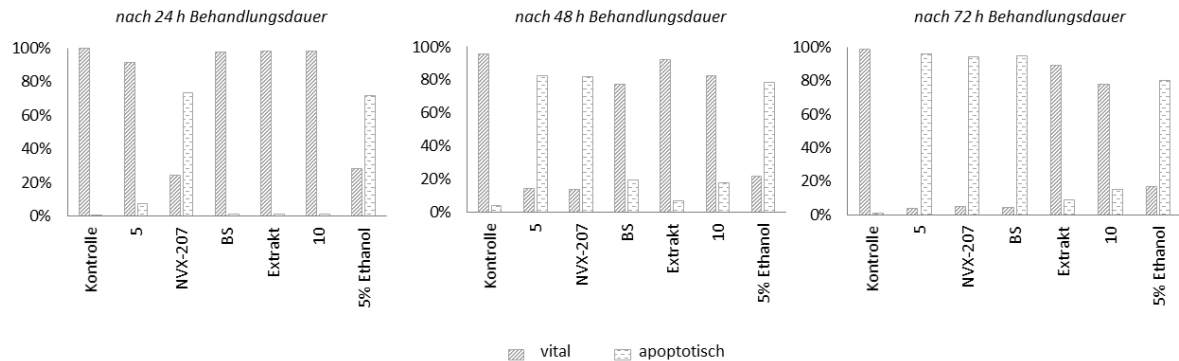


Abbildung 70. Graphische Darstellung der Ergebnisse des TUNEL-Assays der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links), 48 Stunden (Mitte) und 72 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betulinyln-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Einen eher schwachen Effekt zeigt hingegen **5** mit 7.4 % apoptotischen Zellen und verbleibenden 92 % vitalen Zellen. Dieses Ergebnis deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen der Caspase 3- und AnnexinV-Assays ab, wobei **5** nach Durchführung des AnnexinV-Assays einen stärkeren Einfluss auf die Umlagerung des Phosphatidylserins zeigt. Eine Änderung zeigt sich allerdings nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden. Hier ist sowohl bei **NVX-207**, als auch bei **5** einen erheblichen Einfluss auf das Zellüberleben mit rund 83 % apoptotischen und nur noch rund 17 % vitalen Zellen zu erkennen. Auch ist die Behandlung mit Betulinsäure und Verbindung **10** wesentlich effektiver, sodass hier bei beiden Wirkstoffen rund 20 % der Zellen Doppelstrangbrüche aufweisen, welche auf Apoptose schließen lassen. Den schwächsten Effekt zeigt auch nach 48 Stunden des Borkenextrakt der Platane mit nur rund 7 % apoptotischen Zellen. Wie schon bei den zuvor durchgeführten Tests, ist auch bei dem TUNEL-Assay nach 72 Stunden der größte Effekt zu erkennen, sodass neben der Ethanolbehandlung sowohl bei **NVX-207**, Betulinsäure und **5** bei über 90 % der Zellen Apoptose nachweisbar ist. Außerdem ist zu erkennen, dass auch nach 72 Stunden nur ein minimaler Anstieg an apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit dem Borkenextrakt stattgefunden hat. Der Unterschied zur 48 Stunden Behandlung beträgt gerade einmal 1,7 % (von 6,9 % auf 8,6 %). Ein ähnlicher Verlauf ist bei der Behandlung mit Substanz **10** zu beobachten. Auch hier ist kein großer Unterschied zu einer Behandlung von 48 Stunden zu erkennen. Da die Fragmentierung der DNA nur einer von vielen Merkmalen der Apoptose ist, zeigt diese Untersuchung lediglich, dass eine Fragmentierung der DNA in kleinere Bruchstücke durch die Behandlung mit Verbindung **10** nicht stattfindet. Andere Untersuchungsmethoden konnten jedoch deutlich zeigen, dass es nach Behandlung mit Verbindung **10** zur Umlagerung der Zellmembran und der damit verbundenen Umlagerung von Phosphatidylserin kommt. Auch mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass es durch eine Behandlung mit allen fünf verwendeten Substanzen möglich ist, Apoptose auszulösen und erfolgreich nachzuweisen. Lediglich bei der Behandlung mit dem Borkenextrakt der Platane wäre eine zusätzliche Untersuchung nach weiteren 24 Stunden hilfreich gewesen.

4.2.2.4 Zellzyklusanalyse

Veränderungen im Erbgut und daraus folgende Mutationen, die sich auf die Ausbildung von Tumoren auswirken können, treten während des Proliferationsvorgangs in der Zelle auf. Dieser Vorgang, auch Zellzyklus genannt, ist in **Abbildung 71** schematisch gezeigt. Dargestellt sind die vier definierten, durch Kontrollpunkte voneinander abgegrenzten Phasen (als G_1 -, S-, G_2 - und M-Phase bezeichnet). Eine humane Zellen durchläuft alle vier Phasen in ca. 20 Stunden.²¹⁴ Beginnend mit einem einfachen Chromosomensatz, erreicht eine proliferierende Zellen nach etwas 10 Stunden den G_1 -Kontrollpunkt. Nur bei günstigen Umweltbedingungen, einer ausreichende Zellgröße und dem Vorhandensein von unbeschädigter DNA ist ein Übergang der Zelle aus der G_1 -Phase in die S-Phase mittels Regulierung von Cyclin abhängigen Kinasen²¹⁵ möglich. Nach Eintritt in die S-Phase kommt es zur Verdopplung des DNA-Gehaltes (Replikation der vorhandenen DNA). In dieser Phase verweilt eine humane Zelle ca. 6 Stunden, bevor sie in die zweite Interphase, G_2 -Phase genannt, übertritt. Hier kommt es zu einer äquatorialen Anordnung der Chromosomen. Möglich wird diese feste Anordnung durch die Bindung der Chromatiden über ein Centromer, gebunden durch das sich an dieser Stelle befindliche Cohäsin, ein Proteinkomplex, welches die beiden Chromatiden an das Centromer binden. Es erfolgt im Anschluss daran ein zweiter Kontrollpunkt, welcher einen Übergang der Zellen in die Mitose-Phase (M-Phase) nur dann ermöglicht, wenn die gesamte DNA erfolgreich repliziert wurde und die Ausrichtung dieser in der Äquatorialebene stattgefunden hat. In der Mitose-Phase kommt es nun zur Teilung zwei völlig identischer Genome, welche die gebildete Mutterzelle enthalten, und dem Entstehen zweier Tochterzellen. Dies geschieht durch Aktivierung eines weiteren Enzyms, der Separase, welche erst nach Zersetzung des inhibierenden Securins in der Lage ist, die durch das Cohäsin gebildeten Bindungen zu spalten²¹⁶. Bei Veränderung äußerer Einflüsse, beispielsweise durch Behandlung mit Zytostatika, kann die neu gebildete Zelle direkt in den G_0 -Zustand, dem Wachstumsarrest, überführt werden oder an den bekannten Kontrollpunkten der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet werden.

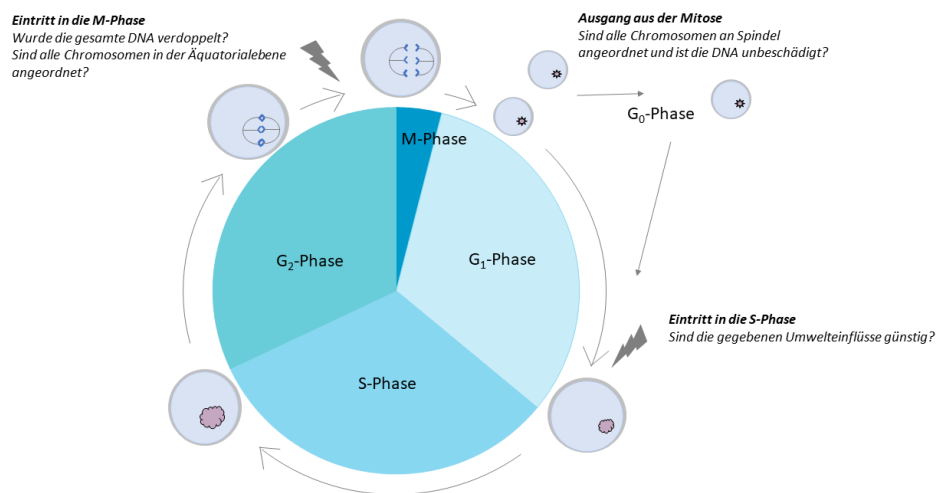


Abbildung 71. Gezeigt ist die schematische Darstellung des Zellzykluses mit den vier definierten, voneinander abgegrenzten Phasen der Zellproliferation und dem dazugehörigen Status einer eukaryotischen Zelle.

Die Messung der Verteilung der Zellen im Zellzyklus weist bei einer Mischung aus lebenden und apoptotischen Zellen neben den erkennbaren Phasen G_0 beziehungsweise G_1 (einfacher Chromosomensatz, längste Phase), Synthesephase (fließend ansteigender Chromosomensatz von einfach auf doppelt) und G_2 - und M-Phase (doppelter Chromosomensatz) eine Population apoptotischer (oder nekrotischer) Zellen auf mit weniger als dem einfachen Chromosomensatz. Für die Messung

werden die Zellen in Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei einer eintretenden Apoptose kommt es zur Chromatinkondensation und Fragmentation der DNA. Durch die Fixierung der Zellen mit Ethanol kommt es zur Permeabilisierung der Zellmembran und somit zum Verlust kleinerer DNA-Fragmente, sodass apoptotische Zellen weniger als den einfachen Chromosomensatz beinhalten. Angesichts der unterschiedlichen Mengen an DNA in den Zellen und der proportionalen Bindung von PI an die DNA, kann anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten auf die Verteilung der Zellen in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus geschlossen werden. Bestimmt wurde der Gehalt der DNA mit Hilfe einer DNA-Histogramm-Auftragung. Der Verlust von DNA führt zu einer geringeren Fluoreszenzintensität und somit zur Verschiebung des Peaks im DNA-Histogramm. Die Analyse wurde, wie auch bei dem AnnexinV-Assay, sowohl an den drei *equinen* Zelllinien MelDuWi, sRGO2 und PriFri2, als auch zum Vergleich an der humanen Zelllinie A375 durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit den Substanzen Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** erfolgte für 24 Stunden und 48 Stunden (für die Zelllinie MelDuWi wurde dieser Versuch auch nach 72 Stunden Behandlungsdauer durchgeführt) mit der doppelten IC₅₀-Konzentration (in µM). Außerdem wurde für jeden Zeitpunkt und Zelllinie eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. In der unbehandelten Kontrolle befinden sich sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 48 Stunden und 72 Stunden Behandlungsdauer erwartungsgemäß 70 % der Zellen in der G₁-Phase und rund 30 % der Zellen in der Synthese-Phase. Bei der Behandlung der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi zeigten sich erst nach einer Zeit von 48 Stunden signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle, wie in **Abbildung 72** zu sehen ist.

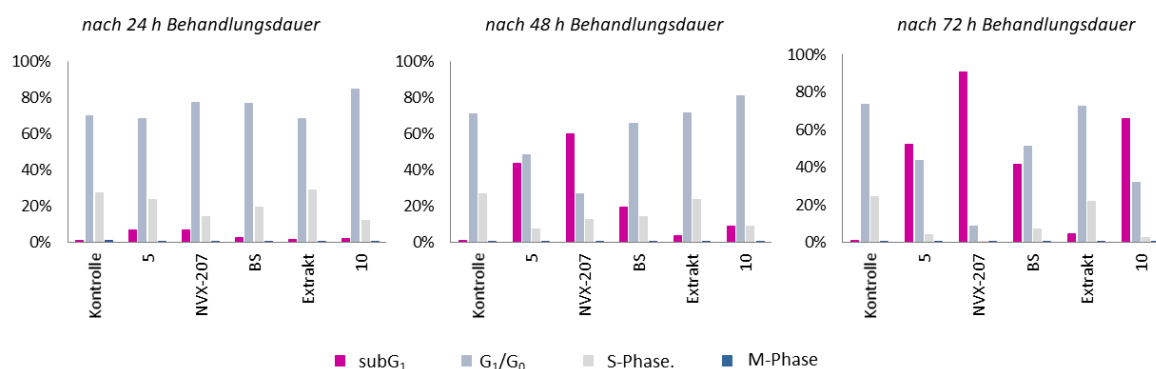


Abbildung 72. Graphische Darstellung der Zellzyklusanalyse der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links), 48 Stunden (Mitte) und 72 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betulinyll-3,28-O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Replikaten.

Eine ähnliche Verteilung zeigt sich nach der Behandlung mit Verbindung **10**, Betulinsäure und dem Extrakt der Platanenborke nach 24 Stunden (G₁/G₀: 70-80 %, S: 20-30 %). Bei der Behandlung mit **NVX-207** zeigte sich hingegen eine Verschiebung der Zellpopulation aus der S-Phase in die G₁-Phase und eine geringe Zunahme apoptotischer Zellen in der SubG₁-Phase (G₁/G₀: 77,4 %, S: 14,4 % SubG₁: 7,1 %). Auch bei der Behandlung mit **5** fand eine Abnahme der Zellen aus der Synthese-Phase mit einer Zunahme hin zu der G₁/G₀-Phase statt (G₁/G₀: 84,8 %, S: 12,4 % SubG₁: 2,3 %). Nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden ist eine deutliche Zunahme des SubG₁-Peaks bei den Verbindungen **5** und **NVX-207** detektierbar. Mit einem Anteil von 60,2 % Zellen in der SubG₁-Phase ist die Wirkung von **NVX-207** am höchsten. Zudem ist eine Abnahme der Zellen aus der S-Phase (Kontrolle: 26,8 %, **NVX-207**: 12,9 %) auffallend. Ähnlich aktiv zeigte sich die Behandlung mit **5** mit einer Zunahme des SubG₁-Peaks auf bis zu 43,8 % und einer Abnahme der Zellen aus der S-Phase (Kontrolle: 26,8 %, **NVX-207**: 7,6 %). Die Behandlung mit Betulinsäure zeigte ebenfalls eine mäßige Veränderung des SubG₁-Peaks (Kontrolle: 1,1 %, **NVX-207**: 19,4 %). Da nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden eine Tendenz der untersuchten Verbindungen zu sehen war, wurde die Zellzyklusanalyse ebenfalls nach

einer Behandlungsdauer von 72 Stunden durchgeführt. Die stärkste Wirkung zeigt, wie schon nach 24 Stunden und 48 Stunden, die Behandlung mit **NVX-207** mit einem Anstieg des SubG₁-Peaks auf 91 % und einer Abnahme des G₁-Peaks auf nur noch 9 %. Einen signifikanten Unterschied zu der Untersuchung nach 48 Stunden zeigte Verbindung **10** nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden. Aufgrund des Anstiegs des subG₁-Peaks nach 72 Stunden (Kontrolle: 1 %, 10: 66,3 %) kommt es zu einer Verringerung der Zellzahl in der G₁/G₀ - Phase (Kontrolle: 47,2 %, 10: 32,1 %) und der S - Phase (Kontrolle: 24,6 %, **10**: 3, 5%). Als einzige Substanz zeigte die Behandlung mit dem Borkenextrakt auch nach 72 Stunden sehr geringe Effekte. Ein vergleichbares Bild zeigt sich bei der Untersuchung der *equinen* Sarkoidzellen. Die Zellzyklusverteilung der sRGO2-Zellen wird nach 24 Stunden und 48 Stunden Behandlung erwartungsgemäß von einem ausgeprägten Anteil an G₁-Phase-Zellen dominiert, mit über 70 %, die verbleibenden 30 % teilen sich in S- Phase (20 %) und M-Phase (10 %) auf . Deutlich wird dies in **Abbildung 73**.

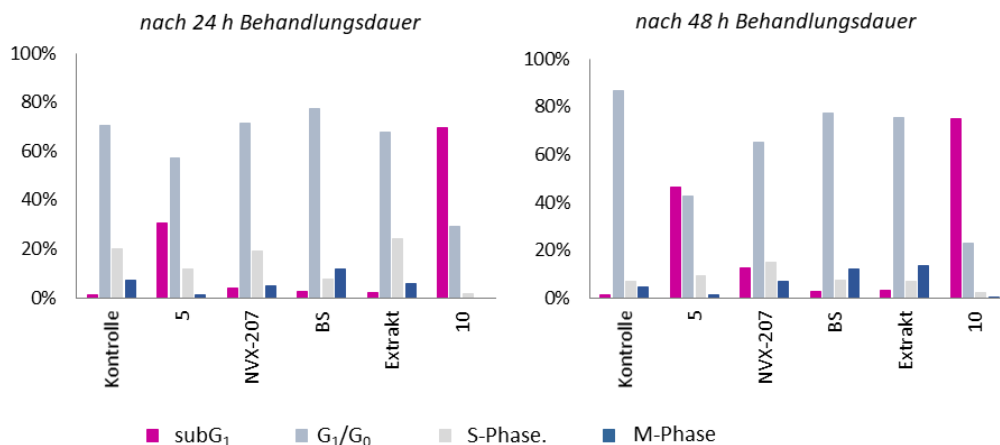


Abbildung 73. Graphische Darstellung der Zellzyklusanalyse der *equinen* Sarkoidzelllinie sRGO2 nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betulinyln-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Eine ähnliche Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zeigt sich sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 48 Stunden Behandlung mit dem Extrakt der Platanenrinde, Betulinsäure und dessen Derivat **NVX-207** mit einer konsistenten Verteilung nach 24 Stunden mit (G₁/G₀: 70-80 %, SubG₁: 3 %; S: 10-20 %). Nach 48 Stunden verschieben sich lediglich die Zellen der S-Phase in die G₁/G₀-Phase. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen durch solch eine Behandlung in die G₀-Phase (diese wird auch als Ruhephase bezeichnet) übergehen und dort nicht mehr proliferieren. Den stärksten Einfluss zeigen die Substanzen **5** und **10** auf die *equinen* Sarkoidzellen. Nach 24 Stunden Inkubation mit **5** ist eine Zunahme der Zellen in der SubG₁-Phase von 30 % festzustellen, bei der Behandlung mit Verbindung **10** fand sogar eine Zunahme von 70 % statt. Zudem ist eine starke Reduktion der Zellen in der S-Phase (Kontrolle: 20 %, DS: 10 %, **10**: 1 %) und M-Phase von ursprünglich 7 % in der Kontrolle auf 0 % bei beiden Behandlungen zu erkennen. Nach 48 Stunden ist die Wirkung der beiden beschriebenen Wirkstoffe noch größer, sodass ein noch deutlicher Anstieg der Zellen in der SubG₁-Phase zu sehen ist (Kontrolle: 1 %, DS: 50 %, **10**: 75 %). Vergleich man an dieser Stelle *equine* Melanomzellen mit *equinen* Sarkoidzellen, so kann gesagt werden, dass **5** als einzige der fünf potentiellen Wirkstoffe eine Wirkung auf den Zellzyklus nach einer Behandlungszeit von 48 Stunden, auf beide Zellarten besitzt, nach 72 Stunden überzeugt jedoch auch Verbindung **10** mit der Wirkung auf beide Zellarten. Die für die Behandlung von *equinen* Melanomen zielgerichtete Substanz ist das **NVX-207**, welches nach einer Behandlungszeit von 48 Stunden bei den *equinen* Sarkoidzellen nur eine

eingeschränkte Wirkung (SubG₁: 13 %) zeigt. Auf der anderen Seite zeigt Verbindung **10**, mit sehr vielversprechenden Ergebnissen bei den Sarkoidzellen, bei den Melanomen erst nach 72 Stunden einen Effekt, jedoch nach dieser Behandlungszeit signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle. Sodass nach Vergleich dieser beiden Zellarten 5 und Verbindung **10** als potentielle Wirkstoffe für weitere Untersuchungen sehr bedeutend sein könnten. Noch vielversprechender zeigt sich die Behandlung mit 5 und Verbindung **10** im Vergleich zu den *equinen* Fibroblasten (Normalzellen). Um genauere Schlüsse über den Zelltodmechanismus und eventuell vorhandene Selektivitäten schließen zu können, wurde die Zellzyklusanalyse ebenfalls an *equinen* Normalzellen durchgeführt.

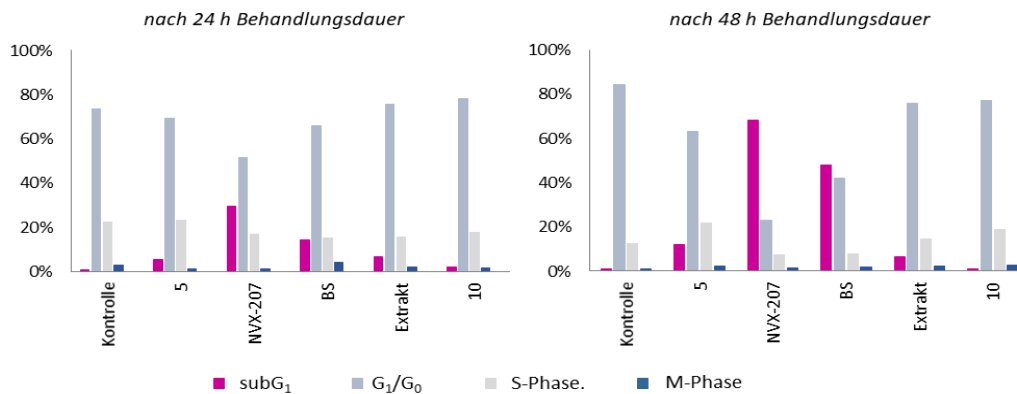


Abbildung 74. Graphische Darstellung der Zellzyklusanalyse der *equinen* Fibroblasten PriFri2 nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betulinyln-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Auch bei der Normalzelllinie PriFri2 befindet sich, wie schon bei den zuvor beschriebenen Zelllinien, der größte Anteil der Zellen sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 48 Stunden in der G₁/G₀-Phase mit ca. 75 %. Nach 24 Stunden zeigen lediglich **NVX-207** und Betulinsäure eine Veränderung im Zellzyklus (SubG₁ bei **NVX-207**: 30 % und BS: 15 %). Auch nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden zeigt sich eine milde Wirkung auf die Normalzellen bei den Verbindungen **5** (SubG₁: 12 %), dem Extrakt der Platanenrinde (SubG₁: 7 %) und Verbindung **10** (SubG₁: 1 %). Beim direkten Vergleich der Zellverteilung und dem Anteil an apoptotischen Zellen der Normalzellen (Fibroblasten) und den Sarkoidzellen nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit Verbindung **10** fällt auf, dass diese nach 24 Stunden einen erheblichen Effekt auf das Zellüberleben von sarkoiden Zellen hat (SubG₁: 70%), Normalzellen jedoch unversehrt bleiben (SubG₁: 1 %). Diese Selektivität bleibt auch nach 48 Stunden Behandlungsdauer bestehen. Dies bestätigt die zuvor getroffene Annahme nach Durchführung des AnnexinV-Assays, welcher schon gezeigt hat, dass Verbindung **10** eine selektive Wirkung auf *equinen* Melanom- und Sarkoidzellen zeigt. Für eine vollständige Betrachtung und den Vergleich zur Humanmedizin, wurde die Zellzyklusanalyse, wie schon bei dem zuvor beschriebenen Assays, an der humanen Melanomzelllinie A375 durchgeführt. Die Behandlung erfolgte ebenfalls für 24 und 48 Stunden mit den Substanzen Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10**.

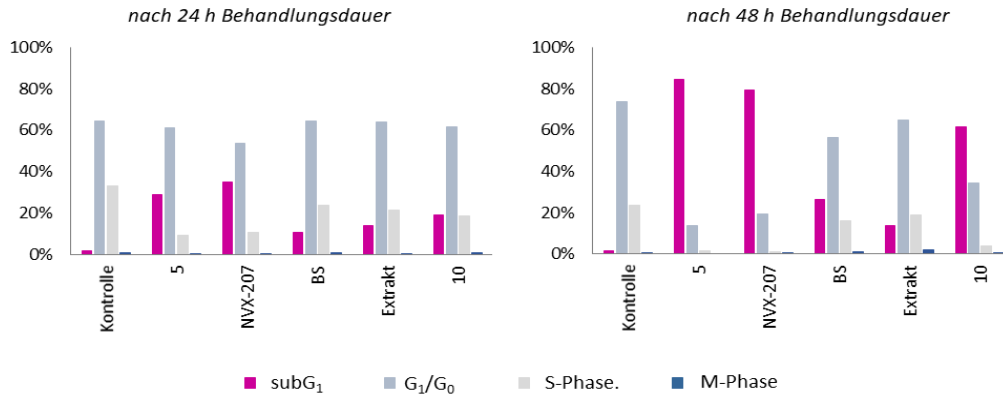


Abbildung 75. Graphische Darstellung der Zellzyklusanalyse der humanen Melanomzelllinie A375 nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden (links) und 48 Stunden (rechts) mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betulinyln-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten.

Wie auch bei den zuvor untersuchten *equinen* Zelllinien liegt der größte Anteil der Zellen sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 48 Stunden in der G₁/G₀-Phase mit ca. 70 %. Die verbleibenden 30 % der Zellen sind bei beiden Zeitpunkten und der S-Phase wiederzufinden. Auch bei der verwendeten humanen Zelllinie zeigt **NVX-207** den stärksten apoptotischen Effekt, sodass nach 24 Stunden schon rund 35 % der Zellen in der SubG₁-Phase, 53 % in der G₁/G₀-Phase und nur noch 10 % der Zellen in der S-Phase nachweisbar sind. Ähnlich gute Ergebnisse zeigte die Behandlung mit **5** nach der Dauer von 24 Stunden mit ca. 30 % Zellen in der SubG₁-Phase, 60 % in der G₁/G₀-Phase und nur noch 9 % der Zellen in der S-Phase. Einen weniger starken Effekt zeigte hingegen die Behandlung mit den verbleibenden drei Substanzen Betulinsäure, dem Extrakt der Borkenrinde und Verbindung **10** mit durchschnittlichen Anteilen von 10-20 % Zellen in der SubG₁-Phase, 60 % in der G₁/G₀-Phase und rund 15-20 % der Zellen in der S-Phase. Eine Verschiebung der Zellen im Zellzyklus ist jedoch bei der Behandlung mit allen fünf Substanzen deutlich erkennbar. Dies wird nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden noch signifikanter. Den stärksten Effekt zeigen die Behandlungen mit **5** von ca. 85 % der Zellen in der SubG₁-Phase, 1 % der Zellen in der S-Phase und verbleibenden 14 % in der G₁/G₀-Phase. Eine ähnlich gute Wirkung zeigt die Behandlung mit **NVX-207** mit einer Zellaufteilung von 79 % der Zellen in der SubG₁-Phase, 1 % der Zellen in der S-Phase und 19 % in der G₁/G₀-Phase. Auch bei der Behandlung mit **10** ist eine deutliche Verschiebung der Phasen im Zellzyklus zu erkennen (G₁/G₀: 34 %, SubG₁: 62 %; S: 4 %). Weitaus weniger starke Effekte zeigt hingegen die Behandlung mit Betulinsäure (G₁/G₀: 56 %, SubG₁: 26 %; S: 16 %) und dem Extrakt der Platanenborke (G₁/G₀: 65 %, SubG₁: 14 %; S: 20 %). Diese gezeigten Ergebnisse sind sehr gut vergleichbar mit der zuvor untersuchten *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi.

4.2.2.5 Untersuchung der Zelltodmechanismen anhand der Zelllinie MelDuWi

Zur besseren Vergleichbarkeit und Bestätigung der unterschiedlich durchgeführten Methoden zum Nachweis der Apoptose, sollen die zuvor gezeigten Daten nun auf eine Zelllinie minimiert und anhand dieser ein Vergleich durchgeführt werden. Betrachtet wird die *equine* Melanomzelllinie MelDuWi. Bei allen verwendeten Methoden wurden $7.5 \cdot 10^5$ Zellen in 5 mL frischem Medium (in einer 25 cm² Zellkulturflasche) ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für jede Substanz, einer Kontrolle und jeden Zeitpunkt wurde eine Zellkulturflasche vorbereitet. Bei den zu vergleichenden Methoden handelt es sich um den AnnexinV-Assay, dem TUNEL-Assay, dem Nachweis auf Caspase 3-Aktivität und der Zellzyklusanalyse; gezeigt in **Abbildung 76**. Mit Hilfe der vier verwendeten Apoptose-Assays AnnexinV-Assay, TUNEL-Assay, der Detektion von Caspase 3 aktiven Zellen und

der Zellzyklusanalyse konnte übereinstimmend für alle fünf Wirkstoffe eine Induktion von Apoptose beobachtet werden. Zudem ist bei allen verwendeten Methoden eine einheitliche Tendenz zu erkennen. Der Vergleich macht deutlich, dass **NVX-207** den größten Einfluss auf die Induktion von Apoptose in *equinen* Melanomzellen hat. Bereits nach einer 24 stündigen Behandlung mit **NVX-207** ist mit drei der vier Methoden ein Anstieg von apoptotischen Zellen detektierbar. Einzig mit der Untersuchung des Zellzyklus war dies nach 24 Stunden nur eingeschränkt möglich. Jedoch zeigt auch hier **NVX-207**, im Vergleich zu der mitgeführten Kontrolle, den größten Effekt. Nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden und 72 Stunden zeigt zudem die Behandlung mit **NVX-207** den signifikantesten Effekt auf die Induktion von Apoptose.

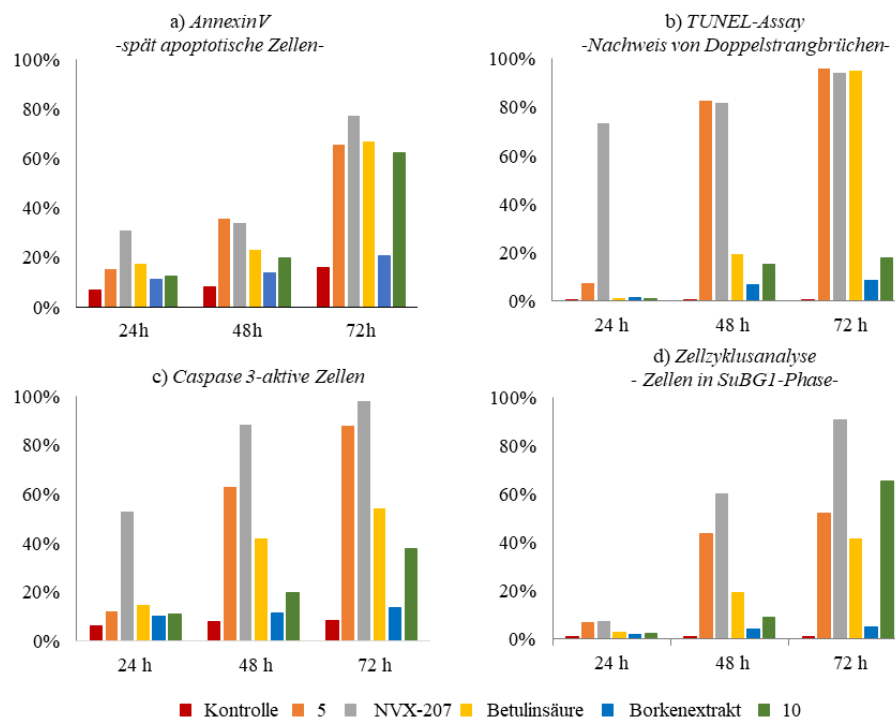


Abbildung 76. Vergleich der vier verwendeten Methoden zum Nachweis von Apoptose nach Behandlung der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betulinyln-3,28-O,O'-disulfamat). Für die Behandlung wurde bei allen Methoden die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Ergebnisse nach einer Behandlungsdauer von 24, 48 und 72 Stunden von a) dem AnnexinV-Assay unter Verwendung der spät apoptotischen Zellpopulation, b) dem TUNEL-Assay unter Verwendung der markierten Doppelstrangbrüche, c) der Detektion von Caspase 3-aktiven Zellen durch Fluoreszenzmarkierung und d) der Zellzyklusanalyse unter Verwendung der Zellpopulation der SubG1-Phase.

Ebenfalls sehr ähnliche Werte konnten nach Behandlung mit **5** und Betulinsäure gemessen werden. Beide Substanzen zeigen nach einer 24 stündigen Behandlung kaum einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen; dies ändert sich jedoch sehr stark bei der Behandlung mit **5** nach einer Inkubation von 48 Stunden. Bei der Untersuchung der Zellen nach einer Dauer von 72 Stunden zeigen die drei Substanzen **NVX-207**, Betulinsäure und **5** beinahe einheitliche Effekte auf das Überleben der Zellen; am deutlichsten erkennbar bei den Ergebnissen des TUNEL-Assays und der Messung der Caspase 3-aktiven Zellen durch Fluoreszenzmarkierung. Gleichermäßen gute und einheitliche Ergebnisse erzielte die Behandlung mit **10**, jedoch erst nach einer Inkubation von 72 Stunden. Sehr gut zu erkennen ist, dass nach Behandlung der *equinen* Melanomzellen mit dem Borkenextrakt der Platane mit keiner der vier verwendeten Methoden eine erhebliche Induktion der Apoptose nachweisbar war. Es konnte also mit Hilfe der hier verwendeten Methoden eine Induktion der Apoptose bewiesen werden; besser noch, es konnte gezeigt werden, dass mit allen vier Methoden übereinstimmende Ergebnisse der hervorgerufenen Apoptose, durch die jeweiligen Wirkstoffe, nachgewiesen werden konnte.

4.3 Diskussion des Teilgebietes: Lokale Tumorbehandlung bei *equinen* Melanomen

Im Laufe von drei Jahren (April 2017 - April 2020) konnten im Interesse von Tier (Pferd) und Halter erhebliche Erkenntnisse für die Behandlung von Melanomen bei Pferden erbracht werden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Entwicklung eines neuartigen Arzneimittels für die Behandlung von *equinen* malignen Melanomen, welche ebenso die Behandlungsstrategien von *equinen* Sarkoiden beeinflusste. Zu Beginn des Gesamtprojektes zur lokalen Tumorbehandlung von *equinen* Melanomen stand die Entscheidung eines geeigneten Wirkstoffes. Die durchgeführten Zellkulturexperimente zeigten einheitliche zytotoxische, antiproliferative und apoptotische Eigenschaften der untersuchten Wirkstoffe. Im Rahmen des Projektes und dieser Dissertation wurden fünf verschiedene Substanzen, darunter die Betulinsäure und das Rohextrakt der Platanenrinde, das Disulfamat des Betulins (**5**), ein Sulfonamid der Betulinsäure (**10**) und **NVX-207**, auf ihre zytotoxische Wirkung sowohl nach 96 Stunden (**Tabelle 10**), als auch zeitabhängig, getestet.

Tabelle 10. Ermittelte IC₅₀-Konzentration (in µM mit Angabe der Standardabweichung) von Betulinsäure, dem Borkenextrakt der Platane, **NVX-207**, **5** und **10** bei Behandlung von *equinen* Melanomzellen MelDuWi, den Sarkoidzellen sRGO1 und sRGO2, einer *equinen* Normalzelllinie PriFri2 und einer humanen Melanomzelllinie A375 nach 96 Stunden Behandlungsdauer. Verwendet wurde der SRB-Assay, wobei mindestens drei biologische und zwölf technische Replikate angefertigt wurden.

Zelllinie	Betulinsäure	Extrakt	NVX-207	5	10
MelDuWi	23.4 ± 1.9	18.4 ± 2.0	3.7 ± 0.3	16.3 ± 2.4	10.7 ± 0.6
sRGO1	29.7 ± 10.2	19.9 ± 1.9	3.8 ± 2.3	17.9 ± 2.3	13.4 ± 1.4
sRGO2	45.9 ± 5.0	27.3 ± 2.7	3.5 ± 0.6	21.1 ± 5.0	19.4 ± 7.2
PriFri2	27.2 ± 3.8	18.4 ± 5.7	3.4 ± 0.8	11.7 ± 3.6	11.3 ± 1.4

In Hinsicht auf Zytotoxizität und Wirkeffizienz zeigte die Behandlung der *equinen* Tumorzellen mit **NVX-207** die stärkste Wirkung. Bei Behandlung der Zellen mit diesem Wirkstoff konnte ein durchschnittlicher IC₅₀-Wert von 3.5 µM erreicht werden. Auch überzeugt **NVX-207** bei der zeitabhängigen zytotoxischen Untersuchung, sodass nach nur 3 h Behandlungsdauer der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi eine IC₅₀-Konzentration von IC₅₀ = 8.4 µM nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnte die Zytotoxizitäten der Wirkstoffe **10** (IC₅₀ = 10.7 µM; MelDuWi), **5** (IC₅₀ = 16.3 µM ± 2.4; MelDuWi), Betulinsäure (IC₅₀ = 23.4 µM; MelDuWi) und dem Extrakt der Platanenrinde (IC₅₀ = 18.4 µM; MelDuWi) mittels SRB-Assay werden. Zur besseren Einschätzung der zytotoxischen Wirkung wurde, neben dem erwähnten SRB-Assay, ein zweiter Test auf das Wachstum der Zellen nach Behandlung durchgeführt. Dabei handelte es sich um den MTT-Assay, wobei nur Zellen mit funktionierenden Mitochondrien in der Lage sind, MTT (gelb) in Formazan (Blau) umzuwandeln. Nach Durchführung dieses Assays konnten alle, mittels SRB-Assay bestimmten Zytotoxizitäten, bestätigt werden. Auch die vorhandenen Zelltodmechanismen wurden anschließend erfolgreich untersucht. Hierfür wurde der Einfluss der doppelten IC₅₀-Konzentration [µM] nach Behandlung der *equinen* Zelllinie MelDuWi (*equines* Melanom), sRGO2 (*equines* Sarkoid) und PriFri2 (*equine* Fibroblasten; Normalzelllinie) nach 24 und 48 Stunden (für die MelDuWi ebenfalls 72 Stunden) mittels AnnexinV-Assay, Caspase 3-Assay, der Untersuchung des Zellzyklus und dem TUNEL-Assay genauer betrachtet. Auch hier zeigte die Behandlung mit **NVX-207** die effektivste Wirkung auf das Auslösen von Apoptose. Diese konnte bei drei von vier Methoden an der Zelllinie MelDuWi schon nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden nachgewiesen werden. Der Vergleich der vier verwendeten Methoden zum Nachweis von Apoptose nach einer Behandlung der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat) nach 24, 48 und 72 Stunden ist in **Abbildung 77** gezeigt.

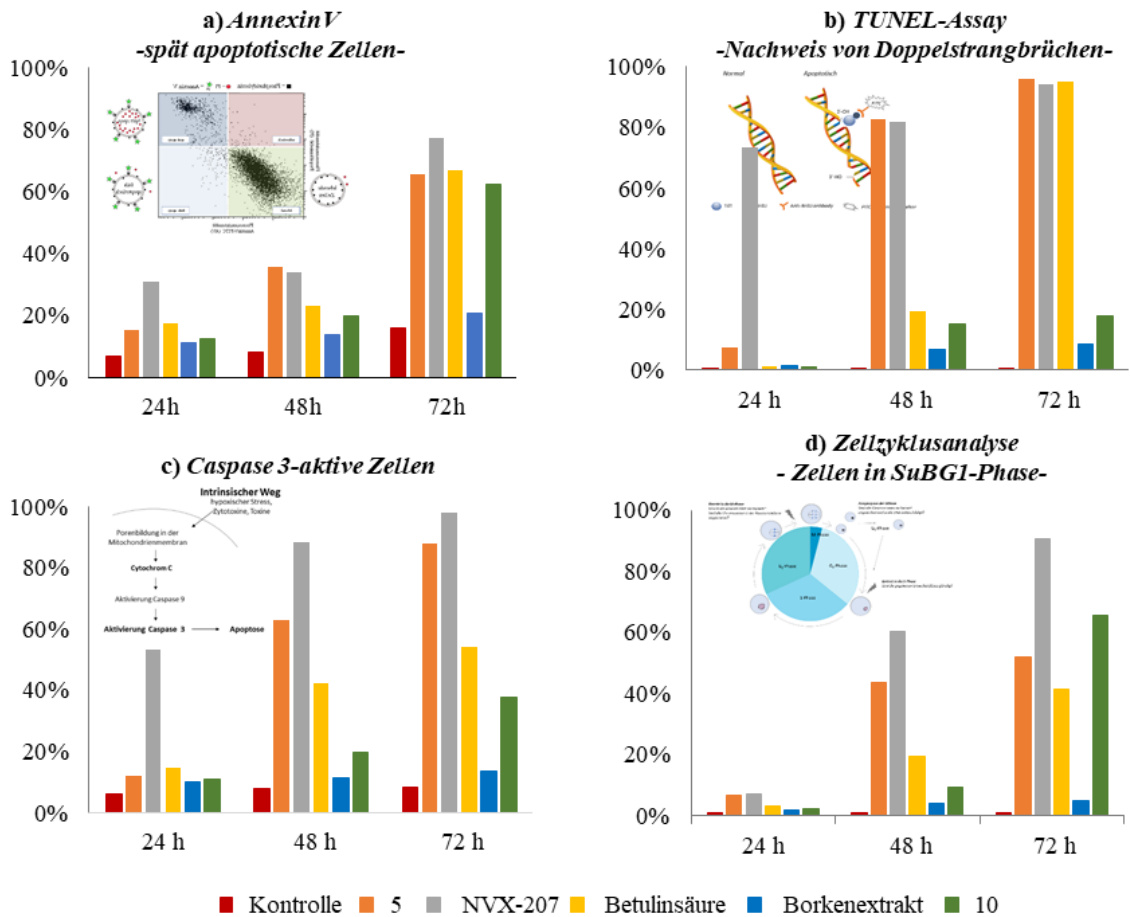


Abbildung 77. Vergleich der vier verwendeten Methoden zum Nachweis von Apoptose nach Behandlung der equinen Melanomzelllinie MelDuWi mit BS (Betulinsäure), **NVX-207**, dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt), **10** und **5** (Betulinyln-3,28-O₂-disulfamat). Für die Behandlung wurde bei allen Methoden die doppelte IC₅₀-Konzentration verwendet. Gezeigt sind die Ergebnisse nach einer Behandlungsdauer von 24, 48 und 72 Stunden von a) dem AnnexinV-Assay unter Verwendung der spät apoptotischen Zellpopulation, b) dem TUNEL-Assay unter Verwendung der markierten Doppelstrangbrüche, c) der Detektion von Caspase 3-aktiven Zellen durch Fluoreszenzmarkierung und d) der Zellzyklusanalyse unter Verwendung der Zellpopulation der SubG1-Phase.

Ebenfalls sehr gute Ergebnisse zeigte die Behandlung mit dem Disulfamat des Betulins (**5**) und Betulinsäure. Aufgrund unzureichender Stabilität und einer besseren Verfügbarkeit der Betulinsäure, wurden alle weiteren Schritte in der Entwicklung einer topischen Applikationsform mit **NVX-207** und Betulinsäure durchgeführt.

4.4 Ergebnisse des Gesamtprojektes „TopiDrugHorse“

In einem ersten Schritt wurden durch den Projektpartner Skinomics beide Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen und mit verschiedenen Lösungsvermittlern in Basiscreme DCA (O/W – Emulsion, veröffentlicht im Deutschen Arzneimittel-Codex) eingebracht. Die Freisetzungsversuche wurden durch Linus Gohlke (Skinomics GmbH, Halle) mit Hilfe des Mehrschichtmembranmodell (MSMM) durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich Betulinsäure bei einem Zusatz von 20 % MKT sehr gut in der Basiscreme verteilen lässt und ebenso gut nach einer Dauer von 24 Stunden in die Akzeptorschichten des Mehrschichtmembranmodells diffundiert. Auf Grund der höheren Polarität von **NVX-207** konnte auf den Zusatz von 20 % MKT verzichtet werden.

In einem nächsten Schritt sollte die Permeation der beiden Wirkstoffe *in vitro* an Hautstücken von Pferdehaut untersucht werden. Dies wurde von Frau Dr. Lisa Weber an der Tierklinik für Pferde in Hannover durchgeführt^{32, 33}. Betrachtet man die Ergebnisse so konnte eine Gesamt-Betulinsäure-Menge von $98 \pm 7 \%$ wiedergefunden werden. In der Haut (ohne dem *Stratum Corneum*) befanden sich nach Analyse $24 \pm 1 \%$ der aufgetragenen Menge an Betulinsäure. Zudem wurde das Akzeptormedium (PBS + 1% BSA, pH = 7.4) auf das Vorhandensein von Betulinsäure untersucht. Dabei wurden $18 \pm 11 \%$ der Gesamtmenge von Betulinsäure wiedergefunden. Dies beweist, dass Betulinsäure, eingebracht in einer „Basiscreme DAC“ mit 20 % MKT, in der Lage ist, das *Stratum Corneum* zu penetrieren und innerhalb der gemessenen 24 Stunden in die epidermalen und dermalen Schichten der isolierten Pferdehaut vorzudringen. In einer Hauttiefe von 810 μm betrug die Konzentration an Betulinsäure noch $39.6 \mu\text{M} \pm 38 \mu\text{M}$; dieser Wert entspricht exakt dem IC_{50} -Wert von Betulinsäure nach 24 Stunden von $39.8 \mu\text{M} \pm 3.6 \mu\text{M}$, gemessen an der *equinen* Melanomzelllinie MelDuWi. Bei dem gezeigten Mitteln (12 technische Replikate) der Permeationsversuche mit 1 % **NVX-207** in „Baiscreme DAC“ lag die Wiederfindung bei $85 \pm 14 \%$ der zuvor aufgetragenen Formulierung. Auch bei diesen Versuchen fanden sich $32 \pm 12 \%$ in der Haut wieder. Anders, als bei den zuvor beschriebenen Versuchen mit Betulinsäure, konnte kein **NVX-207** in dem Akzeptormedium nachgewiesen werden. Auf Grund der sehr guten zytotoxischen Wirkung von **NVX-207** (IC_{50} an der MelDuWi nach 24h: 4.6 ± 0.3) kann auch bei dem Einsatz dieser Formulierung von einer effektiven Wirkung gegen das *equine* maligne Melanom ausgegangen werden.

Der nächste Schritt in der Entwicklung einer topischen Behandlungsform von *equinen* malignen Melanomen war die Durchführung einer lokalen und systemischen Verträglichkeitsstudie, verbunden mit einer *in vivo* durchgeführten Konzentrationsbestimmung der penetrierten Wirkstoffe Betulinsäure und **NVX-207**, welche ebenfalls von der Tierärztin Frau Dr. Lisa Weber durchgeführt wurde²¹⁷. Die, nach sieben Tagen Behandlung und neun Tagen Untersuchung, ermittelten und addierten Gesamtpunkte lagen bei allen Formulierungen unter 5 (Plazebo: $3.4 (\pm 3.4)$, Betulinsäure: $4.4 (\pm 3.9)$ und **NVX-207**: $1.4 (\pm 1.6)$), was auf eine sehr gute systematische Verträglichkeit hinweist. Neben der Einschätzung von optischen/klinischen Nebenwirkungen, wurde Biopsien entnommen, um die Eindringtiefe der Wirkstoffe untersuchen zu können. Bei der Untersuchung der acht Betulinsäure - behandelten Proben (1% Betulinsäure in Basiscreme DAC + 20 % MKT) konnte Betulinsäure noch in einer Hauttiefe von 2010 μm (Bereich von 1310 μm - 2010 μm bei allen 8 Proben) bei den Pferden mit Abdeckung nachgewiesen werden, ohne Abdeckung lag die Wiederfindungsgrenze bestenfalls in einer Hauttiefe von 1210 μm (Bereich von 310 μm - 1210 μm bei allen 8 Proben). Auch bei der Behandlung der Haut mit 1 % **NVX-207** in Basiscreme DAC ist ein deutlicher Unterschied zwischen den abgedeckten und nicht abgedeckten Stellen bemerkbar. Findet man **NVX-207** bei einer vorhandenen Abdeckung noch in

Hautschichten von 1510 μm - 2010 μm , so ist die Wiederfindung bei einer fehlenden Abdeckung stark schwankend in einem Bereich von 510 μm - 2010 μm . Damit konnte gezeigt werden, dass durch eine Abdeckung der behandelten Stelle sowohl die Erfolgchancen für die Behandlung von Melanomen beim Pferd, durch eine effektivere Penetration von BS oder **NVX-207**, deutlich gesteigert werden könnte und unerwünschte Irritationen vermehrt ausblieben.

Aus diesem Grund wurde die nachfolgende Wirksamkeitsstudie (Studienphase II) aufbauend auf der Verträglichkeitsstudie durchgeführt. Durchgeführt wurde die Studienphase II in einem Zeitraum vom 21.01.20 - 22.04.20 an der „Spanischen Hofreitschule, spezielle im Lipizzanergestüt Piber“ von Frau Dr. Lisa Weber, welche dort die drei monatige Behandlung selbst ausführen konnte. 18 *equinen* Melanompatienten wurden vom Gestüt zur Verfügung gestellt, jeweils zwei Tumore (mit einem maximalen Durchmesser von 1.5 cm) sollten während dieser Studie pro Patienten behandelt werden. Es erfolgte zweimal täglich eine Behandlung mit den von der Firma Skinomics GmbH Halle hergestellten und verblindeten Proben. Im Mittel konnte eine Reduktion des Volumens bei Patienten der Placebo-Gruppe von anfänglich 220 mm^3 ($\pm 184 \text{ mm}^3$) an Tag 0 zu 195 mm^3 ($\pm 167 \text{ mm}^3$) an Tag 92 beobachtet werden. Nach Behandlung mit Betulinsäure zeigte sich eine Veränderung von anfänglich 268 mm^3 ($\pm 220 \text{ mm}^3$) an Tag 0 zu 147 mm^3 ($\pm 137 \text{ mm}^3$) an Tag 92. In der letzten Gruppe, der Behandlung mit **NVX-207** war ein Rückgang von anfänglich 113 mm^3 ($\pm 77 \text{ mm}^3$) an Tag 0 zu 87 mm^3 ($\pm 81 \text{ mm}^3$) an Tag 92 beobachtet werden. Jedoch konnten deutlich mehr Tumore in die Kategorie „erfolgreiche Behandlung“ aus den Gruppen Betulinsäure und **NVX-207** eingeordnet werden, als Tumore aus der Placebo-Gruppe. Obwohl die ersten Ergebnisse sehr vielversprechend sind, müssen für fundierte Schlussfolgerungen weitere Versuche in Bezug auf die Wirksamkeit durchgeführt werden. Dabei muss auch eine Optimierung der Formulierung in Bezug auf Wirkstoffkonzentration oder dem gezielten Einsatz von *enhancern* beachtet werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Strategien für den Einsatz von Betulinsäurederivaten bei der Behandlung von unterschiedlichen Tumorentitäten. Hierfür sollten die antitumorale Wirkung und leichte Modifizierbarkeit des Naturstoffes Betulinsäure ausgenutzt werden, um diesen als verknüpfendes Element für zwei unterschiedlichen Lösungsansätze in der Tumorthherapie zu nutzen. Eine Derivatisierung war sowohl an der C3-, als auch an der C28-Position der Betulinsäure und des Betulins möglich. Neben der Verbesserten Löslichkeit zeigten die neu synthetisierten Substanzen auch die Möglichkeit, den Wirkstoff durch ein gezieltes *drug-targeting* im Tumorgewebe anzureichern. Als *target* diente hierbei die Carboanhydrase IX, ein membrangebundenes Protein mit extrazellulärem katalytischem Zentrum, welches überwiegend in hypoxischen Bereichen von Tumoren zu finden ist. Für die Inhibierung der CA IX und der damit verbundenen Schwächung von hypoxischen Tumoren wurden Sulfamate verwendet, welche bereits eine bedeutende Stellung in der Entwicklung neuer Carboanhydrase-Inhibitoren in der Literatur einnehmen. Ebenso von großem Interesse sind Sulfonamide. Eine dritte Stoffklasse, welche in dieser Arbeit genauer untersucht wurde, sind cyclische Sulfonamide, darunter Saccharin. Als eine weitere inhibierende Gruppe wurde Acetazolamid eingeführt. Acetazolamid gilt als Standardinhibitor für die CA IX, wodurch eine Anbringung an den Naturstoff Betulin sehr vielversprechend war. Neben den inhibierenden Gruppen, wurden auch die verwendeten Linkerlängen variiert. Dies sollte einen Einblick geben, ob der Abstand zwischen dem Wirkstoff und der Enzym-Bindegruppe einen Einfluss auf die Enzymbindung hat. Als Linker wurden Dicarbonsäuren verwendet, welche die Möglichkeit der Anknüpfung von Sulfonamiden durch das Umsetzen dieser mit Taurinamid lieferten. Um einen deutlichen Unterscheid in der Polarität zu schaffen, wurde Triethylenglykol als Linker verwendet, welcher sowohl allein als auch in Verbindung mit einer Dicarbonsäure eingesetzt wurde. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sowohl bei der Bestimmung der Zytotoxizität, als auch bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten, die hergestellten Sulfonamide und die Derivate des Acetazolamids die effektivste Wirkung, mit IC_{50} -Werten in einem Bereich von 5 - 10 μM und k_i -Werten in einem Bereich zwischen 0.12 - 1.2 μM , zeigten. Besonders kleine k_i -Werte zeigten die Acetazolamid-Derivate ohne Betulin. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Verbindungen mit einem kürzeren Linker zwischen Wirkstoff und Bindegruppe eine höhere Bindeaffinität besitzen, wodurch es zu einer stärkeren Anreicherung des Wirkstoffes im Tumor kommen könnte. Einige der untersuchten Substanzen zeigten nur eine geringe Hemmung der CA IX-Aktivität unter Verwendung des Esterase-Assays. Hier wäre eine erneute Messung mit Hilfe eines zweiten Testsystems, beispielsweise dem CO_2 -Assay (SFA), sehr interessant. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation haben gezeigt, dass es möglich ist, mit vergleichsweise einfachen Synthesestrategien aktive Substanzen herzustellen. Allerdings ist die Fähigkeit der synthetisierten Verbindungen zwischen malignen und nicht-malignen Zellen zu unterscheiden häufig nicht zufriedenstellend ausgeprägt. Auch wäre eine Untersuchung der Selektivität der Inhibitoren in Hinsicht auf die Carboanhydrase IX-Hemmung von großer Bedeutung, da eine Vielzahl wichtiger Prozesse im Organismus von anderen Isoformen der Carboanhydrase gesteuert und so Nebenwirkung nicht ausgeschlossen werden können. Neben der Verbesserten Löslichkeit und der Möglichkeit, den Wirkstoff durch ein gezieltes *drug-targeting* im Tumorgewebe anzureichern, konnten die synthetisierten Substanzen auch mit einer sehr guten zytotoxischen Wirkung gegen *equine* Melanomen überzeugen.

Ein zweiter wichtiger Ansatzpunkt für den Einsatz von Naturstoffen, ist die Entwicklung topischer Applikationsmöglichkeiten für die gezielte äußerliche Behandlung von Hauttumoren. Circa 80 % der über 15-jährigen Schimmel erkrankten an Melanomen. Ein weiteres Ziel in dieser Arbeit lag in der

biologischen Evaluierung potentieller Wirkstoffe, um in einem zweiten Schritt eine topische Formulierung zur Behandlung von *equinen* malignen Melanomen entwickeln zu können. Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung wurden sowohl der SRB-, als auch der MTT-Assay verwendet. Auch wurde, zur Bestimmung der Permeationszeit, ein zeitabhängiger SRB-Assay durchgeführt. Hierbei zeigten sich erstaunliche Ergebnisse für den Wirkstoff NVX-207, welcher schon nach einer Behandlungsdauer von drei Stunden einen IC₅₀-Wert von 8 µM liefern konnte. Durchgeführt wurden diese Versuche sowohl an *equinen* Melanom- und Sarkoidzellen, als auch an *equinen* Fibroblasten. Eine zweite wichtige Einschätzung lieferte die Untersuchung der Zelltodmechanismen. Hierfür wurden vier unabhängige Methoden durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl der reine Naturstoff Betulinsäure, als auch deren Derivate in der Lage sind, bei ca. 80 % der Tumorzellen, Apoptose auszulösen (Nekrose konnte dabei zumeist ausgeschlossen werden). Aufgrund der guten Verfügbarkeit und überzeugenden Wirkung, wurden Betulinsäure und NVX-207 für die Entwicklung einer topischen Formulierung zur äußeren Behandlung von Melanomen bei Pferden verwendet.

6. Experimenteller Teil

6.1 Material und Methoden

Die folgenden Chemikalien wurden für die Synthese bei Sigma Aldrich gekauft: 4-(Dimethylamino)pyridin (99 %), Calciumhydrid (95 %), Triethylenglycol (99 %), Bernsteinsäureanhydrid (99 %), Salzsäure, Acetazolamid (99 %), *N,N*-Diisopropylethylenamin (99 %), Saccharin (98 %), 2-bromo-3'-methoxyacetophenon (98 %), 4-Methylbenzylbromid (97 %), 4-Bromobenzylbromid (98 %), Dimethylformamid (trocken), Dimethylacetamid (trocken), Pyridin (trocken), Dichlormethan (trocken). Sowohl *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (99 %), als auch Propionsäure-anhydrid (98 %) und Chloressigsäurechlorid wurden bei Merck gekauft. Folgende Chemikalien wurden bei Alfa Aesar gekauft: Natriumcarbonat (98 %), Natriumhydrogencarbonat (99 %), Diglycolamin (98 %), Oxalylchlorid (98 %) und Kaliumcarbonat (98 %). 1-Octanol (99 %) und 1,8-Octandiol (99 %) wurden bei Acros Organics gekauft. Triethylamin (99,5 %) wurde bei Fluka gekauft, Essigsäureanhydrid (99 %) und Acetonitril (99,5 %) bei Grüssing. Das verwendete Taurinamid wurde bei abcr gekauft, das Kupplungsreagenz HOBt (98 %) bei TCI. Die verwendete Betulinsäure und Betulin stammen aus der Firma BioSolutions Halle GmbH. Natriumchlorid, Natriumsulfat und die verwendeten Lösungsmittel Dichlormethan, Essigsäureethylester, Petroether, Methanol, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid, und Toluol wurden in technischer Reinheit in der Chemikalienausgabe der Chemie (MLU) gekauft und vor Verwendung destilliert.

Die gezeigten ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Spektren wurden an folgenden Geräten gemessen: Varian Unity Inova 500 (500 MHz). Gemessen wurden die Spektren bei 27 °C unter Verwendung von deuteriertem Chloroform (CDCl_3), deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO-d^6) oder deuteriertem Dimethylformamid (DMF-d^7). Alle chemischen Verschiebungen wurden in part per million (ppm) angegeben. Ausgewertet wurden alle Spektren mit Hilfe MestreNova Software (Version 6.0.2-5475). Dabei wurden alle Signale auf das entsprechende Lösungsmittelsignal bezogen (CDCl_3 : 7.26 ppm (^1H), 77.0 ppm (^{13}C), DMSO-d^6 : 2.50 ppm (^1H), 39.5 ppm (^{13}C) und DMF-d^7 : 2.74 ppm, 291 ppm und 8.01 ppm (^1H), 30.1 ppm, 35.2 ppm und 162.7 ppm (^{13}C). Gekauft wurden alle deuterierten Lösungsmittel bei Sigma Aldrich.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde mit Merck Kieselgel 60-Platten durchgeführt. Spots auf dem DC wurden mit einem Oxidationsmittel (entweder *blue staining* oder Kaliumpermanganat-Lösung) oder UV-Licht (256 oder 366 nm) visualisiert. Die *blue staining* - Lösung wurde wie folgt hergestellt: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 g) und $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 g) wurden in einer Mischung aus destilliertem Wasser (90 ml) und konzentrierter Schwefelsäure (6 ml) gelöst. Die Kaliumpermanganatlösung wurde wie folgt hergestellt: KMnO_4 (3 g) und K_2CO_3 (20 g) wurden in H_2O (300 ml) und 10 % NaOH (5 ml) gelöst. Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel (*high-purity grade*), 60 Porengröße, 230-400 Partikelgröße durchgeführt.

Für die Kultivierung der Zellen wurden folgende Produkte bei Capricorn Scientific gekauft: RPMI 1640, mit L-Glutamin (RPMI-A, steril filtriert), RPMI 1640, mit stabilem Glutamin (RPMI-STA, steril filtriert), DMEM High Glucose (4.5 g/L), mit stabilem Glutamin (DMEM-HPSTA), Antibiotic/Antimycotic Solution (AAS-B, 100x), Penicillin/Streptomycin (PS-B, 100x), Trypsin (2.5 %) in DPBS (TRY-2B10, 10x), Dulbecco's PBS (10x), w/o Ca^{2+} & Mg^{2+} , w/o Phenol Red (PBS-10XA) und Dulbecco's PBS (10x), with Ca^{2+} & Mg^{2+} , w/o Phenol Red (PBS-2A). Das verwendete FKS wurde bei Sigma-Aldrich gekauft.

Für die Zellkultivierung und den dazugehörigen Zellkulturversuchen wurden folgende Geräte verwendet: Sterilbank (HERAsafe HSP12) von Heraeus Instruments (Hanau), Inkubator (HERAcell® 150) von Thermo Electron LED GmbH (Langenselbold), automatischer Zellzähler

(Countess™) von Invitrogen (Carlsbad, USA), Durchflusszytometer (Attune acoustic focusing cytometer) von Life Technologies GmbH (Darmstadt), Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 20 Kamera: AxioCam MR3) von Carl Zeiss AG (Oberkochen), Plattenlesegerät (Infinite F200 PRO) von Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim), 96-*well*-Plattenwäscher (Hydro Speed) von Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim), Analysenwaage (AX124) von Sartorius AG (Göttingen).

6.2 Synthese

Aufgrund von Vereinfachungen wurden in dieser Arbeit vereinfachte „Trivialnamen“ aller Substanzen verwendet. Folgende Tabelle soll aus diesem Grund eine Auflistung aller Substanzen zeigen, deren zugeordneten Nummern, den Trivialnamen und den Namen laut JUPAC beinhaltet sind.

Tabelle 11. Auflistung der synthetisierten Verbindungen und deren Namen nach Bezeichnung in der Arbeit und den Namen nach Scifinder.

Nummer	Bezeichnung in Arbeit	Name nach Scifinder
1a	28- <i>O</i> -Acetylbetulin	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-28-acetat
1b	3,28- <i>O,O'</i> -diacetylbetulin	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3,28-diacetat
1c	3- <i>O</i> -Acetylbetulin	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3-acetat
2	28- <i>O</i> -Acetylbetuliny-3- <i>O</i> -sulfamat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-28-acetat-3-sulfamat
3	3- <i>O</i> -Acetylbetuliny-28- <i>O</i> -sulfamat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3-acetat-28-sulfamat
4	Betuliny-28- <i>O</i> -sulfamat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-28-sulfamat
5	Betuliny-3,28- <i>O,O'</i> -disulfamat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3,28-disulfamat
6	Octylsulfamat	Octylsulfamat
7	Octyldisulfamat	Octyldisulfamat
8	Triethylenglycol-disulfamat	Triethylenglycol-disulfamat
9	3- <i>O</i> -Acetylbetulinsäure	Lup-20(29)-en-28-säure- 3-acetat
10	3- <i>O</i> -Acetylbetulinsäure-28-aurinamid	Ethanesulfonic amid- 2-[[(3 α)-28-oxo-3-(1-oxoacetyl)lupan-28-yl]amino]
11	3-Hemisuccinat-28- <i>O</i> -acetylbetuliny	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3-acetate-28-(hydrogenbutandioat)
12	3- <i>O</i> -Acetylbetuliny-28-hemisuccinat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-28-acetate-3-(hydrogenbutandioat)
13	3-Hemisuccinat-aurinamid-28- <i>O</i> -acetylbetuliny	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3-acetate-28-[4-amid-4-[(2-sulfoethyl)amino]butanoat]
14	3- <i>O</i> -Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-aurinamid	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-28-acetate-3-[4-amid-4-[(2-sulfoethyl)amino]butanoat]
15	5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid	5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid
16	5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid - hemisuccinat	5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid - hydrogenbutandioat
17	5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid - hemisuccinat-aminodiethylenglycol	5-Amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid - hydrogenbutandioate-aminodiethylenglycol

18	3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3-acetate-28-(hydrogenbutanedioate-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid))
19	3-O-Acetylbetulinsäure-aminodiethylenglycol-amid	2-[2-[2-[(3 β)-3-(acetyloxy)-28-oxolup-20(29)-en-28-yl]amino]ethoxy]ethoxy]
20	3-O-Acetylbetulinsäure-aminodiethylenglycol-amid-hemisuccinat	2-[2-[2-[(3 β)-3-(acetyloxy)-28-oxolup-20(29)-en-28-yl]amino]ethoxy]ethoxy]-hydrogenbutandioat
21	3-O-Acetylbetulinsäure-aminodiethylenglycol-amid-hemisuccinat - 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid	2-[2-[2-[(3 β)-3-(acetyloxy)-28-oxolup-20(29)-en-28-yl]amino]ethoxy]ethoxy]-(hydrogenbutanedioate-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamid))
22	2-[2-(3-Methoxyphenyl)-2-oxoethyl]-1,2-benzothiazol-3 (2H)-one-1,1-dioxid	2-[2-(3-Methoxyphenyl)-2-oxoethyl]-1,2-benzothiazol-3 (2H)-one 1,1-dioxid
23	2-(4-Methylbenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-one-1,1-dioxid	2-(4-Methylbenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-one 1,1-dioxid
24	2-(4-Bromobenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-one-1,1-dioxid	2-(4-Bromobenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-one 1,1-dioxid
25a	Betuliny-28-propionat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-28-propanoat
25b	Betuliny-di-3,28-propionat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3,28-dipropanoat
26	Betuliny-3-chloracetat-28-propionat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3-chloracetat-28-propanoat
27	Betuliny-di-3,28-chloracetat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3,28-dichloracetat
28	Betuliny-3-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat	Lup-20(29)-ene-3,28-diol-3-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat
29	Betuliny-di-3,28-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat	Lup-20(29)-ene-di-(3,28)-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat

6.2.1 Sulfamate

6.2.1.1 28-O-Acetylbetulin (1a) und 3,28-O,O'-diacetylbetulin (1b)

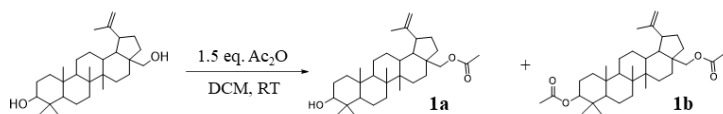


Abbildung 78. Synthese von 28-O-Acetylbetulin (1a) und 3,28-O,O'-diacetylbetulin (1b).

Generelle Durchführung: Betulin (15.0 g, 33.9 mmol), DMAP (0.1 g, 0.8 mmol) und Triethylamin (5.0 mL, 3.64 g, 36.0 mmol) wurden in Dichlormethan (150 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurde ein Gemisch aus Essigsäureanhydrid in Dichlormethan langsam zu der Suspension getropft und anschließend für 1 h bei RT gerührt. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Gemisch auf Eis gegeben und das Produkt durch Extraktion mit Essigsäureethylester aus der wässrigen Phase isoliert. Die organische Phase wurde mit Na₂CO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ über Nacht getrocknet. Die Reinigung des Produktes erfolgte säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (9:1).

Charakterisierung von 1a:

Ausbeute: 10.01g, 20.7 mmol, 61%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4.68 (d, 1H, *H*₂₉), 4.58 (d, 1H, *H*₂₉), 4.23 (d, 1H, ²*J*_{H-H} = 11.1 Hz, *H*₂₈), 3.84 (d, 1H, ²*J*_{H-H} = 11.1 Hz, *H*₂₈), 3.16 (dd, 1H, ³*J*_{H-H} = 10.2 Hz, *H*₃), 2.46 (m, 1H, *H*₁₉), 2.06 (s, 3H, *H*₃₂), 2.03 (s, 3H, *H*₃₄), 1.81-0.76 (42H).

ESI-MS (+) (C₃₂H₅₂O₃, M = 484.39): 467.20 ([M-OH]⁺), 991.27 ([2M+Na]⁺).

Charakterisierung von 1b:

Ausbeute: 3.92 g, 7.5 mmol, 22%

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4.68 (d, 1H, *H*₂₉), 4.58 (d, 1H, *H*₂₉), 4.46 (dd, 1H, ³*J*_{H-H} = 10.2 Hz, *H*₃), 4.24 (d, 1H, ²*J*_{H-H} = 11.1 Hz, *H*₂₈), 3.84 (d, 1H, ²*J*_{H-H} = 11.1 Hz, *H*₂₈), 2.43 (m, 1H, *H*₁₉), 2.06 (s, 3H, *H*₃₂), 2.03 (s, 3H, *H*₃₄), 1.81-0.76 (42H).

ESI-MS (+) (C₃₄H₅₄O₄, M = 526.40): 1075.33 ([2M+Na]⁺).

6.2.1.2 3-O-Acetylbetulin (1c)



Abbildung 79. Synthese von 3-O-Acetylbetulin 1c.

Generelle Durchführung: 1b (4 g, 7.6 mmol) wurde mit einer katalytischen Menge an Calciumhydrid in einem Gemisch aus Methanol (20 mL) und THF (20 mL) gelöst, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter verminderten Druck aus der Reaktion entfernt. Der Rückstand wurde anschließend in Essigsäureethylester aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel erneut entfernt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (9:1).

Charakterisierung von **1c**:

Ausbeute: 2.35g, 4.8 mmol, 64%

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.68 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 2.5$ Hz, H_{29}), 4.58 (d, 1H, H_{29}), 4.48 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz + 4.7 Hz, H_3), 3.80 (m, 1H, H_{28}), 3.35 (m, 1H, H_{28}), 2.37 (m, 1H, H_{19}), 1.98 (s, 3H, H_{32}), 1.90-0.60 (42H).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$, $M = 484.39$): 991.33 ($[2\text{M}+\text{Na}]^+$).

6.2.1.3 28-O-Acetylbetuliny-3-sulfamat (**2**)

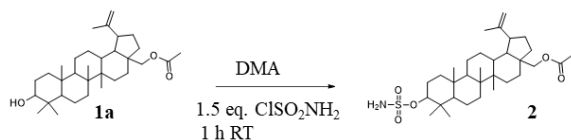


Abbildung 80. Synthese von 28-O-Acetylbetuliny-3-O-sulfamat **2**.

Generelle Durchführung: **1a** (250 mg, 0.52 mmol) wurde zusammen mit Sulfamylchlorid (89.7 mg, 0.78 mmol) in DMA (3 mL) gelöst und für 3 Stunden bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Quenchen der Reaktion mit Eiswasser und anschließender Extraktion des Produktes aus der wässrigen Phase mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wurde einmal mit Na_2CO_3 -Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die anschließende Trocknung erfolgte mit Na_2SO_4 . Nach der Trocknung wurde das organische Lösungsmittel abgezogen und das Produkt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3) gereinigt.

Charakterisierung von **2**:

Ausbeute: 222.6 mg, 0.41 mmol, 76%

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.30 (s, 2H, NH_2), 4.69 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz, H_{29}), 4.55 (d, 1H, H_{29}), 4.25 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.2$ Hz, H_{28}), 3.39 (dd, 1H, H_3), 3.75 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.7$ Hz, H_{28}), 2.43 (m, 1H, H_{19}), 2.00 (s, 3H, H_{32}), 1.95-0.65 (42H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{NO}_5\text{S}$, $M = 563.37$): 562.40 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), 607.93 ($[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$).

6.2.1.4 3-O-Acetylbetuliny-28-O-sulfamat (**3**)

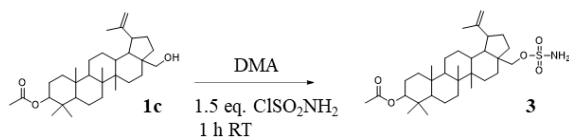


Abbildung 81. Synthese von 3-O-Acetylbetuliny-28-O-sulfamat **3**.

Generelle Durchführung: **1c** (300 mg, 0.615 mmol) wurde zusammen mit Sulfamylchlorid (105.3 mg, 0.92 mmol) in DMA (3 mL) gelöst und für 3 Stunden bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Quenchen der Reaktion mit Eiswasser und anschließender Extraktion des Produktes aus der wässrigen Phase mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wurde einmal mit Na_2CO_3 -Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die anschließende Trocknung erfolgte mit Na_2SO_4 . Nach der Trocknung wurde das organische Lösungsmittel abgezogen und das Produkt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3) gereinigt.

Charakterisierung von 3:

Ausbeute: 339.5 mg, 0.603 mmol, 98%

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.73 (s, 2H, NH_2), 4.69 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.9$ Hz H_{29}), 4.60 (d, 1H, H_{29}), 4.48 (dd, 1H, H_3), 4.37 (d, 1H, H_{28}), 3.92 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.7$ Hz, H_{28}), 2.41 (m, 1H, H_{19}), 2.04 (s, 3H, H_{32}), 1.95-0.65 (42H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{NO}_5\text{S}$, $M = 563.37$): 562.59 ($[\text{M-H}]^-$), 598.33 ($[\text{M+Cl}]^-$).

6.2.1.5 Betuliny-28-O-sulfamat (4) und Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat (5)

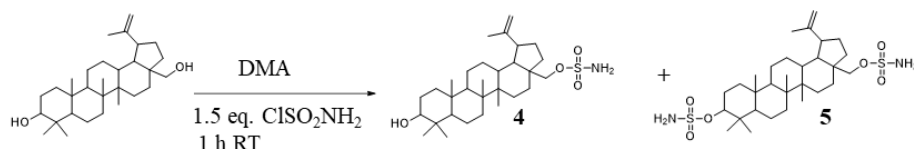


Abbildung 82. Synthese von Betuliny-28-O-sulfamat **4** und Betuliny-3,28-O,O'-disulfamat **5**.

Generelle Durchführung: Betulin (5 g, 11.3 mmol) wurde zusammen mit Sulfamylchlorid (2 g, 17 mmol) in DMA (15 mL) gelöst und für 3 Stunden bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Quenchen der Reaktion mit Eiswasser und anschließender Extraktion des Produktes aus der wässrigen Phase mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wurde einmal mit Na_2CO_3 -Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die anschließende Trocknung erfolgte mit Na_2SO_4 . Nach der Trocknung wurde das organische Lösungsmittel abgezogen und das Produkt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3) gereinigt.

Charakterisierung von 4:

Ausbeute: 1.2 g, 2.94 mmol, 26 %

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.39 (s, 2H, NH_2), 4.68 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, H_{29}), 4.56 (d, 1H, H_{29}), 4.25 (m, 1H, OH), 4.11 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.6$ Hz, H_{28}), 3.74 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.5$ Hz, H_{28}), 2.96 (m, 1H, H_3), 2.48 (m, 1H, H_{19}), 2.00-0.64 (42H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{NO}_4\text{S}$, $M = 521.36$): 520.47 ($[\text{M-H}]^-$).

Charakterisierung von 5:

Ausbeute: 3.41 g, 8.36 mmol, 74 %

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.35 (s, 2H, NH_2), 7.31 (s, 2H, NH_2), 4.69 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, H_{29}), 4.56 (d, 1H, H_{29}), 4.12 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.6$ Hz, H_{28}), 4.00 (m, 1H, H_3), 3.75 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 9.5$ Hz, H_{28}), 2.39 (m, 1H, H_{19}), 1.97-0.73 (42H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$, $M = 600.34$): 599.52 ($[\text{M-H}]^-$), 635.33 ($[\text{M+Cl}]^-$).

6.2.1.6 Octylsulfamat (6)

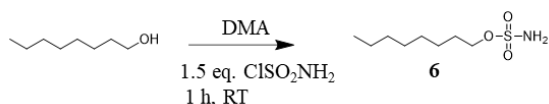


Abbildung 83. Synthese von Octylsulfamat **6**.

Generelle Durchführung: (Synthese wie bei Winum *et. al*¹⁴⁸) 1-Octanol (0.2 mL, 163 mg, 1.25 mmol) wurde zusammen mit Sulfamylchlorid (215.6 mg, 1.88 mmol) in DMA (2 mL) gelöst und für 3 Stunden bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Quenchen der Reaktion mit Eiswasser und

anschließender Extraktion des Produktes aus der wässrigen Phase mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wurde einmal mit Na₂CO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die anschließende Trocknung erfolgte mit Na₂SO₄. Nach der Trocknung wurde das organische Lösungsmittel abgezogen und das Produkt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (8:2) gereinigt.

Charakterisierung von 6:

Ausbeute: 109 mg, 0,48 mmol, 39 %

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7.35 (s, 2H, NH₂), 3.99 (dd, 2H, H₁), 1.61 (m, 2H, H₂), 1.24 (m, 10H, C3-C7), 0.85 (s, 3H, H₈).

ESI-MS (+) (C₈H₁₉NO₃S, M = 209.11): 231.88 ([M+Na]⁺), 263.62 ([M+Na+MeOH]⁺).

6.2.1.7 Octyldisulfamat (7)

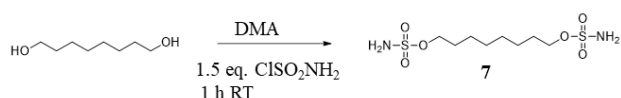


Abbildung 84. Synthese von Octyldisulfamat 7.

Generelle Durchführung: (Synthese wie bei *Winum et. al*¹⁴⁸) 1,8-Octandiol (200 mg, 1.37 mmol) wurde zusammen mit Sulfamylchlorid (236.3 mg, 2.1 mmol) in DMA (3 mL) gelöst und für 3 Stunden bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Quenchen der Reaktion mit Eiswasser und anschließender Extraktion des Produktes aus der wässrigen Phase mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wurde einmal mit Na₂CO₃-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen. Die anschließende Trocknung erfolgte mit Na₂SO₄. Nach Trocknung wurde das organische Lösungsmittel abgezogen und das Produkt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (8:2) gereinigt.

Charakterisierung von 7:

Ausbeute: 358 mg, 1.23 mmol, 85,3 %

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7.35 (s, 4H, 2 NH₂), 3.99 (m, 4H, H₁ + H₈), 1.61 (m, 4H, H₂ + H₇), 1.24 (m, 8H, H₃ - H₆).

ESI-MS (+) (C₈H₂₀N₂O₆S₂, M = 304.08): 327.07 ([M+Na]⁺).

6.2.1.8 Triethylenglycol-disulfamat (8)

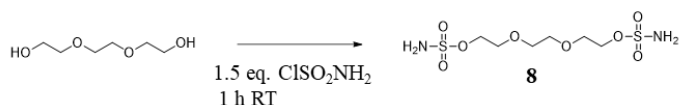


Abbildung 85. Synthese von Triethylenglycol-disulfamat

Generelle Durchführung: Triethylenglycol (165 mg, 150 µL, 1.1 mmol) wurde zusammen mit Sulfamylchlorid (250 mg, 1.8 mmol) in Acetonitril (10 mL) gelöst und für 3 h bei 50 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wurde mehrmals mit Acetonitril (10 mL) gewaschen, in Methanol (10 mL) gelöst und anschließend das Methanol unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde anschließend mehrmals mit DCM gewaschen und getrocknet.

Charakterisierung von **8**:

Ausbeute: 113 mg, 0.3 mmol, 33.5 %

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 4.1 (m, 4H, 2 NH_2), 3.64 (m, 4H, $H_1 + H_6$), 3.5 - 3.4 (8H, $H_2 - H_5$).

6.2.1.9 3-O-Acetylbetulinsäure (**9**)

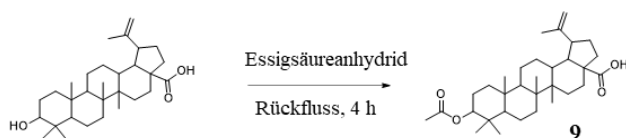


Abbildung 86. Synthese von 3-O-Acetylbetulinsäure **9**.

Generelle Durchführung: Betulinsäure (10 g, 21.8 mmol) und Essigsäureanhydrid (250 mL, 3.25 mol) werden für 4 h am Rückflusskühler bis zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen des Gemisches wird die Lösung langsam unter ständigem Rühren auf Eiswasser (ca. 1 L) gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mehrmals mit heißem Wasser gewaschen und anschließend über Nacht getrocknet. Das getrocknete Produkt wird anschließend in Ethanol (250 mL, 70% mit Wasser) aufgenommen und weitere 8 h unter Rückfluss gekocht. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (3:1).

Charakterisierung von **9**:

Ausbeute: 8.4 g, 16.8 mmol, 71.2 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.67 (d, 1H, H_{29}), 4.54 (d, 1H, H_{29}), 4.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 10.9 + 4.5 \text{ Hz}$, H_3), 2.92 (m, 1H H_{29}), 2.26 (d, 1H, H_{18}), 2.17 (m, 1H, H_{21}), 2.04 (s, 3H, H_{32}), 1.98 (m, 1H, $\text{C}21\text{H}$) 1.84-0.77 (40H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$, $M = 498.37$): 497.33 ($[\text{M-H}]^-$), 995.20 ($[\text{2M-H}]^-$), 1017.53 ($[\text{2M-2H}+\text{Na}]^-$).

6.2.2 Sulfonamide

6.2.2.1 Sulfonamid der Acetylbetulinsäure (**10**)

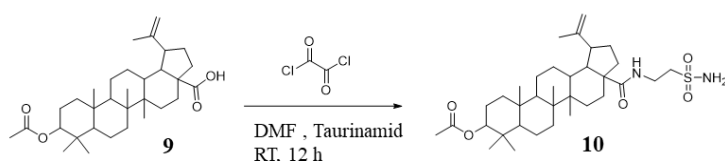


Abbildung 87. Synthese von 3-O-Acetylbetulinsäure-28-aurinamid **10**.

Generelle Durchführung: **8** (300 mg, 0.60 mmol) wurde in trockenem Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit Oxalylchlorid (100 μL , 148.3 mg, 1.2 mmol) versetzt. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel unter Hitze und verminderten Druck abgezogen. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden Taurinamid (150 mg, 1.2 mmol) und Triethylamin (300 μL , 215 mg, 2 mmol) in einem Gemisch aus trockenem Dichlormethan (20 mL) und trockenem Dimethylformamid (5 mL) gelöst und langsam zu dem zuvor hergestellten Säurechlorid, ebenfalls gelöst in trockenem Dichlormethan, hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, anschließend wurde das Lösungsmittel abgezogen, das Produkt in Essigsäureethylester aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel erneut abgezogen. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit DCM / Methanol (15:1).

Charakterisierung von 10:

Ausbeute: 247 mg, 0.41 mmol, 68.2 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 6.47 (t, 1H, CONH), 5.38 (s, 2H, NH_2), 4.71 (d, 1H, H_{29}), 4.58 (d, 1H, H_{29}), 4.46 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 10.9 \text{ Hz} + 4.3 \text{ Hz}$, H_3), 3.75 (m, 2H, H_{34}), 3.26 (m, 2H, H_{33}), 2.39 (m, 1H, H_{19}), 2.05 (m, 1H, H_{18}), 2.02 (s, 3H, H_{32}), 1.76-0.77 (40H).

6.2.2.2 3-Hemisuccinat-28-O-acetylbetulinyll (11a) und 3-(2-Methyl-hemisuccinat)-28-O-acetylbetulinyll (11b)

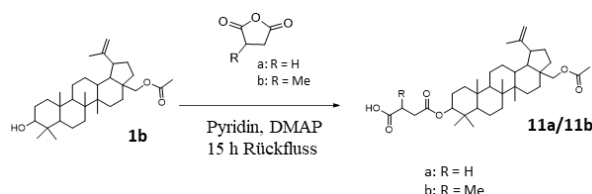


Abbildung 88. Synthese von 3-Hemisuccinat-28-O-acetylbetulinyll (11a) und 3-(2-Methyl-hemisuccinat)-28-O-acetylbetulinyll (11b).

Generelle Durchführung: 1b (1 g, 1.7 mmol) wurde zusammen mit einer katalytischen Menge an DMAP in trockenem Pyridin (10 mL) gelöst. Bernsteinsäureanhydrid/ 2-Methylbernsteinsäureanhydrid, ebenfalls gelöst in trockenem Pyridin (5 mL), wurde anschließend hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 15 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Beenden der Reaktion wurde das Gemisch auf Eiswasser (500 mL) gegeben und das Produkt mehrmals mit Dichlormethan aus der wässrigen Lösung extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde anschließend erst mit einer 5 %igen HCl, dann mit gesättigter NaHCO_3 und zuletzt mit H_2O gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel abgezogen und die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit DCM / Methanol (15:1).

Charakterisierung von 11a:

Ausbeute: 774 mg, 1.26 mmol, 56 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.69 (d, 1H, H_{29}), 4.55 (d, 1H, H_{29}), 4.36 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.2 \text{ Hz} + 4.6 \text{ Hz}$, H_3), 4.26 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0 \text{ Hz}$, H_{28}), 3.74 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9 \text{ Hz}$, H_{28}), 2.68 (m, 2H, H_{34}), 2.49 (m, 2H, H_{35}), 2.04 (s, 3H, H_{32}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_6$, $M = 584.41$): 584.16 ($[\text{M-H}]^-$), 1167.73 ($[2\text{M-H}]^-$).

Charakterisierung von 11b:

Ausbeute: 403 mg, 0.67 mmol, 30 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.69 (d, 1H, H_{29}), 4.55 (d, 1H, H_{29}), 4.36 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.2 \text{ Hz} + 4.6 \text{ Hz}$, H_3), 4.26 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0 \text{ Hz}$, H_{28}), 3.74 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9 \text{ Hz}$, H_{28}), 2.68 (m, 2H, H_{34}), 2.49 (m, 2H, H_{35}), 2.04 (s, 3H, H_{32}), 1.1 (m, 3H, H_{34}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$, $M = 598.42$): 621.33 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

6.2.2.3 28-Hemisuccinat-3-O-acetylbetuliny (12a) und 28-(2-Methyl-hemisuccinat)-3-O-acetylbetuliny (12b)

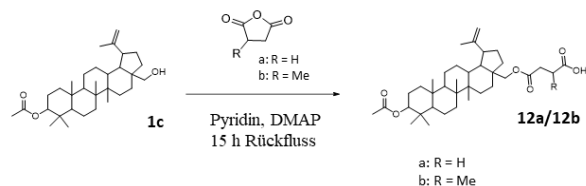


Abbildung 89. Synthese von 28-Hemisuccinat-3-O-acetylbetuliny (12a) und 28-(2-Methyl-hemisuccinat)-3-O-acetylbetuliny (12b).

Generelle Durchführung: **1c** (1 g, 1.7 mmol) wurde zusammen mit einer katalytischen Menge an DMAP in trockenem Pyridin (10 mL) gelöst. Bernsteinsäureanhydrid/ 2-Methylbernsteinsäureanhydrid, ebenfalls gelöst in trockenem Pyridin (5 mL), wurde anschließend hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 15 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Beenden der Reaktion wurde das Gemisch auf Eiswasser (500 mL) gegeben und das Produkt mehrmals mit Dichlormethan aus der wässrigen Lösung extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde anschließend erst mit einer 5 %igen HCl, dann mit gesättigter NaHCO_3 und zuletzt mit H_2O gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel abgezogen und die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit DCM / Methanol (15:1).

Charakterisierung von 12a:

Ausbeute: 942 mg, 1.36 mmol, 80.3 %,

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.69 (d, 1H, H_{29}), 4.59 (d, 1H, C H_{29}), 4.46 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.2 \text{ Hz} + 4.6 \text{ Hz}$, H_3), 4.26 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0 \text{ Hz}$, H_{28}), 3.84 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9 \text{ Hz}$, H_{28}), 2.68 (m, 4H, $H_{34} + H_{35}$), 2.04 (s, 3H, H_{32}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_6$, $M = 584.41$): 607.33 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Charakterisierung von 12b:

Ausbeute: 375 mg, 0.63 mmol, 28.3 %,

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.69 (d, 1H, H_{29}), 4.59 (d, 1H, C H_{29}), 4.46 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.2 \text{ Hz} + 4.6 \text{ Hz}$, H_3), 4.26 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0 \text{ Hz}$, H_{28}), 3.84 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9 \text{ Hz}$, H_{28}), 2.68 (m, 4H, $H_{34} + H_{35}$), 2.04 (s, 3H, H_{32}), 1.2 (m, 3H, H_{34}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_6$, $M = 598.42$): 621.40 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

6.2.2.4 3-Hemisuccinat-aurinamid-28-O-acetylbetuliny (13a) und 3-(2-Methyl-hemisuccinat)-aurinamid-28-O-acetylbetuliny (13b)

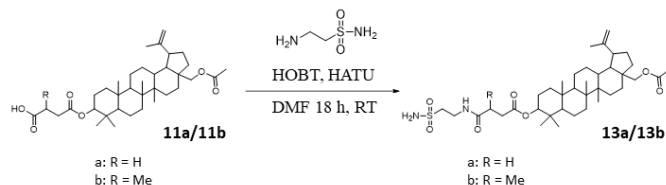


Abbildung 90. Synthese von Sulfonamid von 3-Hemisuccinat-aurinamid-28-O-acetylbetuliny (13) und 3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-aurinamid (14).

Generelle Durchführung: **11a** oder **11b** (200 mg, 0.35 mmol) wurde zusammen mit einem Überschuss an DIPEA in DMF gelöst. Unter Rühren wird bei RT zunächst eine stöchiometrische Menge an DCC, gelöst in DMF (2 mL), hinzuge tropft, anschließend eine stöchiometrische Menge an HOBT, gelöst in

DMF (3 mL), und nach einer Aktivierungszeit von 10 min Taurinamid (87.5 mg, 0.7 mmol), ebenfalls gelöst in DMF, hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT für weitere 15 Stunden gerührt. Zum Entfernen des Lösungsmittels wurde dieses unter verminderte Druck entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und zunächst mit K₂CO₃-Lösung und dann mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (8:2).

Charakterisierung von 13a:

Ausbeute: 193.6 mg, 0.28 mmol, 80.1%

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.00 (t, 1H, ³J_{H-H} = 5.1 Hz, CONH), 6.84 (s, 2H, NH₂), 4.67 (d, 1H, H₂₉), 4.54 (d, 1H, H₂₉), 4.33 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 11.3 Hz + 4.6 Hz, H₃), 4.23 (d, 1H ²J_{H-H} = 11.1 Hz, H₂₈), 3.85 (d, 1H, ³J_{H-H} = 11.0 Hz, H₂₈), 3.78 (m, 2H, H₃₇), 3.36 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, H₃₈), 2.68 (m, 1H, H₃₄), 2.50 (m, 1H, H₃₅), 1.99 (s, 3H, H₃₂), 1.94-0.74 (42H).

ESI-MS (+) (C₃₈H₆₂N₂O₇S, M = 690.43): 714.02 ([M+Na]⁺), 1403.44 ([2M+Na]⁺).

Charakterisierung von 13b:

Ausbeute: 148 mg, 0.21 mmol, 77.3 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.00 (t, 1H, ³J_{H-H} = 5.1 Hz, CONH), 6.84 (s, 2H, NH₂), 4.67 (d, 1H, H₂₉), 4.54 (d, 1H, H₂₉), 4.33 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 11.3 Hz + 4.6 Hz, H₃), 4.23 (d, 1H ²J_{H-H} = 11.1 Hz, H₂₈), 3.85 (d, 1H, ³J_{H-H} = 11.0 Hz, H₂₈), 3.78 (m, 2H, H₃₇), 3.36 (t, 2H, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, H₃₈), 2.68 (m, 1H, H₃₄), 2.50 (m, 1H, H₃₅), 1.99 (s, 3H, H₃₂), 1.1 (m, 3H, H₃₄'), 1.94-0.74 (42H).

ESI-MS (+) (C₃₉H₆₄N₂O₇S, M = 704.44): 705.13 ([M+H]⁺), 727.40 (100, [M+Na]⁺).

6.2.2.5 28-Hemisuccinat-aurinamid-3-O-acetylbetuliny (14a) und 28-(2-Methyl-hemisuccinat)-aurinamid-3-O-acetylbetuliny (14b)

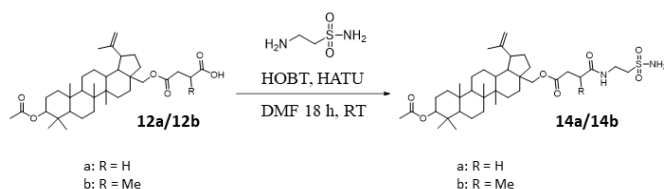


Abbildung 91. Synthese von 28-Hemisuccinat-aurinamid-3-O-acetylbetuliny (14a) und 28-(2-Methyl-hemisuccinat)-aurinamid-3-O-acetylbetuliny (14b).

Generelle Durchführung: 12a oder 12b (150 mg, 0.25 mmol) wurde zusammen mit einem Überschuss an DIPEA in DMF gelöst. Unter Rühren wird bei RT zunächst eine stöchiometrische Menge an DCC, gelöst in DMF (2 mL), hinzugegeben, anschließend eine stöchiometrische Menge an HOBT, gelöst in DMF (3 mL), und nach einer Aktivierungszeit von 10 min Taurinamid (87.5 mg, 0.7 mmol), ebenfalls gelöst in DMF, hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT für weitere 15 Stunden gerührt. Zum Entfernen des Lösungsmittels wurde dieses unter verminderte Druck entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und zunächst mit K₂CO₃-Lösung und dann mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (8:2).

Charakterisierung von 14a:

Ausbeute: 162.3 mg, 0.23 mmol, 92 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.01 (t, 1H, ³J_{H-H} = 5.1 Hz, CONH), 6.85 (s, 2H, NH₂), 4.68 (d, 1H, H₂₉), 4.55 (d, 1H, H₂₉), 4.34 (dd, 1H, ³J_{H-H} = 11.3 Hz + 4.6 Hz, H₃), 4.22 (d, 1H ²J_{H-H} = 11.1 Hz,

H_{28}), 3.73 (d, 1H, $^3J_{H-H} = 11.0$ Hz, H_{28}), 3.39 (m, 2H, H_{37}), 3.05 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 7.2$ Hz, H_{38}), 2.52 (m, 1H, H_{34}), 2.32 (m, 1H, H_{35}), 1.97 (s, 3H, H_{32}), 1.94-0.74 (42H).

ESI-MS (+) ($C_{38}H_{62}N_2O_7S$, $M = 690.43$): 691.13 ($[M+H]^+$), 713.40 ($[M+Na]^+$).

Charakterisierung von 14b:

Ausbeute: 128.3 mg, 0.18 mmol, 74 %

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.01 (t, 1H, $^3J_{H-H} = 5.1$ Hz, CONH), 6.85 (s, 2H, NH_2), 4.68 (d, 1H, H_{29}), 4.55 (d, 1H, H_{29}), 4.34 (dd, 1H, $^3J_{H-H} = 11.3$ Hz + 4.6 Hz, H_3), 4.22 (d, 1H, $^2J_{H-H} = 11.1$ Hz, H_{28}), 3.73 (d, 1H, $^3J_{H-H} = 11.0$ Hz, H_{28}), 3.39 (m, 2H, H_{37}), 3.05 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 7.2$ Hz, H_{38}), 2.52 (m, 1H, H_{34}), 2.32 (m, 1H, H_{35}), 1.97 (s, 3H, H_{32}), 1.1 (m, 3H, H_{34}), 1.94-0.74 (42H).

ESI-MS (+) ($C_{39}H_{64}N_2O_7S$, $M = 704.44$): 705.13 (17, $[M+H]^+$), 727.40 (100, $[M+Na]^+$)

6.2.3 Acetazolamid basierte Konjugate

6.2.3.1 5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (15)

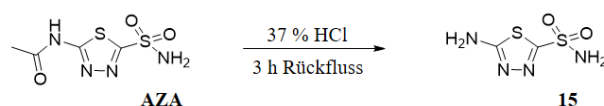


Abbildung 92. Synthese von 5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (15).

Generelle Durchführung: Acetazolamid (3g, 13.5 mmol) wurde in 37 % HCl (20 mL) gelöst und für 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit einer konz. NaOH-Lösung auf pH = 7 gebracht. Nach Zugabe von NaCl wurde die wässrige Phase dreimal mit THF extrahiert und die vereinigte organische Phase unter verminderten Druck eingengt.

Charakterisierung von 15:

Ausbeute: 1,4g, 7,8 mmol, 57.6 %

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.03 (s, 2H, NH_2), 7.78 (s, 2H, NH_2).

ESI-MS (-) ($C_2H_4N_4O_2S_2$, $M = 179.98$): 178.9 ($[M-H]^-$).

6.2.3.2 5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid-hemisuccinat (16)

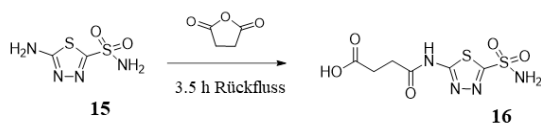


Abbildung 93. Synthese von 5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid-hemisuccinat (16).

Generelle Durchführung: 15 (300 mg; 1.6 mmol) wurden in Acetonitril (10 mL) gelöst und Bernsteinsäureanhydrid (170 mg; 1.6 mmol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 3.5 h unter Rückfluss gekocht und weitere 12 h bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet.

Charakterisierung von 16:

Ausbeute: 328mg, 1.17mmol, 73.2%

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.28 (s, 2H, NH_2), 2.9 (s, H, NH), 2.74 (m, 2H, H_5), 2.58 (m, 2H, H_4).

ESI-MS (+) ($C_6H_8N_4O_5S_2$, $M = 279.98$): 289.9 ($[M+H]^+$).

6.2.3.3 5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid -hemisuccinat-aminodiethylenglycol (17)

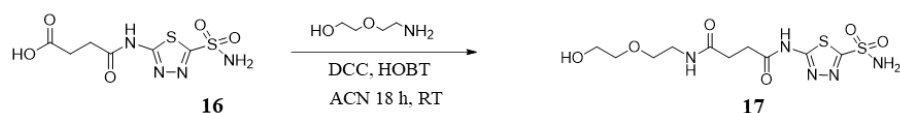


Abbildung 94. Synthese von 5-Amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid -hemisuccinat-aminodiethylenglycol (17).

Generelle Durchführung: **16** (200 mg; 0.7 mmol) wurden in Acetonitril (50 mL) gelöst und erwärmt. Anschließend wurden DIPEA, DCC und HOBT zur Reaktion gegeben und für 10 min bei RT gerührt. Das aktivierte Carbonsäurederivat wurde anschließend zu einer Lösung aus 10 mL Acetonitril mit Diglycolamin (70 µL; 73.6 mg; 0.7 mmol) tropfenweise hinzugegeben und für 18 h bei RT gerührt. Das entstandene DCU wurde abfiltriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol (10:1.5).

Charakterisierung von 17:

Ausbeute: 71.5 mg, 0.19 mmol, 28 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 8.28 (s, 2H, NH_2), 4.54 (s, H, OH), 3.47 (dd, 2H, H_8), 3.38 (m, 4H, $H_9 + H_{10}$), 3.15 (m, 4H, $H_4 + H_5$), 2.71 (m, 2H, H_7).

6.2.3.4 3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (18)

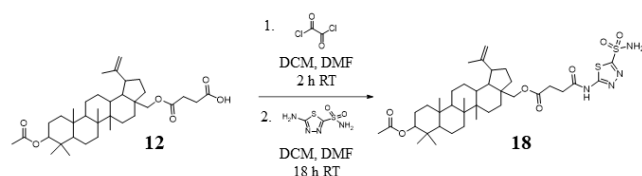


Abbildung 95. Synthese von 3-O-Acetylbetuliny-28-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (18).

Generelle Durchführung: **12** (160 mg; 0.27 mmol) wurden in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst, Oxalylchlorid (85 µL; 63 mg; 0.5 mmol) und katalytische Mengen DMF zu der Reaktion hinzugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde über eine Brücke bei 50 °C abgezogen und das entstandene Säurechlorid erneut in 15 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen. **15** (97.2 mg; 0.5 mmol) wurde in 2 mL DMF gelöst, zu dem gelösten Säurechlorid hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und mehrfach mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Hilfe von Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel erneut entfernt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol (2.5:1) gereinigt werden.

Charakterisierung von 18:

Ausbeute: 49.8 mg, 0.067 mmol, 13 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 8.28 (s, 2H, NH_2), 5.71 (s, H, NH), 4.67 (d, 1H, H_{29}), 4.50 (d, 1H, H_{29}), 4.36 (dd, 1H, H_3), 4.19 (d, 1H, H_{28}), 3.74 (d, 1H, H_{28}), 2.82 (m, 2H, H_{34}), 2.67 (m, 2H, H_{35}), 1.97 (s, 3H, H_{32}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$, $M = 746.4$): 745.4 ($[\text{M-H}]^-$).

6.2.3.5 3-O-Acetylbetulinsäure- aminodiethylenglycol-amid (19)

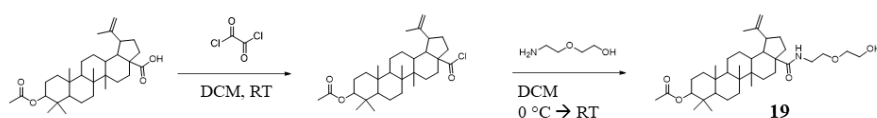


Abbildung 96. Synthese von 3-O-Acetylbetulinsäure- aminodiethylenglycol-amid (19).

Generelle Durchführung: Acetylbetulinsäure (1g; 2 mmol) wurde in 20 mL trockenem DCM gelöst, Oxalylchlorid (470 μ L; 317.3 mg; 2.5 mmol) zu der Reaktion hinzugegeben und für 15 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde über eine Brücke bei 50 °C abgezogen und das entstandene Säurechlorid erneut in 15 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen. In einem zweiten Kolben wurde in 10 mL trockenem Dichlormethan Diglycolamin (278 μ L; 262.8 mg; 2.5 mmol) und Triethylamin (184 μ L; 252.5 mg; 2.5 mmol) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Das Säurechlorid wurde anschließend langsam zu dem vorgelegten Diglycolamin hinzutropft und für 2 h bei 0°C gerührt. Nach Beenden der 2 h wurde das Eis entfernt und die Reaktion für weitere 3.5 h bei RT gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Waschen mit NaCl-Lösung und Wasser und anschließendem trocknen der organischen Phase mit Na_2SO_4 . Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das Gemisch säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol (100:1) gereinigt werden.

Charakterisierung von 19:

Ausbeute: 980 mg, 1.67 mmol, 83.7 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 6.02 (t, 1H, NH), 4.72 (d, 1H, H_{29}), 4.58 (d, 1H, H_{29}), 4.45 (dd, 1H, H_3), 3.72 (d, 2H, H_{34}), 3.55 (d, 4H, $H_{35} + H_{36}$), 3.39 (dd, H, H_{33}), 3.09 (dd, H_{33}), 2.42 (m, 1H, H_{19}), 2.02 (m, 3H, H_{32}), 1.94-0.74 (42H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{NO}_5$, $M = 585.4$): 584.5 ($[\text{M-H}]^-$); 620.5 ($[\text{M+Cl}]^-$)

6.2.3.6 3-O-Acetylbetulinsäure- (aminodiethylenglycol-amid)-hemisuccinat (20)

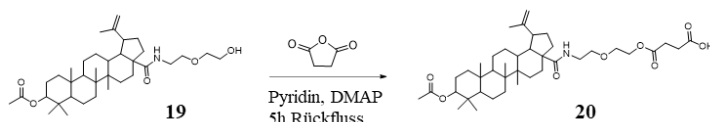


Abbildung 97. Synthese von 3-O-Acetylbetulinsäure- (aminodiethylenglycol-amid)-hemisuccinat (20).

Generelle Durchführung: 19 (500 mg; 0.85 mmol) wurde in trockenem Pyridin gelöst, DMAP (katalytische Menge) und Bernsteinsäureanhydrid (430 mg; 4.3 mmol) hinzugegeben und für 3.5 h unter Rückfluss gekocht. Die Aufarbeitung erfolgte durch Quenschen mit Wasser und einer anschließenden Extraktion der wässrigen Phase mit Essigsäureethylester. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit lauwarmen Wasser gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung mit Dichlormethan/Methanol (10:0.5).

Charakterisierung von 20:

Ausbeute: 437 mg, 0.64 mmol, 75 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 6.02 (t, 1H, NH), 4.73 (d, 1H, H_{29}), 4.59 (d, 1H, H_{29}), 4.45 (dd, 1H, H_3), 3.64 (d, 4H, $H_{35} + H_{36}$), 3.51 (d, 2H, H_{34}), 3.43 (dd, H, H_{33}), 3.12 (dd, H, H_{33}), 2.66 (m, 4H, $H_{38} + H_{39}$), 2.40 (m, 1H, H_{19}), 2.03 (m, 3H, H_{32}), 1.94-0.74 (42H).

ESI-MS (-) ($\text{C}_{40}\text{H}_{63}\text{NO}_8$, $M = 685.6$): 684.6 ($[\text{M-H}]^-$).

6.2.3.7 Acetylbetulinsäure- (aminodiethylenglycol-amid)-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (21)

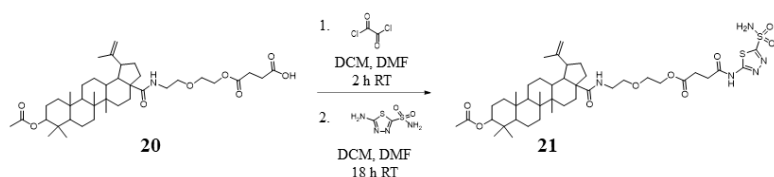


Abbildung 98. Synthese von Acetylbetulinsäure- (aminodiethylenglycol-amid)-hemisuccinat-5-amino-1,3,4-thiadiazol-2-sulfonamid (21).

Generelle Durchführung: **20** (250 mg; 0.36 mmol) wurden in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst, Oxalylchlorid (50 μ L; 74 mg; 0.6 mmol) zu der Reaktion hinzugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde über eine Brücke bei 50 °C abgezogen und das entstandene Säurechlorid erneut in 10 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen. **15** (97.2 mg; 0.5 mmol), gelöst in 2 mL DMF, wurde zu dem gelösten Säurechlorid hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und mehrfach mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Hilfe von Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel erneut entfernt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol (20:1).

Charakterisierung von **21**:

Ausbeute: 123 mg, 0.145 mmol, 40.3 %

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7.53 (s, 1H, NH₍₁₎), 7.40 (s, 1H, NH₍₂₎), 4.63 (d, 1H, H₂₉), 4.50 (d, 1H, H₂₉), 4.35 (dd, 1H, H₃), 4.04 (d, 2H, H₃₄), 3.51 (d, 2H, H₃₆), 3.37 (d, 2H, H₃₅), 3.43 (dd, H, H₃₃), 3.12 (dd, H, H₃₃), 2.66 (m, 2H, H₃₈), 2.48 (m, 2H, H₃₉), 2.03 (m, 3H, H₃₂), 1.94-0.74 (42H).

6.2.4 Saccharin-Derivate ohne Betulin

6.2.4.1 2-[2-(3-Methoxyphenyl)-2-oxoethyl]-1,2-benzothiazol-3 (2H)-on-1,1-dioxid (22)

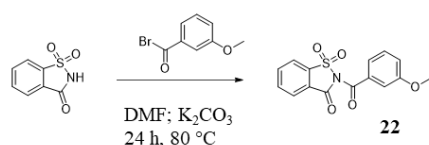


Abbildung 99. Synthese von 2-[2-(3-Methoxyphenyl)-2-oxoethyl]-1,2-benzothiazol-3 (2H)-on-1,1-dioxid (22).

Generelle Durchführung: Saccharin (350, mg, 1.9 mmol) wurden in trockenem DMF gelöst und vorsichtig Kaliumcarbonat (290 mg, 2 mmol) hinzugegeben. Nach 5 min erfolgte anschließend die Zugabe von 2-Bromo-3'-methoxyacetophenon (480 mg, 2.1 mmol). Das Gemisch wurde für 72 Stunden auf 80 °C erhitzt und nach Beenden der Reaktion in Essigester aufgenommen, mehrmals mit Wasser gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3).

Charakterisierung von **22**:

Ausbeute: 178.3 mg, 0.26 mmol, 74 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.05 - 7.94 (m, 4H, H₂ - H₅), 7.7 - 7.14 (m, 4H, H₁₀ - H₁₄), 3.85 (s, 3H, H₁₅).

6.2.4.2 2-(4-Methylbenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid (23)

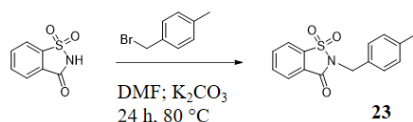


Abbildung 100. Synthese von 2-(4-Methylbenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid (23).

Generelle Durchführung: Saccharin (350, mg, 1.9 mmol) wurden in trockenem DMF gelöst und vorsichtig Kaliumcarbonat (290 mg, 2 mmol) hinzugegeben. Nach 5 min erfolgte anschließend die Zugabe von 4-Methylbenzylbromid (480 mg, 2.1 mmol). Das Gemisch wurde für 72 Stunden auf 80 °C erhitzt und nach Beenden der Reaktion in Essigester aufgenommen, mehrmals mit Wasser gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3).

Charakterisierung von 23:

Ausbeute: mg, mmol, %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.05 - 7.78 (m, 4H, H₂ - H₅), 7.27 (d, 2H, H₁₁ + H₁₃), 7.42 (d, 2H, H₁₀ + H₁₄), 4.87 (s, 2H, H₈), 4.64 (s, 3H, H₁₅).

ESI-MS (-) (C₁₅H₁₃NO₃S, M = 287.1): 286.0 ([M-H]⁻) ; 318.1 ([M+MeOH-H]⁻)

6.2.4.3 2-(4-Bromobenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid (24)

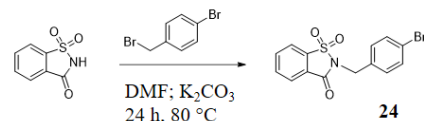


Abbildung 101. Synthese von 2-(4-Bromobenzyl)-1,2-benzothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid (24).

Generelle Durchführung: Saccharin (350, mg, 1.9 mmol) wurden in trockenem DMF gelöst und vorsichtig Kaliumcarbonat (290 mg, 2 mmol) hinzugegeben. Nach 5 min erfolgte anschließend die Zugabe von 4-Bromobenzylbromid (540 mg, 2.1 mmol). Das Gemisch wurde für 72 Stunden auf 80 °C erhitzt und nach Beenden der Reaktion in Essigester aufgenommen, mehrmals mit Wasser gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3).

Charakterisierung von 24:

Ausbeute: mg, mmol, %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.05 - 7.87 (m, 4H, H₂ - H₅), 7.47 (d, 2H, H₁₁ + H₁₃), 7.39 (d, 2H, H₁₀ + H₁₄), 4.85 (s, 2H, H₈).

ESI-MS (-) (C₁₄H₁₀BrNO₃S, M = 350.3): 349.3 ([M-H]⁻) ; 700.5 ([2M-H]⁻)

6.2.5 Saccharin-Derivate mit Betulin

6.2.5.1 Betuliny-28-propionat (25a) und Betuliny-di-3,28-propionat (25b)

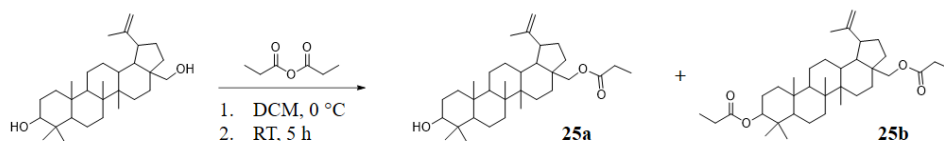


Abbildung 102. Synthese von Betuliny-28-propionat (**25a**) und Betuliny-di-3,28-propionat (**25b**).

Generelle Durchführung: Betulin (5g, 11.3 mmol) wurden zusammen mit DMAP und Triethylamin in trockenem DCM (50 mL) bei 0 °C suspendiert. Gleichzeitig wurde Propionsäureanhydrid (1.8 g, 1.8 mL, 13.8 mmol) in trockenem DCM (10 mL) gelöst und langsam über einen Tropftrichter hinzugegeben. Das Eis wurde entfernt und die Reaktion für weitere 5 Stunden bei RT gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde die organische Phase zuerst mit K_2CO_3 und dann mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3).

Charakterisierung von 25a:

Ausbeute: 732 mg, 1,46 mmol, 13 %

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 4.69 (d, 1H, H_{29}), 4.55 (d, 1H, H_{29}), 4.26 (d, 1H, $^2J_{H-H} = 11.0$ Hz, H_{28}), 3.87 (d, 1H, H_{28}), 3.16 (dd, 1H, H_3), 2.44 (m, 1H, H_{19}), 2.34 (s, 2H, H_{32}), 2.34 (m, 3H, H_{33}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (+) ($C_{33}H_{54}O_3$, $M = 498.4$): 481.4 ($[M-H_2O+H]^+$) ; 537.4 ($[M+K]^+$) ; 1019.8 ($[2M+Na]^+$)

Charakterisierung von 25b:

Ausbeute: 2.86 g, 5.15 mmol, 46 %

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 4.69 (d, 1H, H_{29}), 4.55 (d, 1H, H_{29}), 4.46 (dd, 1H, H_3), 4.26 (d, 1H, $^2J_{H-H} = 11.0$ Hz, H_{28}), 3.83 (dd, 1H, H_{28}), 2.4 (m, 1H, H_{19}), 2.34 (s, 4H, $H_{32} + H_{34}$), 2.34 (m, 6H, $H_{33} + H_{36}$), 1.90-0.79 (42H).

6.2.5.2 Betuliny-3-chloracetat-28-propionat (26)

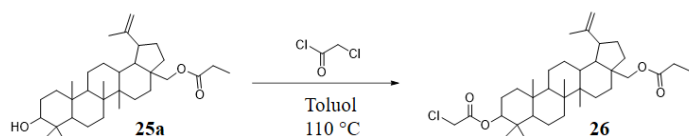


Abbildung 103. Synthese von Betuliny-3-chloracetat-28-propionat (**26**).

Generelle Durchführung: **25a** (400 mg, 0.8 mmol) wurde in vorgetrocknetem Toluol (5 mL) gelöst und langsam Chloressigsäurechlorid (128.3 μ L, 90.35 mg, 1.6 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h unter ständigem Rühren auf 90 °C erwärmt. Nach Beenden der Reaktion wurde Essigsäureethylester zu dem Gemisch gegeben und dieses mit K_2CO_3 und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das organische Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (8:2) aufgereinigt.

Charakterisierung von 26:

Ausbeute: 461 mg, 0.8 mmol, 100 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.69 (d, 1H, H_{29}), 4.59 (d, 1H, H_{29}), 4.53 (dd, 1H, H_3), 4.26 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz H_{28}), 4.04 (m, 2H, H_{32}), 3.84 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9$ Hz, H_{28}), 2.45 (m, 5H, H_{19}), 2.33 (m, 2H, H_{34}), 1.15 (m, 3H, H_{35}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{ClO}_4$, $M = 574.4$): 629 ($[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$); 1172.0 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$)

6.2.5.3 Betulinyl-di-(3,28)-chloracetat (27)

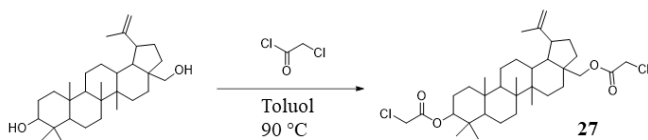


Abbildung 104. Synthese von Betulinyl-di-3,28-chloracetat (27).

Generelle Durchführung: Betulin (1g, 2.25 mmol) wurde gelöst in vorgetrocknetem Toluol (20 mL) und langsam Chloressigsäurechlorid (725 μL , 510.4 mg, 4.5 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h unter ständigem Rühren auf 90 °C erwärmt. Nach Beenden der Reaktion wurde Essigsäureethylester zu dem Gemisch gegeben und dieses mit K_2CO_3 und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das organische Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (8:2) aufgereinigt.

Charakterisierung von 27:

Ausbeute: 1.1 mg, 1.84 mmol, 82 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 4.68 (d, 1H, H_{29}), 4.58 (d, 1H, H_{29}), 4.48 (dd, 1H, H_3), 4.28 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz H_{28}), 4.04 (m, 2H, $H_{32} + H_{34}$), 3.84 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9$ Hz, H_{28}), 2.45 (m, 5H, H_{19}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (+) ($\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{O}_4$, $M = 594.1$): 596.1 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$); 649.5 ($[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+$).

6.2.5.4 Betulinyl-3-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat (28)

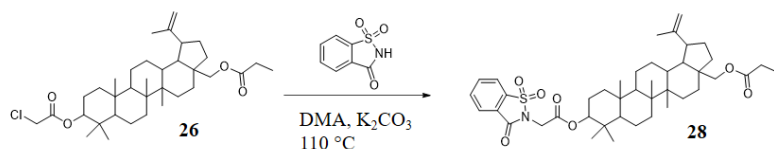


Abbildung 105. Synthese von Betulinyl-3-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat (28).

Generelle Durchführung: Saccharin (63, mg, 0.34 mmol) wurden in trockenem DMA (5 mL) gelöst und vorsichtig Kaliumcarbonat (46.9 mg, 0.34 mmol) hinzugegeben. Nach 5 min erfolgte anschließend die Zugabe von 26 (200 mg, 0.34 mmol). Das Gemisch wurde für 3 Stunden auf 110 °C erhitzt und nach Beenden der Reaktion in Essigester aufgenommen, mehrmals mit Wasser gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3).

Charakterisierung von 28:

Ausbeute: 127.5 mg, 0.18 mmol, 52 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.04 - 7.84 (m, 4H, $H_{38} - H_{41}$), 4.69 (d, 1H, H_{29}), 4.59 (d, 1H, H_{29}), 4.4 (m, 2H, H_{35}), 4.26 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ Hz, H_{28}), 4.08 (dd, 1H, $^3J_{\text{H-H}} = 11.2$ Hz + 4.6 Hz, H_3), 3.84 (d, 1H, $^2J_{\text{H-H}} = 10.9$ Hz, H_{28}), 2.45 (m, 5H, H_{19}), 2.33 (m, 2H, H_{32}), 1.90-0.79 (42H).

ESI-MS (+) ($C_{42}H_{59}NO_7S$, $M = 721.4$): 744.6 ($[M+Na]^+$); 776.5 ($[M+Na+MeOH]^+$); 1466.0 ($[2M+Na]^+$).

6.2.5.5 Betulinyldi-3,28-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat (29)

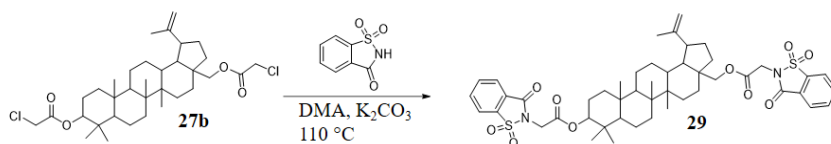


Abbildung 106. Synthese von Betulinyldi-3,28-acetyl-(1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxid)-28-propionat (29).

Generelle Durchführung: Saccharin (110 mg, 0.6 mmol) wurden in trockenem DMA (5 mL) gelöst und vorsichtig Kaliumcarbonat (60 mg, 0.45 mmol) hinzugegeben. Nach 5 min erfolgte anschließend die Zugabe von **27b** (180 mg, 0.3 mmol). Das Gemisch wurde für 3 h auf 110 °C erhitzt und nach Beenden der Reaktion in Essigester aufgenommen, mehrmals mit Wasser gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt säulenchromatographisch mit Petrolether/Essigester (7:3).

Charakterisierung von 29:

Ausbeute: 91 mg, 0.1 mmol, 17 %

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 8.04 - 7.84 (m, 8H, $H_{38} - H_{41} + H_{38} - H_{41}$), 4.66 (d, 1H, H_{29}), 4.56 (d, 1H, H_{29}), 4.46 (m, 2H, $H_{32} + H_{41}$), 4.46 (d, 1H, $^2J_{H-H} = 11.0$ Hz, H_{28}), 4.12 (dd, 1H, $^3J_{H-H} = 11.2$ Hz + 4.6 Hz, H_3), 3.97 (d, 1H, $^2J_{H-H} = 10.9$ Hz, H_{28}), 2.39 (m, 5H, H_{19}), 1.90-0.79 (42H)

ESI-MS (+) ($C_{48}H_{60}N_2O_{10}S_2$, $M = 888.4$): 911.4 ($[M+Na]^+$).

6.3 Zellkulturmethoden

6.3.1 Verwendete Zelllinien

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden die in Tabelle **Tabelle 12** aufgeführten humanen Zelllinien und die in Tabelle **Tabelle 13** aufgeführten *equinen* Primärzellkulturen zur Durchführung eines Vorscreenings der zu untersuchenden Substanzen verwendet.

6.3.1.1 Humane Zelllinien

Tabelle 12. Übersicht der verwendeten humanen Zelllinien mit der entsprechenden Bezeichnung, der zugehörigen Zellart und der Herkunft der Zellen.

Bezeichnung der Zelllinien	Zellart	Zur Verfügung gestellt von
A375	Melanom	Dr. Thomas Müller
A2780	Eierstockkarzinom	(Universitätsklinikum Halle-
MCF7	Mammakarzinom	Wittenberg, Klinik für Innere
NIH 3T3	Fibroblasten (<i>mouse</i>)	Medizin, Onkologie/Hämatologie)

6.3.1.2 Equine Primärzellkultur

Tabelle 13. Übersicht der verwendeten *equinen* Zelllinien mit der entsprechenden Bezeichnung, der zugehörigen Zellart und der Herkunft der Zellen.

Bezeichnung der Zelllinien	Zellart	Zur Verfügung gestellt von
MelDuWi	Melanom	Prof. Dr. Jessika-M.V. Cavalleri, Tierärztliche Hochschule Hannover
sRGO1	<i>Equines</i> Sarkoid	Dr. Lisa Weber, Tierärztliche Hochschule Hannover
sRGO2	<i>Equines</i> Sarkoid	
PriFri2	Primäre Fibroblasten	

6.3.2 Zellkultivierung

Die humanen Zelllinien und die Normalzelllinie NIH3T3 (*mouse*) (**Tabelle 12**) wurden in RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, 10 % FKS und 1x Penicillin und Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die primären *equine* Melanomzellen MelDuWi wurde in RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin, 10 % FKS und 1x Penicillin und Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sowohl die primären *equinen* Sarkoidzellen, als auch die *equinen* Fibroblasten wurden in DMEM *high* Glucose Medium mit L-Glutamin, 10 % FKS und 1x *Antibiotic/Antimycotic* bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Aufgrund der Größe der Zellen wurden die primären *equinen* Sarkoidzellen und die *equinen* Fibroblasten, anders als die humanen Zelllinien und die *equine* Melanomzellen, in 75 cm² Flaschen kultiviert.

6.3.3 Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei Erreichen einer Konfluenz von 80 %, je nach Zelllinie entspricht dies zwei bis drei Tagen. Bei den *equinen* Sarkoidzellen wurde eine Konfluenz von 80 % des Öfteren auch erst nach vier Tagen erreicht, sodass ein Umsetzen der Zellen erst nach vier Tagen möglich war. Das Passagieren erfolgte bei allen Zellarten auf die gleiche Weise. Nach Entfernen des alten Mediums wurden der Zellrasen mit 4 mL PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺ gewaschen. Nach Zugabe von 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellkulturflaschen kurz geschwenkt und die Zellen für etwa fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden jeweils 4 mL frisches Medium

zu den Zellen gegeben und diese durch mehrfaches Hoch - und Herunterpipettieren resuspendiert. Eine entsprechende Menge der Suspension wurde in eine neue 25 cm² Zellkulturflasche, gefüllt mit 5 mL frischem Medium, überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei Kultivierung in 75 cm² Zellkulturflaschen wurde sowohl zum Waschen der Zellen die doppelte Menge an PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺, als auch die doppelte Menge an Trypsin-EDTA-Lösung und Medium zum Abstoppen verwendet. Bei 75 cm² Zellkulturflaschen entsprach die Menge an neuem Medium 15 mL.

6.3.4 Einfrieren von Zellen

Freezing medium 70 % RPMI 1640/ DMEM Medium
 20 % FKS
 1x Penicillin und Streptomycin
 10 % DMSO

Zur Sicherung des Zellbestandes wurden alle Zellen kurz nach Beginn der Kultivierung (dies entspricht einer kleinen Passagierzahl) in flüssigem Stickstoff weggefroren und darin gelagert. Für das Einfrieren werden die Zellen, wie in Abschnitt 6.3.3 beschrieben, abgelöst und in frischen Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl werden 10 µL der Suspension entnommen, mit 10 µL Trypan Blau gemischt und mithilfe eines automatischen *Cellcounters* ausgezählt. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Suspension, welche zwischen 2-3 Mio. Zellen enthielt, in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 mL *freezing medium* aufgenommen und anschließend die Suspension in ein Kryoröhrchen überführt. Für die folgenden 15 Minuten wurden diese auf Eis gelagert, um ein Eindringen des Frostschutzmittels (DMSO) in die Zellen zu gewährleisten. Nach diesem ersten Schritt wurden die Zellen in einen -20 °C gelagerten *freezing container* überführt und für zwei Stunden bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte der dritte Einfrierschritt, bei welchem der *freezing container* für mindestens 24 Stunden bei -80 °C gelagert wird. Im letzten Schritt wurden die einzelnen Kryoröhrchen in speziellen Lagersystemen in flüssigen Stickstoff überführt.

6.4 Untersuchung der Zytotoxizität von Wirkstoffen

6.4.1 Sulforhodamin B-Assay

Das Ablösen der Zellen erfolgt wie im Abschnitt 6.3.3 beschrieben. Nach dem Resuspendieren der Zellen in frischem Medium wurden 10 µL Zellsuspension entnommen und mit 10 µL Trypan Blau gemischt. Die so angefärbten Zellen konnten anschließend im automatischen *Cellcounter* ausgezählt und die Vitalität der Zellen bestimmt werden. Die Volumina mit der entsprechenden Zellzahl für das Kultivieren der Zellen auf einer 96-well-plate (**Tabelle 14**) wurde mit frischem Medium auf 10 mL verdünnt und jeweils 100 µL pro well aufgetragen. Dabei wurde für die Bestimmung des Nullwertes in der obersten Reihe der 96-well-plate keine Zellen aufgetragen. Pro Platte wurde eine Zelllinie aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden.

Tabelle 14. Übersicht der eingesetzten Zellzahl pro *well* einer 96-well-plate in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie für eine Behandlungsdauer von 96 Stunden.

Zelllinie	Zellzahl pro <i>well</i>	Zelllinie	Zellzahl pro <i>well</i>
A375	750	MCF7	2000
A2780	2000	FaDu	3000
HT29	2000	SW1736	4000
sRGO1/2 & PriFri2	5000	MelDuWi	4000

Für die Behandlung der Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde zunächst eine Konzentrationsreihe der zu untersuchenden Wirkstoffe mit doppelter Konzentration in separaten Reaktionsgefäßen in frischem Medium angemischt. Je nach Wirkstoff lag der zu untersuchende Konzentrationsbereich zwischen 1 μM und 100 μM , sodass sechs verschiedene Konzentrationen pro 96-well-plate untersucht werden konnten. Pro *well* wurden 100 μL der doppelt konzentrierten Mediumlösung aufgetragen, wobei in der zweiten Reihe 100 μL pures Medium für die 100 % Kontrolle aufgetragen wurde. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 96 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 . Zum Abstoppen der Behandlung wurde das Medium entfernt und in jedes *well* 100 μL TCA (10 %) gegeben. Diese Fixierung erfolge mindestens für zwei Stunden bei 4 °C. Anschließend konnten die Platten am Plattenwäscher fünfmal mit destilliertem Wasser gewaschen und daraufhin die Zellen mit 100 μL pro *well* SRB-Lösung (0,4 %) für 40 Minuten bei RT angefärbt werden. Nach 40-minütiger Inkubation erfolgten ein fünfmaliger Waschschriff mit Essigsäure (1 %) am Plattenwäscher und ein anschließender Trocknungsschritt über Nacht. Das Auslesen der Platten erfolgte nach Lösen des Farbstoffes in je 100 μL Tris-Puffer am *plate reader* bei einer Wellenlänge von 570 nm. Für die Auswertung der Daten wurde der Nullwert (Messwert der Reihe ohne Zellen) von allen Messwerten abgezogen. Anschließend wurde die Zelldichte in Bezug zu den unbehandelten Zellen (100 % Kontrolle) genommen und mithilfe des Programmes GraphPad Prism 9 eine Dosis-Wirkungskurve modelliert. Dabei wurde die Funktion *dose-response-Inhibition: log(inhibitor) vs. response (variable slope)* verwendet. Pro Platte und Wirkstoff wurden mindestens 12 technische und 3 biologische Replikate angefertigt.

6.4.2 Zeitabhängiger Sulforhodamin B-Assay

Die Messung des zeitabhängigen Sulforhodamin B-Assay erfolgt wie in **6.4.1** beschrieben. Nach Auftragen der doppelt konzentrierten Lösungen wird im Unterscheid dazu schon nach einer Behandlungsdauer von 3, 6, 12 und 24 Stunden das Medium entfernt und durch 200 μL frisches Medium pro *well* ersetzt. Die Inkubation wurde danach bis 96 Stunden nach Start der Behandlung mit den Wirkstoffen fortgesetzt. Das Abstoppen, Waschen und Auslesen der Platten erfolgte wie schon im **Abschnitt 6.4.1** beschrieben.

6.4.3 MTT-Assay

Das Ablösen der Zellen erfolgt wie im **Abschnitt 6.3.3** beschrieben. Nach dem Resuspendieren der Zellen in frischem Medium wurden 10 μL Zellsuspension entnommen und mit 10 μL Trypan Blau gemischt. Die so angefärbten Zellen konnten anschließend im automatischen *Cellcounter* ausgezählt und die Vitalität der Zellen bestimmt werden. Die Volumina mit der entsprechenden Zellzahl für das Kultivieren der Zellen auf einer 96-well-plate (**Tabelle 14**) wurde mit frischem Medium auf 10 mL verdünnt und jeweils 100 μL pro *well* aufgetragen. Dabei wurde für die Bestimmung des Nullwertes in der obersten Reihe der 96-well-plate keine Zellen aufgetragen. Pro Platte wurde eine Zelllinie aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 für 24 Stunden. Für die Behandlung der Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde zunächst eine Konzentrationsreihe der zu untersuchenden Wirkstoffe mit doppelter Konzentration in separaten Reaktionsgefäßen mit Medium

angemischt. Je nach Wirkstoff lag der zu untersuchende Konzentrationsbereich zwischen 1 μM und 100 μM , wobei sechs verschiedene Konzentrationen pro 69-well-plate untersucht werden konnten. Pro well wurden 100 μL der doppelt konzentrierten Mediumlösung aufgetragen, wobei in der zweiten Reihe 100 μL pures Medium für die 100 % Kontrolle aufgetragen wurde. Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 96 Stunden bei 37 °C und 5 CO_2 . Vier Stunden vor Erreichen der Behandlungsdauer von 96 h wurden 20 μL der zuvor frisch angemischten MTT stock solution (5mg/mL in PBS w/o Ca^{2+} & Mg^{2+}) in jedes well gegeben. Die Inkubation wurde danach bis 96 Stunden nach Start der Behandlung mit den Wirkstoffen fortgesetzt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Medium entfernt und der entstandene blaue Farbstoff in 100 μL DMSO pro well gelöst. Anschließend erfolgte das Messen der Absorption am plate reader bei einer Wellenlänge von 570 nm. Für die Auswertung der Daten wurde der Nullwert (Messwert der Reihe ohne Zellen) von allen Messwerten abgezogen. Anschließend wurde die Zelldichte in Bezug zu den unbehandelten Zellen (100 % Kontrolle) genommen und mithilfe des Programmes GraphPad Prism eine Dosis-Wirkungskurve modelliert. Dabei wurde die Funktion *dose-response-Inhibition: log(inhibitor) vs. response (variable slope)* verwendet. Pro Platte und Wirkstoff wurden mindestens zwölf technische und drei biologische Replikate angefertigt.

6.5 Untersuchung der Zelltodmechanismen

6.5.1 AnnexinV-Assay

Durchführung:

Für die Durchführung des AnnexinV-Assay wurden an Tag eins für die equine Melanomzelllinie MelDuWi $7.5 \cdot 10^5$, für die humane Melanomzelllinie A375 $3 \cdot 10^5$ und sowohl für die Sarkoidzellen sRGO2, als auch für die equinen Fibroblasten PriFri2 $1 \cdot 10^6$ Zellen in 5 mL frischem Medium (25 cm^2 Zellkulturflasche) bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Für jede Substanz, jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt wurde eine Zellkulturflasche vorbereitet. An Tag zwei wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und durch 10 mL Medium, versetzt mit der doppelten IC_{50} -Konzentration der jeweiligen Substanz und Zelllinie, ersetzt (die entsprechenden IC_{50} -Werte sind in **Tabelle 6** dargestellt). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 für 24, 48 und 72 Stunden (für die Zelllinie MelDuWi) inkubiert und alle anschließenden Schritte für jeden Zeitpunkt wiederholt. Das Medium wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit 4 mL PBS w/o Ca^{2+} & Mg^{2+} gewaschen und der Puffer ebenfalls in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 mL Trypsin-EDTA erfolgte eine Inkubation von etwas fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 . Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurden diese in 4 mL Medium aufgenommen und in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Abgelösten Zellen wurden für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet, suspendiert in 1 mL PBS with Ca^{2+} & Mg^{2+} , wurde in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde ebenfalls entsorgt, das Pellet in 1 mL PBS with Ca^{2+} & Mg^{2+} resuspendiert und nochmals für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Vor dem Messen der Zellzahl am Durchflusszytometer wurde das Pellet erneut in 1 mL PBS with Ca^{2+} & Mg^{2+} aufgenommen und gleichmäßig suspendiert. Es wurde eine 1:10 Verdünnung mit PBS with Ca^{2+} & Mg^{2+} (50 μL Suspension + 450 μL PBS with Ca^{2+} & Mg^{2+}) hergestellt und nach dem Auszählen der Zellzahl diese auf die Gesamtmenge in 1 mL Suspension hochgerechnet. Bei Überschreiten einer Zellmenge von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL wurde die überschüssige Menge entnommen und der Rest erneut für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in AnnexinV-Bindepuffer aufgenommen und dabei eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingestellt. Je 100 μL der Kontrolle wurden in vier neue 1.5 mL Reaktionsgefäße gegeben, von den behandelten Zellen wurde jeweils nur ein 1.5 mL Reaktionsgefäß mit 100 μL Suspension vorbereitet. Eine Probe Kontrollzellen wurde mit 5 μL

AnnexinV-FITC, eine weitere mit 3 μL PI-Stammlösung (1 mg/ml PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+}) und eine dritte mit 5 μL AnnexinV-FITC und 3 μL PI-Stammlösung gemischt. Die vierte Probe Kontrollzellen ist die *unstained* Kontrolle. Zu allen behandelten Proben wurden 5 μL AnnexinV-FITC und 3 μL PI-Stammlösung gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation im Dunkeln bei RT wurde die Reaktion mit 400 μL AnnexinV-Bindepuffer verdünnt um ein Messvolumen von 500 μL zu erhalten. Im ersten Schritt wurde eine Kompensation der beiden verwendeten Farbstoffe durchgeführt. Dazu wurde zunächst die *unstained* Probe gemessen und dabei die Spannungen der Detektoren BL-1 und BL-3 so eingestellt, dass die Autofluoreszenzpeaks bei einer Intensität von 10^3 ihre Maxima haben. Daraufhin wurde die nur mit AnnexinV-FITC inkubierte Probe gemessen und das Gate für den Detektor BL-1 so verschoben, dass nur die positiven Signale (bei rund 10^6) enthalten sind. Das gleiche wurde mit der mit nur PI inkubierten Probe durchgeführt, wobei hier der Detektor BL-3 verwendet wurde. Anschließend wurden von allen Proben, welche sowohl AnnexinV-FITC und PI enthielten, drei Messungen durchgeführt. Während der Messung erfolgte eine Einteilung der Zellen in vier Populationen, welche für die spätere Auswertung verwendet wurden.

6.5.2 Caspase 3-Assay

CaspGLOW Fluorescein Active Caspase 3 Staining Kit:

FITC-DEVD-FMK: 1 μL der gelieferten Lösung

Z-VAD-FMK: Inhibitor als negativ Kontrolle

Durchführung:

Für die Durchführung des Caspase 3-Assays wurden an Tag eins für die *equine* Melanomzelllinie MelDuWi $7.5 \cdot 10^5$ und für die humane Melanomzelllinie A375 $3 \cdot 10^5$ in 5 mL frischem Medium (25 cm² Zellkulturflasche) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für jede Substanz, jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt wurde eine Zellkulturflasche vorbereitet. An Tag zwei wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und durch 10 mL Medium, versetzt mit der doppelten IC₅₀-Konzentration der jeweiligen Substanz und Zelllinie, ersetzt (die entsprechenden IC₅₀-Werte sind in **Tabelle 6** dargestellt). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24, 48 und 72 Stunden (für die Zelllinie MelDuWi) inkubiert und alle anschließenden Schritte für jeden Zeitpunkt wiederholt. Das Medium wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit 4 mL PBS w/o Ca^{2+} & Mg^{2+} gewaschen und der Puffer ebenfalls in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 mL Trypsin-EDTA erfolgte eine Inkubation von etwas fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurden diese in 4 mL Medium aufgenommen und in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Abgelösten Zellen wurden bei für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet, suspendiert in 1 mL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} , wurde in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde ebenfalls entsorgt, das Pellet in 1 mL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} resuspendiert und nochmals für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Vor dem Messen der Zellzahl am Durchflusszytometer wurde das Pellet erneut in 1 mL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} aufgenommen und gleichmäßig suspendiert. Es wurde eine 1:10 Verdünnung mit PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} (50 μL Suspension + 450 μL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+}) hergestellt und nach dem Auszählen der Zellzahl diese auf die Gesamtmenge in 1 mL Suspension hochgerechnet. Bei Überschreiten einer Zellmenge von $1.5 \cdot 10^6$ Zellen/mL wurde die überschüssige Menge entnommen und der Rest erneut für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 300 μL Medium (komplett) aufgenommen, zu jeder Probe 1 μL FITC-DEVD-FMK hinzugegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit je 1 mL Waschpuffer. Nach dem

Aufnehmen der Pellets in je 1 mL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität nach Anregung durch den BL1-Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488 \text{ nm}$. Dabei wird die Intensität des Lasers so eingestellt, dass der Peak der Kontrolle bei einer Fluoreszenzintensität von $2 \cdot 10^6$ sein Maximum hat. Nach dem Einstellen der Kontrolle wurden keine Änderungen mehr vorgenommen und alle Proben dreimal hintereinander gemessen.

6.5.3 TUNEL-Assay

APO-BRDU-Kit von Phoenix *Flow systems*

<i>DNA-Labeling Solution:</i>	10 μL	TdT Puffer (grün)
	0.75 μL	TdT Enzym (gelb)
	8 μL	Br-dUTP (violet)
	32.5 μL	destilliertes Wasser
<i>Antibody Solution:</i>	5 μL	Fluorescein-PRB-1 (orange)
	95 μL	<i>Rins-Buffer</i> (rot)

Durchführung:

Für die Durchführung des TUNEL-Assays wurden an Tag eins für die *equine* Melanomzelllinie MelDuWi $7.5 \cdot 10^5$ Zellen in 5 mL frischem Medium (25 cm² Zellkulturflasche) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für jede Substanz, jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt wurde eine Zellkulturflasche vorbereitet. An Tag zwei wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und durch 10 mL Medium, versetzt mit der doppelten IC₅₀-Konzentration der jeweiligen Substanz und Zelllinie, ersetzt (die entsprechenden IC₅₀-Werte sind in **Tabelle 6** dargestellt). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden, 48 und 72 Stunden inkubiert und alle anschließenden Schritte für jeden Zeitpunkt wiederholt. Das Medium wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit 4 mL PBS *w/o* Ca^{2+} & Mg^{2+} gewaschen und der Puffer ebenfalls in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 mL Trypsin-EDTA erfolgte eine Inkubation von etwas fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurden diese in 4 mL Medium aufgenommen und in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Abgelösten Zellen wurden für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet, suspendiert in 1 mL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} , wurde in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde ebenfalls entsorgt, das Pellet in 1 mL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} resuspendiert und nochmals für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Vor dem Messen der Zellzahl am Durchflusszytometer wurde das Pellet erneut in 1 mL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} aufgenommen und gleichmäßig suspendiert. Es wurde eine 1:10 Verdünnung mit PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} (50 μL Suspension + 450 μL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+}) hergestellt und nach dem Auszählen der Zellzahl diese auf die Gesamtmenge in 1 mL Suspension hochgerechnet. Bei Überschreiten einer Zellmenge von $1.5 \cdot 10^6$ Zellen/mL wurde die überschüssige Menge entnommen und der Rest erneut für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte der erste Fixierschritt mit 1 %iger *para*-Formaldehydlösung (gelöst in PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+}) für eine Stunde auf Eis. Nach vollständiger Fixierung wurde die Lösung für fünf Minuten bei 4 °C und 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in drei hintereinander folgenden Waschschritten mit jeweils 1 mL PBS *with* Ca^{2+} & Mg^{2+} gewaschen und ebenfalls für fünf Minuten bei 4 °C und 3000 rpm abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschriss wurde das Zellpellet in 1 mL Ethanol (-20 °C, 70 %) vorsichtig resuspendiert und für mindestens 12 Stunden bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für fünf

Minuten bei 4 °C und 4500 rpm abzentrifugiert und erneut jeweils zweimal mit 1 mL PBS *with* Ca²⁺ & Mg²⁺ gewaschen und ebenfalls für fünf Minuten bei 4 °C und 4500 rpm abzentrifugiert. Anschließend erfolgte das DNA-labeling. Hierfür wurden jeweils 50 µL der *DNA-Labeling Solution* zu jeder Probe gegeben und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach Beenden wurde 1 mL *Rins-Buffer* zu jeder Probe hinzugegeben und bei 4500 rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das entstandene Pellet wurde jeweils in 100 µL frisch hergestellter *Antibody Solution* aufgenommen und für weitere 30 min bei RT inkubiert. In einem letzten Schritt wurden 400 µL PI-RNase-Lösung zu den Proben gegeben und nach einer Inkubationszeit von 1,5 h im Kühlschrank, vermessen. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität von Fluorescein gegen die des Propidiumiodes aufgetragen und eine Einteilung der Zellen in vital und apoptotisch vorgenommen.

6.5.4 Zellzyklusanalyse

<i>PI-Staining Solution:</i>	15 µg PI	(15 µL; 1 mg/mL Stammlösung)
	100 µg RNase	(100 µL, 100 mg/mL in PBS <i>with</i> Ca ²⁺ & Mg ²⁺)
	PBS <i>with</i> Ca ²⁺ & Mg ²⁺	(885 µL)

Durchführung:

Für die Durchführung der Zellzyklusanalyse wurden an Tag eins für die *equine* Melanomzelllinie MelDuWi $7.5 \cdot 10^5$, für die humane Melanomzelllinie A375 $2.5 \cdot 10^5$ und sowohl für die Sarkoidzellen sRGO2, als auch für die *equinen* Normalzellen PriFri2 $1 \cdot 10^6$ Zellen in 5 mL Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für jede Substanz, jede Zelllinie und jeden Zeitpunkt wurde eine Zellkulturflasche vorbereitet. An Tag zwei wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und durch 10 mL Medium, versetzt mit der doppelten IC₅₀-Konzentration der jeweiligen Substanz und Zelllinie ersetzt (die entsprechenden IC₅₀-Werte sind in **Tabelle 6** dargestellt). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24, 48 und 72 Stunden (für die Zelllinie MelDuWi) inkubiert und alle anschließenden Schritte für jeden Zeitpunkt wiederholt. Das Medium wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit 4 mL PBS w/o Ca²⁺ & Mg²⁺ gewaschen und der Puffer ebenfalls in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 mL Trypsin-EDTA erfolgte eine Inkubation von etwas fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurden diese in 4 mL Medium aufgenommen und in das gleiche Zentrifugenröhrchen überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Abgelösten Zellen wurden für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet, suspendiert in 1 mL PBS *with* Ca²⁺ & Mg²⁺, wurde in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde ebenfalls entsorgt, das Pellet in 1 mL PBS *with* Ca²⁺ & Mg²⁺ resuspendiert und nochmals für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Vor dem Messen der Zellzahl am Durchflusszytometer wurde das Pellet erneut in 1 mL PBS *with* Ca²⁺ & Mg²⁺ aufgenommen und gleichmäßig suspendiert. Es wurde eine 1:10 Verdünnung mit PBS *with* Ca²⁺ & Mg²⁺ (50 µL Suspension + 450 µL PBS *with* Ca²⁺ & Mg²⁺) hergestellt und nach dem Auszählen der Zellzahl diese auf die Gesamtmenge in 1 mL Suspension hochgerechnet. Bei Überschreiten einer Zellmenge von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL wurde die überschüssige Menge entnommen und der Rest erneut für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden das Pellet in 600 µL Ethanol (- 20 °C, 70 %) resuspendiert und mind. vier Stunden bei 4 °C gelagert. Die fixierten Zellen wurden für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der anschließende Wasch- und Zentrifugierschritt mit 1 mL PBS *with* Ca²⁺ & Mg²⁺ diente zum Entfernen des restlichen Ethanols. Das Pellet wurde anschließend in *PI-Staining solution* aufgenommen, wobei eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingestellt wurde. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT im Dunkeln. Vor der Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen vorsichtig gemischt. Zunächst

wurden die Kontrollzellen am Durchflusszytometer gemessen, wobei die Spannung des BL2-A Detektors so eingestellt wurde, dass der G₁-Peak bei einer Fluoreszenzintensität von $2 \cdot 10^6$ sein Maximum hat. Die Messung wurde für jede Probe dreimal durchgeführt.

6.6 Enzymkinetische Untersuchung

6.6.1 Präparation der Carboanhydrase IX

Geliefert wurde die verwendete Carboanhydrase IX (Sino Biological) in 10 x 100 µg Portionen als Lyophilisat (aus sterilem PBS, pH = 7.4, 5 % Trehalose, 5 % Mannitol, 0,01 % Tween-80) und wurde nach Erhalten bei T = – 20 °C gelagert. Im ersten Schritt wurden 100 µg (Charge 1) auf Eis gelagert und in 200 µL sterilem Wasser aufgenommen. Nach 30 Minuten Quellen auf Eis wurden erneut 200 µL steriles Wasser zugegeben und durch langsames Auf- und Abpipettieren eine homogene Lösung hergestellt. Es wurden 50 µL Portionen in 1.5 mL Reaktionsgefäßen abgefüllt und in flüssigem Stickstoff bei – 196 °C weggefroren. Die Lagerung des gelösten Enzyms erfolgte bei – 80 °C. Vor Beginn jeder Messung wurde nur die benötigte Menge an CA IX aufgetaut und bei 4 °C und 15.000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert. Nach Überführen des Enzyms in ein neues 1.5 mL Reaktionsgefäß erfolgte die Konzentrationsbestimmung am NanoDrop. Anschließend wurde die Enzymlösung mit Tris-Puffer (pH = 7.5) auf eine Konzentration von 3 µM eingestellt, sodass bei jeder Messung Volumen und Konzentration des eingesetzten Enzyms gleich sind.

6.6.2 Messung der Enzyminhibierung in der Quarzküvette

Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette mit einem Arbeitsvolumen von 100 µL. Vor Beginn eines Messtages wurden alle Lösungen frisch präpariert.

Tabelle 15: Auflistung der Reaktionskomponenten, welche bei der kinetischen Betrachtung der Inhibierung der Carboanhydrase IX benötigt wurden. Das verwendete Arbeitsvolumen betrug 100 µL.

	Konz. der Stammlösung	Konz. in Reaktion	v im Reaktionsansatz
CA IX	3 µM	300 nM	10 µL
pNPA (Substrat)	25 mM - 125 mM	0.5 mM - 2.5 mM	2 µL
Acetonitril	100%	+ 2 %	3.4 µL (Endkonzentration bei der Messung: 6 %)
Inhibitor	1.25 µM - 200 µM	25 nM - 4 µM	2 µL
Tris-Puffer			84 µL

6.6.2.1 Kalibrierung des Produktes

Die Kalibrierung von *para*-Nitrophenol (Produkt) wurde in einer Doppelbestimmung in dem verwendeten Messpuffer (Tris-Puffer + 6 % ACN, Tris-Puffer + 4 % ACN und PBS-Puffer + 4 % ACN) durchgeführt. Dafür wurden Konzentrationen in einem Bereich von 12.5 µM - 200 µM hergestellt und jeweils 100 µL dieser Lösung bei 20 °C und $\lambda = 405$ nm in einer Doppelbestimmung vermessen. Anschließend wird die Absorption gegen die Konzentrationen von *para*-Nitrophenol aufgetragen und der Anstieg ermittelt. Dieser wurde für die Berechnung der Aktivität des Enzyms und die daraus folgende Inhibierung benötigt.

6.6.2.2 Aktivitätsmessung

Die Aktivitätsmessung erfolgte bei einer Enzymkonzentration von 600 nM, einer Temperatur von $T = 20\text{ °C}$ und einer Wellenlänge von $\lambda = 405\text{ nm}$. Für die Messung der Enzymaktivität wurden 89 μL Tris-Puffer und 10 μL Enzym (6 μM) in ein 1.5 mL Reaktionsgefäße gegeben, für drei Minuten bei 20 °C inkubiert und anschließend 1 μL einer 100 mM Substratlösung direkt vor der Messung hinzugegeben (Konzentration in Reaktion = 1 mM; 1 % Acetonitril in Reaktion). Nach dreimaligen Auf- und Abpipettieren wurde die Reaktionslösung in die Quartküvette überführt und für 180 Sekunden in einem Intervall von 3 s gemessen. Für die Untersuchung des Messpuffers wurde Anstelle von Tris-Puffer mit $\text{pH} = 7.5$, PBS-Puffer $\text{pH} = 7.4$ verwendet.

6.6.2.3 Messung der Inhibierung der Carboanhydrase IX

Es erfolgte die kinetische Messung bei einer Temperatur von 20 °C und einer Wellenlänge von $\lambda = 405\text{ nm}$. Im ersten Schritt erfolgte die Messung der Autohydrolyse des Substrates im Messpuffer. Dafür wurden 98 μL Tris-Puffer, versetzt mit 4 % ACN, in ein 1.5 mL Reaktionsgefäße gegeben und 2 μL der entsprechenden Substratlösung direkt vor der Messung hinzugegeben. Nach 3maligen Auf- und Abpipettieren wurde die Reaktionslösung in die Quartküvette überführt und für 210 s in einem Intervall von 3 s gemessen. Dies wurde mit allen Substratkonzentrationen als Zweifachbestimmung durchgeführt. Anschließend erfolgte die Messung der v-s-Charakteristik ohne Inhibitor. Hierfür wurden 94 μL Tris-Puffer, 4 μL ACN und 10 μL Enzym in ein 1.5 mL Reaktionsgefäße gegeben, für drei Minuten bei 20 °C inkubiert und anschließend 2 μL der entsprechenden Substratlösung direkt vor der Messung hinzugegeben. Nach 3maligen Auf- und Abpipettieren wurde die Reaktionslösung in die Quartküvette überführt und für 210 Sekunden in einem Intervall von 3 s gemessen. Dies wurde ebenfalls mit allen Substratkonzentrationen als Zweifachbestimmung durchgeführt. Im letzten Schritt erfolgte die Messung der v-s-Charakteristik mit Inhibitor. Dazu wurden 84 μL Tris-Puffer zusammen mit 2 μL ACN, 2 μL des zu untersuchenden Inhibitors und 10 μL Enzym in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß gegeben und für drei Minuten bei 20 °C inkubiert und anschließend, wie schon bei den beiden vorherigen Schritten, 2 μL der entsprechenden Substratlösung direkt vor der Messung hinzugegeben. Nach 3maligen Auf- und Abpipettieren wurde die Reaktionslösung in die Quartküvette überführt und ebenfalls für 210 Sekunden in einem Intervall von 3 Sekunden gemessen. Dies wurde mit allen Substratkonzentrationen als Zweifachbestimmung durchgeführt. Bei allen drei Schritten wurden die Anstiege (Absorptionsänderung/Zeit) notiert und gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte Anschließend bei Excel und dem Programm GraphPad Prism mit Hilfe der Michaelis-Menten-Auftragung.

6.6.3 Anpassung des Systems an eine 96-well-plate

Bei einer zweiten Methode erfolgte die Messung der Enzyminhibierung im 96-*half area-well-plate* mit einem Arbeitsvolumen von 170 μL . Vor Beginn eines Messtages wurden auch bei dieser Methode alle Lösungen frisch präpariert.

Tabelle 6: Auflistung der Reaktionskomponenten, welche bei der kinetischen Betrachtung der Inhibierung der Carboanhydrase IX benötigt wurden. Das verwendete Arbeitsvolumen betrug 170 μL .

	Konz. der Stammlösung	Konz. in Reaktion	v im Reaktionsansatz
CA IX	5.1 μM	300 nM	10 μL
pNPA (Substrat)	25 mM - 125 mM	0,5 mM - 2,5 mM	3.4 μL
Acetonitril	100%	+ 2 %	3.4 μL (Endkonzentration bei der Messung: 6 %)
Inhibitor	1.25 μM - 200 μM	25 nM - 4 μM	3.4 μL
Tris-Puffer			149.2 μL

6.6.3.1 Kalibrierung des Produktes

Die Kalibrierung von *para*-Nitrophenol (Produkt) wurde in einer Doppelbestimmung in dem verwendeten Messpuffer (Tris-Puffer + 6 % ACN) durchgeführt. Dafür wurden Konzentrationen in einem Bereich von 12,5 mM - 200 mM hergestellt und jeweils 170 μL dieser Lösung bei 20 °C und $\lambda = 405 \text{ nm}$ in einer Doppelbestimmung vermessen. Anschließend wird die Absorption gegen die Konzentrationen von *para*-Nitrophenol aufgetragen und der Anstieg ermittelt. Dieser wurde für die Berechnung der Aktivität des Enzyms und die daraus folgende Inhibierung benötigt.

6.6.3.2 Aktivitätsmessung

Die Aktivitätsmessung erfolgte bei einer Temperatur von 20 °C und einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$. Für die Messung der Enzymaktivität wurden 158.3 μL Tris-Puffer und 10 μL Enzym in ein *well* einer 96-*half area-well-plate* gegeben, für drei Minuten bei 20 °C inkubiert und anschließend 1.7 μL einer 100 mM Substratlösung direkt vor der Messung hinzugegeben (Konzentration in Reaktion = 1 mM). Die Messung erfolgte für 10 min in einem Messintervall von 6 s, die Aktivitätsmessung als Zweifachbestimmung durchgeführt wurde.

6.6.3.3 Messung der Inhibierung der Carboanhydrase IX

Anschließend erfolgte die Messung der v-s-Charakteristik ohne Inhibitor. Hierfür wurden 149.8 μL Tris-Puffer, 6.8 μL ACN und 10 μL Enzym (3 μM) in je ein *well* einer 96-*half area-well-plate* gegeben, für drei Minuten bei 20 °C inkubiert und anschließend 3.4 μL der entsprechenden Substratlösung mit Hilfe einer 8-Kanalpipette direkt vor der Messung hinzugegeben. Im letzten Schritt erfolgte die Messung der v-s-Charakteristik mit Inhibitor. Dazu wurden 149.8 μL Tris-Puffer zusammen mit 3.4 μL ACN, 3.4 μL des zu untersuchenden Inhibitors und 10 μL Enzym in je ein *well* einer 96-*half area-well-plate* gegeben, für drei Minuten bei 20 °C inkubiert und anschließend, wie schon bei den beiden vorherigen Schritten, 3.4 μL der entsprechenden Substratlösung mittels einer 8-Kanalpipette direkt vor der Messung hinzugegeben. Je Durchgang wurden auch in diesem Schritt 5 Proben gleichzeitig präpariert und für 10 min in einem Messintervall von 6 s, ebenfalls als Zweifachbestimmung, gemessen. Bei allen drei Schritten wurden die Anstiege (Absorptionsänderung/Zeit) notiert und gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte Anschließend bei Excel und mit dem Programm GraphPad Prism mit Hilfe der Michaelis-Menten-Auftragung.

7. Literaturverzeichnis

1. Drag-Zalesinska, M.; Kulbacka, J.; Saczko, J.; Wysocka, T.; Zabel, M.; Surowiak, P.; Drag, M., Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (16), 4814-4817.
2. Da Rocha, A. B.; Lopes, R. M.; Schwartzmann, G., Natural products in anticancer therapy. *Current opinion in pharmacology* **2001**, *1* (4), 364-369.
3. G Grothaus, P.; M Cragg, G.; J Newman, D., Plant natural products in anticancer drug discovery. *Current Organic Chemistry* **2010**, *14* (16), 1781-1791.
4. G Ravelo, A.; Estévez-Braun, A.; Chávez-Orellana, H.; Pérez-Sacau, E.; Mesa-Siverio, D., Recent studies on natural products as anticancer agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2004**, *4* (2), 241-265.
5. Gordaliza, M., Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology* **2007**, *9* (12), 767-776.
6. Germer, R., *Handbuch der Altägyptischen Heilpflanzen*. Otto Harrassowitz: 2008.
7. Eis, G., Handschriftenstudien zur medizinischen Literatur des Spätmittelalters. *Sudhoffs Archiv für Geschichte der Medizin und der Naturwissenschaften* **1954**, (H. 3), 233-266.
8. Gershenzon, J.; Dudareva, N., The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology* **2007**, *3* (7), 408-414.
9. Oloyede, H.; Ajiboye, H.; Salawu, M.; Ajiboye, T., Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. *Microbial pathogenesis* **2017**, *111*, 338-344.
10. Pavlova, N.; Savinova, O.; Nikolaeva, S.; Boreko, E.; Flekhter, O., Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. *Fitoterapia* **2003**, *74* (5), 489-492.
11. Baltina, L.; Flekhter, O.; Nigmatullina, L.; Boreko, E.; Pavlova, N.; Nikolaeva, S.; Savinova, O.; Tolstikov, G., Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13* (20), 3549-3552.
12. Zdzińska, B.; Rzeski, W.; Paduch, R.; Szuster-Ciesielska, A.; Kaczor, J.; Wejksza, K.; Kandefer-Szerszeń, M., Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Polish journal of pharmacology* **2003**, *55* (2), 235-238.
13. Takada, Y.; Aggarwal, B. B., Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. *The Journal of Immunology* **2003**, *171* (6), 3278-3286.
14. Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H., Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *Journal of medicinal chemistry* **1996**, *39* (5), 1016-1017.
15. Ren, W.; Qin, L.; Xu, Y.; Cheng, N., Inhibition of betulinic acid to growth and angiogenesis of human colorectal cancer cell in nude mice. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology* **2010**, *9* (3), 153-157.

16. Dehelean, C. A.; Feflea, S.; Ganta, S.; Amiji, M., Anti-angiogenic effects of betulinic acid administered in nanoemulsion formulation using chorioallantoic membrane assay. *Journal of biomedical nanotechnology* **2011**, 7 (2), 317-324.
17. Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T., On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **2004**, 65 (3), 261-291.
18. Brandes, B.; Koch, L.; Hoenke, S.; Deigner, H.-P.; Csuk, R., The presence of a cationic center is not alone decisive for the cytotoxicity of triterpene carboxylic acid amides. *Steroids* **2020**, 163, 108713.
19. Friedrich, S.; Serbian, I.; Hoenke, S.; Wolfram, R. K.; Csuk, R., Synthesis and cytotoxic evaluation of malachite green derived oleanolic and ursolic acid piperazineamides. *Medicinal Chemistry Research* **2020**, 29 (5), 926-933.
20. Heller, L.; Knorrscheidt, A.; Flemming, F.; Wiemann, J.; Sommerwerk, S.; Pavel, I. Z.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R., Synthesis and proapoptotic activity of oleanolic acid derived amides. *Bioorganic chemistry* **2016**, 68, 137-151.
21. Sommerwerk, S.; Csuk, R., Convenient and chromatography-free partial syntheses of maslinic acid and augustic acid. *Tetrahedron Letters* **2014**, 55 (37), 5156-5158.
22. Allouche, Y.; Warleta, F.; Campos, M.; Sánchez-Quesada, C.; Uceda, M.; Beltrán, G.; Gaforio, J. J., Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59 (1), 121-130.
23. Liu, J.; Sun, H.; Duan, W.; Mu, D.; Zhang, L., Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. *Biol Pharm Bull* **2007**, 30 (11), 2075-8.
24. Mullauer, F. B.; Kessler, J. H.; Medema, J. P., Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. *Anti-cancer drugs* **2010**, 21 (3), 215-227.
25. Fulda, S.; Kroemer, G., Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug Discovery Today* **2009**, 14 (17), 885-890.
26. Alakurtti, S.; Mäkelä, T.; Koskimies, S.; Yli-Kauhaluoma, J., Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European journal of pharmaceutical sciences* **2006**, 29 (1), 1-13.
27. 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., Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature medicine* **1995**, 1 (10), 1046-1051.
28. Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F., Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters* **2002**, 175 (1), 17-25.
29. Kommera, H.; Kaluđerović, G. N.; Kalbitz, J.; Paschke, R., Lupane triterpenoids—betulin and betulinic acid derivatives induce apoptosis in tumor cells. *Investigational new drugs* **2011**, 29 (2), 266-272.
30. Kommera, H.; Kaluđerović, G. N.; Dittrich, S.; Kalbitz, J.; Dräger, B.; Mueller, T.; Paschke, R., Carbamate derivatives of betulinic acid and betulin with selective cytotoxic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**, 20 (11), 3409-3412.

31. Kommera, H., Synthesis and in vitro antitumor activity of novel lupane type pentacyclic triterpenoids. **2010**.
32. 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., Betulinic acid shows anticancer activity against equine melanoma cells and permeates isolated equine skin in vitro. *BMC Veterinary Research* **2020**, *16* (1), 44.
33. Weber, L. A.; Funtan, A.; Paschke, R.; Delarocque, J.; Kalbitz, J.; Meißner, J.; Feige, K.; Kietzmann, M.; Cavalleri, J.-M. V., In vitro assessment of triterpenoids NVX-207 and betulinyl-bis-sulfamate as a topical treatment for equine skin cancer. *PLOS ONE* **2020**, *15* (11), e0241448.
34. Petrenko, M.; Güttler, A.; Funtan, A.; Keßler, J.; Emmerich, D.; Paschke, R.; Vordermark, D.; Bache, M., Combined 3-O-acetylbetulin treatment and carbonic anhydrase IX inhibition results in additive effects on human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* **2021**, *333*, 109326.
35. Willmann, M.; Wacheck, V.; Buckley, J.; Nagy, K.; Thalhammer, J.; Paschke, R.; Triche, T.; Jansen, B.; Selzer, E., Characterization of NVX-207, a novel betulinic acid-derived anti-cancer compound. *European Journal of Clinical Investigation* **2009**, *39* (5), 384-394.
36. Bache, M.; Bernhardt, S.; Passin, S.; Wichmann, H.; Hein, A.; Zschornak, M. P.; Kappler, M.; Taubert, H.; Paschke, R.; Vordermark, D., Betulinic Acid Derivatives NVX-207 and B10 for Treatment of Glioblastoma—An in Vitro Study of Cytotoxicity and Radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15* (11), 19777-19790.
37. Liebscher, G.; Vanchangiri, K.; Mueller, T.; Feige, K.; Cavalleri, J. M. V.; Paschke, R., In vitro anticancer activity of Betulinic acid and derivatives thereof on equine melanoma cell lines from grey horses and invivo safety assessment of the compound NVX-207 in two horses. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *246*, 20-29.
38. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *cell* **2000**, *100* (1), 57-70.
39. Voigt, W.; Dietrich, A.; Schmoll, H. J., Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. *Pharmazie in unserer Zeit* **2006**, *35* (2), 134-143.
40. Ruano, L.; Cárdenas, G.; Nogueira, J. J., The Permeation Mechanism of Cisplatin through a Dioleoylphosphocholine Bilayer. *Chemphyschem: a European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* **2021**.
41. Nepomuceno, J., Antioxidants in Cancer Treatment. 2011.
42. Emmerich, D.; Vanchanagiri, K.; Baratto, L. C.; Schmidt, H.; Paschke, R., Synthesis and studies of anticancer properties of lupane-type triterpenoid derivatives containing a cisplatin fragment. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *75*, 460-466.
43. Kischkel, F. C.; Lawrence, D. A.; Chuntharapai, A.; Schow, P.; Kim, K. J.; Ashkenazi, A., Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **2000**, *12* (6), 611-620.
44. Wang, J.; Chun, H. J.; Wong, W.; Spencer, D. M.; Lenardo, M. J., Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (24), 13884-13888.
45. Ferraro-Peyret, C.; Quemeneur, L.; Flacher, M.; Revillard, J.-P.; Genestier, L., Caspase-Independent Phosphatidylserine Exposure During Apoptosis of Primary T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* **2002**, *169* (9), 4805.

46. Ohsumi, Y., Historical landmarks of autophagy research. *Cell research* **2014**, 24 (1), 9-23.
47. Xie, Z.; Klionsky, D. J., Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology* **2007**, 9 (10), 1102-1109.
48. Mukhopadhyay, S.; Panda, P. K.; Sinha, N.; Das, D. N.; Bhutia, S. K., Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis* **2014**, 19 (4), 555-566.
49. Dunn Jr, W., Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *The Journal of cell biology* **1990**, 110 (6), 1935-1945.
50. Scott, R. C.; Juhász, G.; Neufeld, T. P., Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Current Biology* **2007**, 17 (1), 1-11.
51. Fulda, S.; Kroemer, G., Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug discovery today* **2009**, 14 (17-18), 885-890.
52. Fulda, S.; Scaffidi, C.; Susin, S. A.; Krammer, P. H.; Kroemer, G.; Peter, M. E.; Debatin, K.-M., Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (51), 33942-33948.
53. Ganguly, A.; Das, B.; Roy, A.; Sen, N.; Dasgupta, S. B.; Mukhopadhyay, S.; Majumder, H. K., Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer research* **2007**, 67 (24), 11848-11858.
54. Zeng, A.-Q.; Yu, Y.; Yao, Y.-Q.; Yang, F.-F.; Liao, M.; Song, L.-J.; Li, Y.-L.; Yu, Y.; Li, Y.-J.; Deng, Y.-L., Betulinic acid impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer models. *Oncotarget* **2018**, 9 (3), 3794.
55. Zeng, A.; Hua, H.; Liu, L.; Zhao, J., Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2019**, 27 (12), 2546-2552.
56. Mukherjee, R.; Jaggi, M.; Rajendran, P.; Siddiqui, M. J.; Srivastava, S. K.; Vardhan, A.; Burman, A. C., Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2004**, 14 (9), 2181-2184.
57. Kwon, H. J.; Shim, J. S.; Kim, J. H.; Cho, H. Y.; Yum, Y. N.; Kim, S. H.; Yu, J., Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Japanese journal of cancer research* **2002**, 93 (4), 417-425.
58. Tan, Y.; Yu, R.; Pezzuto, J. M., Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clinical Cancer Research* **2003**, 9 (7), 2866-2875.
59. Frost, S. C.; McKenna, R., *Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications*. Springer Science & Business Media: 2013; Vol. 75.
60. Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications. *Future medicinal chemistry* **2011**, 3 (9), 1165-1180.
61. Fisher, S. Z.; Maupin, C. M.; Budayova-Spano, M.; Govindasamy, L.; Tu, C.; Agbandje-McKenna, M.; Silverman, D. N.; Voth, G. A.; McKenna, R., Atomic crystal and molecular dynamics simulation structures of human carbonic anhydrase II: insights into the proton transfer mechanism. *Biochemistry* **2007**, 46 (11), 2930-2937.

62. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A., Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal research reviews* **2003**, 23 (2), 146-189.
63. Akıncioğlu, A.; Akbaba, Y.; Göçer, H.; Göksu, S.; Gülçin, İ.; Supuran, C. T., Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, 21 (6), 1379-1385.
64. Gülçin, İ.; Beydemir, Ş.; Büyükokuroğlu, M. E., In vitro and in vivo effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2004**, 27 (5), 613-616.
65. Hisar, O.; Beydemir, Ş.; Gülçin, İ.; Hisar, Ş. A.; Yanik, T.; Küfrevioğlu, Ö. İ., The effects of melatonin hormone on carbonic anhydrase enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes in vitro and in vivo. *Turkish journal of veterinary and animal sciences* **2005**, 29 (3), 841-845.
66. Schenk, S. Dissertation, Quantenchemische Untersuchung von Carboanhydrase-analogen Modellsystemen, 2006.
67. Nair, S. K.; Christianson, D. W., Unexpected pH-dependent conformation of His-64, the proton shuttle of carbonic anhydrase II. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113 (25), 9455-9458.
68. Kaur, I. P.; Smitha, R.; Aggarwal, D.; Kapil, M., Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 248 (1), 1-14.
69. Tritsch, M. F.; Pfeiffer, N., Erhöhte Schwellen für die Detektion von Phasenunterschieden in musterinduzierten Flimmerfarben bei Patienten mit Glaukom. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* **1994**, 205 (07), 27-32.
70. Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E., Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal* **2007**, 274 (6), 1393-1418.
71. Oosterwldk, E.; Ruiter, D.; Hoedemaeker, P. J.; Pauwels, E.; Jonas, U.; Zwartendijk, I.; Warnaar, S., Monoclonal antibody G 250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *International journal of cancer* **1986**, 38 (4), 489-494.
72. Liao, S. Y.; Brewer, C.; Závada, J.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Manetta, A.; Berman, M. L.; DiSaia, P. J.; Stanbridge, E. J., Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas. *The American journal of pathology* **1994**, 145 (3), 598.
73. Oosterwijk, E., Carbonic anhydrase IX: historical and future perspectives. *BJU international* **2008**, 101, 2-7.
74. Bayley, J.-P.; Devilee, P., The Warburg effect in 2012. *Current opinion in oncology* **2012**, 24 (1), 62-67.
75. Liberti, M. V.; Locasale, J. W., The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends in biochemical sciences* **2016**, 41 (3), 211-218.
76. Mucaj, V.; Shay, J. E. S.; Simon, M. C., Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism. *International Journal of Hematology* **2012**, 95 (5), 464-470.
77. De Simone, G.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2010**, 1804 (2), 404-409.

78. Hurt, J. D.; Tu, C.; Laipis, P. J.; Silverman, D. N., Catalytic properties of murine carbonic anhydrase IV. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272 (21), 13512-13518.
79. Sabri, K.; Levin, A. V., The Additive Effect of Topical Dorzolamide and Systemic Acetazolamide in Pediatric Glaucoma. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* **2006**, 10 (5), 464-468.
80. Supuran, C. T., Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2012**, 27 (6), 759-772.
81. Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G., Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chemical Reviews* **2012**, 112 (8), 4421-4468.
82. Nocentini, A.; Ceruso, M.; Carta, F.; Supuran, C. T., 7-Aryl-triazolyl-substituted sulfocoumarins are potent, selective inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrase IX and XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, 31 (6), 1226-1233.
83. Davis, R. A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A., Natural Product Polyamines That Inhibit Human Carbonic Anhydrases. *BioMed Research International* **2014**, 2014, 374079.
84. Carta, F.; Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C. T., Polyamines Inhibit Carbonic Anhydrases by Anchoring to the Zinc-Coordinated Water Molecule. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53 (15), 5511-5522.
85. Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: Interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, 18 (5), 1583-1587.
86. Santos, M. A.; Marques, S.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of cytosolic/tumor-associated isoforms I, II, and IX with iminodiacetic carboxylates/hydroxamates also incorporating benzenesulfonamide moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17 (6), 1538-1543.
87. Nocentini, A.; Carta, F.; Ceruso, M.; Bartolucci, G.; Supuran, C. T., Click-tailed coumarins with potent and selective inhibitory action against the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, 23 (21), 6955-6966.
88. Bozdag, M.; Alafeefy, A. M.; Altamimi, A. M.; Vullo, D.; Carta, F.; Supuran, C. T., Coumarins and other fused bicyclic heterocycles with selective tumor-associated carbonic anhydrase isoforms inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, 25 (2), 677-683.
89. Tars, K.; Vullo, D.; Kazaks, A.; Leitans, J.; Lends, A.; Grandane, A.; Zalubovskis, R.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T., Sulfocoumarins (1,2-Benzoxathiine-2,2-dioxides): A Class of Potent and Isoform-Selective Inhibitors of Tumor-Associated Carbonic Anhydrases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56 (1), 293-300.
90. D'Ambrosio, K.; Carradori, S.; Monti, S. M.; Buonanno, M.; Secci, D.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; De Simone, G., Out of the active site binding pocket for carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communications* **2015**, 51 (2), 302-305.
91. Capasso, C.; Supuran, C. T., Anti-infective carbonic anhydrase inhibitors: a patent and literature review. *Expert opinion on therapeutic patents* **2013**, 23 (6), 693-704.
92. Neri, D.; Supuran, C. T., Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature reviews Drug discovery* **2011**, 10 (10), 767-777.

93. Supuran, C. T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature reviews Drug discovery* **2008**, 7 (2), 168-181.
94. Supuran, C. T.; Scozzafava, A., Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2007**, 15 (13), 4336-4350.
95. Andreucci, E.; Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Laurenzana, A.; Carta, F.; Supuran, C. T.; Calorini, L., The carbonic anhydrase IX inhibitor SLC-0111 sensitises cancer cells to conventional chemotherapy. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2019**, 34 (1), 117-123.
96. Casini, A.; Scozzafava, A.; Mincione, F.; Menabuoni, L.; Ilies, M. A.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: water-soluble 4-sulfamoylphenylthioureas as topical intraocular pressure-lowering agents with long-lasting effects. *Journal of medicinal chemistry* **2000**, 43 (25), 4884-4892.
97. Di Fiore, A.; Pedone, C.; D'Ambrosio, K.; Scozzafava, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: valdecoxib binds to a different active site region of the human isoform II as compared to the structurally related cyclooxygenase II 'selective' inhibitor celecoxib. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2006**, 16 (2), 437-442.
98. Köhler, K.; Hillebrecht, A.; Schulze Wischeler, J.; Innocenti, A.; Heine, A.; Supuran, C. T.; Klebe, G., Saccharin inhibits carbonic anhydrases: possible explanation for its unpleasant metallic aftertaste. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46 (40), 7697-7699.
99. McDonald, P. C.; Chia, S.; Bedard, P. L.; Chu, Q.; Lyle, M.; Tang, L.; Singh, M.; Zhang, Z.; Supuran, C. T.; Renouf, D. J., A phase 1 study of SLC-0111, a novel inhibitor of carbonic anhydrase IX, in patients with advanced solid tumors. *American journal of clinical oncology* **2020**, 43 (7), 484.
100. Ruzzolini, J.; Laurenzana, A.; Andreucci, E.; Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Carta, F.; Supuran, C. T.; Romanelli, M. N.; Nediani, C.; Calorini, L., A potentiated cooperation of carbonic anhydrase IX and histone deacetylase inhibitors against cancer. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2020**, 35 (1), 391-397.
101. Scozzafava, A.; Menabuoni, L.; Mincione, F.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors. A general approach for the preparation of water-soluble sulfonamides incorporating polyamino-polycarboxylate tails and of their metal complexes possessing long-lasting, topical intraocular pressure-lowering properties. *Journal of medicinal chemistry* **2002**, 45 (7), 1466-1476.
102. Weber, A.; Casini, A.; Heine, A.; Kuhn, D.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Klebe, G., Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, 47 (3), 550-557.
103. Liljas, A.; Håkansson, K.; Jonsson, B. H.; Xue, Y., Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase: Recent crystallographic analyses. *European journal of biochemistry* **1994**, 219 (1-2), 1-10.
104. Cappalonga Bunn, A. M.; Alexander, R. S.; Christianson, D. W., Mapping protein-peptide affinity: binding of peptidylsulfonamide inhibitors to human carbonic anhydrase II. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116 (12), 5063-5068.
105. Stams, T.; Chen, Y.; Christianson, D. W.; Boriack-Sjodin, P. A.; Hurt, J. D.; Laipis, P.; Silverman, D. N.; Liao, J.; May, J. A.; Dean, T., Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: Molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Science* **1998**, 7 (3), 556-563.

106. Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G., *X-ray crystallography of carbonic anhydrase inhibitors and its importance in drug design*. Wiley: Hoboken, New Jersey: 2009.
107. Winum, J.-Y.; Vullo, D.; Casini, A.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T., Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane, Tumor-Associated Isozyme IX with Sulfamates Including EMATE Also Acting as Steroid Sulfatase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46* (11), 2197-2204.
108. Bache, M.; Kappler, M.; Said, H.; Staab, A.; Vordermark, D., Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15* (4), 322-338.
109. Thews, O.; Riemann, A.; Nowak, M.; Gekle, M., Impact of hypoxia-related tumor acidosis on cytotoxicity of different chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo. In *Oxygen Transport to Tissue XXXVI*, Springer: 2014; pp 51-58.
110. Vaupel, P.; Briest, S.; Höckel, M., Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **2002**, *152* (13-14), 334-342.
111. Tafreshi, N. K.; Lloyd, M. C.; Proemsey, J. B.; Bui, M. M.; Kim, J.; Gillies, R. J.; Morse, D. L., Evaluation of CAIX and CAXII expression in breast cancer at varied O₂ levels: CAIX is the superior surrogate imaging biomarker of tumor hypoxia. *Molecular imaging and biology* **2016**, *18* (2), 219-231.
112. Smirnovienė, J.; Smirnovas, V.; Matulis, D., Picomolar inhibitors of carbonic anhydrase: Importance of inhibition and binding assays. *Analytical Biochemistry* **2017**, *522*, 61-72.
113. Tashian, R. E.; Douglas, D. P.; Ya-Shiou, L. Y., Esterase and hydrazidase activity of carbonic anhydrase-I from primate erythrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **1964**, *14* (3), 256-261.
114. Gould, S. M.; Tawfik, D. S., Directed evolution of the promiscuous esterase activity of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **2005**, *44* (14), 5444-5452.
115. Fierke, C. A.; Calderone, T. L.; Krebs, J. F., Functional consequences of engineering the hydrophobic pocket of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **1991**, *30* (46), 11054-11063.
116. Elleby, B.; Sjöblom, B.; Lindskog, S., Changing the efficiency and specificity of the esterase activity of human carbonic anhydrase II by site-specific mutagenesis. *European journal of biochemistry* **1999**, *262* (2), 516-521.
117. Alexander, R. S.; Nair, S. K.; Christianson, D. W., Engineering the hydrophobic pocket of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **1991**, *30* (46), 11064-11072.
118. Lopez, M.; Vu, H.; Wang, C. K.; Wolf, M. G.; Groenhof, G.; Innocenti, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A., Promiscuity of Carbonic Anhydrase II. Unexpected Ester Hydrolysis of Carbohydrate-Based Sulfamate Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (45), 18452-18462.
119. Izatt, R. M.; Rytting, J. H.; Hansen, L. D.; Christensen, J. J., Thermodynamics of Proton Dissociation in Dilute Aqueous Solution. V. An Entropy Titration Study of Adenosine, Pentoses, Hexoses, and Related Compounds^{1a,b}. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88* (12), 2641-2645.
120. Christensen, J. J.; Izatt, R. M.; Hansen, L. D.; Partridge, J. A., Entropy Titration. A Calorimetric Method for the Determination of ΔG , ΔH , and ΔS from a Single Thermometric Titration^{1a,b}. *The Journal of Physical Chemistry* **1966**, *70* (6), 2003-2010.

121. Kišonaitė, M.; Zubrienė, A.; Čapkauskaitė, E.; Smirnov, A.; Smirnovienė, J.; Kairys, V.; Michailovienė, V.; Manakova, E.; Gražulis, S.; Matulis, D., Intrinsic thermodynamics and structure correlation of benzenesulfonamides with a pyrimidine moiety binding to carbonic anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. *PloS one* **2014**, 9 (12), e114106.
122. Linkuvienė, V.; Matulienė, J.; Juozapaitienė, V.; Michailovienė, V.; Jachno, J.; Matulis, D., Intrinsic thermodynamics of inhibitor binding to human carbonic anhydrase IX. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2016**, 1860 (4), 708-718.
123. Dudutienė, V.; Zubrienė, A.; Smirnov, A.; Gylytė, J.; Timm, D.; Manakova, E.; Gražulis, S.; Matulis, D., 4-Substituted-2, 3, 5, 6-tetrafluorobenzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2013**, 21 (7), 2093-2106.
124. Srivastava, V. K.; Yadav, R., Chapter 9 - Isothermal titration calorimetry. In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, Misra, G., Ed. Academic Press: 2019; pp 125-137.
125. Petrauskas, V.; Zubrienė, A.; Todd, M. J.; Matulis, D., Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrases by Fluorescent Thermal Shift Assay. In *Carbonic Anhydrase as Drug Target: Thermodynamics and Structure of Inhibitor Binding*, Matulis, D., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 63-78.
126. Rogez-Florent, T.; Duhamel, L.; Goossens, L.; Six, P.; Drucbert, A.-S.; Depreux, P.; Danzé, P.-M.; Landy, D.; Goossens, J.-F.; Foulon, C., Label-free characterization of carbonic anhydrase—novel inhibitor interactions using surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry and fluorescence-based thermal shift assays. *Journal of Molecular Recognition* **2014**, 27 (1), 46-56.
127. Matulis, D.; Kranz, J. K.; Salemme, F. R.; Todd, M. J., Thermodynamic Stability of Carbonic Anhydrase: Measurements of Binding Affinity and Stoichiometry Using ThermoFluor. *Biochemistry* **2005**, 44 (13), 5258-5266.
128. Baranauskienė, L.; Hilvo, M.; Matulienė, J.; Golovenko, D.; Manakova, E.; Dudutienė, V.; Michailovienė, V.; Torresan, J.; Jachno, J.; Parkkila, S.; Maresca, A.; Supuran, C. T.; Gražulis, S.; Matulis, D., Inhibition and binding studies of carbonic anhydrase isozymes I, II and IX with benzimidazo[1,2-c][1,2,3]thiadiazole-7-sulphonamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2010**, 25 (6), 863-870.
129. Matulis, D.; Kranz, J. K.; Salemme, F. R.; Todd, M. J., Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry* **2005**, 44 (13), 5258-5266.
130. Cimperman, P.; Baranauskienė, L.; Jachimovičiūtė, S.; Jachno, J.; Torresan, J.; Michailovienė, V.; Matulienė, J.; Sereikaitė, J.; Bumelis, V.; Matulis, D., A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. *Biophysical journal* **2008**, 95 (7), 3222-3231.
131. Spillane, W. J.; Ryder, C. A.; Walsh, M. R.; Curran, P. J.; Concagh, D. G.; Wall, S. N., Sulfamate sweeteners. *Food Chemistry* **1996**, 56 (3), 255-261.
132. Vanchanagiri, K.; Emmerich, D.; Bruschke, M.; Bache, M.; Seifert, F.; Csuk, R.; Vordermark, D.; Paschke, R., Synthesis and biological investigation of new carbonic anhydrase IX (CAIX) inhibitors. *Chemico-Biological Interactions* **2018**, 284, 12-23.
133. Schimmel, P.; Tao, J.; Hill, J., Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new anti-infectives. *The FASEB Journal* **1998**, 12 (15), 1599-1609.

134. Pérez-Pérez, M.-J.; Balzarini, J.; de Clercq, E.; Camarasa, M.-J., Glycosyl-oxycarbonylamino-sulfonyl-2',3'-dideoxynucleoside derivatives as lipophilic nucleotide mimics. Synthesis and anti-HIV activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1993**, *1* (4), 279-284.
135. Winum, J.-Y.; Scozzafava, A.; Montero, J.-L.; Supuran, C. T., Sulfamates and their therapeutic potential. *Medicinal Research Reviews* **2005**, *25* (2), 186-228.
136. Howarth, N. M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V., Estrone sulfamates: potent inhibitors of estrone sulfatase with therapeutic potential. *Journal of medicinal chemistry* **1994**, *37* (2), 219-221.
137. Woo, L. L.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V., Active site directed inhibition of estrone sulfatase by nonsteroidal coumarin sulfamates. *Journal of medicinal chemistry* **1996**, *39* (7), 1349-1351.
138. Sköld, O., Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates* **2000**, *3* (3), 155-160.
139. Connor, E. E., Sulfonamide antibiotics. *Primary Care Update for OB/GYNs* **1998**, *5* (1), 32-35.
140. Tačić, A.; Nikolić, V.; Nikolić, L.; Savić, I., Antimicrobial sulfonamide drugs. *Advanced technologies* **2017**, *6* (1), 58-71.
141. Scozzafava, A.; Owa, T.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T., Anticancer and antiviral sulfonamides. *Current medicinal chemistry* **2003**, *10* (11), 925-953.
142. Casey, J. R.; Morgan, P. E.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T., Carbonic Anhydrase Inhibitors. Design of Selective, Membrane-Impermeant Inhibitors Targeting the Human Tumor-Associated Isozyme IX. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47* (9), 2337-2347.
143. Eldehna, W. M.; Abo-Ashour, M. F.; Berrino, E.; Vullo, D.; Ghabbour, H. A.; Al-Rashood, S. T.; Hassan, G. S.; Alkahtani, H. M.; Almehizia, A. A.; Alharbi, A., SLC-0111 enamino analogs, 3/4-(3-aryl-3-oxopropenyl) aminobenzenesulfonamides, as novel selective subnanomolar inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX. *Bioorganic chemistry* **2019**, *83*, 549-558.
144. Koyuncu, I.; Tülüce, Y.; Slahaddin Qadir, H.; Durgun, M.; Supuran, C. T., Evaluation of the anticancer potential of a sulphonamide carbonic anhydrase IX inhibitor on cervical cancer cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2019**, *34* (1), 703-711.
145. Lolak, N.; Akocak, S.; Bua, S.; Sanku, R. K.; Supuran, C. T., Discovery of new ureido benzenesulfonamides incorporating 1, 3, 5-triazine moieties as carbonic anhydrase I, II, IX and XII inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2019**, *27* (8), 1588-1594.
146. Supuran, C. T.; Winum, J.-Y., Carbonic anhydrase IX inhibitors in cancer therapy: an update. *Future medicinal chemistry* **2015**, *7* (11), 1407-1414.
147. Supuran, C. T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7*, 168.
148. Winum, J.-Y.; Pastorekova, S.; Jakubickova, L.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Pastorek, J.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with bis-sulfamates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15* (3), 579-584.
149. Dudutienė, V.; Zubrienė, A.; Smirnov, A.; Gylytė, J.; Timm, D.; Manakova, E.; Gražulis, S.; Matulis, D., 4-Substituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (7), 2093-2106.

150. Berson, F. G.; Epstein, D. L.; Grant, W. M.; Hutchinson, B. T.; Dobbs, P. C., Acetazolamide Dosage Forms in the Treatment of Glaucoma. *Archives of Ophthalmology* **1980**, 98 (6), 1051-1054.
151. Imiela, T.; Budaj, A., Acetazolamide as Add-on Diuretic Therapy in Exacerbations of Chronic Heart Failure: a Pilot Study. *Clinical Drug Investigation* **2017**, 37 (12), 1175-1181.
152. Brater, D. C.; Kaojarern, S.; Chennavasin, P., Pharmacodynamics of the diuretic effects of aminophylline and acetazolamide alone and combined with furosemide in normal subjects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1983**, 227 (1), 92-97.
153. Kassamali, R.; Sica, D. A., Acetazolamide: A Forgotten Diuretic Agent. *Cardiology in Review* **2011**, 19 (6), 276-278.
154. Mann, T.; Keilin, D., Sulphanilamide as a Specific Inhibitor of Carbonic Anhydrase. *Nature* **1940**, 146 (3692), 164-165.
155. Göres, E.; Lange, B., [On the anticonvulsive action of sulfonamides, especially benzene sulfonamides]. *Acta Biol Med Ger* **1968**, 21 (2), 193-203.
156. Fahlberg, C.; Remsen, I., Ueber die oxydation des orthotoluolsulfamids. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1879**, 12 (1), 469-473.
157. Prashant, G.; Patil, R. B.; Nagaraj, T.; Patel, V. B., The antimicrobial activity of the three commercially available intense sweeteners against common periodontal pathogens: an in vitro study. *J Contemp Dent Pract* **2012**, 13 (6), 749-52.
158. Carradori, S.; Secci, D.; De Monte, C.; Mollica, A.; Ceruso, M.; Akdemir, A.; Sobolev, A. P.; Codispoti, R.; De Cosmi, F.; Guglielmi, P.; Supuran, C. T., A novel library of saccharin and acesulfame derivatives as potent and selective inhibitors of carbonic anhydrase IX and XII isoforms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, 24 (5), 1095-1105.
159. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **1983**, 65 (1-2), 55-63.
160. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1990**, 82 (13), 1107-1112.
161. Bisswanger, H., *Enzyme: Struktur, Kinetik und Anwendungen*. John Wiley & Sons: 2015.
162. Briggs, G. E.; Haldane, J. B. S., A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical journal* **1925**, 19 (2), 338-339.
163. Woolf, B., quoted by Haldane, JBS and Stern, KG (1932). *Allgemeine Chemie der Enzyme*, 119.
164. Barrese III, A. A.; Genis, C.; Fisher, S. Z.; Orwenyo, J. N.; Kumara, M. T.; Dutta, S. K.; Phillips, E.; Kiddle, J. J.; Tu, C.; Silverman, D. N., Inhibition of carbonic anhydrase II by thioxolone: a mechanistic and structural study. *Biochemistry* **2008**, 47 (10), 3174-3184.
165. Shank, R. P.; McComsey, D. F.; Smith-Swintosky, V. L.; Maryanoff, B. E., Examination of two independent kinetic assays for determining the inhibition of carbonic anhydrases I and II: structure–activity comparison of sulfamates and sulfamides. *Chemical biology & drug design* **2006**, 68 (2), 113-119.
166. Uda, N. R.; Seibert, V.; Stenner-Liewen, F.; Müller, P.; Herzig, P.; Gondi, G.; Zeidler, R.; van Dijk, M.; Zippelius, A.; Renner, C., Esterase activity of carbonic anhydrases serves as surrogate for

selecting antibodies blocking hydratase activity. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2015**, 30 (6), 955-960.

167. Mboge, M. Y.; Chen, Z.; Wolff, A.; Mathias, J. V.; Tu, C.; Brown, K. D.; Bozdag, M.; Carta, F.; Supuran, C. T.; McKenna, R., Selective inhibition of carbonic anhydrase IX over carbonic anhydrase XII in breast cancer cells using benzene sulfonamides: Disconnect between activity and growth inhibition. *PloS one* **2018**, 13 (11), e0207417.

168. Vitale, R. M.; Alterio, V.; Innocenti, A.; Winum, J.-Y.; Monti, S. M.; De Simone, G.; Supuran, C. T., Carbonic Anhydrase Inhibitors. Comparison of Aliphatic Sulfamate/Bis-sulfamate Adducts with Isozymes II and IX as a Platform for Designing Tight-Binding, More Isoform-Selective Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52 (19), 5990-5998.

169. Allensbach, I. *Anzahl der Personen in Deutschland, die persönlich ein Pferd besitzen, von 2015 bis 2019* 2019*.

170. Gerlach, K.; Cronau, M.; McMullen, R.; Gerhards, H., Magnetresonanztomographische Untersuchungen von Melanomen im Kopfbereich bei drei Pferden. *Pferdeheilkunde* **2007**, 23, 259-62.

171. Valentine, B. A., Equine melanocytic tumors: a retrospective study of 53 horses (1988 to 1991). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **1995**, 9 (5), 291-297.

172. Sutton, R.; Coleman, G., Melanoma and the Graying horse. *RIRDC Research Paper Series* **1997**, 55, 1-27.

173. Garvican, E.; Elce, Y.; Woolard, K.; Blikslager, A., Preputial melanoma with systemic metastasis in a pony gelding and disseminated metastatic melanoma in a Thoroughbred gelding. *Equine Veterinary Education* **2007**, 19 (6), 312-315.

174. Sundström, E.; Komisarczuk, A. Z.; Jiang, L.; Golovko, A.; Navratilova, P.; Rinkwitz, S.; Becker, T. S.; Andersson, L., Identification of a melanocyte-specific, microphthalmia-associated transcription factor-dependent regulatory element in the intronic duplication causing hair greying and melanoma in horses. *Pigment Cell & Melanoma Research* **2012**, 25 (1), 28-36.

175. Rosengren Pielberg, G.; Golovko, A.; Sundström, E.; Curik, I.; Lennartsson, J.; Seltenhammer, M. H.; Druml, T.; Binns, M.; Fitzsimmons, C.; Lindgren, G.; Sandberg, K.; Baumung, R.; Vetterlein, M.; Strömberg, S.; Grabherr, M.; Wade, C.; Lindblad-Toh, K.; Pontén, F.; Heldin, C.-H.; Sölkner, J.; Andersson, L., A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature Genetics* **2008**, 40 (8), 1004-1009.

176. Curik, I.; Druml, T.; Seltenhammer, M.; Sundström, E.; Pielberg, G. R.; Andersson, L.; Sölkner, J., Complex Inheritance of Melanoma and Pigmentation of Coat and Skin in Grey Horses. *PLOS Genetics* **2013**, 9 (2), e1003248.

177. Jackson, C., The incidence and pathology of tumors of domestic animals in South Africa. A study of the Onderstepoort collections of neoplasms with special reference to their histopathology. *Onderstepoort J Vet Res* **1936**, 6, 1-460.

178. Marti, E.; Lazary, S.; Antczak, D.; Gerber, H., Report of the first international workshop on equine sarcoid. *Equine veterinary journal* **1993**, 25 (5), 397-407.

179. RAGLAND III, W.; Keown, G.; Spencer, G., Equine sarcoid. *Equine Veterinary Journal* **1970**, 2 (1), 2-11.

180. Baker, J.; Leyland, A., Histological survey of tumours of the horse, with particular reference to those of the skin. *The Veterinary Record* **1975**, 96 (19), 419-422.

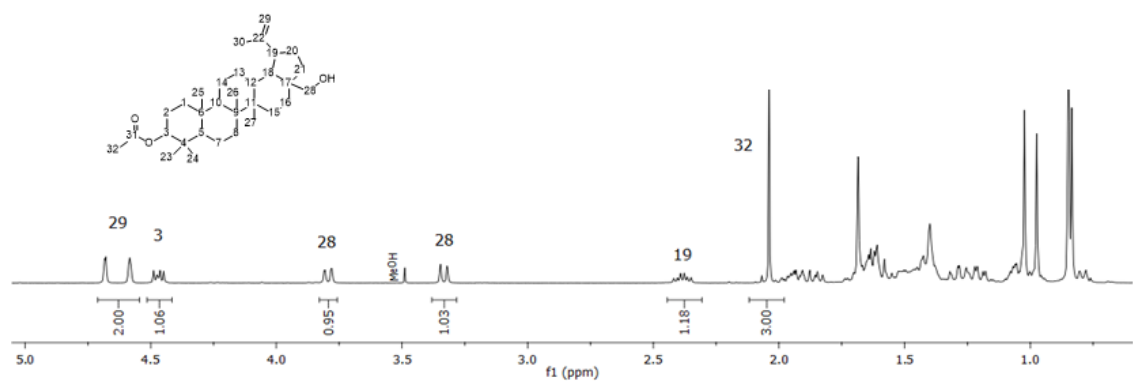
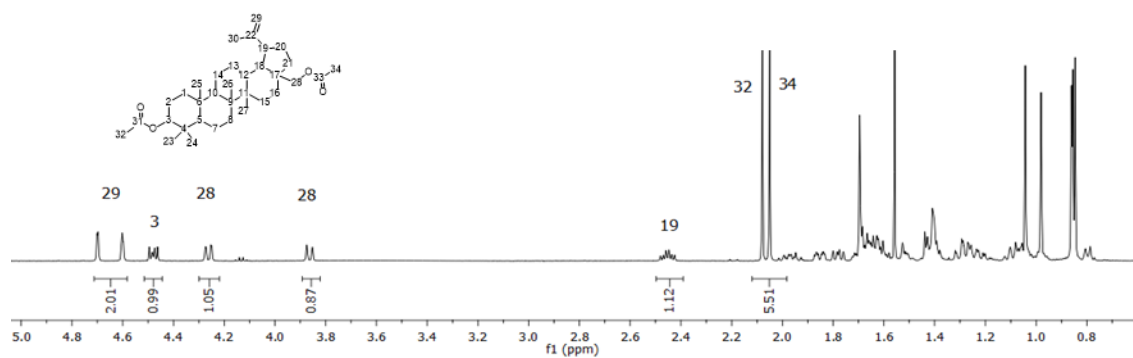
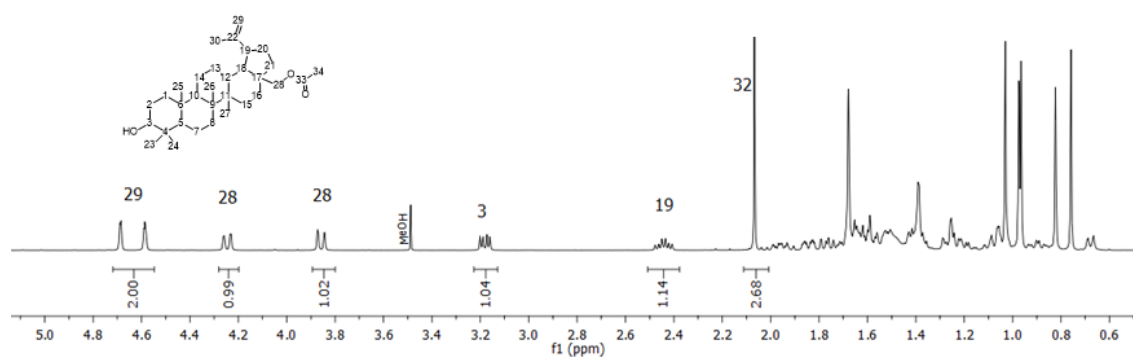
181. Taylor, S.; Haldorson, G., A review of equine sarcoid. *Equine Veterinary Education* **2013**, *25* (4), 210-216.
182. Chambers, G.; Ellsmore, V.; O'brien, P.; Reid, S.; Love, S.; Campo, M.; Nasir, L., Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *Journal of General Virology* **2003**, *84* (5), 1055-1062.
183. Martens, A.; Moor, A.; Demeulemeester, J.; Ducatelle, R., Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. *Research in Veterinary Science* **2000**, *69* (3), 295-300.
184. Brandt, S.; Hainisch, E., Prophylactic Vaccination Against Papillomavirus-Induced Tumour Disease. In *Comparative Medicine*, Springer: 2017; pp 151-165.
185. Knottenbelt, D. C., A Suggested Clinical Classification for the Equine Sarcoid. *Clinical Techniques in Equine Practice* **2005**, *4* (4), 278-295.
186. Yuan, Z.; Gault, E. A.; Campo, M. S.; Nasir, L., Different contribution of bovine papillomavirus type 1 oncoproteins to the transformation of equine fibroblasts. *Journal of general virology* **2011**, *92* (4), 773-783.
187. Martens, A.; De Moor, A.; Ducatelle, R., PCR detection of bovine papilloma virus DNA in superficial swabs and scrapings from equine sarcoids. *The Veterinary Journal* **2001**, *161* (3), 280-286.
188. Fürst, A.; Martens, A.; Bogaert, L., Das Equine Sarkoid. *CVE Pferd/Continuing Veterinary Education* **2009**, *1* (4), 1-32.
189. Müller, J.-M. V.; Feige, K.; Wunderlin, P.; Hödl, A.; Meli, M. L.; Seltenhammer, M.; Grest, P.; Nicolson, L.; Schelling, C.; Heinzerling, L. M., Double-blind Placebo-controlled Study With Interleukin-18 and Interleukin-12-encoding Plasmid DNA Shows Antitumor Effect in Metastatic Melanoma in Gray Horses. *Journal of Immunotherapy* **2011**, *34* (1).
190. Théon, A. P.; Wilson, W. D.; Magdesian, K. G.; Pusterla, N.; Snyder, J. R.; Galuppo, L. D., Long-term outcome associated with intratumoral chemotherapy with cisplatin for cutaneous tumors in equidae: 573 cases (1995–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **2007**, *230* (10), 1506-1513.
191. Theon, A. P.; Pascoe, J.; Carlson, G.; Krag, D., Intratumoral chemotherapy with cisplatin in oily emulsion in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **1993**, *202* (2), 261-267.
192. Waissbluth, S.; Daniel, S. J., Cisplatin-induced ototoxicity: Transporters playing a role in cisplatin toxicity. *Hearing Research* **2013**, *299*, 37-45.
193. Goetz, T. E.; Ogilvie, G. K.; Keegan, K. G.; Johnson, P. J., Cimetidine for treatment of melanomas in three horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **1990**, *196* (3), 449-452.
194. Laus, F.; Cerquetella, M.; Paggi, E.; Ippedico, G.; Argentieri, M.; Castellano, G.; Spaterna, A.; Tesei, B., Evaluation of cimetidine as a therapy for dermal melanomatosis in grey horse. *Isr J Vet Med* **2010**, *65* (2), 48-52.
195. Bowers, J.; Huntington, P.; Slocombe, R., Efficacy of cimetidine for therapy of skin tumours of horses-10 cases. *The Australian Equine Veterinarian* **1994**, *1994* (1), 30-32.
196. Filipski, K. K.; Mathijssen, R. H.; Mikkelsen, T. S.; Schinkel, A. H.; Sparreboom, A., Contribution of Organic Cation Transporter 2 (OCT2) to Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2009**, *86* (4), 396-402.

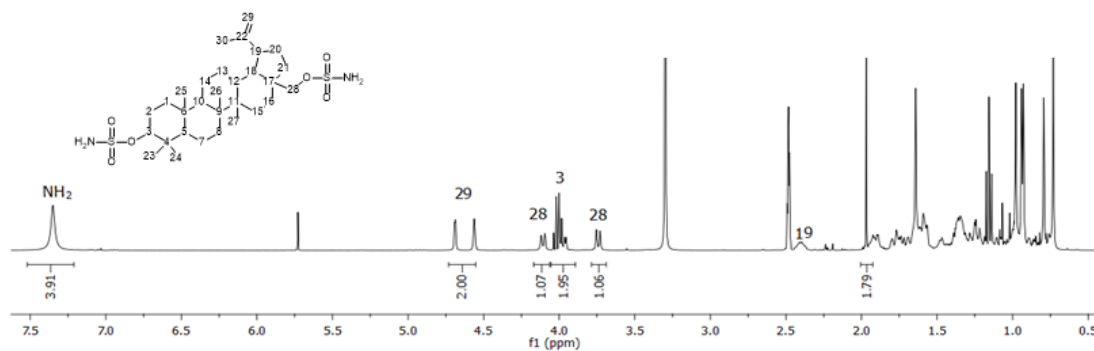
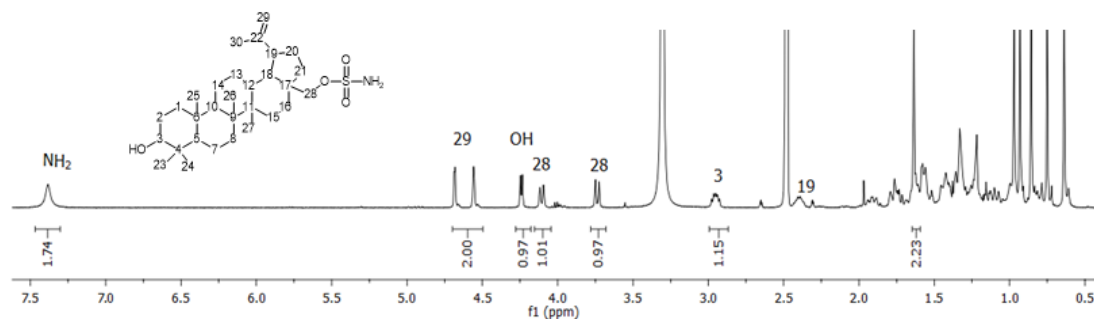
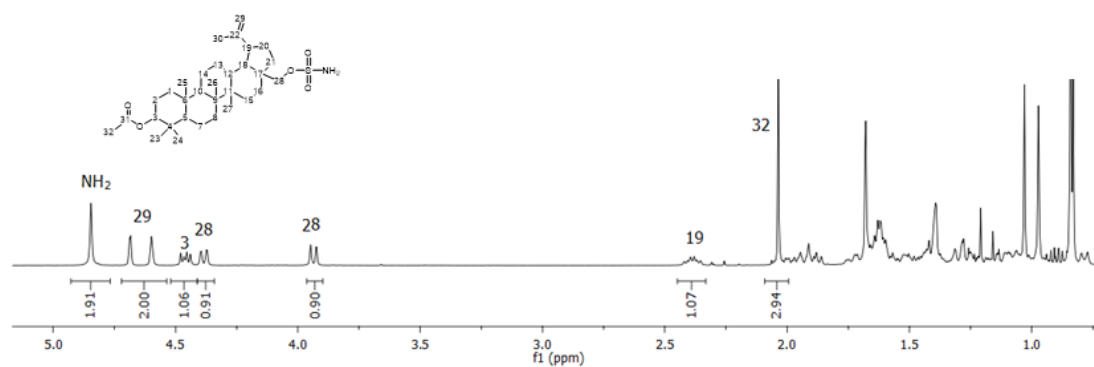
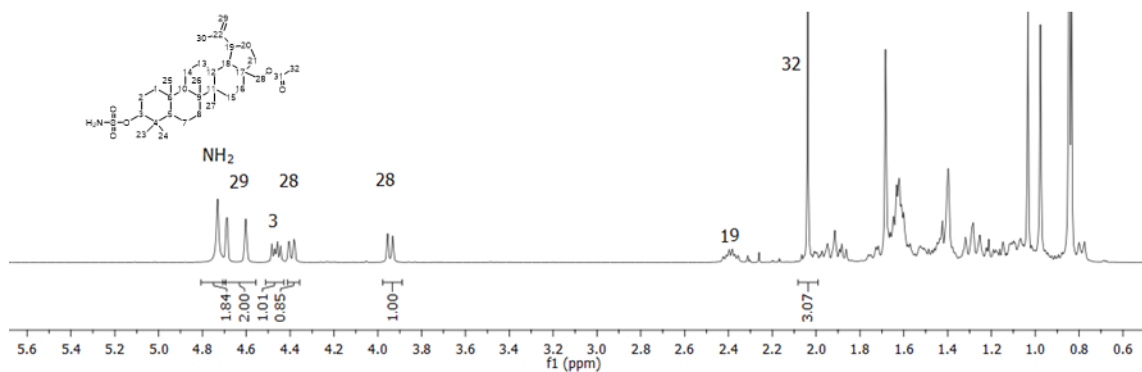
197. Kerbel, R. S., Tumor Angiogenesis. *New England Journal of Medicine* **2008**, 358 (19), 2039-2049.
198. Seltenhammer, M. H.; Sundström, E.; Meisslitzer-Ruppitsch, C.; Cejka, P.; Kosiuk, J.; Neumüller, J.; Almeder, M.; Majdic, O.; Steinberger, P.; Losert, U. M.; Stöckl, J.; Andersson, L.; Sölkner, J.; Vetterlein, M.; Golovko, A., Establishment and characterization of a primary and a metastatic melanoma cell line from Grey horses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **2014**, 50 (1), 56-65.
199. Bogaert, L.; Van Poucke, M.; De Baere, C.; Dewulf, J.; Peelman, L.; Ducatelle, R.; Gasthuys, F.; Martens, A., Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. *Journal of General Virology* **2007**, 88 (8), 2155-2161.
200. Gheorgheosu, D.; Duicu, O.; Dehelean, C.; Soica, C.; Muntean, D., Betulinic Acid as a Potent and Complex Antitumor Phytochemical: A Minireview. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* **2014**, 14 (7), 936-945.
201. Wick, W.; Grimm, C.; Wagenknecht, B.; Dichgans, J.; Weller, M., Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1999**, 289 (3), 1306-1312.
202. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **2007**, 35 (4), 495-516.
203. Bortner, C. D.; Oldenburg, N. B. E.; Cidlowski, J. A., The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* **1995**, 5 (1), 21-26.
204. Cocca, B. A.; Cline, A. M.; Radic, M. Z., Blebs and Apoptotic Bodies Are B Cell Autoantigens. *The Journal of Immunology* **2002**, 169 (1), 159-166.
205. Demchenko, A., The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Experimental oncology* **2012**.
206. Mourdjeva, M.; Kyurkchiev, D.; Mandinova, A.; Altankova, I.; Kehayov, I.; Kyurkchiev, S., Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis* **2005**, 10 (1), 209-217.
207. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutellingsperger, C., A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods* **1995**, 184 (1), 39-51.
208. Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **1998**, 391 (6662), 43-50.
209. Sakahira, H.; Enari, M.; Nagata, S., Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **1998**, 391 (6662), 96-99.
210. Jänicke, R. U.; Sprengart, M. L.; Wati, M. R.; Porter, A. G., Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (16), 9357-9360.

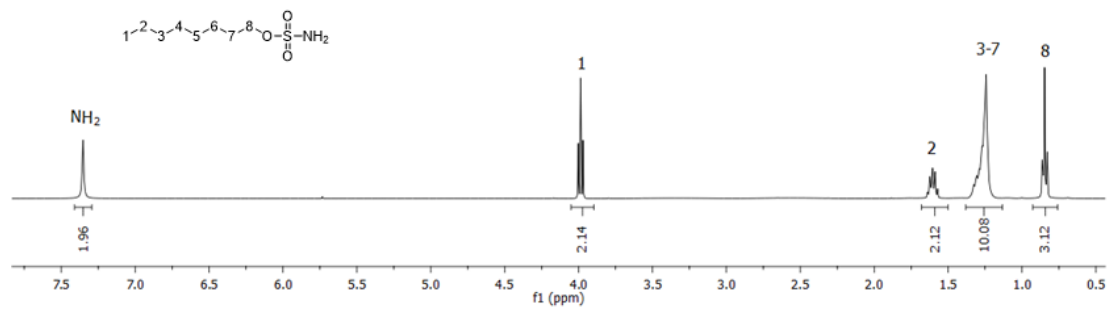
211. Wolf, B. B.; Schuler, M.; Echeverri, F.; Green, D. R., Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274 (43), 30651-30656.
212. Figueiredo, L. M.; Cross, G.; Janzen, C. J., Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nature Reviews Microbiology* **2009**, 7, 504-513.
213. Oberhammer, F.; Wilson, J.; Dive, C.; Morris, I.; Hickman, J.; Wakeling, A.; Walker, P. R.; Sikorska, M., Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO journal* **1993**, 12 (9), 3679-3684.
214. Sigal, A.; Milo, R.; Cohen, A.; Geva-Zatorsky, N.; Klein, Y.; Alaluf, I.; Swerdlin, N.; Perzov, N.; Danon, T.; Liron, Y., Dynamic proteomics in individual human cells uncovers widespread cell-cycle dependence of nuclear proteins. *Nature Methods* **2006**, 3 (7), 525-531.
215. Donjerkovic, D.; Scott, D. W., Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell research* **2000**, 10 (1), 1-16.
216. Boujard, D.; Anselme, B.; Cullin, C.; Raguénès-Nicol, C., Zellzyklus und Apoptose. In *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014; pp 307-326.
217. Weber, L. A.; Puff, C.; Kalbitz, J.; Kietzmann, M.; Feige, K.; Bosse, K.; Rohn, K.; Cavalleri, J.-M. V., Concentration profiles and safety of topically applied betulinic acid and NVX-207 in eight healthy horses—A randomized, blinded, placebo-controlled, crossover pilot study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2020**, n/a (n/a).
218. Mählmann, K.; Feige, K.; Juhls, C.; Endmann, A.; Schuberth, H.-J.; Oswald, D.; Hellige, M.; Doherr, M.; Cavalleri, J.-M. V., Local and systemic effect of transfection-reagent formulated DNA vectors on equine melanoma. *BMC Veterinary Research* **2015**, 11 (1), 132.
219. Faustino-Rocha, A.; Oliveira, P. A.; Pinho-Oliveira, J.; Teixeira-Guedes, C.; Soares-Maia, R.; da Costa, R. G.; Colaço, B.; Pires, M. J.; Colaço, J.; Ferreira, R.; Ginja, M., Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Animal* **2013**, 42 (6), 217-224.

8. Anhang

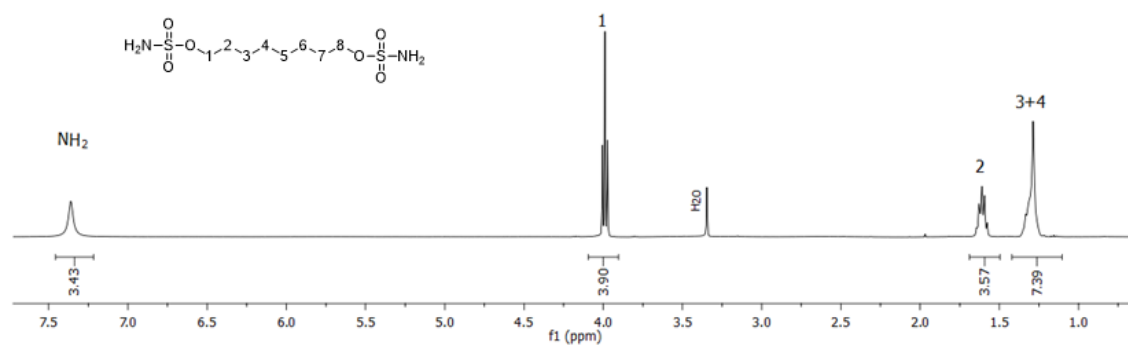
8.1 Charakterisierung der Sulfamate (1a - 8)





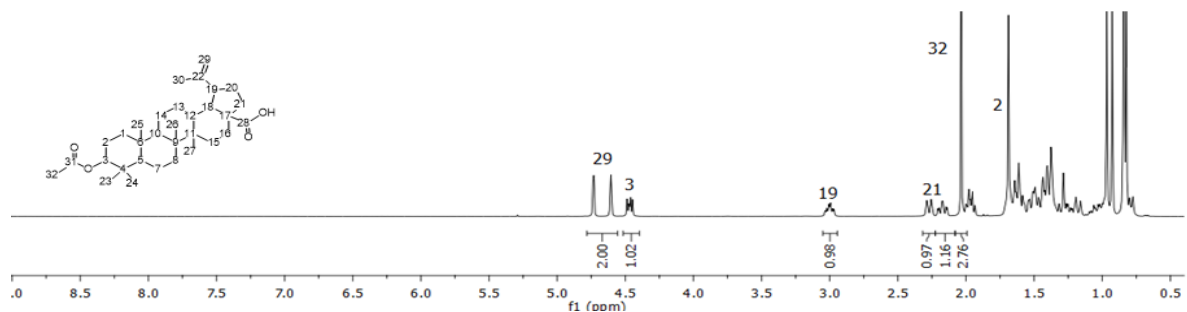


Anhang 8. ^1H -NMR von 6.

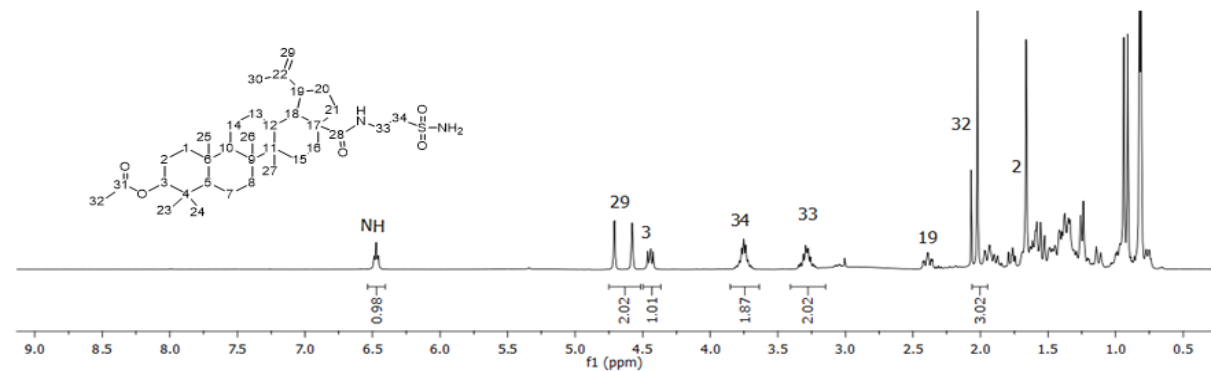


Anhang 9. ^1H -NMR von 7.

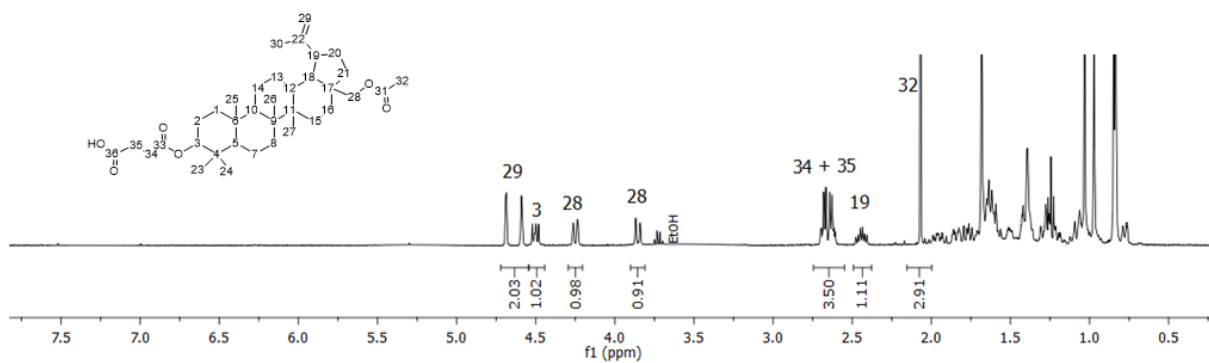
8.2 Charakterisierung der Sulfonamide (9 - 14)



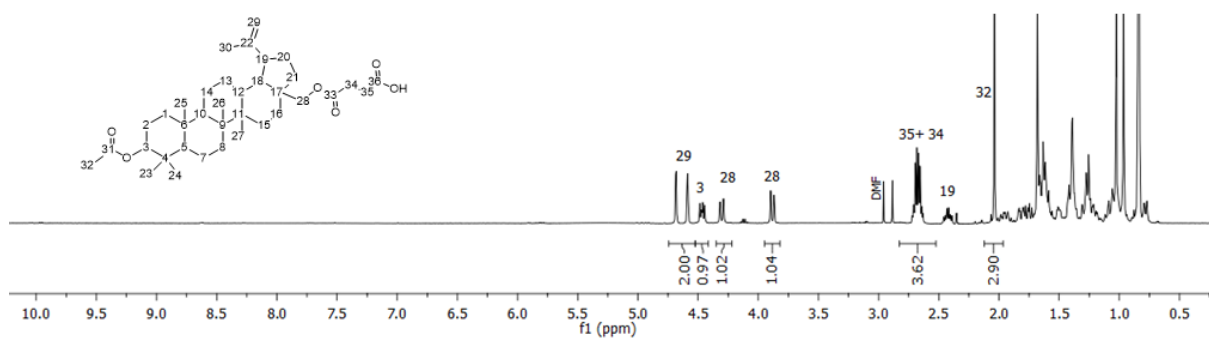
Anhang 10. ^1H -NMR von 9.



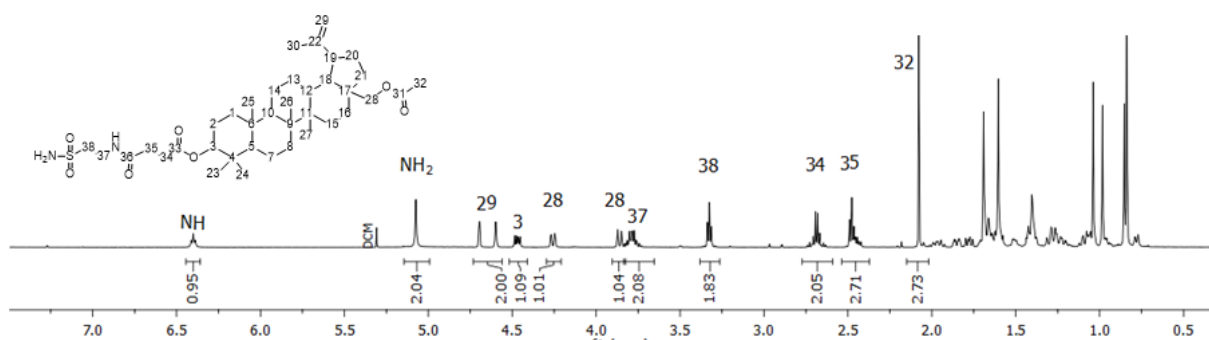
Anhang 11. ^1H -NMR von 10.



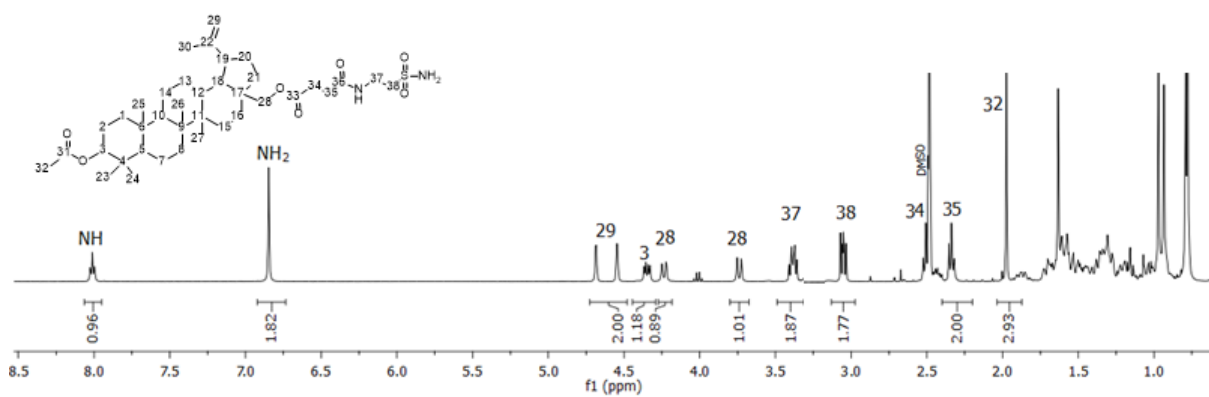
Anhang 12. ^1H -NMR von 11.



Anhang 13. ^1H -NMR von 12.

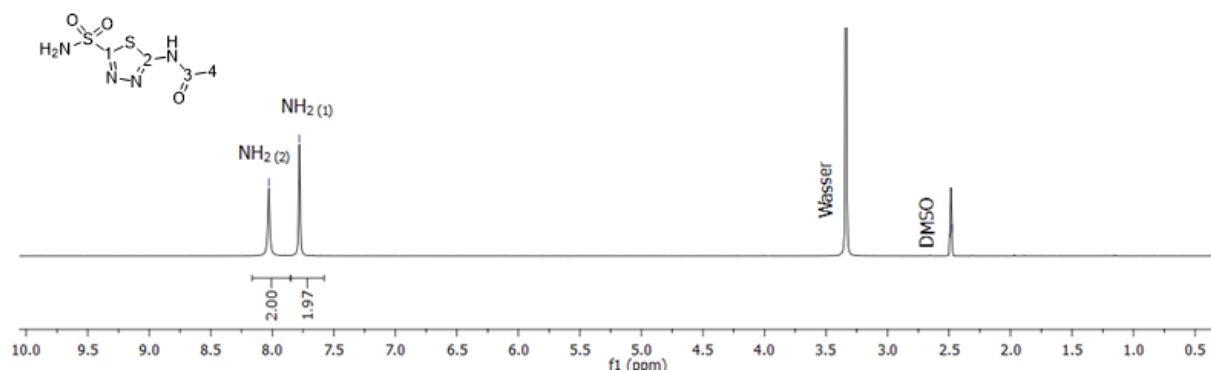


Anhang 14. ^1H -NMR von 13.

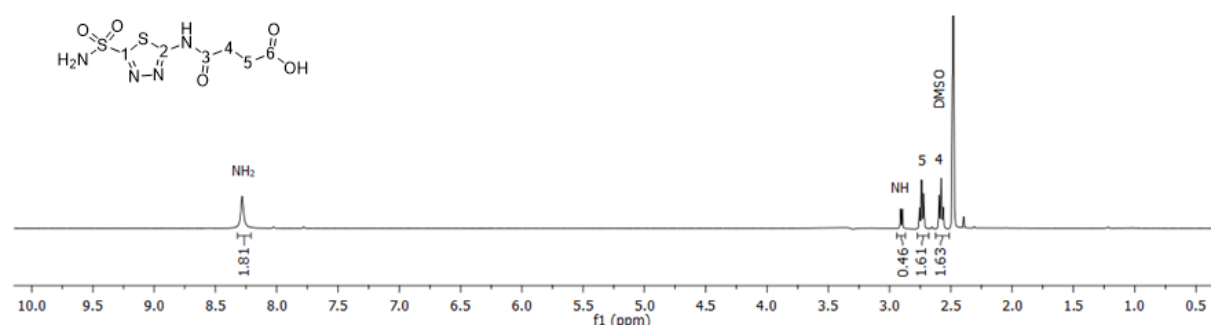


Anhang 15. ^1H -NMR von 14.

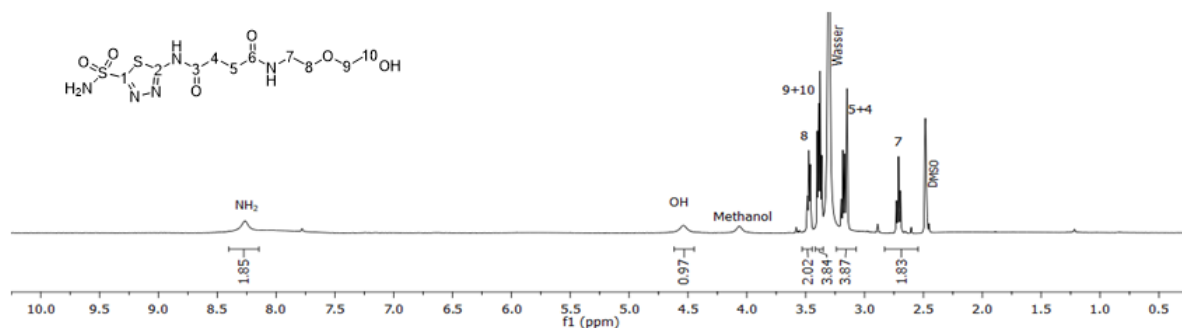
8.3 Charakterisierung der Acetazolamid basierte Konjugate (15 - 21)



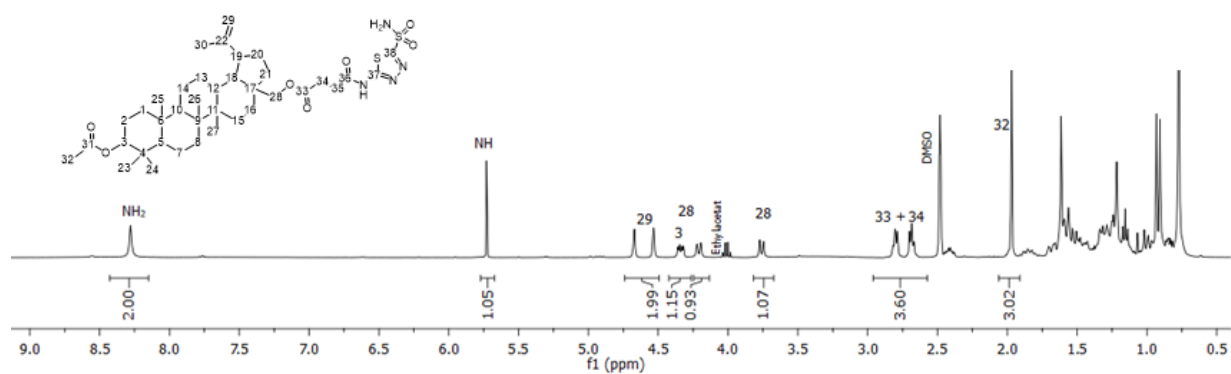
Anhang 16. ¹H-NMR von 15.



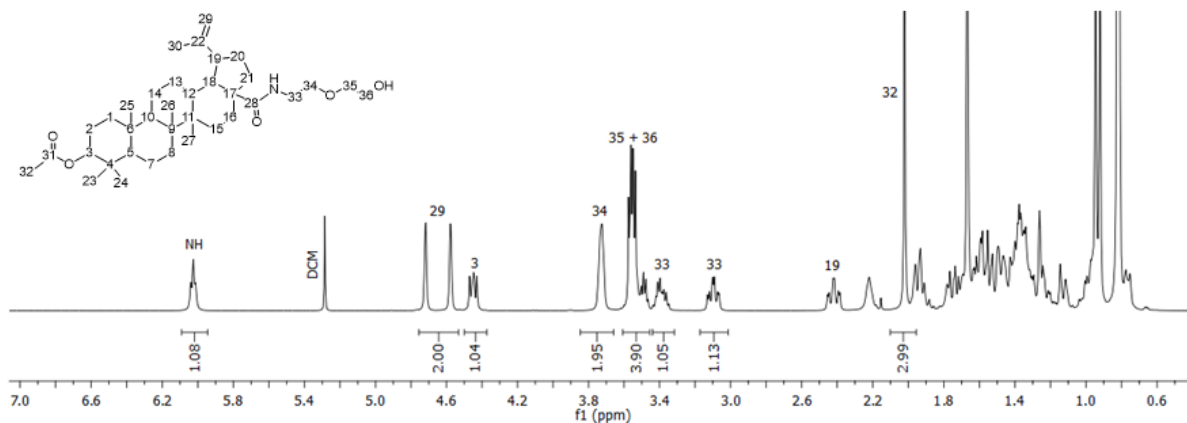
Anhang 17. ¹H-NMR von 16.



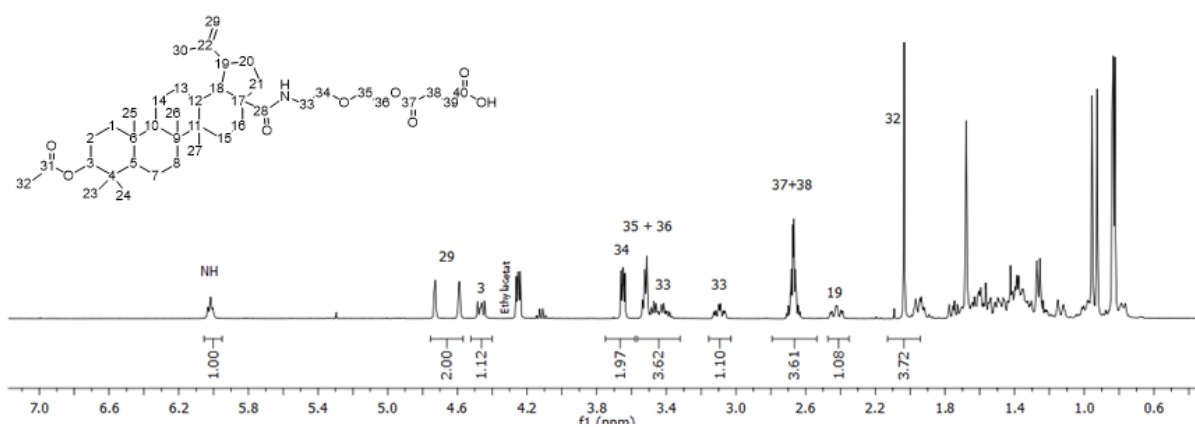
Anhang 18. ¹H-NMR von 17.



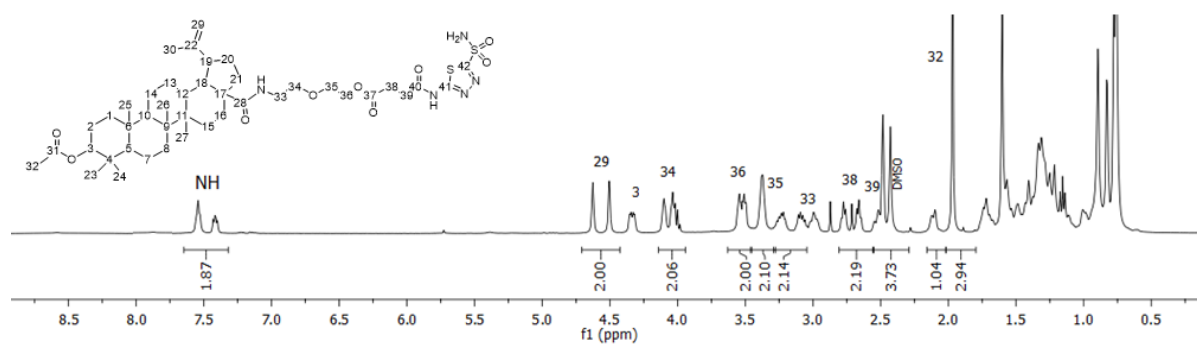
Anhang 19. ¹H-NMR von 18.



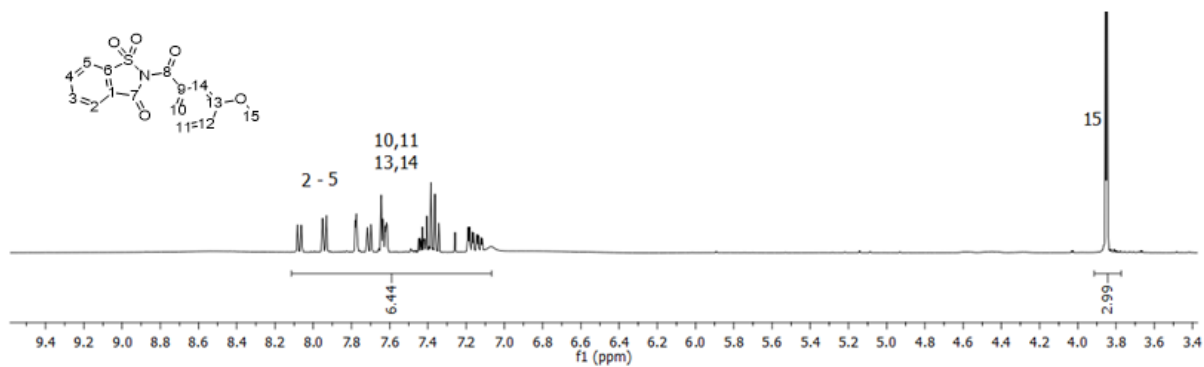
Anhang 20. ^1H -NMR von 19.



Anhang 21. ^1H -NMR von 20.

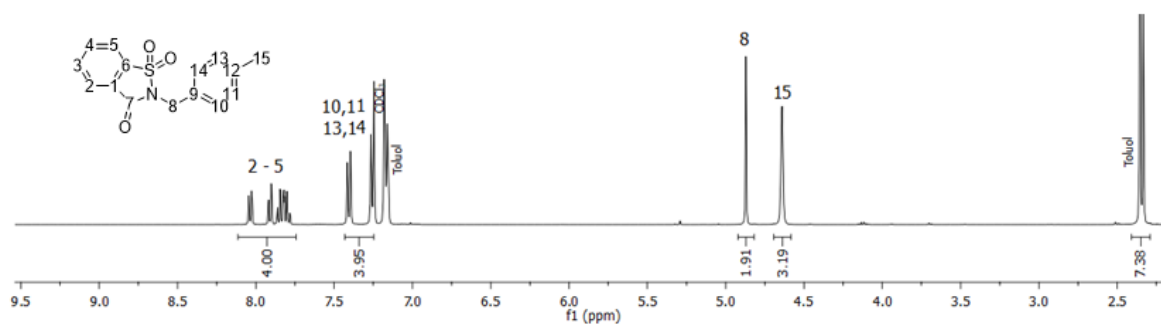


Anhang 22. ^1H -NMR von 21.

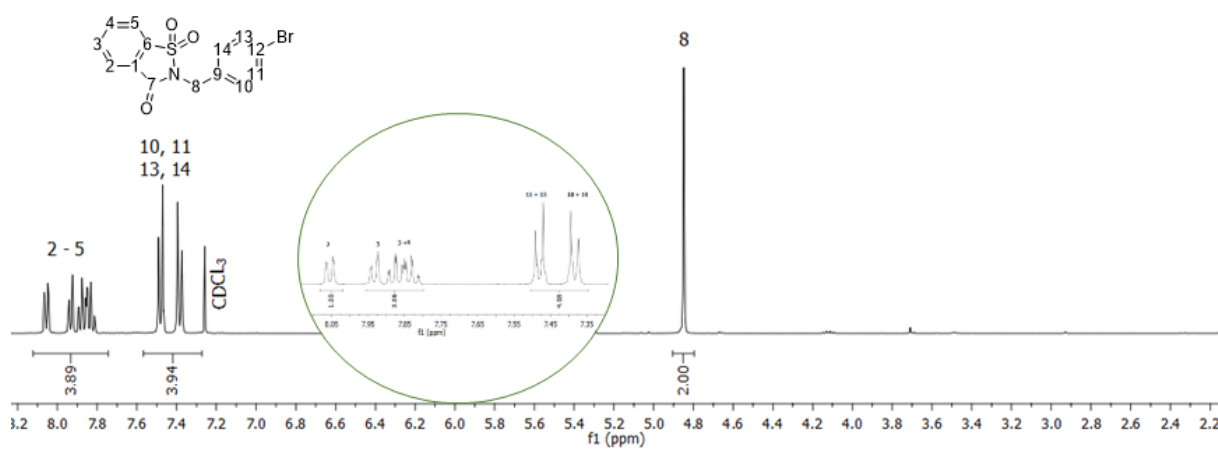


Anhang 23. ¹H-NMR von 22.

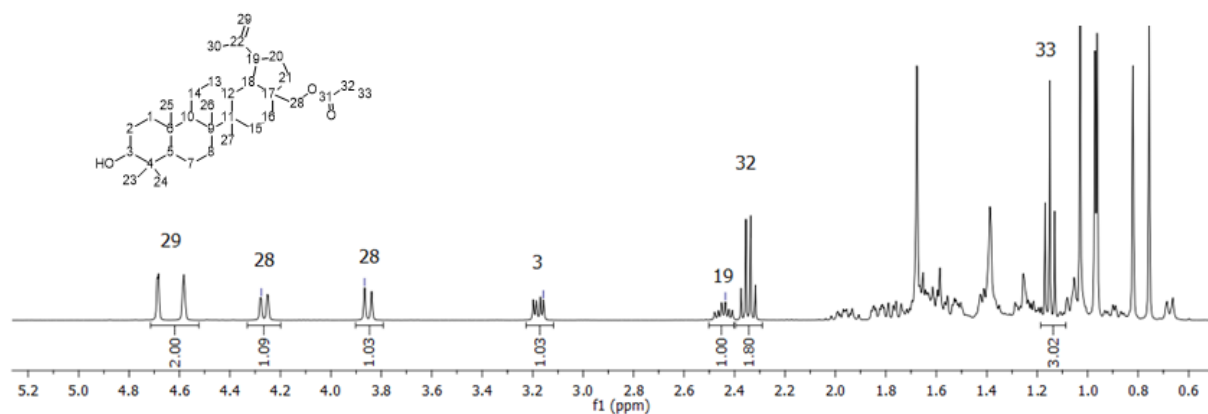
8.4 Charakterisierung der Saccharin-Derivate mit und ohne Betulin (22 -29)



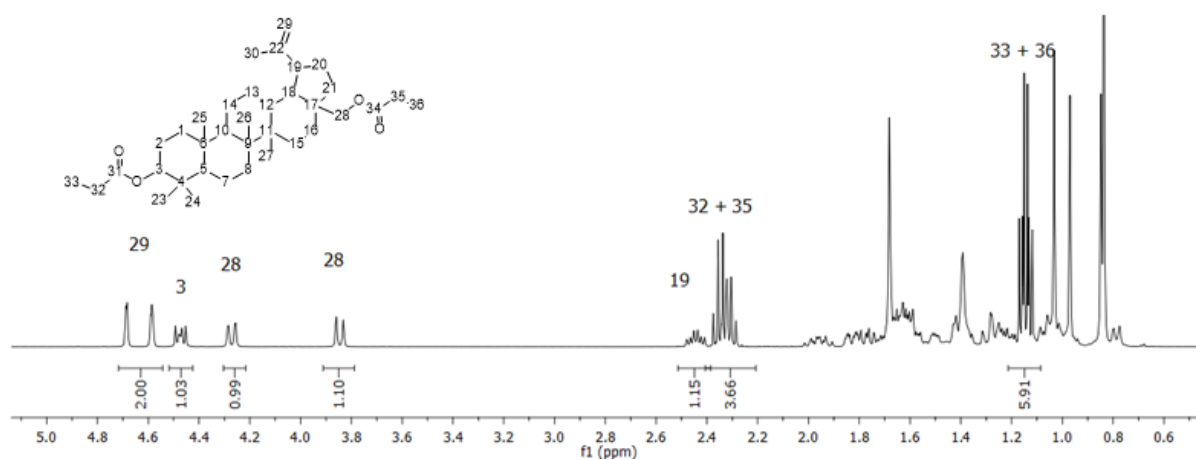
Anhang 24. ¹H-NMR von 23.



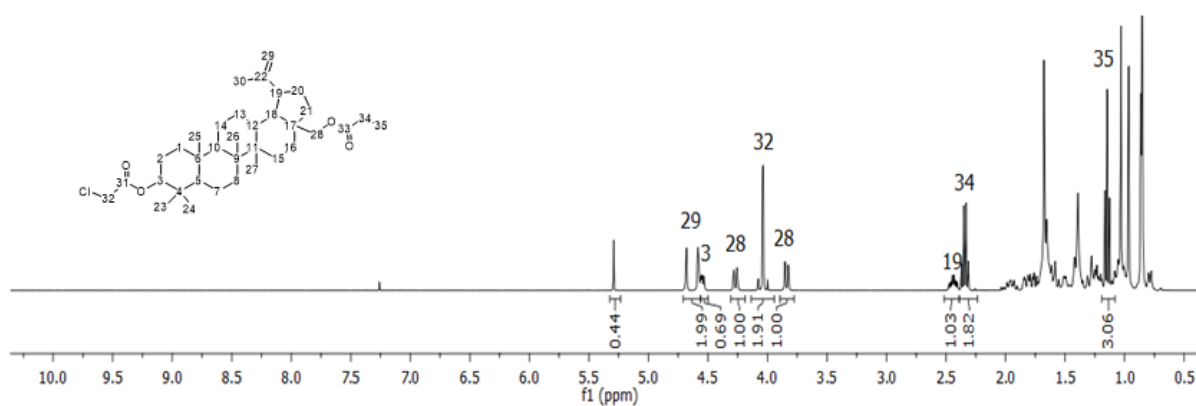
Anhang 25. ¹H-NMR von 24.



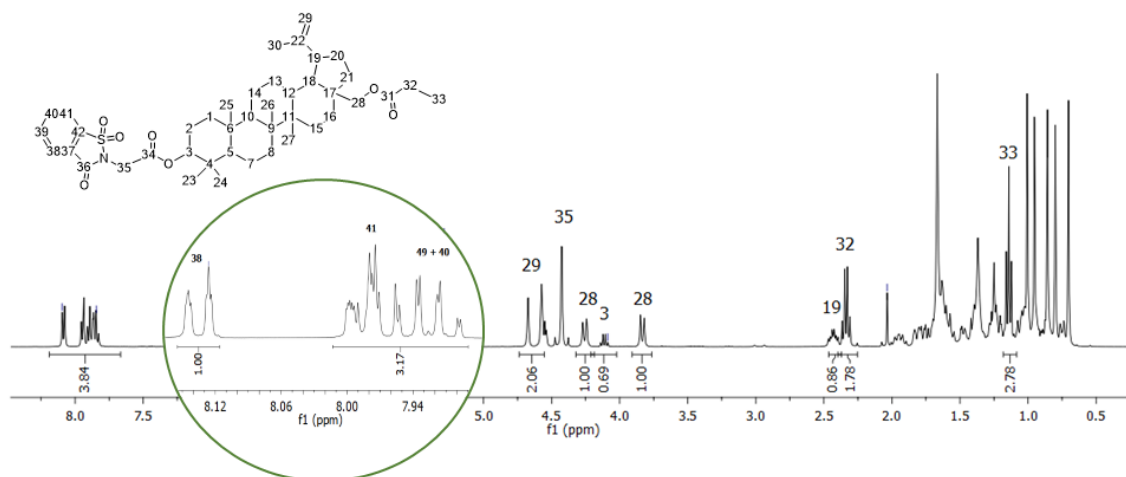
Anhang 26. ^1H -NMR von 25a.



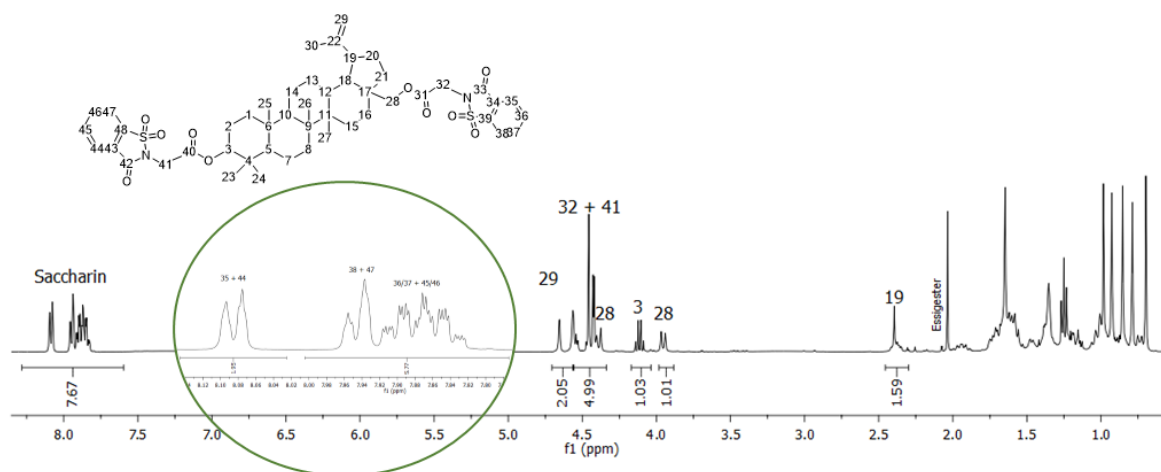
Anhang 27. ^1H -NMR von 25b.



Anhang 28. ^1H -NMR von 26.



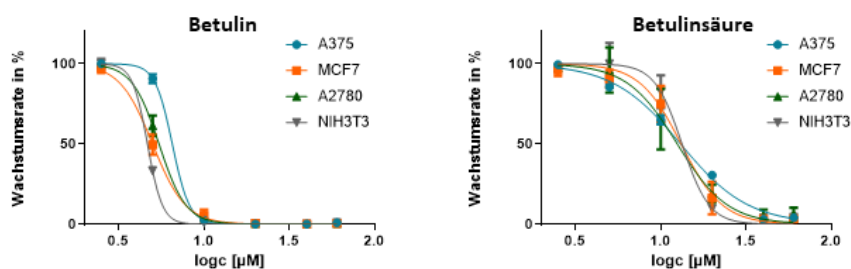
Anhang 29. ¹H-NMR von 28.



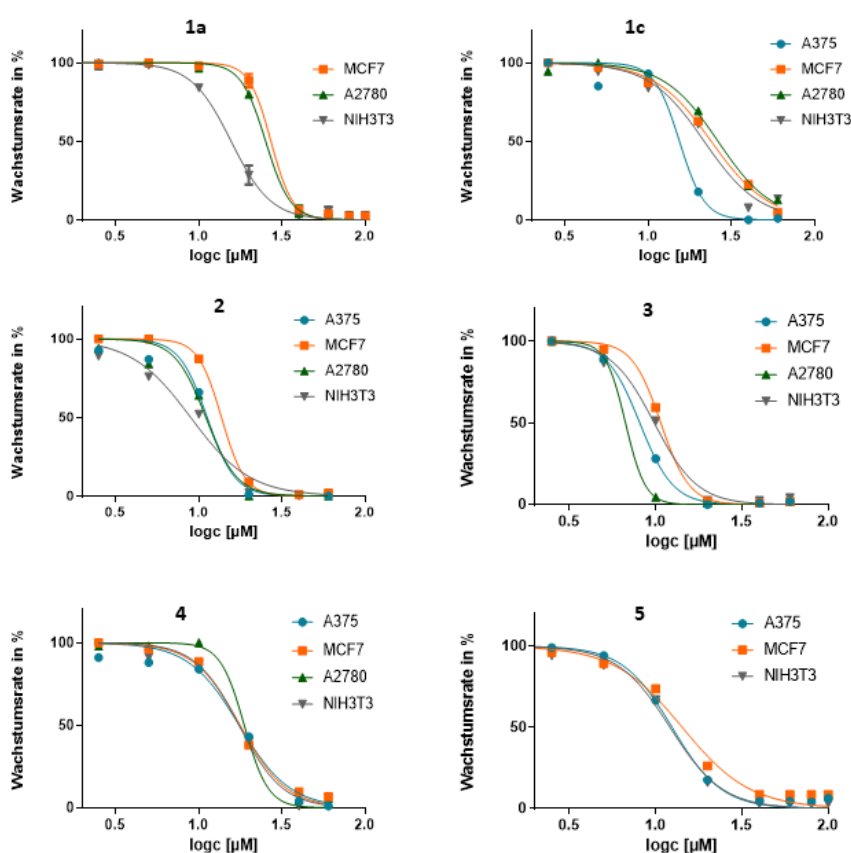
Anhang 30. ¹H-NMR von 29.

8.5 Dosis-Wirkungs-Kurven der Bestimmung der Zytotoxizität an humanen Zelllinien

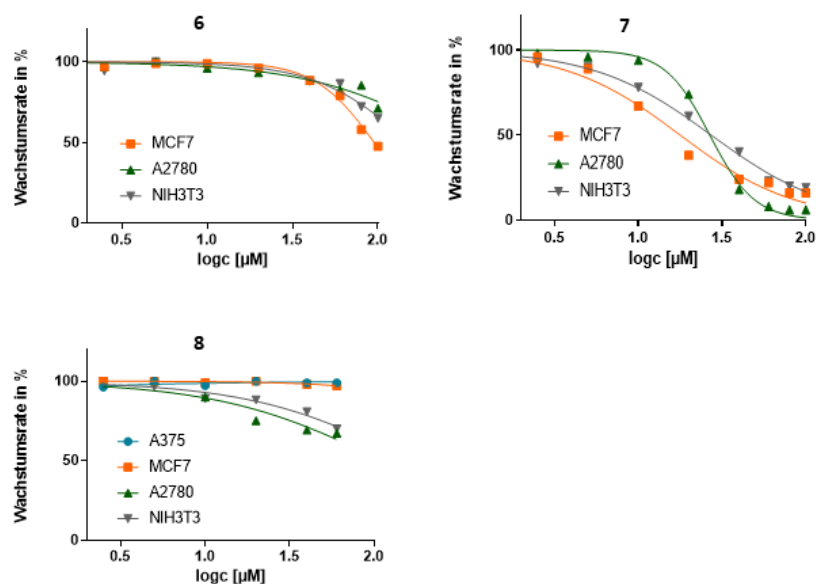
8.5.1 Zytotoxizität an humanen Zelllinien



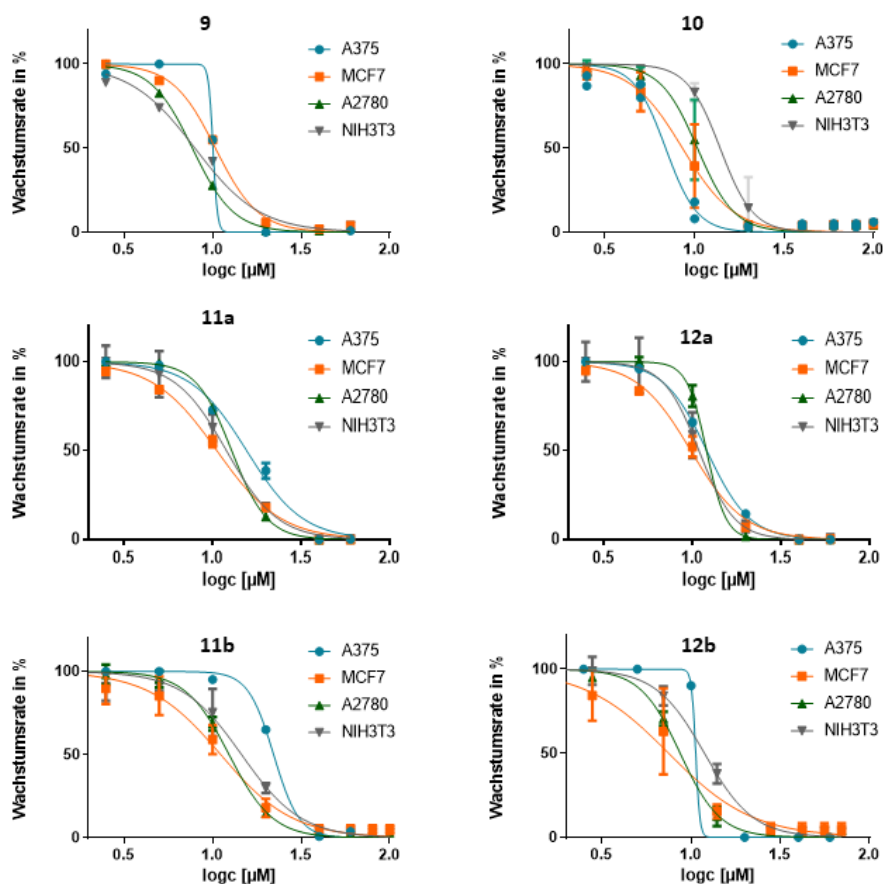
Anhang 31. Wirkungs-Dosis-Kurven von Betulin und Betulinsäure, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.



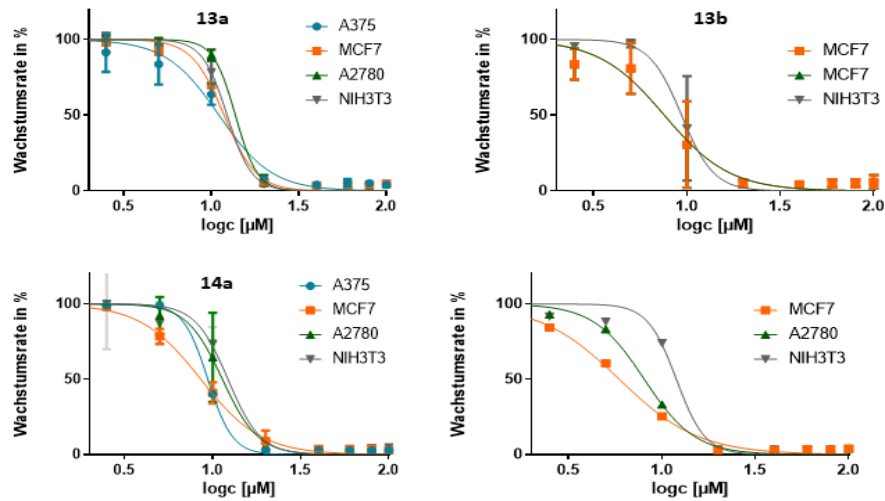
Anhang 32. Wirkungs-Dosis-Kurven von den Sulfamaten **1a** - **5**, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.



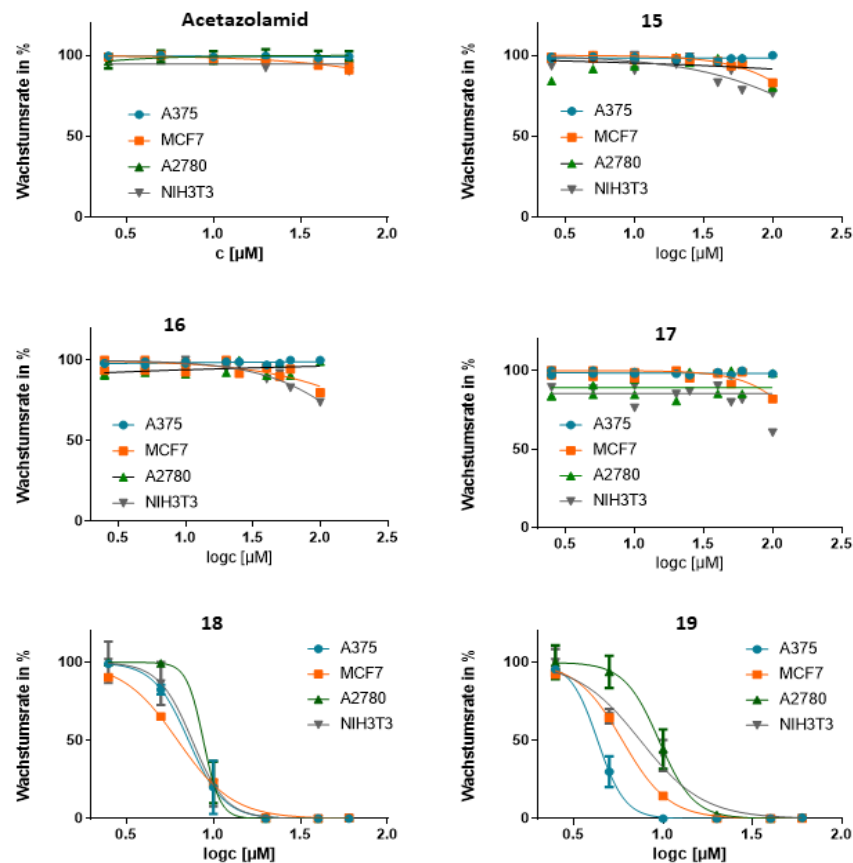
Anhang 33. Wirkungs-Dosis-Kurven von den Sulfamaten **1a** - **5**, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.



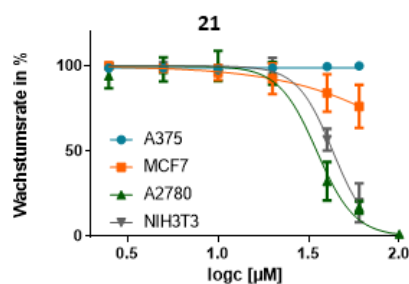
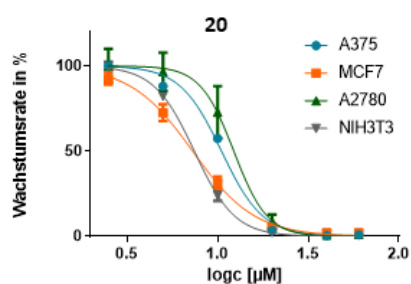
Anhang 34. Wirkungs-Dosis-Kurven von den Sulfonamiden **9** - **12b**, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.



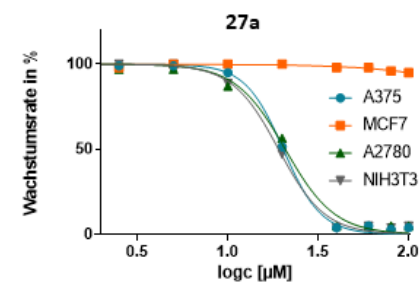
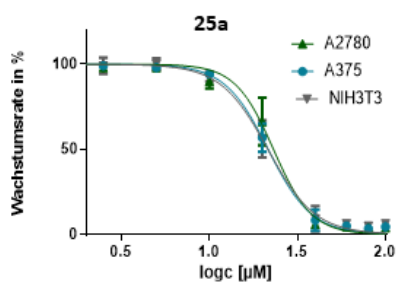
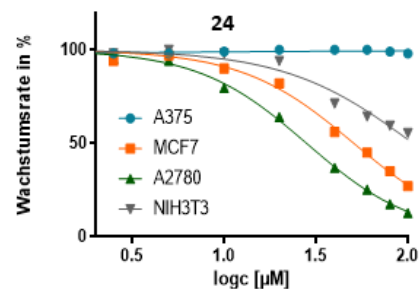
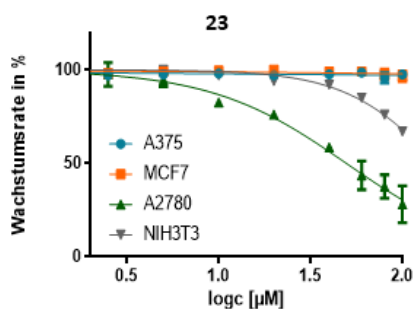
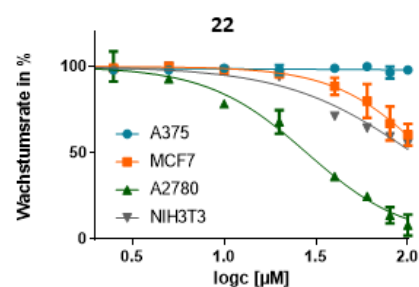
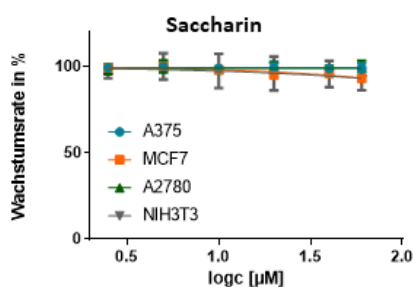
Anhang 35. Wirkungs-Dosis-Kurven von den Sulfonamiden **13a**, **13b** und **14a**, **14b**, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.



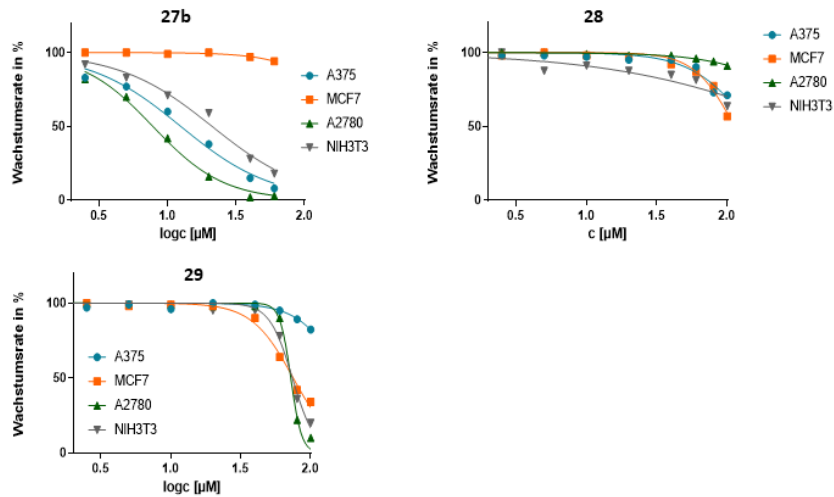
Anhang 36. Wirkungs-Dosis-Kurven von **Acetazolamid** und den Acetazolamid basierten Konjugaten **15** - **19**, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.



Anhang 37. Wirkungs-Dosis-Kurven von den Acetazolamid basierten Konjugaten **20** & **21**, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.

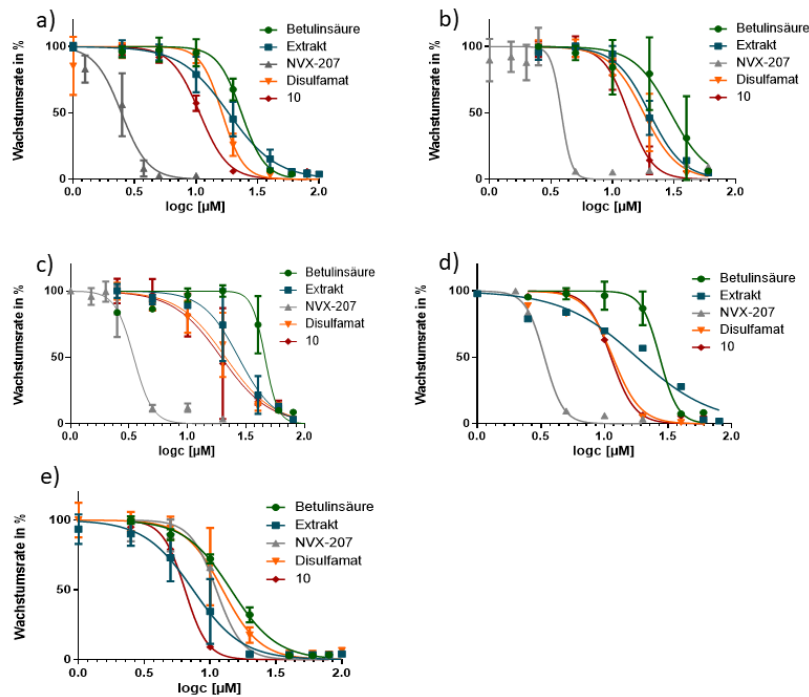


Anhang 38. Wirkungs-Dosis-Kurven von **Saccharin** und den Saccharin basierten Konjugaten **22** - **27a**, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.

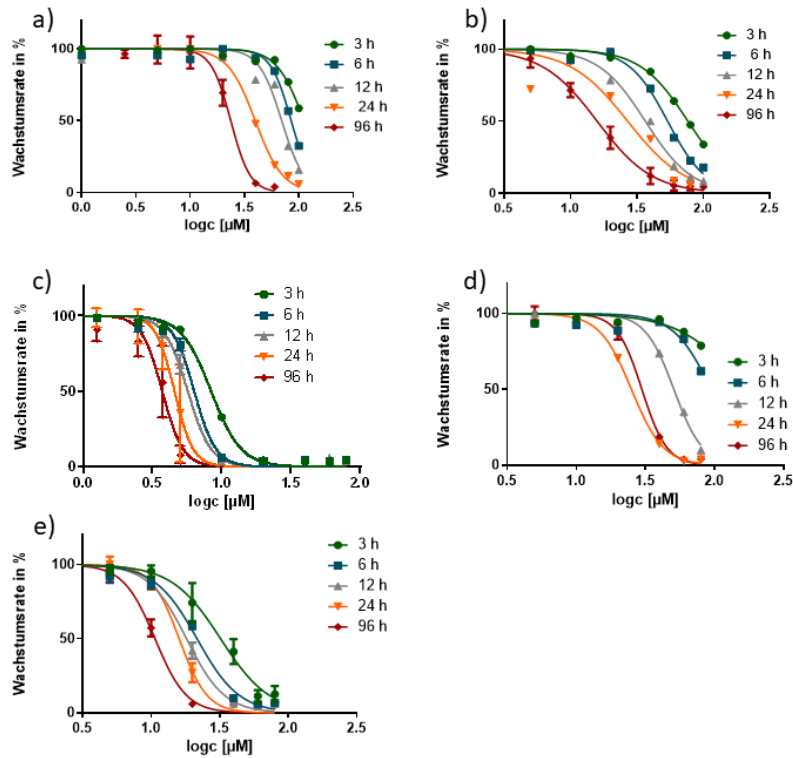


Anhang 39. Wirkungs-Dosis-Kurven von **Saccharin** und den Saccharin basierten Konjugaten **27b** - **29**, ermittelt mit Hilfe des SRB-Assays nach 96 Stunden Behandlung.

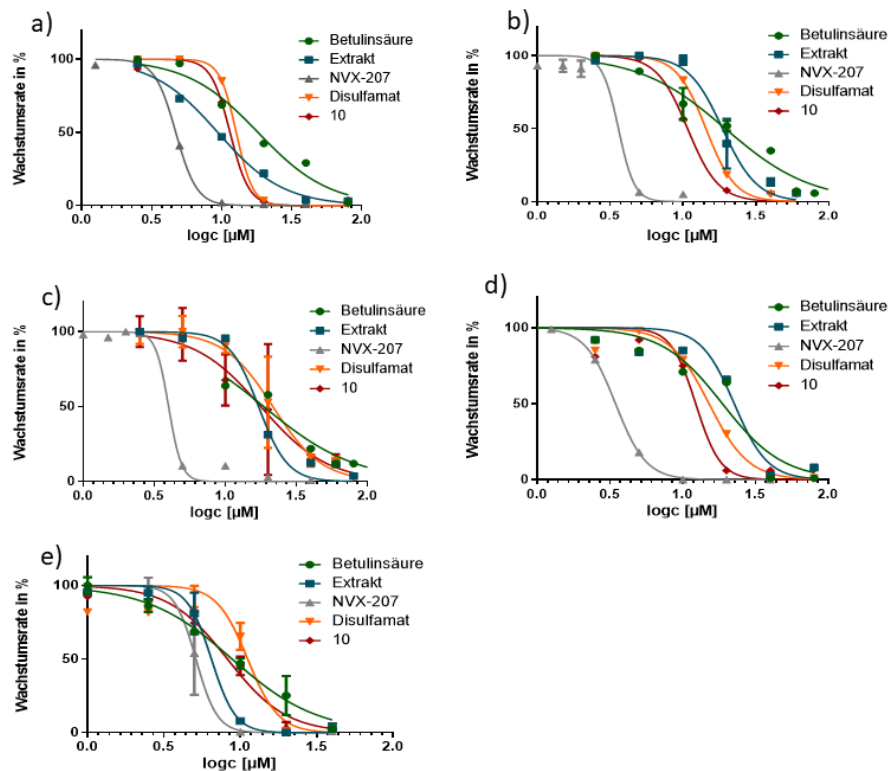
8.5.2 Zytotoxizität an equinen Zelllinien



Anhang 40. Dosis-Wirkungskurven der getesteten Substanzen Betulinsäure, Extrakt, **NVX-207**, 5 und 10 für jede der fünf Zelllinien a) MelDuWi, b) sRGO1, c) sRGO2, d) PriFri2 und e) A375.



Anhang 41. Dosis-Wirkungskurven der zeitabhängigen SRB-Messung an der Zelllinie MelDuWi nach einer Behandlungsdauer von 3, 6, 12, 24 (orange) und 96 Stunden (rot) mit den Substanzen a) Betulinsäure, b) Borkenextrakt der Platane, c) NVX-207, d) Betulinyl-3,28-O,O'-disulfamat und e) Verbindung **10**.



Anhang 42. Dosis-Wirkungskurve aller (mit dem MTT-Assay) getesteten *equinen* Zelllinien. Für jede der fünf Zelllinien a) MelDuWi, b) sRGO1, c) sRGO2, d) PriFri2 und e) A375 sind die Dosis-Wirkungskurven der Substanzen Betulinsäure, Borkenextrakt der Platane, NVX-207, 5 und **10** (rot) dargestellt.

8.6 Untersuchung der Zelltodmechanismen

Für jede Methode und Zelllinie wurde eine repräsentative Messung gezeigt.

8.6.1 AnnexinV-Assay

8.6.1.1 Zelllinie MelDuWi

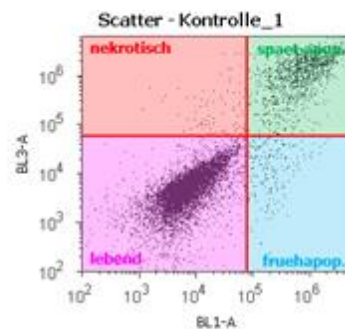
24 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 15_4_20 Duwi 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,593	---	100.000%
nekrotisch	85	0.802%	0.802%
spät apopt.	1,198	11.309%	11.309%
lebend	9,084	85.755%	85.755%
frühapop.	226	2.133%	2.133%
RS	10,000	94.402%	94.402%

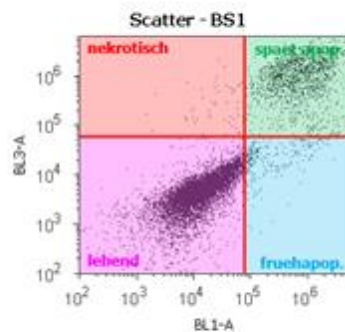


Experiment Name: 15_4_20 Duwi 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,862	---	100.000%
nekrotisch	64	0.589%	0.589%
spät apopt.	1,460	13.441%	13.441%
lebend	9,058	83.392%	83.392%
frühapop.	280	2.578%	2.578%
RS	10,000	92.064%	92.064%

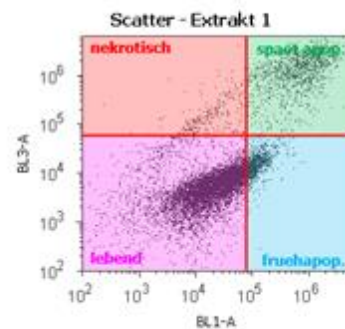


Experiment Name: 15_4_20 Duwi 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,992	---	100.000%
nekrotisch	246	2.238%	2.238%
spät apopt.	1,085	9.871%	9.871%
lebend	8,740	79.512%	79.512%
frühapop.	921	8.379%	8.379%
RS	10,137	92.222%	92.222%

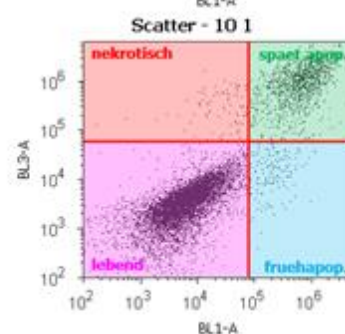


Experiment Name: 15_4_20 Duwi 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,076	---	100.000%
nekrotisch	101	0.912%	0.912%
spät apopt.	1,152	10.401%	10.401%
lebend	9,663	87.243%	87.243%
frühapop.	160	1.445%	1.445%
RS	10,005	90.330%	90.330%



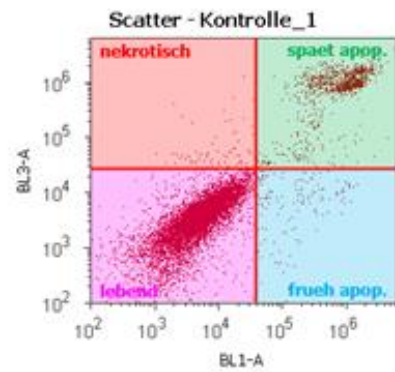
Anhang 43. AnnexinV an der Zelllinie MelDuWi nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und 10. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **12_02_20 DuWi 2xIC50 24h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle_1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,704	---	100.000%
RS	10,000	93.423%	93.423%
nekrotisch	72	0.720%	0.673%
spät apopt.	1,066	10.660%	9.959%
lebend	8,665	86.650%	80.951%
früh apopt.	197	1.970%	1.840%

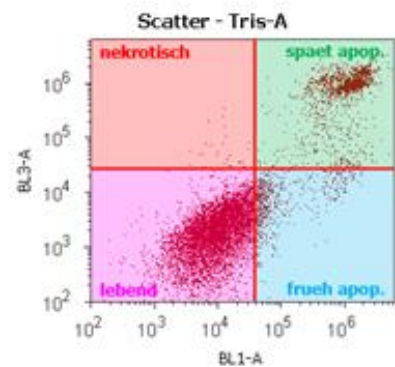


Experiment Name: **12_02_20 DuWi 2xIC50 24h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Tris-A**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,951	---	100.000%
RS	10,000	91.316%	91.316%
nekrotisch	28	0.280%	0.256%
spät apopt.	1,559	15.590%	14.236%
lebend	7,749	77.490%	70.761%
früh apopt.	664	6.640%	6.063%

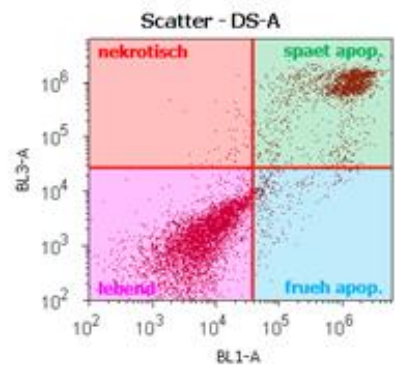


Experiment Name: **12_02_20 DuWi 2xIC50 24h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS-A**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,548	---	100.000%
RS	10,000	86.595%	86.595%
nekrotisch	52	0.520%	0.450%
spät apopt.	2,108	21.080%	18.254%
lebend	7,486	74.860%	64.825%
früh apopt.	354	3.540%	3.065%



Anhang 44. AnnexinV an der Zelllinie MeDuWi nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

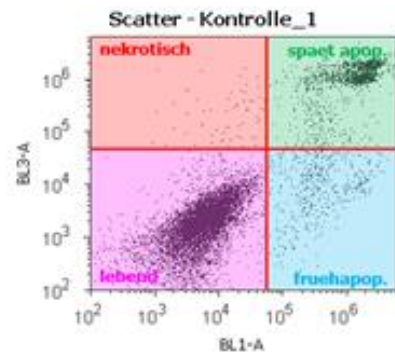
48 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **16_4_20 Duwi 48h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle_1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,934	---	100.000%
nekrotisch	65	0.594%	0.594%
spaat apop.	1,445	13.216%	13.216%
lebend	8,951	81.864%	81.864%
fruehapop.	473	4.326%	4.326%
RS	10,031	91.741%	91.741%

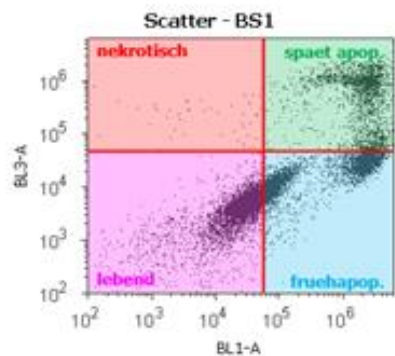


Experiment Name: **16_4_20 Duwi 48h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,204	---	100.000%
nekrotisch	51	0.455%	0.455%
spaat apop.	2,359	21.055%	21.055%
lebend	5,197	46.385%	46.385%
fruehapop.	3,597	32.105%	32.105%
RS	10,033	89.548%	89.548%

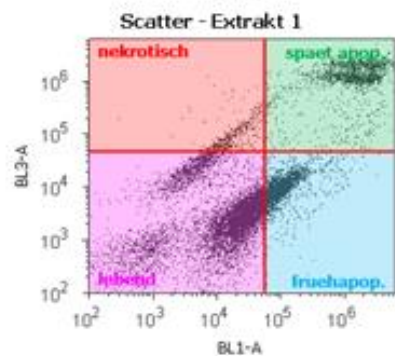


Experiment Name: **16_4_20 Duwi 48h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Extrakt 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	13,257	---	100.000%
nekrotisch	413	3.115%	3.115%
spaat apop.	1,651	12.454%	12.454%
lebend	8,813	66.478%	66.478%
fruehapop.	2,380	17.953%	17.953%
RS	10,172	76.729%	76.729%

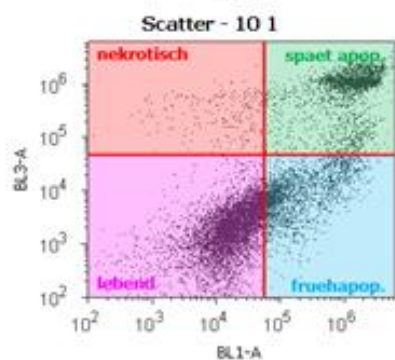


Experiment Name: **16_4_20 Duwi 48h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	12,106	---	100.000%
nekrotisch	235	1.941%	1.941%
spaat apop.	2,436	20.122%	20.122%
lebend	7,329	60.540%	60.540%
fruehapop.	2,106	17.396%	17.396%
RS	10,000	82.604%	82.604%



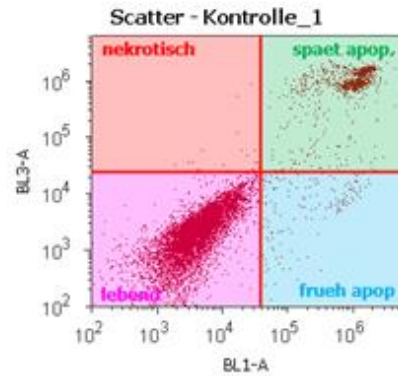
Anhang 45. AnnexinV an der Zelllinie MeDuWi nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und **10**. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 13_02_20 DuWi 2xIC50 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,000	---	100.000%
R5	9,223	92.230%	92.230%
nekrotisch	21	0.228%	0.210%
spät apopt.	866	9.390%	8.660%
lebend	8,141	88.268%	81.410%
früh apopt.	195	2.114%	1.950%

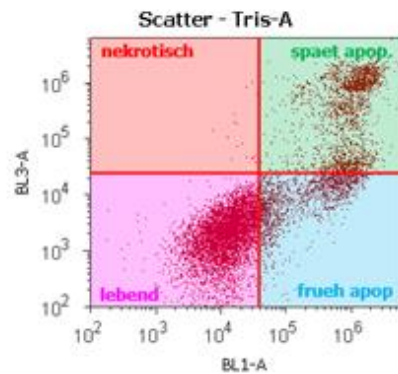


Experiment Name: 13_02_20 DuWi 2xIC50 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Tris-A

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,612	---	100.000%
R5	10,000	86.118%	86.118%
nekrotisch	16	0.160%	0.138%
spät apopt.	2,156	21.560%	18.567%
lebend	6,112	61.120%	52.635%
früh apopt.	1,716	17.160%	14.778%

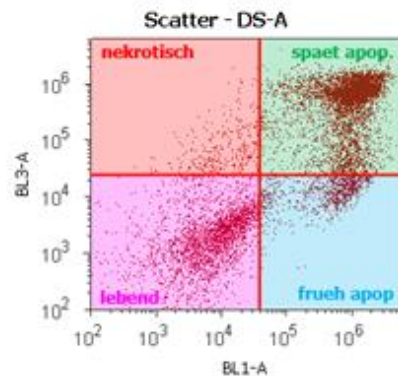


Experiment Name: 13_02_20 DuWi 2xIC50 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS-A

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	15,200	---	100.000%
R5	10,000	65.789%	65.789%
nekrotisch	292	2.920%	1.921%
spät apopt.	5,256	52.560%	34.579%
lebend	3,502	35.020%	23.039%
früh apopt.	950	9.500%	6.250%



Anhang 46. AnnexinV an der Zelllinie MeDuWi nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

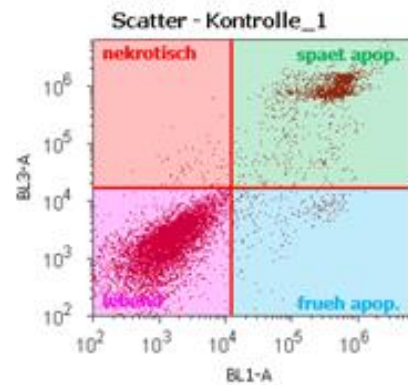
72 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **8_5_20 DuWi 72h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle_1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,992	---	100.000%
RS	10,034	91.285%	91.285%
nekrotisch	59	0.588%	0.537%
späet apop.	1,680	16.743%	15.284%
lebend	8,037	80.098%	73.117%
frueh apop.	258	2.571%	2.347%

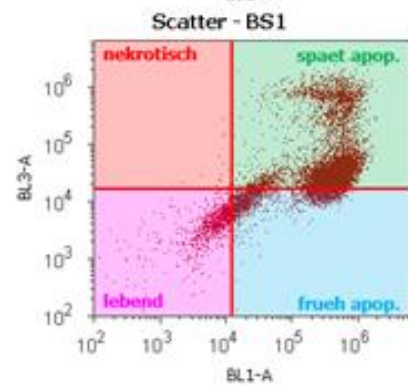


Experiment Name: **8_5_20 DuWi 72h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,717	---	100.000%
RS	10,017	85.491%	85.491%
nekrotisch	15	0.150%	0.128%
späet apop.	6,899	68.873%	58.880%
lebend	986	9.843%	8.415%
frueh apop.	2,117	21.134%	18.068%

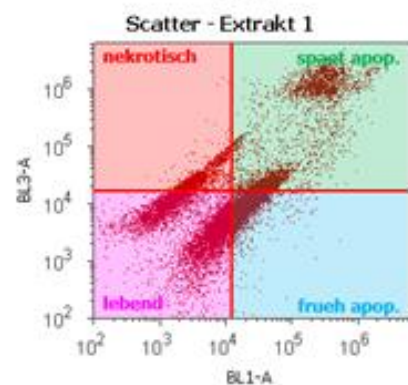


Experiment Name: **8_5_20 DuWi 72h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Extrakt 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	21,388	---	100.000%
RS	17,442	81.550%	81.550%
nekrotisch	1,441	8.262%	6.737%
späet apop.	3,672	21.053%	17.169%
lebend	7,073	40.552%	33.070%
frueh apop.	5,256	30.134%	24.575%

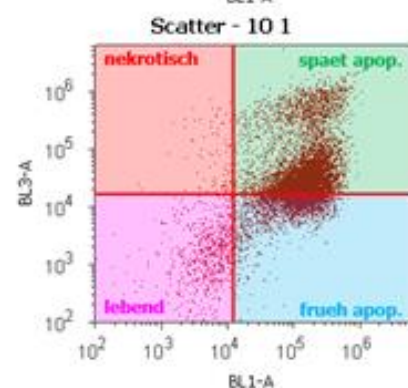


Experiment Name: **8_5_20 DuWi 72h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	14,382	---	100.000%
RS	10,000	69.531%	69.531%
nekrotisch	87	0.870%	0.605%
späet apop.	6,321	63.210%	43.951%
lebend	934	9.340%	6.494%
frueh apop.	2,658	26.580%	18.481%



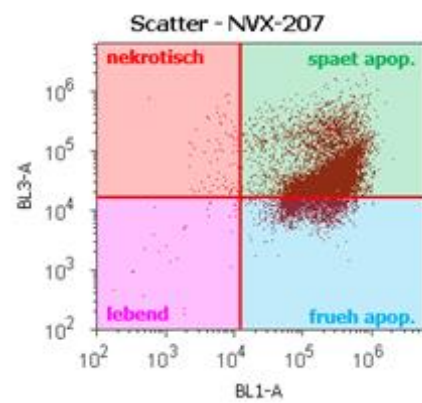
Anhang 47. AnnexinV an der Zelllinie MelDuWi nach 72 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und **10**. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **8_5_20 DuWi 72h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **NVX-207**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	16,581	---	100.000%
☒ R5	10,087	60.835%	60.835%
☒ nekrotisch	79	0.783%	0.476%
☒ spaet apop.	7,858	77.902%	47.392%
☒ lebend	56	0.555%	0.338%
☒ frueh apop.	2,094	20.759%	12.629%

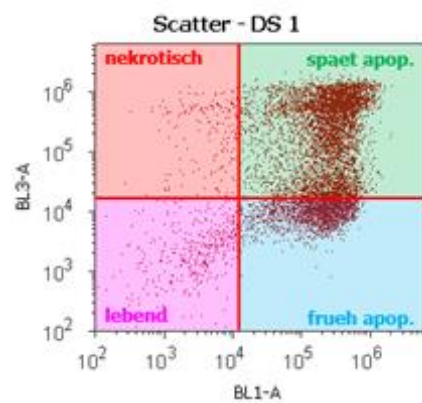


Experiment Name: **8_5_20 DuWi 72h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	12,759	---	100.000%
☒ R5	8,325	65.248%	65.248%
☒ nekrotisch	186	2.234%	1.458%
☒ spaet apop.	5,470	65.706%	42.872%
☒ lebend	483	5.802%	3.786%
☒ frueh apop.	2,186	26.258%	17.133%



Anhang 48. AnnexinV an der Zelllinie MelDuWi nach 72 h den Substanzen **NVX-207** (Tris) und **5 (DS)**. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

8.6.1.2 Zelllinie sRGO2

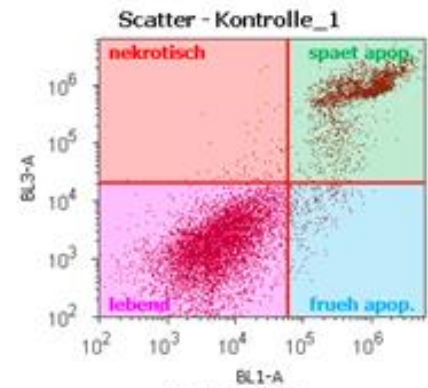
24 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 25_9_19 sRGO2 24 h 2xIC50(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,294	---	100.000%
R5	9,968	88.259%	88.259%
nekrotisch	80	0.803%	0.708%
spät apop.	2,257	22.642%	19.984%
lebend	7,384	74.077%	65.380%
früh apop.	247	2.478%	2.187%

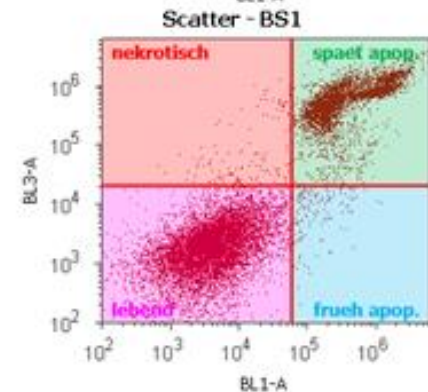


Experiment Name: 25_9_19 sRGO2 24 h 2xIC50(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	16,438	---	100.000%
R5	15,000	91.252%	91.252%
nekrotisch	146	0.973%	0.888%
spät apop.	4,647	30.980%	28.270%
lebend	10,050	67.000%	61.139%
früh apop.	157	1.047%	0.955%

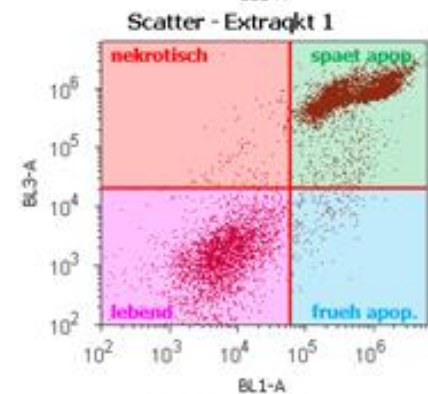


Experiment Name: 25_9_19 sRGO2 24 h 2xIC50(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,002	---	100.000%
R5	9,126	82.949%	82.949%
nekrotisch	111	1.216%	1.009%
spät apop.	5,232	57.331%	47.555%
lebend	3,608	39.535%	32.794%
früh apop.	175	1.918%	1.591%

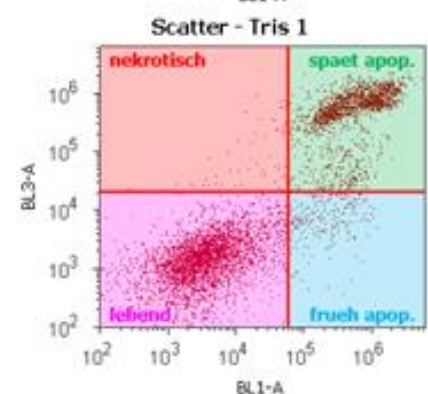


Experiment Name: 25_9_19 sRGO2 24 h 2xIC50(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Tris 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	8,647	---	100.000%
R5	6,123	70.811%	70.811%
nekrotisch	58	0.947%	0.671%
spät apop.	1,923	31.406%	22.239%
lebend	3,918	63.988%	45.311%
früh apop.	224	3.658%	2.590%



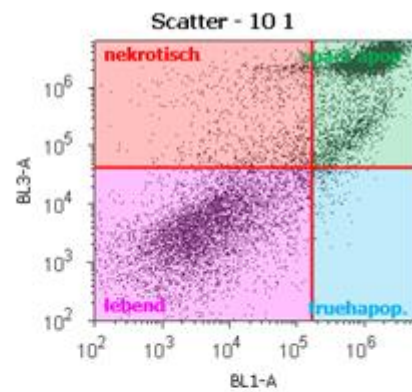
Anhang 49. AnnexinV an der Zelllinie sRGO2 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207 (Tris). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **12_6_19 sRGO1 24 h 2xICS0**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	22,149	---	100.000%
☒ nekrotisch	979	4.420%	4.420%
☒ spaet apop.	5,274	23.811%	23.811%
☒ lebend	15,740	71.064%	71.064%
☒ fruehapop.	156	0.704%	0.704%
☒ R5	20,000	90.298%	90.298%

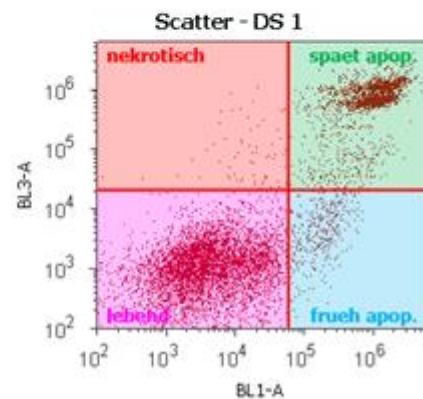


Experiment Name: **25_9_19 sRGO2 24 h 2xICS0(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	17,972	---	100.000%
☒ R5	10,000	55.642%	55.642%
☒ nekrotisch	66	0.660%	0.367%
☒ spaet apop.	2,073	20.730%	11.535%
☒ lebend	7,486	74.860%	41.654%
☒ frueh apop.	375	3.750%	2.087%



Anhang 50. AnnexinV an der Zelllinie sRGO2 nach 24 h von 10 und 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

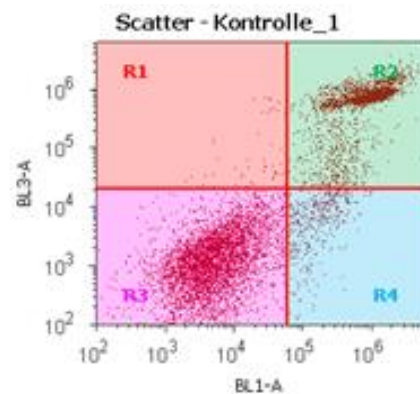
48 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 26_9_19 sRGO2 48 h 2xIC50

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_1

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	11,344	---	100.000%
☒ R5	10,000	88.152%	88.152%
☐ R1	51	0.510%	0.450%
☐ R2	2,403	24.030%	21.183%
☐ R3	7,109	71.090%	62.667%
☐ R4	437	4.370%	3.852%

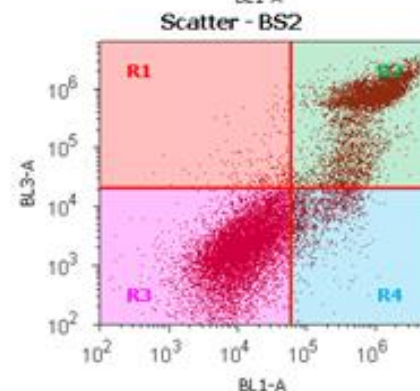


Experiment Name: 26_9_19 sRGO2 48 h 2xIC50

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS2

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	22,865	---	100.000%
☒ R5	20,000	87.470%	87.470%
☐ R1	207	1.035%	0.905%
☐ R2	7,098	35.490%	31.043%
☐ R3	11,416	57.080%	49.928%
☐ R4	1,279	6.395%	5.594%

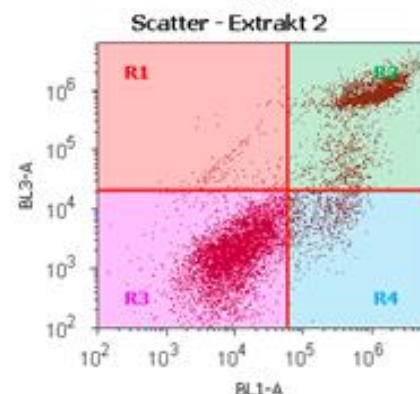


Experiment Name: 26_9_19 sRGO2 48 h 2xIC50

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt 2

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	11,498	---	100.000%
☒ R5	10,000	86.972%	86.972%
☐ R1	138	1.380%	1.200%
☐ R2	2,947	29.470%	25.631%
☐ R3	6,229	62.290%	54.175%
☐ R4	686	6.860%	5.966%

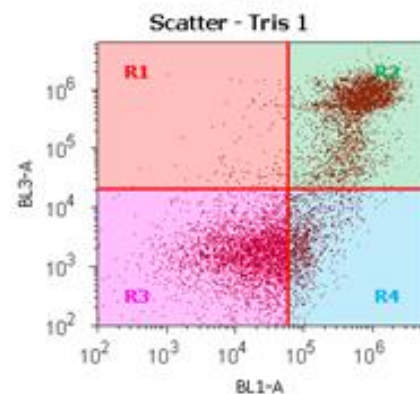


Experiment Name: 26_9_19 sRGO2 48 h 2xIC50

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Tris 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	17,551	---	100.000%
☒ R5	8,619	49.108%	49.108%
☐ R1	113	1.311%	0.644%
☐ R2	3,358	38.960%	19.133%
☐ R3	3,830	44.437%	21.822%
☐ R4	1,318	15.292%	7.510%



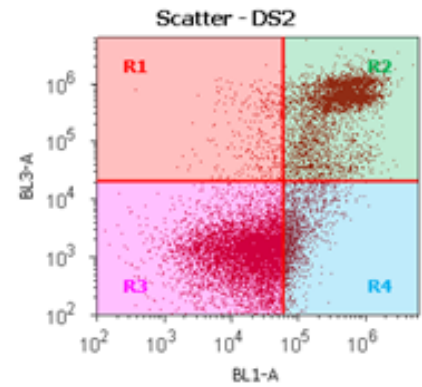
Anhang 51. AnnexinV an der Zelllinie sRGO2 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207 (Tris). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 26_9_19 sRGO2 48 h 2xIC50

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	25,031	---	100.000%
R5	15,190	60.685%	60.685%
R1	329	2.166%	1.314%
R2	4,198	27.637%	16.771%
R3	8,971	59.059%	35.840%
R4	1,692	11.139%	6.760%

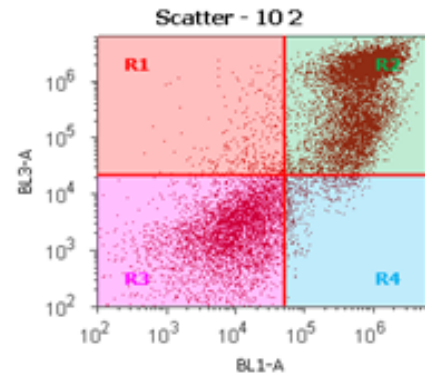


Experiment Name: 26_9_19 sRGO2 48 h 2xIC50(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	22,405	---	100.000%
R5	19,210	85.740%	85.740%
R1	324	1.687%	1.446%
R2	9,209	47.939%	41.102%
R3	9,098	47.361%	40.607%
R4	579	3.014%	2.584%



Anhang 52. AnnexinV an der Zelllinie sRGO2 nach 48 h von 10 und 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

8.6.1.3 Zelllinie PriFri2

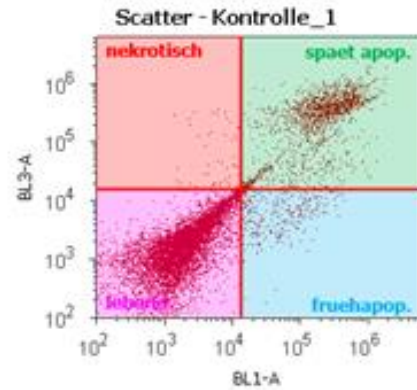
24 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 15_4_20 PriFri2 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,931	---	100.000%
R5	10,002	83.832%	83.832%
nekrotisch	59	0.590%	0.495%
spät apopt.	1,578	15.777%	13.226%
lebend	8,036	80.344%	67.354%
frühapop.	329	3.289%	2.758%

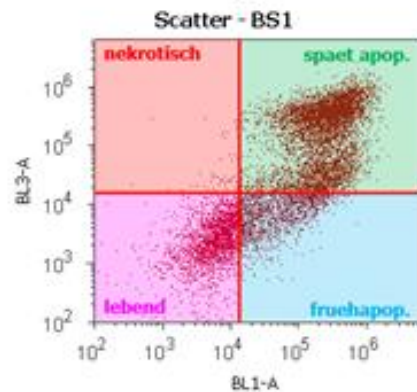


Experiment Name: 15_4_20 PriFri2 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	14,171	---	100.000%
R5	10,006	70.609%	70.609%
nekrotisch	62	0.620%	0.438%
spät apopt.	6,071	60.674%	42.841%
lebend	2,263	22.616%	15.969%
frühapop.	1,610	16.090%	11.361%

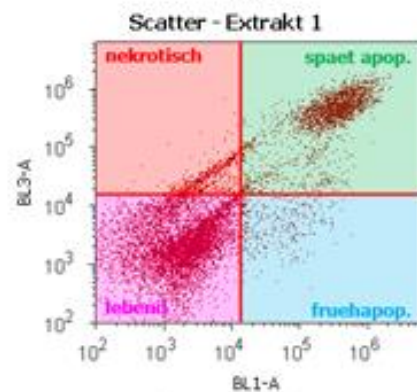


Experiment Name: 15_4_20 PriFri2 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	13,499	---	100.000%
R5	11,321	83.865%	83.865%
nekrotisch	536	4.735%	3.971%
spät apopt.	2,479	21.897%	18.364%
lebend	7,975	70.444%	59.078%
frühapop.	331	2.924%	2.452%

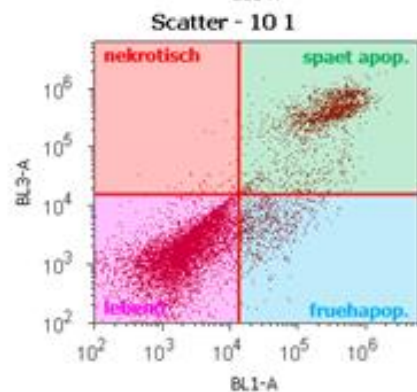


Experiment Name: 15_4_20 PriFri2 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	12,821	---	100.000%
R5	10,000	77.997%	77.997%
nekrotisch	49	0.490%	0.382%
spät apopt.	1,687	16.870%	13.158%
lebend	7,490	74.900%	58.420%
frühapop.	774	7.740%	6.037%



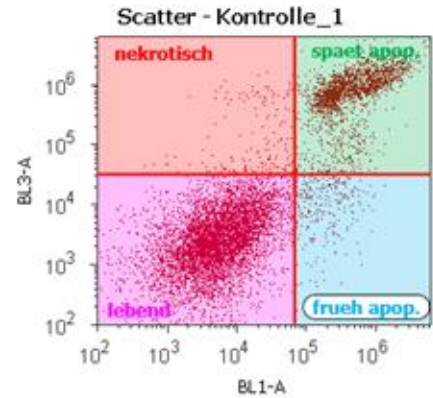
Anhang 53. AnnexinV an der Zelllinie PriFri2 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und **10**. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **29_1_20 PriFri 2xIC50 24h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle_1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	11,331	---	100.000%
☒ RS	10,397	91.757%	91.757%
☐ nekrotisch	173	1.664%	1.527%
☐ spaet apop.	2,187	21.035%	19.301%
☒ lebend	7,742	74.464%	68.326%
☐ frueh apop.	295	2.837%	2.603%

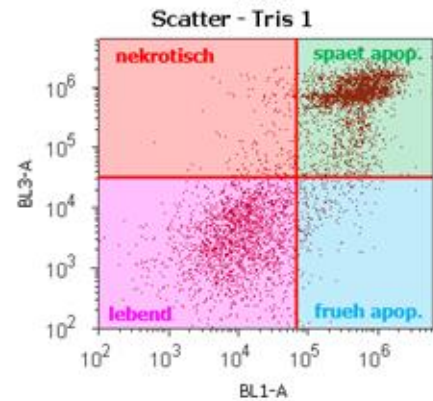


Experiment Name: **29_1_20 PriFri 2xIC50 24h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Tris 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	9,072	---	100.000%
☒ RS	5,802	63.955%	63.955%
☐ nekrotisch	178	3.068%	1.962%
☐ spaet apop.	2,864	49.362%	31.570%
☐ lebend	2,470	42.572%	27.227%
☐ frueh apop.	290	4.998%	3.197%

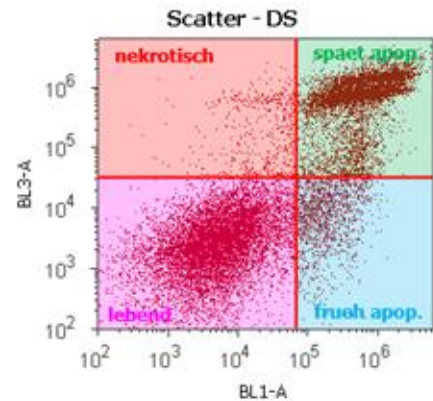


Experiment Name: **29_1_20 PriFri 2xIC50 24h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	26,314	---	100.000%
☒ RS	21,513	81.755%	81.755%
☐ nekrotisch	487	2.264%	1.851%
☐ spaet apop.	6,697	31.130%	25.450%
☐ lebend	12,522	58.207%	47.587%
☐ frueh apop.	1,807	8.400%	6.867%



Anhang 54. AnnexinV an der Zelllinie PriFri2 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

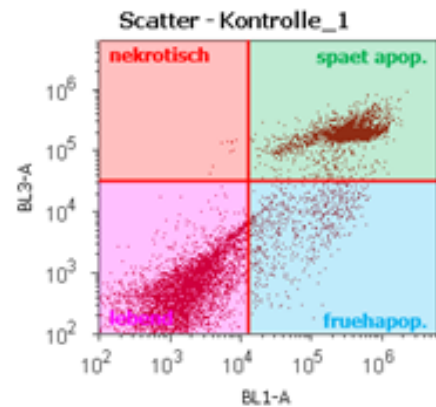
48 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 16_4_20 PriFri2 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	12,855	---	100.000%
R5	10,000	77.791%	77.791%
nekrotisch	10	0.100%	0.078%
spät apopt.	2,541	25.410%	19.767%
lebend	6,727	67.270%	52.330%
früheapop.	722	7.220%	5.616%

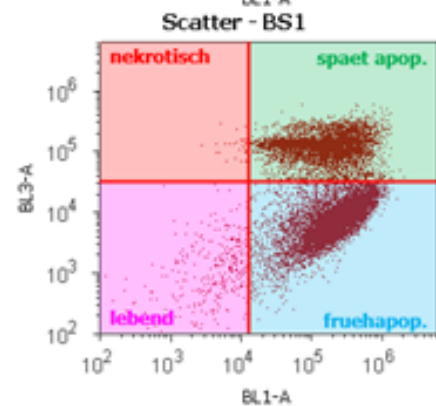


Experiment Name: 16_4_20 PriFri2 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	20,000	---	100.000%
R5	15,603	78.015%	78.015%
nekrotisch	33	0.211%	0.165%
spät apopt.	5,521	35.384%	27.605%
lebend	378	2.423%	1.890%
früheapop.	9,671	61.982%	48.355%

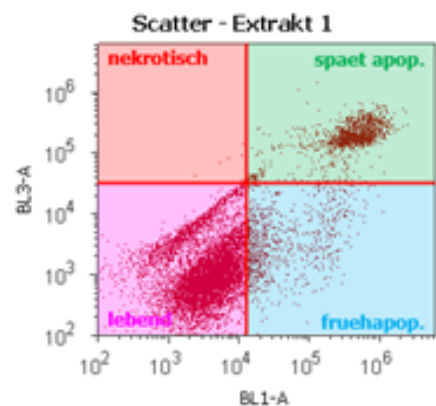


Experiment Name: 16_4_20 PriFri2 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	11,572	---	100.000%
R5	10,000	86.415%	86.415%
nekrotisch	10	0.100%	0.086%
spät apopt.	1,421	14.210%	12.280%
lebend	7,603	76.030%	65.702%
früheapop.	966	9.660%	8.348%

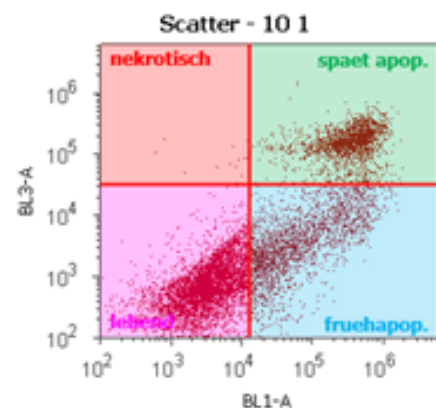


Experiment Name: 16_4_20 PriFri2 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	12,936	---	100.000%
R5	10,000	77.304%	77.304%
nekrotisch	14	0.140%	0.108%
spät apopt.	1,962	19.620%	15.167%
lebend	5,551	55.510%	42.911%
früheapop.	2,473	24.730%	19.117%



Anhang 55. AnnexinV an der Zelllinie PriFri2 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und 10. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **30_1_20 PriFri 2xIC50 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle_1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	21,866	---	100.000%
☒ R5	20,000	91.466%	91.466%
☐ nekrotisch	294	1.470%	1.345%
☐ spaet apop.	3,109	15.545%	14.218%
☐ lebend	16,014	80.070%	73.237%
☐ frueh apop.	583	2.915%	2.666%

Experiment Name: **30_1_20 PriFri 2xIC50 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS**

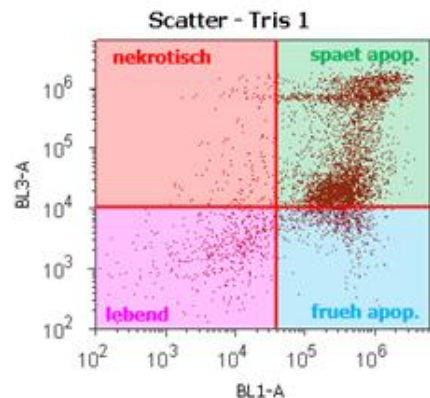
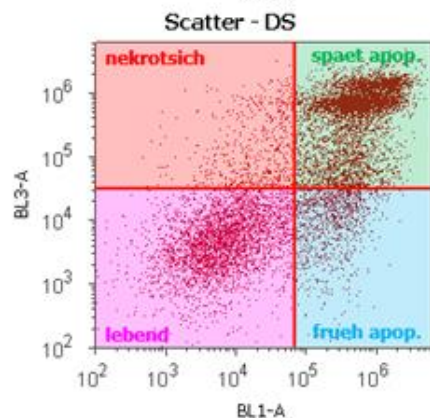
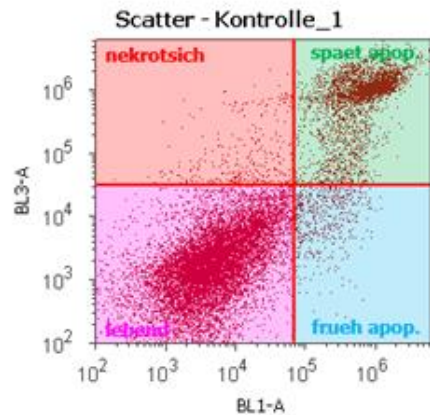
Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	14,387	---	100.000%
☒ R5	10,713	74.463%	74.463%
☐ nekrotisch	580	5.414%	4.031%
☐ spaet apop.	5,632	52.572%	39.146%
☐ lebend	3,361	31.373%	23.361%
☐ frueh apop.	1,140	10.641%	7.924%

Experiment Name: **20_1_20 PriFri 2xIC50 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Tris 1**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	13,230	---	100.000%
☒ R5	5,740	43.386%	43.386%
☐ nekrotisch	152	2.648%	1.149%
☐ spaet apop.	4,213	73.397%	31.844%
☐ lebend	577	10.052%	4.361%
☐ frueh apop.	798	13.902%	6.032%



Anhang 56. AnnexinV an der Zelllinie PriFri2 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

8.6.1.4 Zelllinie A375

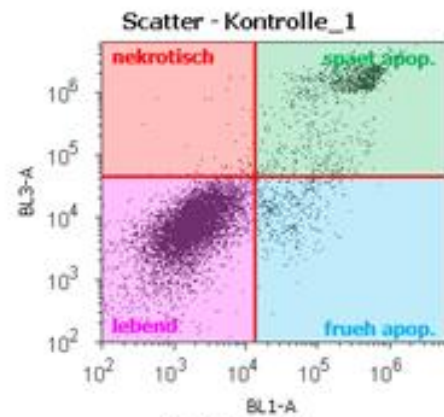
24 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 6_5_20 A375 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,891	---	100.000%
nekrotisch	67	0.615%	0.615%
spät apopt.	1,117	10.256%	10.256%
lebend	9,317	85.548%	85.548%
früh apopt.	390	3.581%	3.581%
RS	10,000	91.819%	91.819%

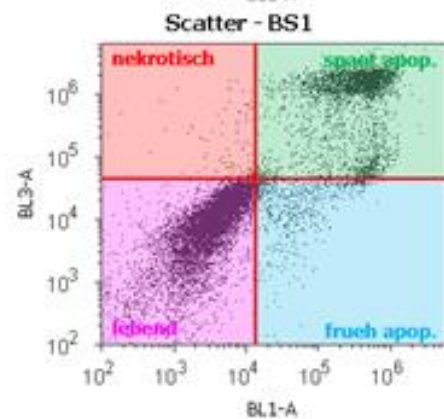


Experiment Name: 6_5_20 A375 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	12,388	---	100.000%
nekrotisch	131	1.057%	1.057%
spät apopt.	2,982	24.072%	24.072%
lebend	8,644	69.777%	69.777%
früh apopt.	631	5.094%	5.094%
RS	10,000	80.723%	80.723%

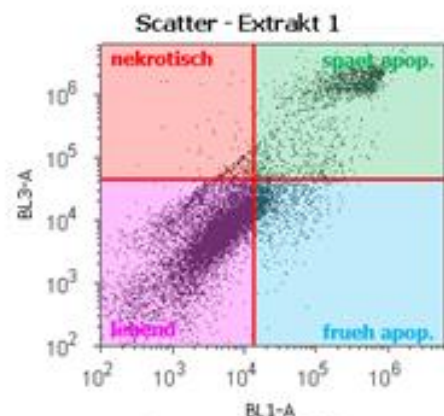


Experiment Name: 6_5_20 A375 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	12,631	---	100.000%
nekrotisch	197	1.560%	1.560%
spät apopt.	1,575	12.469%	12.469%
lebend	9,867	78.117%	78.117%
früh apopt.	992	7.854%	7.854%
RS	10,000	79.170%	79.170%

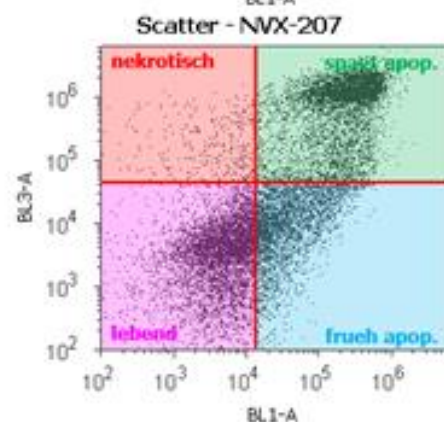


Experiment Name: 6_5_20 A375 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: NVX-207

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	15,331	---	100.000%
nekrotisch	369	2.407%	2.407%
spät apopt.	4,880	31.831%	31.831%
lebend	6,910	45.072%	45.072%
früh apopt.	3,172	20.690%	20.690%
RS	10,000	65.227%	65.227%



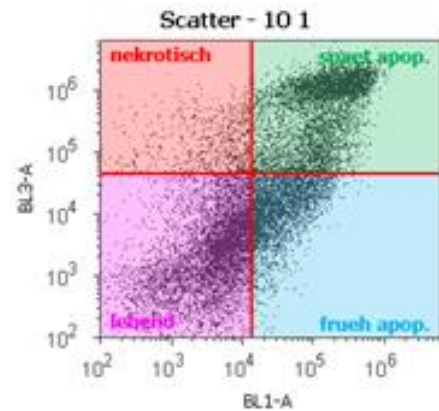
Anhang 57. AnnexinV an der Zelllinie A375 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207 (Tris). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 6_5_20 A375 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	18,205	---	100.000%
nekrotisch	784	4.307%	4.307%
spät apopt.	5,412	29.728%	29.728%
lebend	8,367	45.960%	45.960%
früh apopt.	3,642	20.005%	20.005%
RS	10,000	54.930%	54.930%

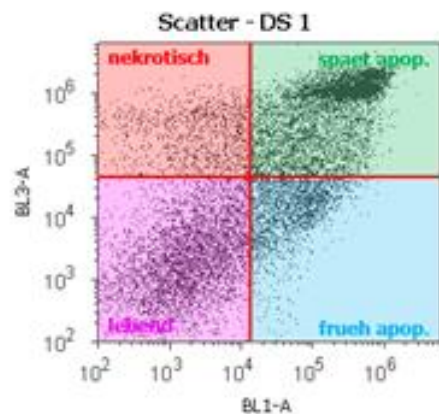


Experiment Name: 6_5_20 A375 24h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	16,085	---	100.000%
nekrotisch	1,318	8.194%	8.194%
spät apopt.	5,395	33.541%	33.541%
lebend	7,367	45.800%	45.800%
früh apopt.	2,005	12.465%	12.465%
RS	10,000	62.170%	62.170%



Anhang 58. AnnexinV an der Zelllinie A375 nach 24 h von Substanzen 10 und 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

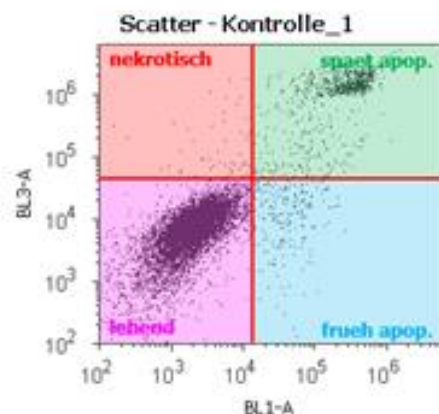
48 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 7_5_20 A375 48h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	10,841	---	100.000%
nekrotisch	53	0.489%	0.489%
spät apopt.	845	7.794%	7.794%
lebend	9,719	89.650%	89.650%
früh apopt.	224	2.066%	2.066%
R5	10,000	92.242%	92.242%

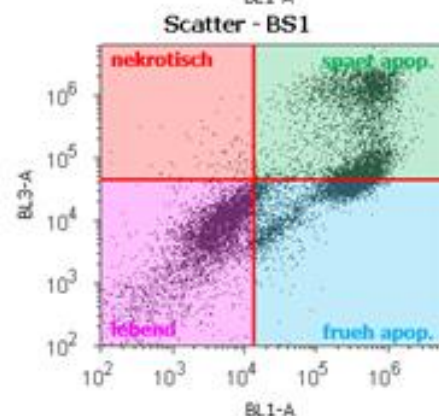


Experiment Name: 7_5_20 A375 48h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	13,495	---	100.000%
nekrotisch	101	0.748%	0.748%
spät apopt.	4,581	33.946%	33.946%
lebend	5,917	43.846%	43.846%
früh apopt.	2,896	21.460%	21.460%
R5	10,000	74.102%	74.102%

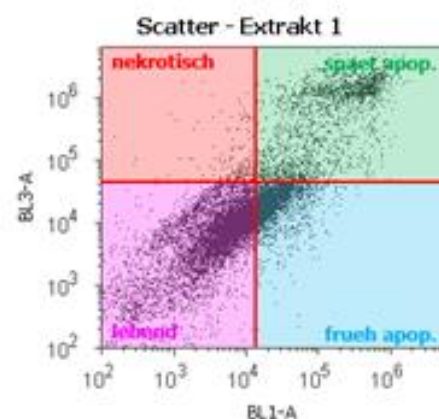


Experiment Name: 7_5_20 A375 48h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt 1

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	14,107	---	100.000%
nekrotisch	210	1.489%	1.489%
spät apopt.	1,953	13.844%	13.844%
lebend	9,189	65.138%	65.138%
früh apopt.	2,755	19.529%	19.529%
R5	10,000	70.887%	70.887%

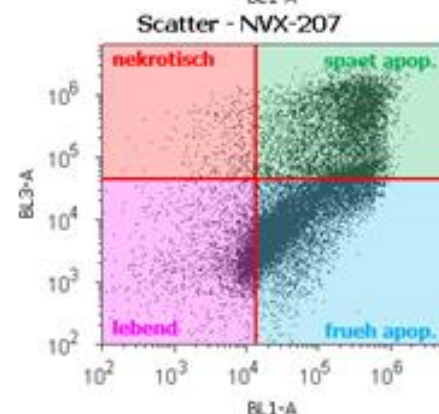


Experiment Name: 7_5_20 A375 48h(1)

Specimen Name: Specimen

Sample Name: NVX-207

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	19,790	---	100.000%
nekrotisch	326	1.647%	1.647%
spät apopt.	6,333	32.001%	32.001%
lebend	2,794	14.118%	14.118%
früh apopt.	10,337	52.233%	52.233%
R5	10,000	50.531%	50.531%



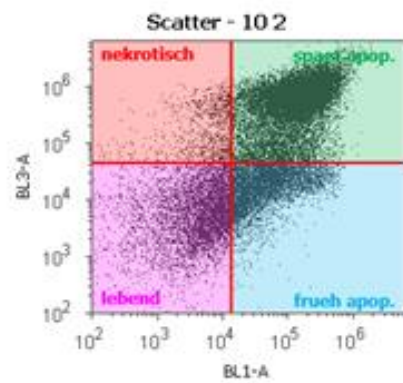
Anhang 59. AnnexinV an der Zelllinie A375 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207 (Tris). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **7_5_20 A375 48h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10 2**

Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	26,683	---	100.000%
☒ nekrotisch	890	3.335%	3.335%
☒ spaet apop.	14,768	55.346%	55.346%
☒ lebend	5,788	21.692%	21.692%
☒ frueh apop.	5,237	19.627%	19.627%
☒ RS	20,000	74.954%	74.954%

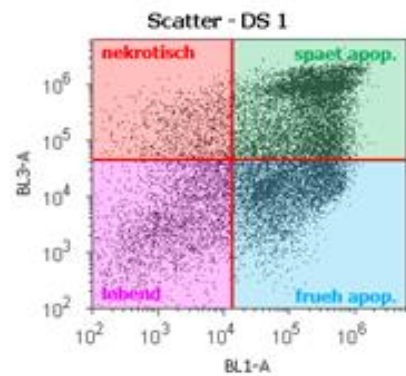


Experiment Name: **7_5_20 A375 48h(1)**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS 1**

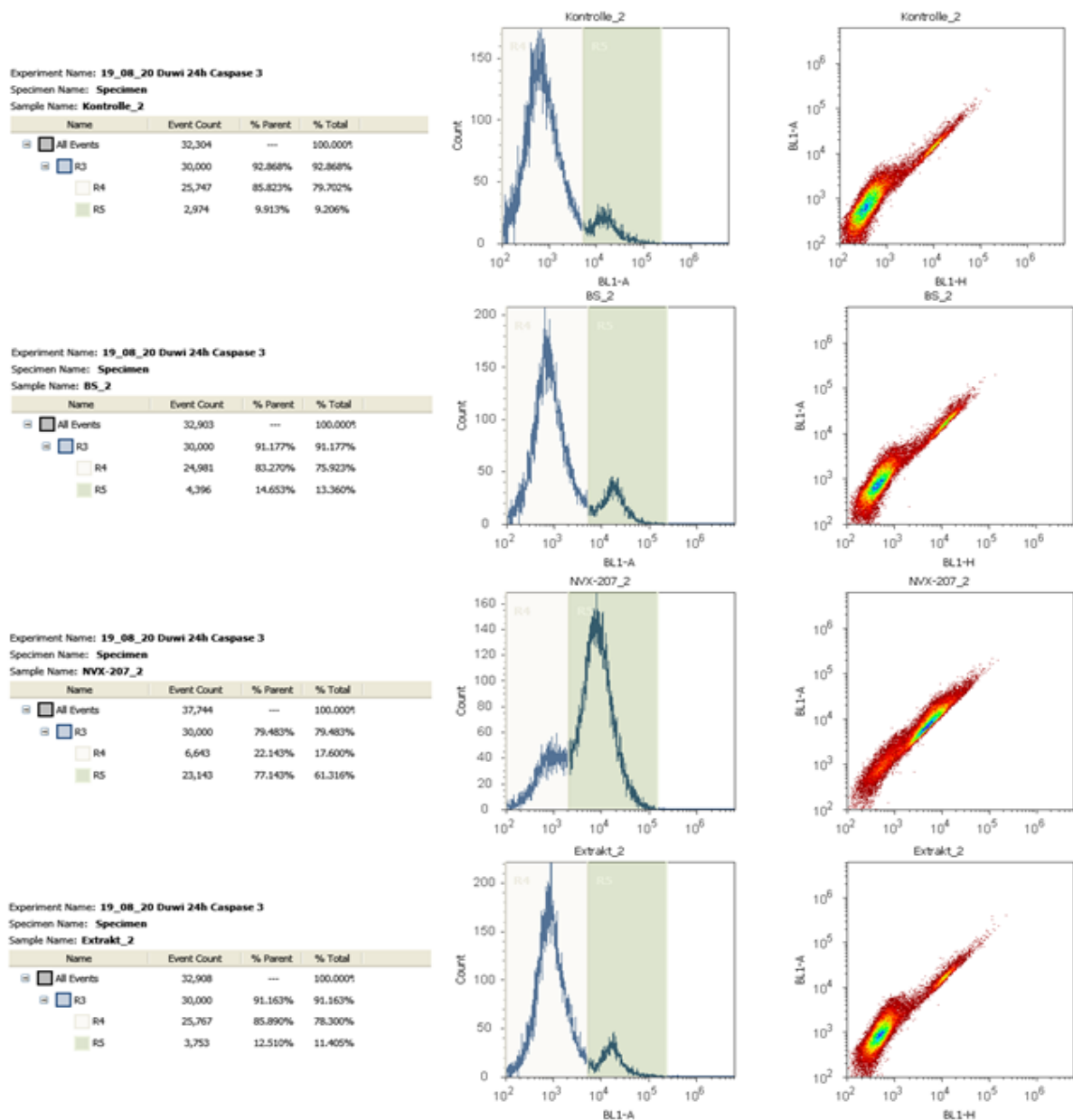
Name	Event Count	% Parent	% Total
☒ All Events	17,138	---	100.000%
☒ nekrotisch	1,098	6.407%	6.407%
☒ spaet apop.	7,392	43.132%	43.132%
☒ lebend	3,726	21.741%	21.741%
☒ frueh apop.	4,922	28.720%	28.720%
☒ RS	10,000	58.350%	58.350%



Anhang 60. AnnexinV an der Zelllinie A375 nach 48 h von Substanzen **10** und **5** (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

8.6.2 Caspase 3-Assay

24 Stunden Behandlungsdauer



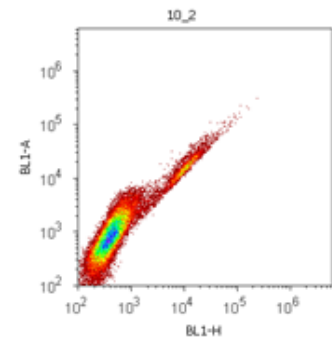
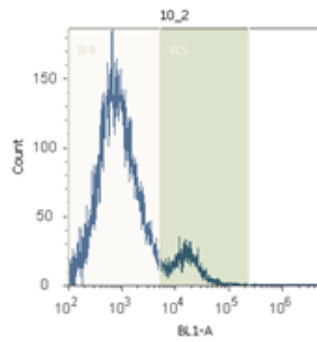
Anhang 61. Caspase 3-Assay an der Zelllinie MclDuWi nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle) und der Zellverteilung im dazugehörigen Histogramm (Zellzahl gegen Fluoreszenzaktivität) in der Mitte.

Experiment Name: 19_08_20 Duwi 24h Caspase 3

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	33,675	---	100.000%
R3	30,000	89.087%	89.087%
R4	25,734	85.780%	76.419%
R5	3,134	10.447%	9.307%

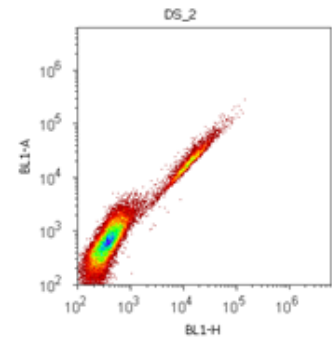
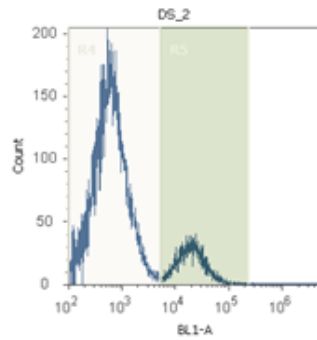


Experiment Name: 19_08_20 Duwi 24h Caspase 3

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	32,441	---	100.000%
R3	30,000	92.476%	92.476%
R4	24,654	82.180%	75.996%
R5	4,103	13.677%	12.648%

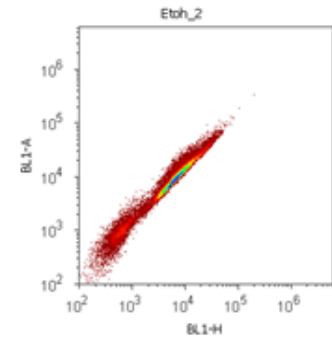
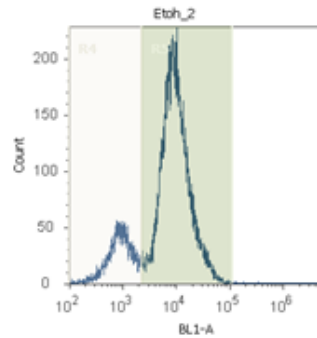


Experiment Name: 19_08_20 Duwi 24h Caspase 3

Specimen Name: Specimen

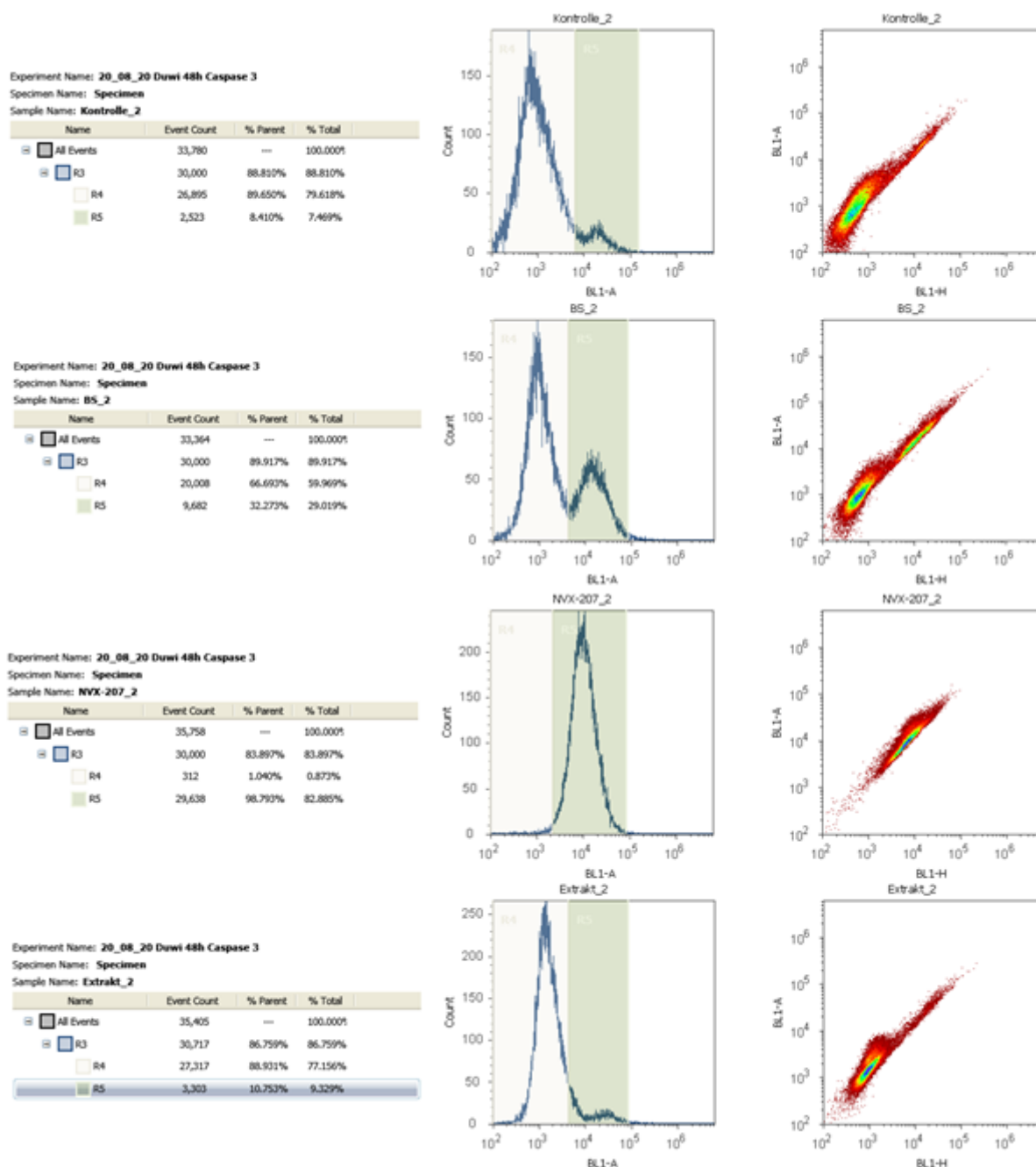
Sample Name: Etoh_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	31,420	---	100.000%
R3	30,000	95.481%	95.481%
R4	5,386	17.953%	17.142%
R5	24,533	81.777%	78.081%



Anhang 62. Caspase 3-Assay an der Zelllinie MelDuWi nach 24 h von den Substanzen Substanzen 10 , 5 (DS) und einer Ethanol-Kontrolle. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle) und der Zellverteilung im dazugehörigen Histogramm (Zellzahl gegen Fluoreszenzaktivität) in der Mitte.

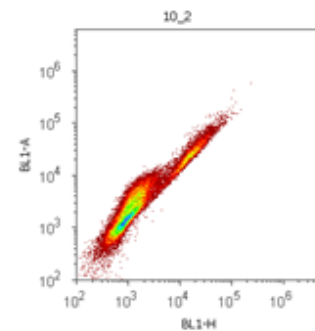
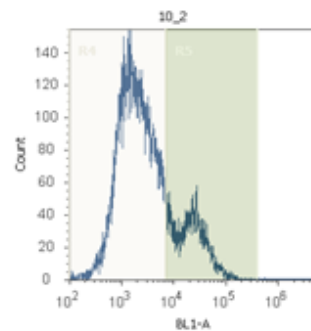
48 Stunden Behandlungsdauer



Anhang 63. Caspase 3-Assay an der Zelllinie MelDuWi nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle) und der Zellverteilung im dazugehörigen Histogramm (Zellzahl gegen Fluoreszenzaktivität) in der Mitte.

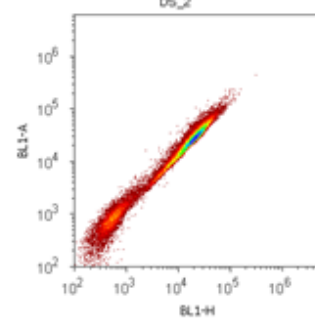
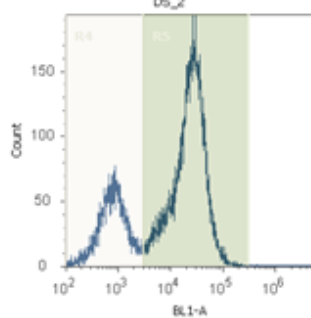
Experiment Name: 20_08_20 Duwi 48h Caspase 3
 Specimen Name: Specimen
 Sample Name: 10_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	35,581	---	100.000%
R3	30,000	84.315%	84.315%
R4	23,287	77.623%	65.448%
R5	6,598	21.997%	18.544%



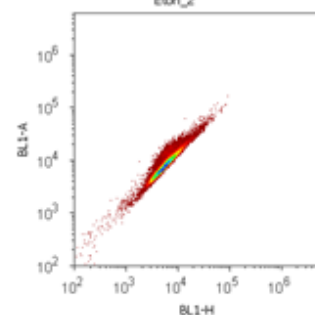
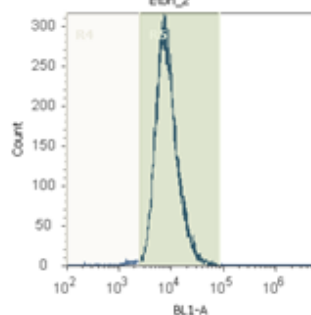
Experiment Name: 20_08_20 Duwi 48h Caspase 3
 Specimen Name: Specimen
 Sample Name: DS_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	39,352	---	100.000%
R3	30,000	76.235%	76.235%
R4	8,050	26.833%	20.456%
R5	21,779	72.597%	55.344%



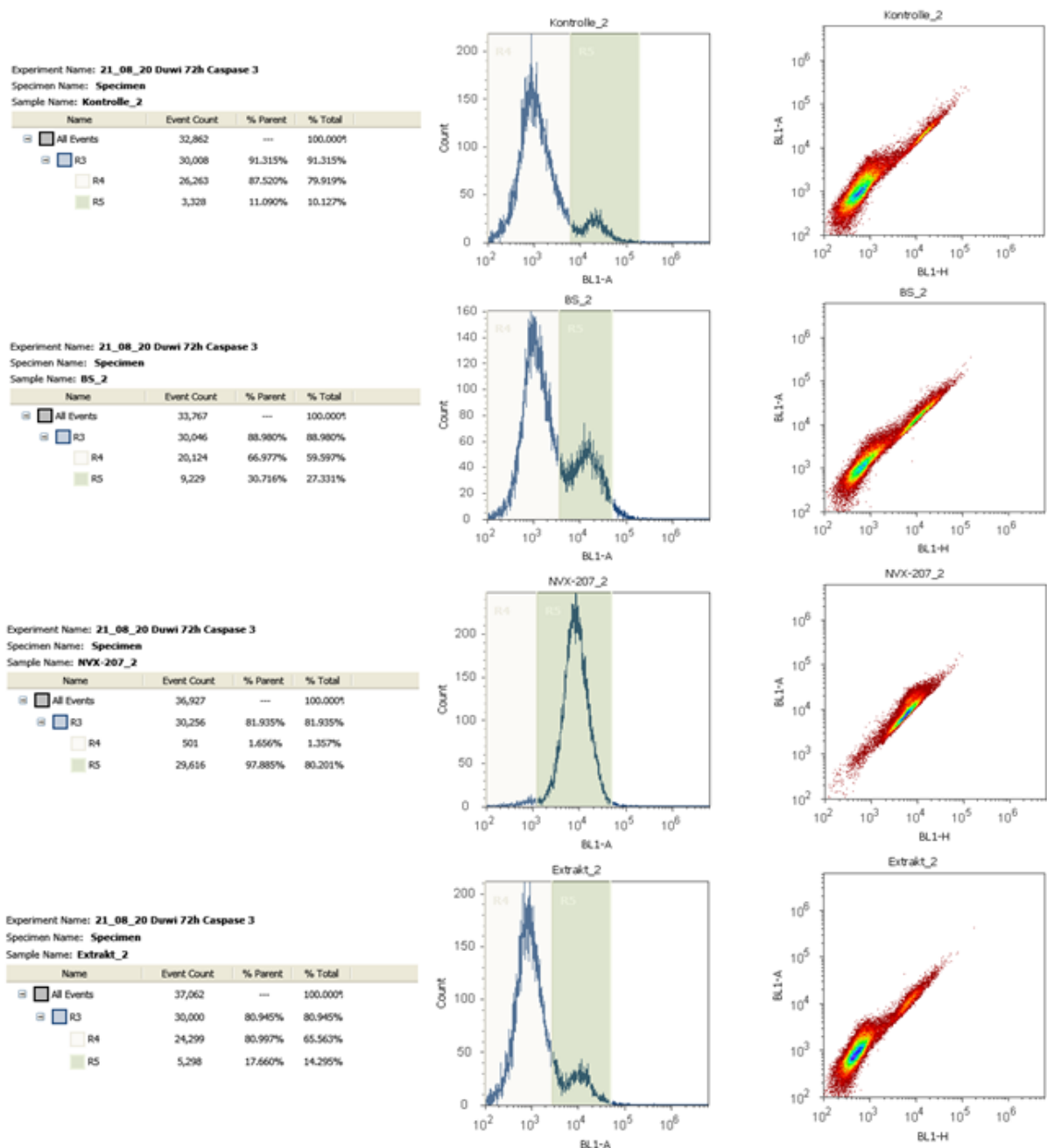
Experiment Name: 20_08_20 Duwi 48h Caspase 3
 Specimen Name: Specimen
 Sample Name: EtOH_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	31,252	---	100.000%
R3	30,000	95.994%	95.994%
R4	342	1.140%	1.094%
R5	29,629	98.763%	94.807%



Anhang 64. Caspase 3-Assay an der Zelllinie MelDuWi nach 48 h von den Substanzen Substanzen 10 , 5 (DS) und einer Ethanol-Kontrolle. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle) und der Zellverteilung im dazugehörigen Histogramm (Zellzahl gegen Fluoreszenzaktivität) in der Mitte.

72 Stunden Behandlungsdauer:



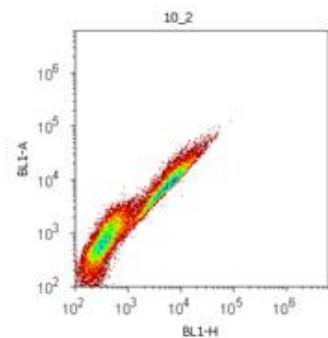
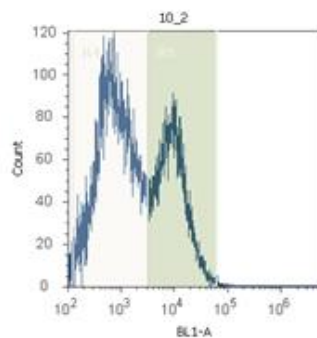
Anhang 65. Caspase 3-Assay an der Zelllinie MelDuWi nach 72 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle) und der Zellverteilung im dazugehörigen Histogramm (Zellzahl gegen Fluoreszenzaktivität) in der Mitte

Experiment Name: 21_08_20 Duwi 72h Caspase 3

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	36,046	---	100.000%
R3	30,000	83.227%	83.227%
R4	17,957	59.857%	49.817%
R5	10,910	36.367%	30.267%

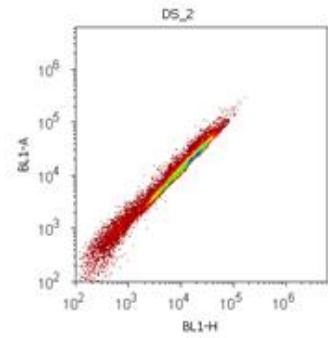
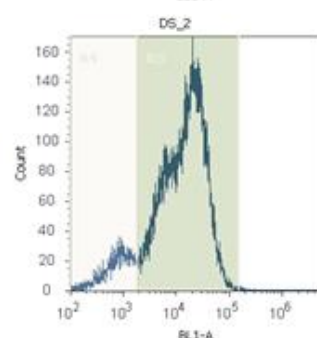


Experiment Name: 21_08_20 Duwi 72h Caspase 3

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	40,255	---	100.000%
R3	30,000	74.525%	74.525%
R4	3,386	11.287%	8.411%
R5	26,423	88.077%	65.639%

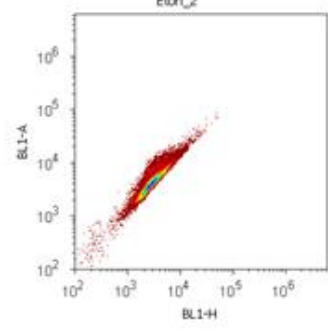
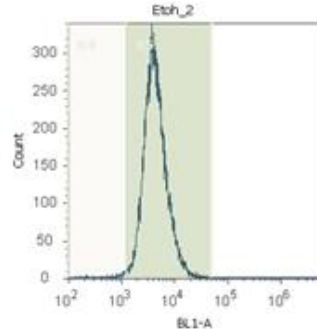


Experiment Name: 21_08_20 Duwi 72h Caspase 3

Specimen Name: Specimen

Sample Name: EtOH_2

Name	Event Count	% Parent	% Total
All Events	32,953	---	100.000%
R3	30,777	93.397%	93.397%
R4	318	1.033%	0.965%
R5	30,415	98.824%	92.298%



Anhang 66. Caspase 3-Assay an der Zelllinie MelDuWi nach 72 h von den Substanzen Substanzen **10** , **5** (DS) und einer Ethanol-Kontrolle. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle) und der Zellverteilung im dazugehörigen Histogramm (Zellzahl gegen Fluoreszenzaktivität) in der Mitte.

8.6.3 TUNEL-Assay

24 Stunden Behandlungsdauer:



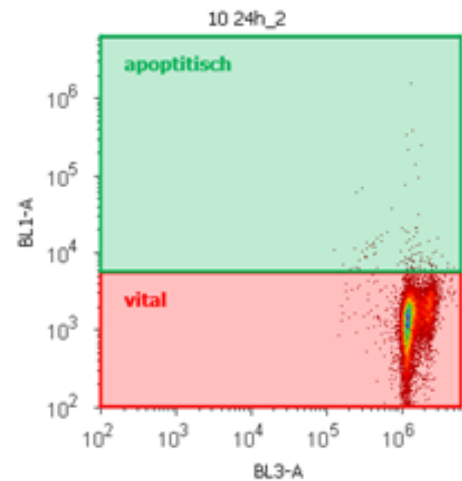
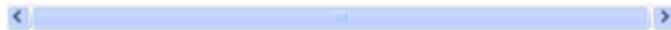
Anhang 67. TUNEL-Assay an der Zelllinie MelDuWi nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 6_7_20 DuWi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 24h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratic
All Events	21,584	---	100.000%	800.64
R3	20,000	92.661%	92.661%	741.89
R4	16,655	83.275%	77.164%	617.81
vital	15,547	93.347%	72.030%	576.70
apoptiti	127	0.763%	0.588%	4.71

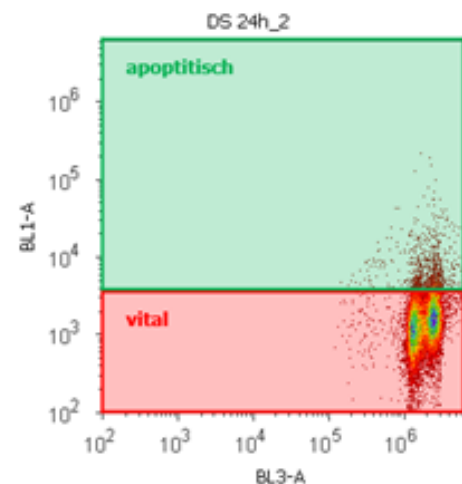


Experiment Name: 22_07_20 Duwi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS 24h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratic
All Events	23,989	---	100.000%	312.73
R3	20,000	83.372%	83.372%	260.73
R4	17,613	88.065%	73.421%	229.61
vital	16,074	91.262%	67.006%	209.55
apoptiti	1,085	6.160%	4.523%	14.14

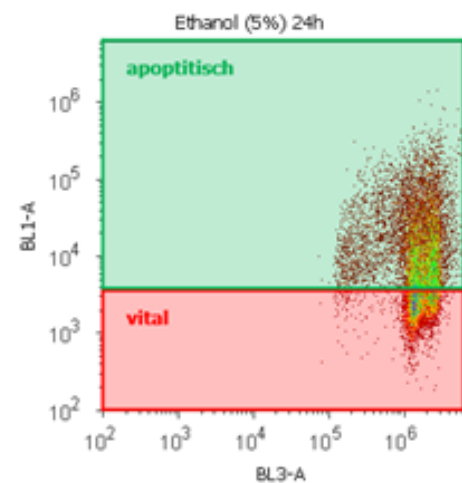
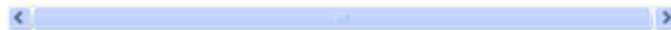


Experiment Name: 22_07_20 Duwi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Ethanol (5%) 24h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratic
All Events	22,328	---	100.000%	264.11
R3	20,000	89.574%	89.574%	236.57
R4	14,119	70.595%	63.235%	167.01
vital	4,033	28.564%	18.063%	47.70
apoptiti	9,734	68.943%	43.595%	115.14



Anhang 68. TUNELAssay an der Zelllinie MeDuWi nach 24 h von den Substanzen Substanzen 10 , 5 (DS) und einer Ethanol-Kontrolle. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

48 Stunden Behandlungsdauer:

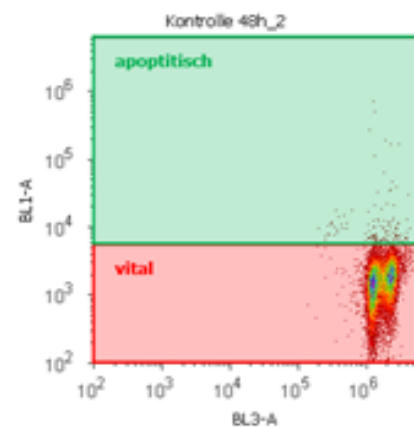
Experiment Name: 6_7_20 DuWi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle 48h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentric
All Events	21,371	---	100.000%	574.36
R3	20,000	93.585%	93.585%	537.51
R4	15,555	77.775%	72.786%	418.05
vital	14,514	93.308%	67.914%	390.07
apoptiti	169	1.086%	0.791%	4.54

< >



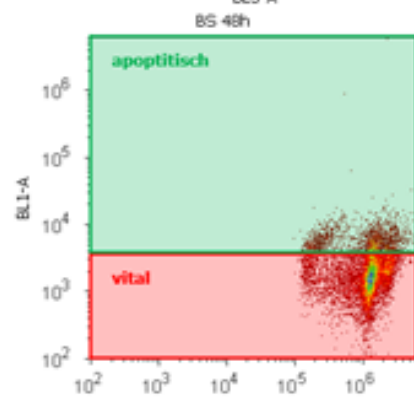
Experiment Name: 22_07_20 DuWi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS 48h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentric
All Events	23,436	---	100.000%	661.72
R3	20,000	85.339%	85.339%	564.71
R4	11,486	57.430%	49.010%	324.31
vital	8,895	77.442%	37.954%	251.15
apoptiti	2,196	19.119%	9.370%	62.00

< >



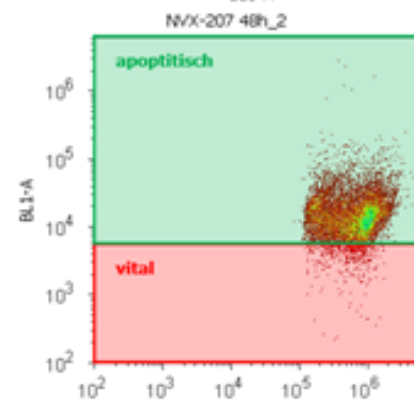
Experiment Name: 6_7_20 DuWi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: NVX-207 48h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentric
All Events	27,382	---	100.000%	1,167.26
R3	20,000	73.041%	73.041%	852.58
R4	11,328	56.640%	41.370%	482.90
vital	539	4.758%	1.968%	22.98
apoptiti	10,658	94.085%	38.923%	454.34

< >



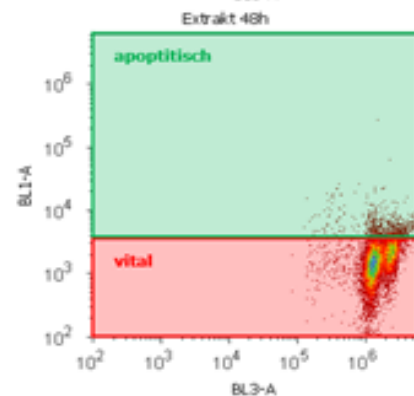
Experiment Name: 22_07_20 DuWi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt 48h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentric
All Events	22,714	---	100.000%	772.15
R3	20,000	88.051%	88.051%	679.89
R4	12,040	60.200%	53.007%	409.29
vital	10,808	89.767%	47.583%	367.41
apoptiti	837	6.952%	3.685%	28.45

< >



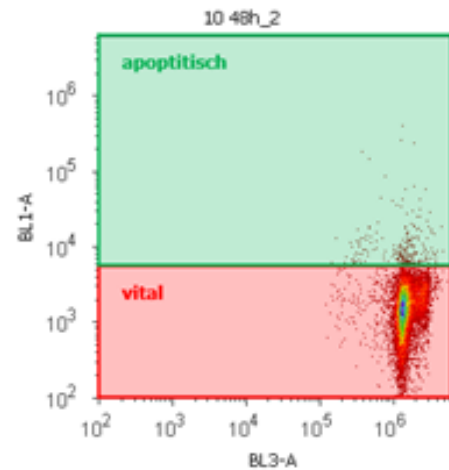
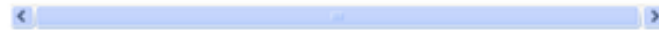
Anhang 69. TUNEL-Assay an der Zelllinie MelDuWi nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 6_7_20 DuWi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 48h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	22,846	---	100.000%	414.75
R3	20,000	87.543%	87.543%	363.09
R4	14,470	72.350%	63.337%	262.69
vital	13,287	91.824%	58.159%	241.22
apoptiti	300	2.073%	1.313%	5.45

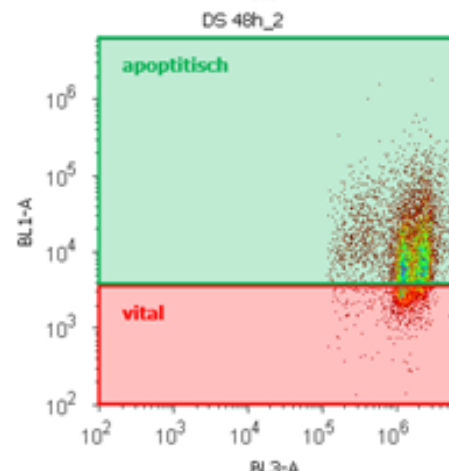


Experiment Name: 22_07_20 DuWi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS 48h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	22,732	---	100.000%	158.55
R3	11,844	52.103%	52.103%	82.61
R4	9,223	77.871%	40.573%	64.33
vital	1,319	14.301%	5.802%	9.20
apoptiti	7,643	82.869%	33.622%	53.31

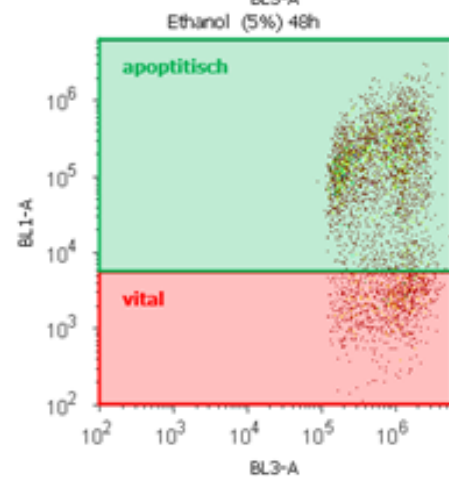


Experiment Name: 6_7_20 DuWi 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Ethanol (5%) 48h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	14,350	---	100.000%	201.40
R3	10,000	69.686%	69.686%	140.35
R4	4,434	44.340%	30.899%	62.23
vital	1,029	23.207%	7.171%	14.44
apoptiti	3,306	74.560%	23.038%	46.40



Anhang 70. TUNELAssay an der Zelllinie MelDuWi nach 48 h von den Substanzen Substanzen 10 , 5 (DS) und einer Ethanol-Kontrolle. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

72 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 18_08_2020 72 h DuWi

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	22,637	—	100.000%	731.21
R3	20,000	88.351%	88.351%	646.03
R4	14,870	74.350%	65.689%	480.32
vital	14,231	95.703%	62.866%	459.68
apoptiti	222	1.493%	0.981%	7.17



Experiment Name: 18_08_2020 72 h DuWi

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	25,103	—	100.000%	174.58
R3	16,034	63.873%	63.873%	111.38
R4	10,052	62.692%	40.043%	69.83
vital	20	0.199%	0.080%	0.14
apoptiti	10,027	99.751%	39.943%	69.65



Experiment Name: 18_08_2020 72 h DuWi

Specimen Name: Specimen

Sample Name: NVX-207

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	5,964	—	100.000%	42.63
R3	1,024	17.170%	17.170%	7.32
R4	316	30.859%	5.298%	2.26
vital	540	9.054%	9.054%	3.86
apoptiti	5,038	84.474%	84.474%	36.01



Experiment Name: 18_08_2020 72 h DuWi

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Extrakt

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	12,270	—	100.000%	398.48
R3	10,000	81.500%	81.500%	324.76
R4	6,824	68.240%	55.615%	221.62
vital	6,079	89.083%	49.544%	197.42
apoptiti	585	8.573%	4.768%	19.00



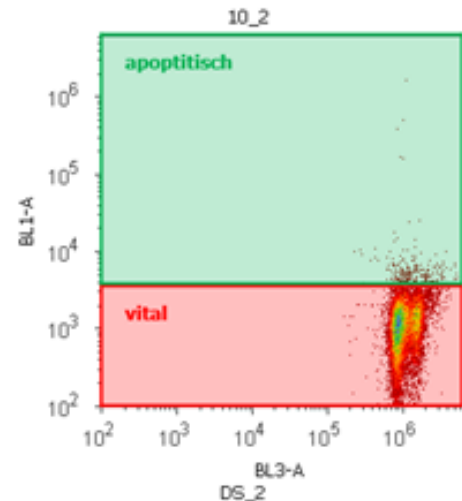
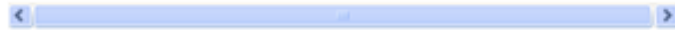
Anhang 71. TUNEL-Assay an der Zelllinie MelDuWi nach 72 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und NVX-207. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **18_08_2020 72 h DuWi**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10_2**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
☒ All Events	21,872	---	100.000%	1,508.41
☒ R3	20,000	91.441%	91.441%	1,379.31
☒ R4	14,856	74.280%	67.922%	1,024.55
☒ vital	13,116	88.288%	59.967%	904.55
☒ apoptiti	313	2.107%	1.431%	21.59

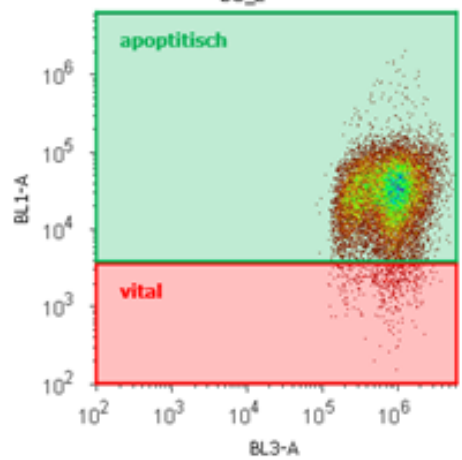
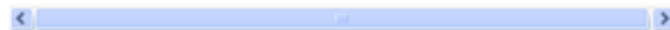


Experiment Name: **18_08_2020 72 h DuWi**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
☒ All Events	4,116	---	100.000%	29.22
☒ R3	1,019	24.757%	24.757%	7.23
☒ R4	482	47.301%	11.710%	3.42
☒ vital	126	12.365%	3.061%	0.89
☒ apoptitisch	781	76.644%	18.975%	5.54

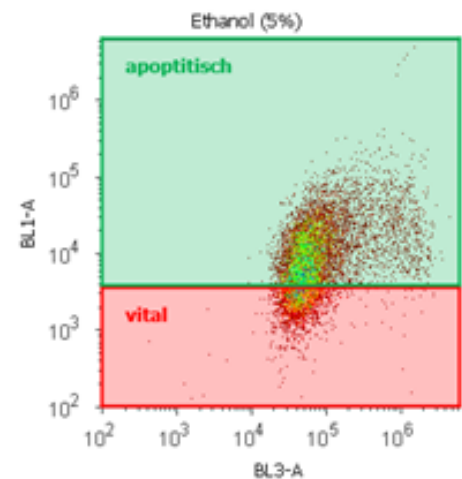
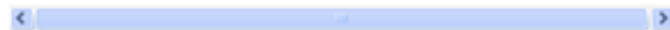


Experiment Name: **18_08_2020 72 h DuWi**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Ethanol (5%)**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
☒ All Events	14,387	---	100.000%	291.87
☒ R3	10,000	69.507%	69.507%	202.87
☒ R4	1,593	15.930%	11.072%	32.32
☒ vital	2,170	21.700%	15.083%	44.02
☒ apoptitisch	7,531	75.310%	52.346%	152.78



Anhang 72. TUNELAssay an der Zelllinie MelDuWi nach 72 h von den Substanzen Substanzen **10** , **5** (DS) und einer Ethanol-Kontrolle. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

8.6.4 Zellzyklusanalyse

8.6.4.1 Zelllinie MelDuWi

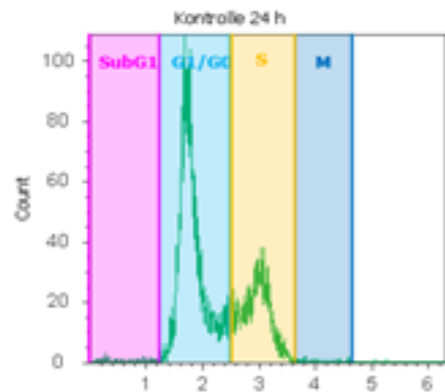
24 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **17_04_20 DuWi 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle 24 h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	15,981	---	100.000%	430.46
R1	10,000	62.574%	62.574%	269.36
R14	8,768	87.680%	54.865%	236.18
SubG1	80	0.912%	0.501%	2.15
G1/G0	5,882	67.085%	36.806%	158.44
S	2,741	31.261%	17.152%	73.83
M	31	0.354%	0.194%	0.84

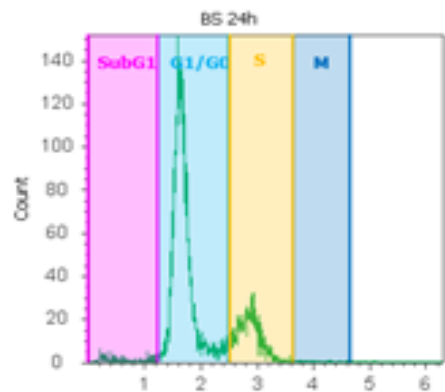


Experiment Name: **17_04_20 DuWi 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS 24h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	15,672	---	100.000%	656.42
R1	10,000	63.808%	63.808%	418.85
R14	8,707	87.070%	55.558%	364.69
SubG1	187	2.148%	1.193%	7.83
G1/G0	6,640	76.260%	42.369%	278.12
S	1,829	21.006%	11.670%	76.61
M	24	0.276%	0.153%	1.01

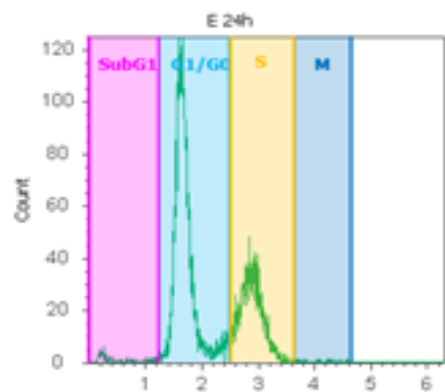


Experiment Name: **17_04_20 DuWi 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **E 24h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	14,245	---	100.000%	827.80
R1	10,000	70.200%	70.200%	581.11
R14	8,510	85.100%	59.740%	494.53
SubG1	134	1.575%	0.941%	7.79
G1/G0	5,584	65.617%	39.200%	324.49
S	2,742	32.221%	19.249%	159.34
M	24	0.282%	0.168%	1.39

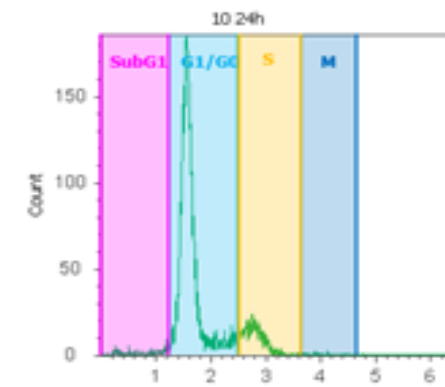


Experiment Name: **17_04_20 DuWi 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10 24h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	15,254	---	100.000%	756.40
R1	10,000	65.557%	65.557%	495.87
R14	8,965	89.650%	58.771%	444.55
SubG1	201	2.242%	1.318%	9.97
G1/G0	7,509	83.759%	49.226%	372.35
S	1,205	13.441%	7.900%	59.75
M	16	0.178%	0.105%	0.79



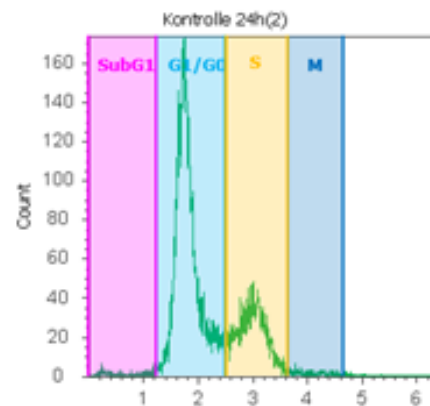
Anhang 73. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie MelDuWi nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und **10**. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 14_02_20 DuWi 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle 24h(2)

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	24,888	---	100.000%	667.39
R1	20,000	80.360%	80.360%	536.31
R14	14,630	73.150%	58.783%	392.31
SubG1	189	1.292%	0.759%	5.07
G1/G0	10,197	69.699%	40.972%	273.44
S	3,967	27.116%	15.939%	106.38
M	208	1.422%	0.836%	5.58

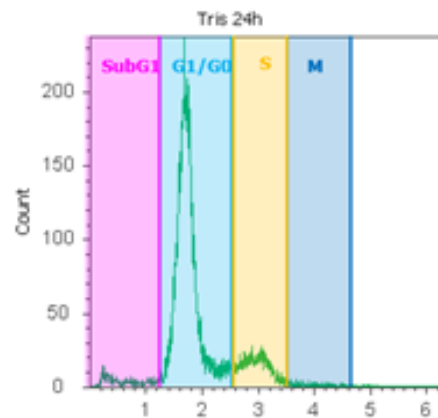


Experiment Name: 14_02_20 DuWi 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Tris 24h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	30,327	---	100.000%	543.98
R1	20,000	65.948%	65.948%	358.74
R14	14,698	73.490%	48.465%	263.64
SubG1	644	4.382%	2.124%	11.55
G1/G0	11,685	79.501%	38.530%	209.60
S	2,127	14.471%	7.014%	38.15
M	167	1.136%	0.551%	3.00

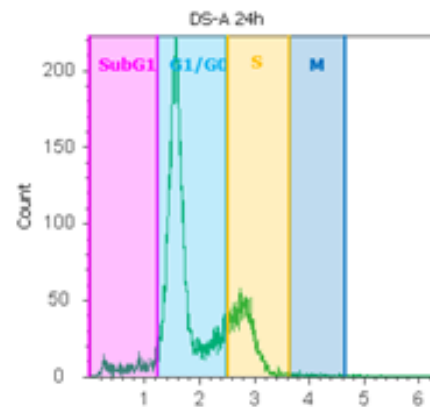


Experiment Name: 14_02_20 DuWi 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS-A 24h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	33,592	---	100.000%	325.08
R1	20,000	59.538%	59.538%	193.55
R14	17,468	87.340%	52.000%	169.05
SubG1	1,081	6.188%	3.218%	10.46
G1/G0	12,385	70.901%	36.869%	119.85
S	3,845	22.012%	11.446%	37.21
M	73	0.418%	0.217%	0.71



Anhang 74. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie MelDuWi nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

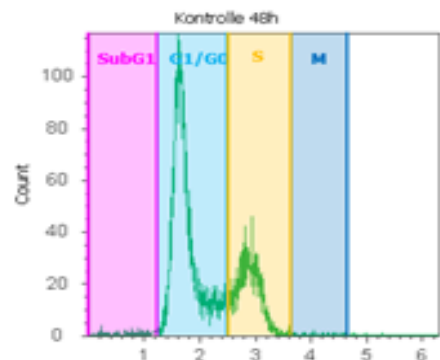
48 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **17_04_20 DuWi 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	12,941	---	100.000%	635.14
R1	10,000	77.274%	77.274%	490.80
R14	8,979	89.790%	69.384%	440.69
SubG1	95	1.058%	0.734%	4.66
G1/G0	6,305	70.219%	48.721%	309.45
S	2,505	27.898%	19.357%	122.94
M	27	0.301%	0.209%	1.33

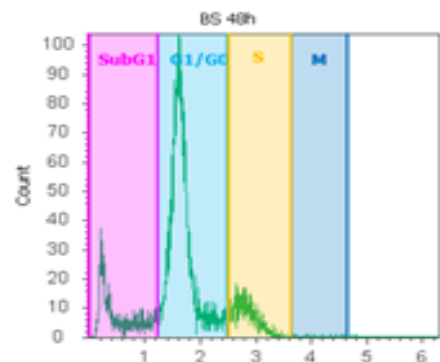


Experiment Name: **17_04_20 DuWi 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	13,282	---	100.000%	753.59
R1	10,000	75.290%	75.290%	567.38
R14	7,627	76.270%	57.424%	432.74
SubG1	1,332	17.464%	10.029%	75.57
G1/G0	5,276	69.175%	39.723%	299.35
S	980	12.849%	7.378%	55.60
M	11	0.144%	0.083%	0.62

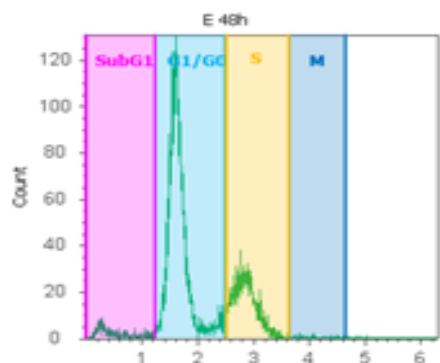


Experiment Name: **17_04_20 DuWi 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **E 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	15,301	---	100.000%	630.97
R1	10,000	65.355%	65.355%	412.37
R14	8,529	85.290%	55.741%	351.71
SubG1	319	3.740%	2.085%	13.15
G1/G0	5,907	69.258%	38.605%	243.59
S	2,251	26.392%	14.711%	92.82
M	25	0.293%	0.163%	1.03

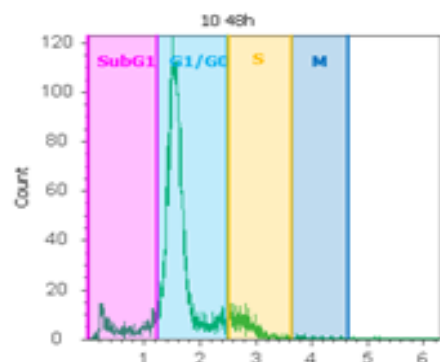


Experiment Name: **17_04_20 DuWi 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	17,570	---	100.000%	701.63
R1	10,000	56.915%	56.915%	399.33
R14	7,758	77.580%	44.155%	309.80
SubG1	848	10.931%	4.826%	33.86
G1/G0	6,138	79.118%	34.935%	245.11
S	720	9.281%	4.098%	28.75
M	25	0.322%	0.142%	1.00



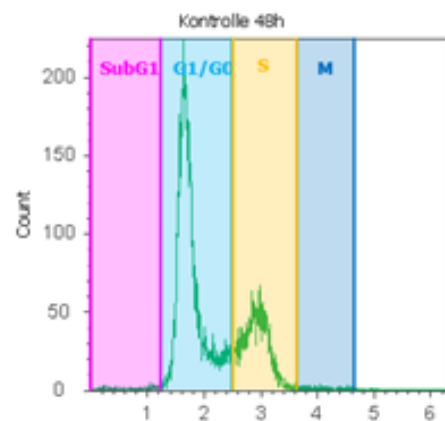
Anhang 75. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie MeDuWi nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt) und **10**. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 14_02_20 DuWi 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle 48h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	31,803	---	100.000%	813.72
R1	20,000	62.887%	62.887%	511.73
R14	16,137	80.685%	50.740%	412.89
SubG1	148	0.917%	0.465%	3.79
G1/G0	11,243	69.672%	35.352%	287.67
S	4,545	28.165%	14.291%	116.29
M	123	0.762%	0.387%	3.15

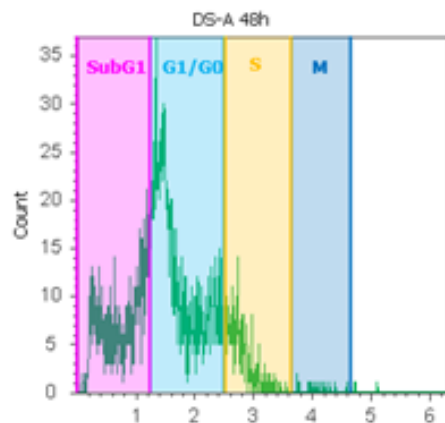


Experiment Name: 14_02_20 DuWi 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS-A 48h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	10,967	---	100.000%	77.16
R1	6,246	56.953%	56.953%	43.95
R14	4,370	69.965%	39.847%	30.75
SubG1	1,364	31.213%	12.437%	9.60
G1/G0	2,488	56.934%	22.686%	17.51
S	468	10.709%	4.267%	3.29
M	19	0.435%	0.173%	0.13

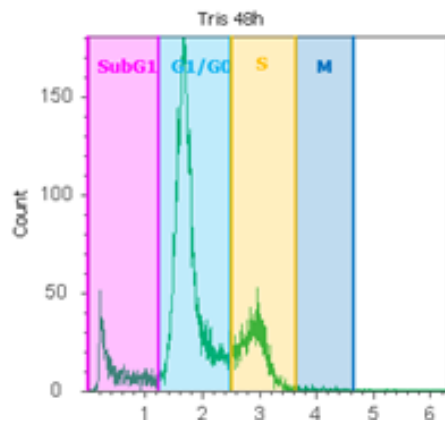


Experiment Name: 14_02_20 DuWi 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Tris 48h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	48,711	---	100.000%	1,709.16
R1	20,000	41.058%	41.058%	701.75
R14	15,496	77.480%	31.812%	543.72
SubG1	1,696	10.945%	3.482%	59.51
G1/G0	10,623	68.553%	21.808%	372.74
S	3,064	19.773%	6.290%	107.51
M	56	0.361%	0.115%	1.96



Anhang 76. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie MelDuWi nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

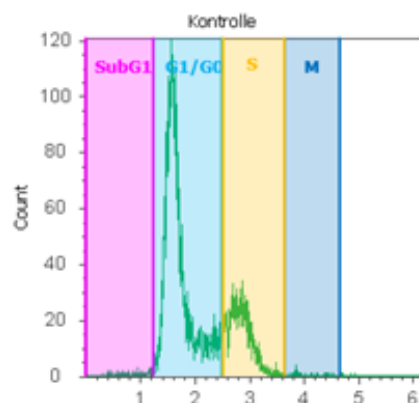
72 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 25_5_20 MelDuWi 72h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	11,894	---	100.000%	653.22
R1	10,000	84.076%	84.076%	549.20
R14	8,903	89.030%	74.853%	488.95
SubG1	90	1.011%	0.757%	4.94
G1/G0	6,499	72.998%	54.641%	356.92
S	2,217	24.902%	18.640%	121.76
M	37	0.416%	0.311%	2.03

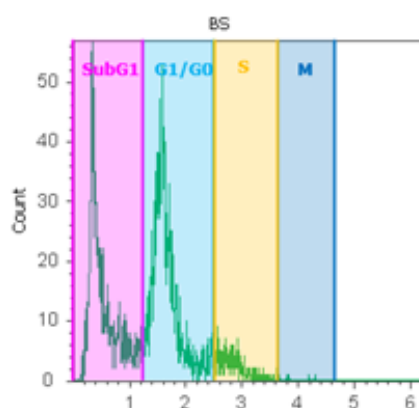


Experiment Name: 25_5_20 MelDuWi 72h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	14,073	---	100.000%	792.85
R1	10,000	71.058%	71.058%	563.38
R14	4,894	48.940%	34.776%	275.72
SubG1	2,030	41.479%	14.425%	114.37
G1/G0	2,511	51.308%	17.843%	141.46
S	341	6.968%	2.423%	19.21
M	7	0.143%	0.050%	0.39

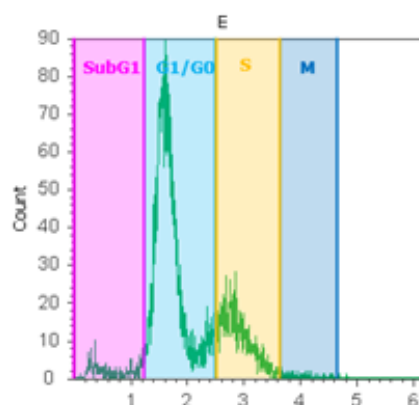


Experiment Name: 25_5_20 MelDuWi 72h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: E

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	16,291	---	100.000%	953.62
R1	10,000	61.384%	61.384%	585.37
R14	7,729	77.290%	47.443%	452.43
SubG1	356	4.606%	2.185%	20.84
G1/G0	5,507	71.251%	33.804%	322.36
S	1,779	23.017%	10.920%	104.14
M	57	0.737%	0.350%	3.34



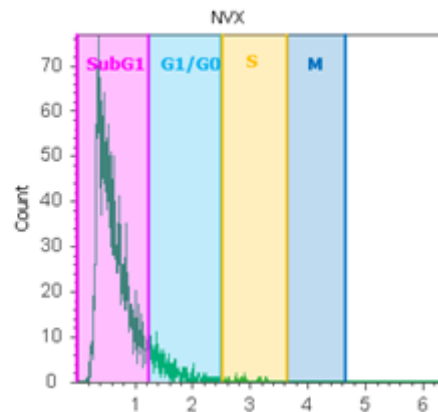
Anhang 77. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie MelDuWi nach 72 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS) und dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 25_5_20 MelDuWi 72h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: NVX

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	20,505	---	100.000%	919.85
R1	10,000	48.769%	48.769%	448.60
R14	4,853	48.530%	23.667%	217.70
SubG1	4,388	90.418%	21.400%	196.84
G1/G0	441	9.087%	2.151%	19.78
S	23	0.474%	0.112%	1.03
M	0	0.000%	0.000%	0.00

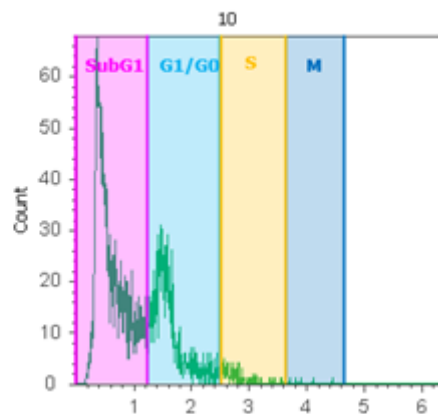


Experiment Name: 25_5_20 MelDuWi 72h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	17,815	---	100.000%	827.00
R1	10,000	56.132%	56.132%	464.22
R14	5,433	54.330%	30.497%	252.21
SubG1	3,477	63.998%	19.517%	161.41
G1/G0	1,808	33.278%	10.149%	83.93
S	139	2.558%	0.780%	6.45
M	5	0.092%	0.028%	0.23

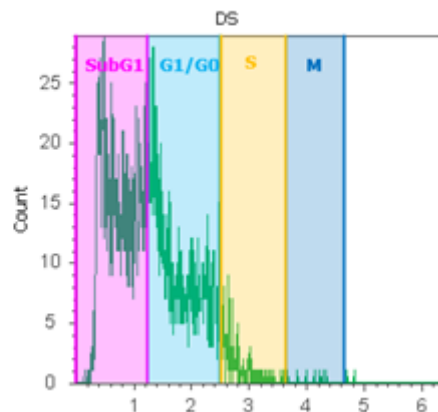


Experiment Name: 25_5_20 MelDuWi 72h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	16,128	---	100.000%	112.82
R1	9,198	57.031%	57.031%	64.34
R14	4,584	49.837%	28.423%	32.07
SubG1	2,384	52.007%	14.782%	16.68
G1/G0	1,994	43.499%	12.364%	13.95
S	186	4.058%	1.153%	1.30
M	7	0.153%	0.043%	0.05



Anhang 78. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie MelDuWi nach 72 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 10 und 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

8.6.4.2 Zelllinie sRGO2

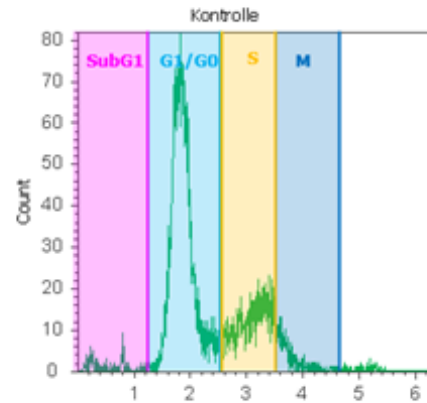
24 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **15_10_19 sGRO2 24h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	21,605	---	100.000%	86.48
R1	10,000	46.286%	46.286%	40.03
R14	7,464	34.548%	34.548%	29.88
SubG1	174	2.331%	0.805%	0.70
G1/G0	4,872	65.273%	22.550%	19.50
S	1,866	25.000%	8.637%	7.47
M	461	6.176%	2.134%	1.85

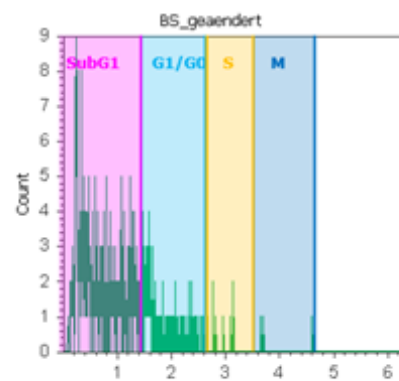


Experiment Name: **15_10_19 sGRO2 48h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS_gaendert**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	8,381	---	100.000%	21.66
R1	1,041	12.421%	12.421%	2.69
R14	544	6.491%	6.491%	1.41
SubG1	410	75.368%	4.892%	1.06
G1/G0	120	22.059%	1.432%	0.31
S	10	1.838%	0.119%	0.03
M	3	0.551%	0.036%	0.01

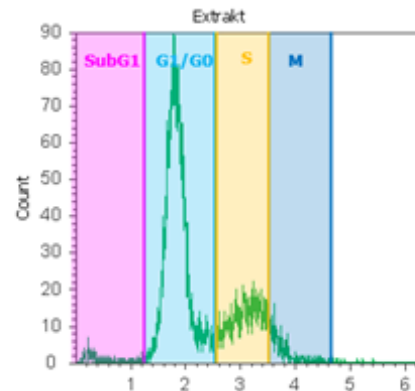


Experiment Name: **15_10_19 sGRO2 24h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Extrakt**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	16,425	---	100.000%	99.10
R1	10,000	60.883%	60.883%	60.33
R14	7,778	47.355%	47.355%	46.93
SubG1	151	1.941%	0.919%	0.91
G1/G0	5,254	67.549%	31.988%	31.70
S	1,883	24.209%	11.464%	11.36
M	434	5.580%	2.642%	2.62



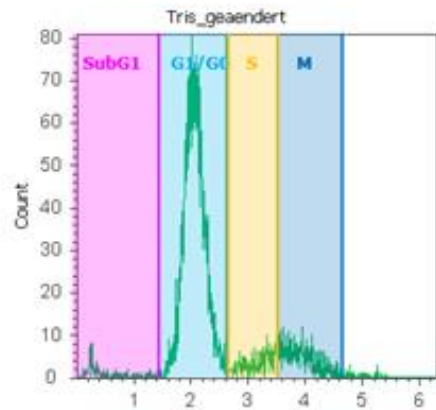
Anhang 79. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie sRGO2 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS) und dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 15_10_19 sGR02 48h 2xICS0

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Tris_gaendert

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	19,824	---	100.000%	145.36
R1	10,000	50.444%	50.444%	73.33
R14	6,309	31.825%	31.825%	46.26
SubG1	159	2.520%	0.802%	1.17
G1/G0	4,886	77.445%	24.647%	35.83
S	464	7.355%	2.341%	3.40
M	753	11.935%	3.798%	5.52

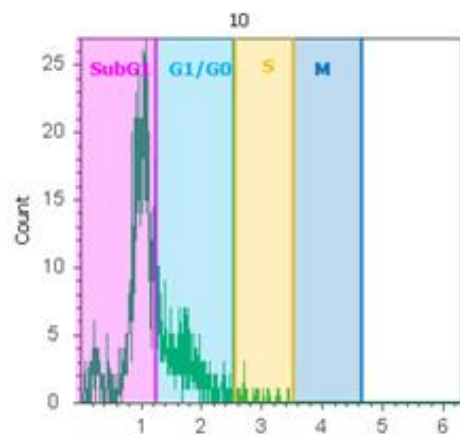


Experiment Name: 15_10_19 sGR02 24h 2xICS0

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	6,973	---	100.000%	18.15
R1	2,340	33.558%	33.558%	6.09
R14	1,834	26.301%	26.301%	4.77
SubG1	1,276	69.575%	18.299%	3.32
G1/G0	532	29.008%	7.629%	1.38
S	26	1.418%	0.373%	0.07
M	0	0.000%	0.000%	0.00

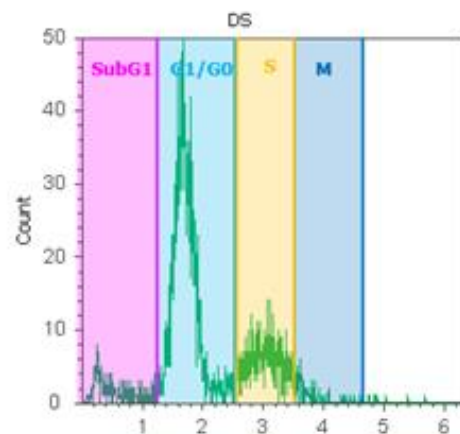


Experiment Name: 15_10_19 sGR02 24h 2xICS0

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	11,243	---	100.000%	29.10
R1	4,689	41.706%	41.706%	12.13
R14	3,897	34.662%	34.662%	10.08
SubG1	284	7.288%	2.526%	0.73
G1/G0	2,592	66.513%	23.054%	6.71
S	871	22.351%	7.747%	2.25
M	118	3.028%	1.050%	0.31



Anhang 80. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie sRGO2 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 10 und 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

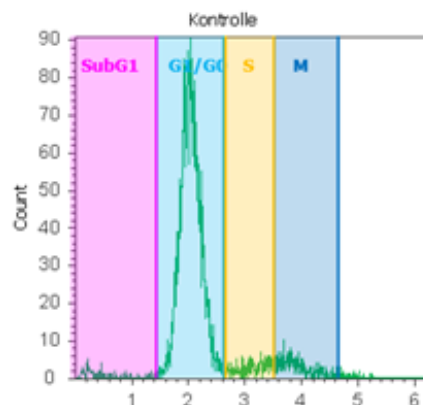
48 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **15_10_19 sGR02 48h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	17,181	---	100.000%	111.72
R1	10,000	58.204%	58.204%	65.02
R14	6,522	37.961%	37.961%	42.41
SubG1	119	1.825%	0.693%	0.77
G1/G0	5,514	84.545%	32.094%	35.85
S	375	5.750%	2.183%	2.44
M	483	7.406%	2.811%	3.14

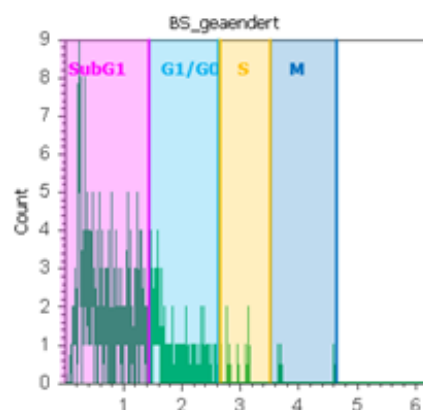


Experiment Name: **15_10_19 sGR02 48h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS_gaendert**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	8,381	---	100.000%	21.66
R1	1,041	12.421%	12.421%	2.69
R14	544	6.491%	6.491%	1.41
SubG1	410	75.368%	4.892%	1.06
G1/G0	120	22.059%	1.432%	0.31
S	10	1.838%	0.119%	0.03
M	3	0.551%	0.036%	0.01

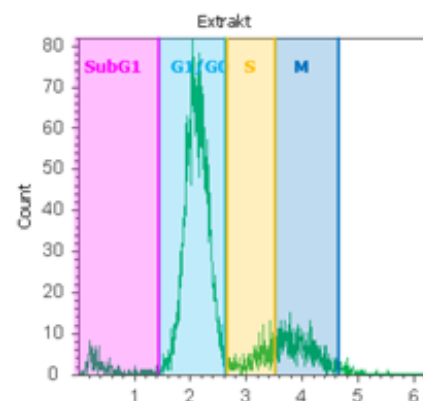


Experiment Name: **15_10_19 sGR02 48h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Extrakt**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	20,884	---	100.000%	122.70
R1	10,000	47.884%	47.884%	58.75
R14	7,579	36.291%	36.291%	44.53
SubG1	240	3.167%	1.149%	1.41
G1/G0	5,735	75.670%	27.461%	33.69
S	516	6.808%	2.471%	3.03
M	1,026	13.537%	4.913%	6.03



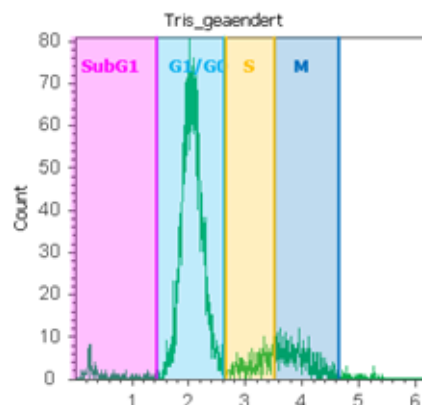
Anhang 81. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie sRGO2 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS) und dem Borkenextrakt der Platane (Extrakt). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **15_10_19 sGRO2 48h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Tris_geaendert**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	19,824	---	100.000%	145.36
R1	10,000	50.444%	50.444%	73.33
R14	6,309	31.825%	31.825%	46.26
SubG1	159	2.520%	0.802%	1.17
G1/G0	4,886	77.445%	24.647%	35.83
S	464	7.355%	2.341%	3.40
M	753	11.935%	3.798%	5.52

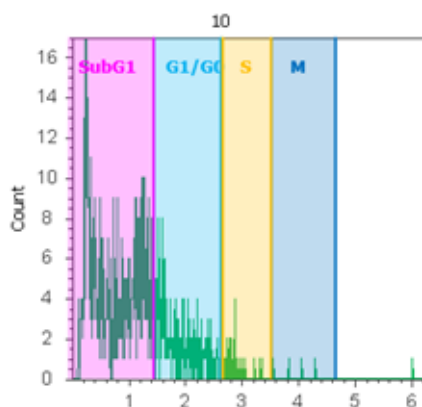


Experiment Name: **15_10_19 sGRO2 48h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	10,199	---	100.000%	26.23
R1	2,545	24.953%	24.953%	6.55
R14	1,368	13.413%	13.413%	3.52
SubG1	1,024	74.854%	10.040%	2.63
G1/G0	310	22.661%	3.040%	0.80
S	28	2.047%	0.275%	0.07
M	4	0.292%	0.039%	0.01

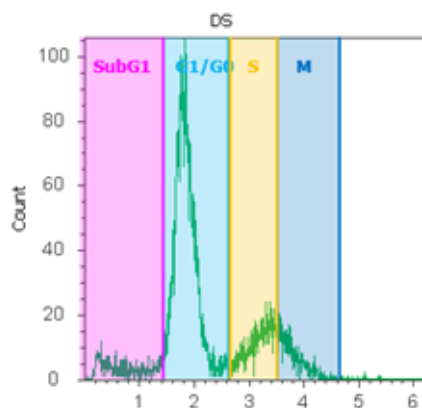


Experiment Name: **15_10_19 sGRO2 48h 2xIC50**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	24,755	---	100.000%	110.76
R1	10,000	40.396%	40.396%	44.74
R14	9,310	37.609%	37.609%	41.66
SubG1	759	8.153%	3.066%	3.40
G1/G0	6,079	65.295%	24.557%	27.20
S	1,520	16.327%	6.140%	6.80
M	916	9.839%	3.700%	4.10



Anhang 82. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie sRGO2 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), **10** und **5** (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

8.6.4.3 Zelllinie PriFri2

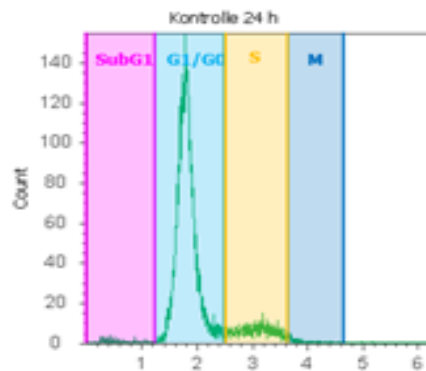
24 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: 17_04_20 PriFri2 24h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle 24 h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	15,256	---	100.000%	284.72
R1	10,000	65.548%	65.548%	186.63
R14	8,900	89.000%	58.338%	166.10
SubG1	88	0.989%	0.577%	1.64
G1/G0	7,635	85.787%	50.046%	142.49
S	1,072	12.045%	7.027%	20.01
M	85	0.955%	0.557%	1.59

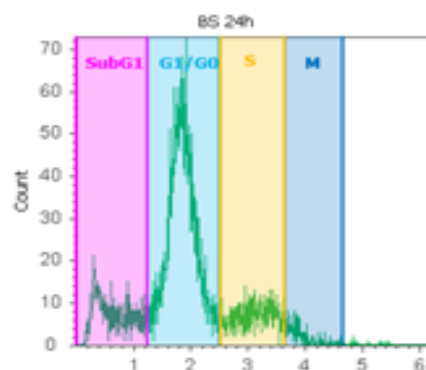


Experiment Name: 17_04_20 PriFri2 24h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: BS 24h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	18,576	---	100.000%	591.28
R1	10,000	53.833%	53.833%	318.30
R14	7,973	79.730%	42.921%	253.78
SubG1	1,328	16.656%	7.149%	42.27
G1/G0	5,097	63.928%	27.439%	162.24
S	1,249	15.665%	6.724%	39.76
M	269	3.374%	1.448%	8.56

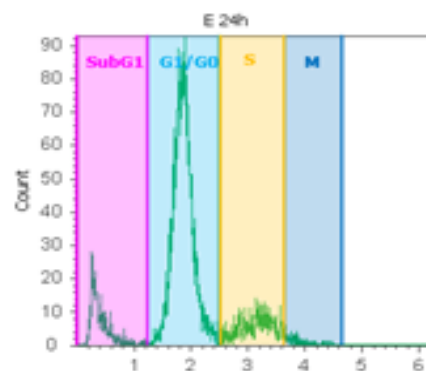


Experiment Name: 17_04_20 PriFri2 24h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: E 24h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	17,752	---	100.000%	561.33
R1	10,000	56.332%	56.332%	316.21
R14	6,963	69.630%	39.224%	220.17
SubG1	743	10.671%	4.185%	23.49
G1/G0	5,118	73.503%	28.831%	161.83
S	993	14.261%	5.594%	31.40
M	105	1.508%	0.591%	3.32

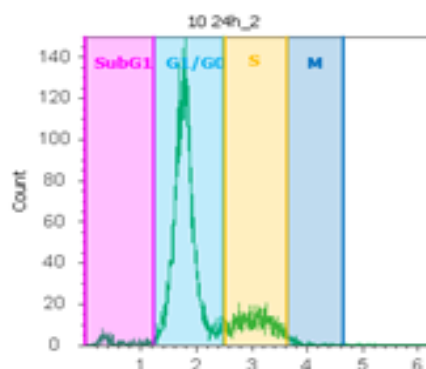


Experiment Name: 17_04_20 PriFri2 24h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 24h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	28,441	---	100.000%	198.77
R1	12,398	43.592%	43.592%	86.65
R14	10,521	84.860%	36.992%	73.53
SubG1	254	2.414%	0.893%	1.78
G1/G0	8,260	78.530%	29.043%	57.73
S	1,874	17.812%	6.589%	13.10
M	106	1.008%	0.373%	0.74



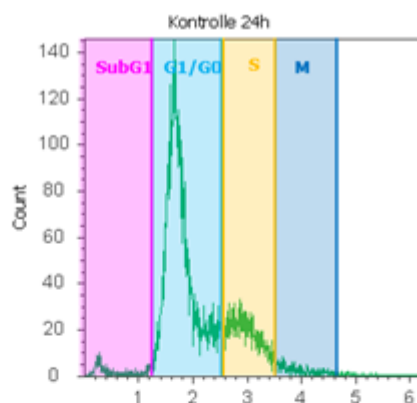
Anhang 83. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie PriFri2 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (E) und 10. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 07_02_20 PriFri 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Kontrolle 24h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratik
All Events	40,995	---	100.000%	962.70
R1	20,000	48.786%	48.786%	469.67
R14	12,975	64.875%	31.650%	304.70
SubG1	300	2.312%	0.732%	7.05
G1/G0	9,326	71.877%	22.749%	219.01
S	2,829	21.803%	6.901%	66.43
M	393	3.029%	0.959%	9.23

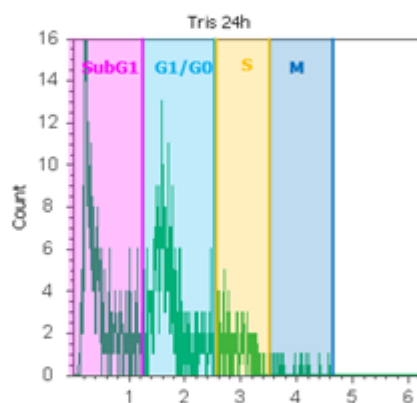


Experiment Name: 07_02_20 PriFri 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: Tris 24h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratik
All Events	10,552	---	100.000%	74.55
R1	2,486	23.560%	23.560%	17.56
R14	1,403	56.436%	13.296%	9.91
SubG1	619	44.120%	5.866%	4.37
G1/G0	606	43.193%	5.743%	4.28
S	152	10.834%	1.440%	1.07
M	18	1.283%	0.171%	0.13

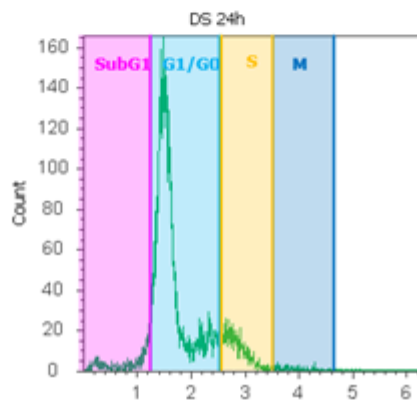


Experiment Name: 07_02_20 PriFri 2xIC50 24h und 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS 24h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratik
All Events	32,926	---	100.000%	232.15
R1	16,426	49.888%	49.888%	115.81
R14	11,304	68.818%	34.332%	79.70
SubG1	798	7.059%	2.424%	5.63
G1/G0	8,938	79.069%	27.146%	63.02
S	1,365	12.075%	4.146%	9.62
M	118	1.044%	0.358%	0.83



Anhang 84. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie PriFri2 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

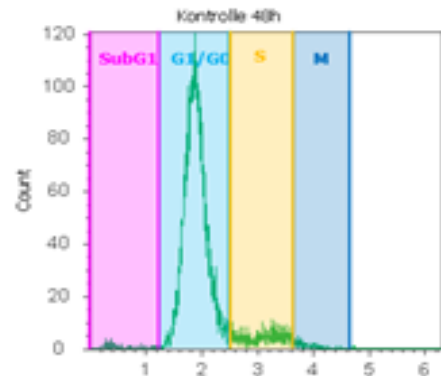
48 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **05_05_20 PriFri 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	15,947	---	100.000%	578.14
R1	10,000	62.708%	62.708%	362.54
R14	8,638	86.380%	54.167%	313.16
SubG1	70	0.810%	0.439%	2.54
G1/G0	7,648	88.539%	47.959%	277.27
S	797	9.111%	4.935%	28.53
M	118	1.366%	0.740%	4.28

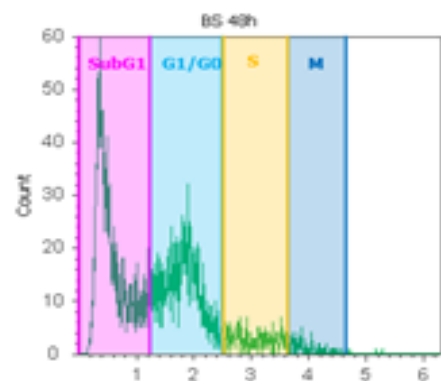


Experiment Name: **05_05_20 PriFri 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	19,491	---	100.000%	449.79
R1	10,000	51.306%	51.306%	230.77
R14	6,002	60.020%	30.794%	138.51
SubG1	2,922	48.684%	14.992%	67.43
G1/G0	2,480	41.320%	12.724%	57.23
S	461	7.681%	2.365%	10.64
M	124	2.066%	0.636%	2.86

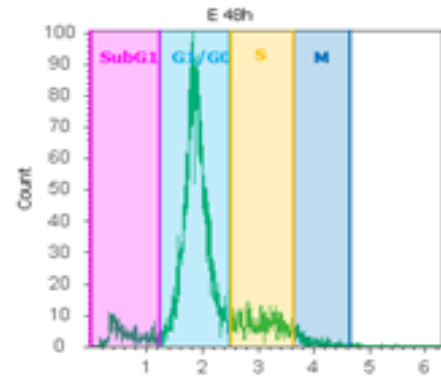


Experiment Name: **05_05_20 PriFri 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **E 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	27,410	---	100.000%	309.14
R1	10,000	36.483%	36.483%	112.78
R14	8,602	86.020%	31.383%	97.02
SubG1	613	7.126%	2.236%	6.91
G1/G0	6,434	74.797%	23.473%	72.56
S	1,302	15.136%	4.750%	14.68
M	225	2.616%	0.821%	2.54

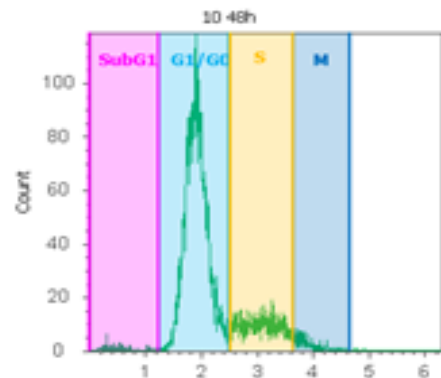


Experiment Name: **05_05_20 PriFri 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	17,333	---	100.000%	405.06
R1	10,000	57.693%	57.693%	233.69
R14	9,037	90.370%	52.138%	211.19
SubG1	91	1.007%	0.525%	2.13
G1/G0	6,980	77.238%	40.270%	163.12
S	1,677	18.557%	9.675%	39.19
M	261	2.888%	1.506%	6.10



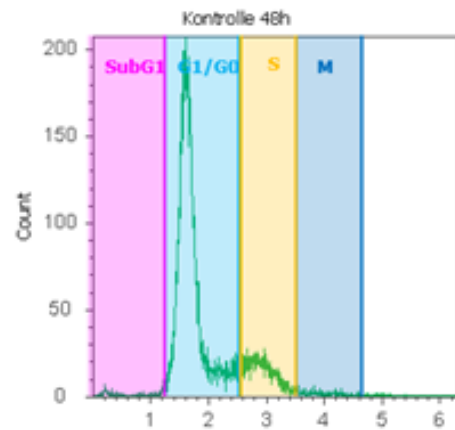
Anhang 85. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie PriFri2 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS), dem Borkenextrakt der Platane (Et) und **10**. Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **07_02_20 PriFri 2xIC50 24h und 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	25,080	---	100.000%	820.05
R1	20,000	79.745%	79.745%	653.95
R14	13,340	66.700%	53.190%	436.19
SubG1	197	1.477%	0.785%	6.44
G1/G0	10,685	80.097%	42.604%	349.37
S	2,134	15.997%	8.509%	69.78
M	219	1.642%	0.873%	7.16

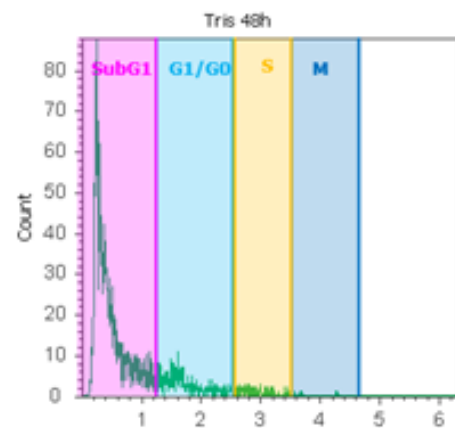


Experiment Name: **07_02_20 PriFri 2xIC50 24h und 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Tris 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	27,760	---	100.000%	196.36
R1	6,936	24.986%	24.986%	49.06
R14	3,545	51.110%	12.770%	25.08
SubG1	2,904	81.918%	10.461%	20.54
G1/G0	527	14.866%	1.898%	3.73
S	105	2.962%	0.378%	0.74
M	5	0.141%	0.018%	0.04

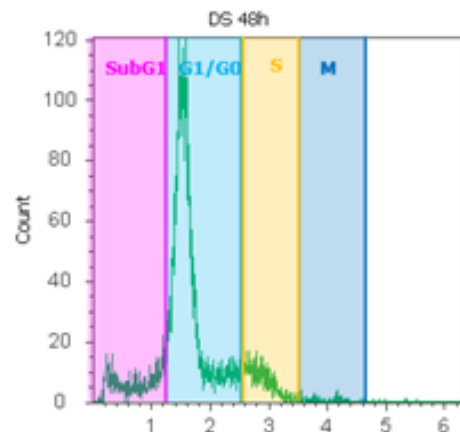


Experiment Name: **07_02_20 PriFri 2xIC50 24h und 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
All Events	21,544	---	100.000%	151.85
R1	13,903	64.533%	64.533%	97.99
R14	8,869	63.792%	41.167%	62.51
SubG1	1,220	13.756%	5.663%	8.60
G1/G0	6,542	73.763%	30.366%	46.11
S	959	10.813%	4.451%	6.76
M	81	0.913%	0.376%	0.57



Anhang 86. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie PriFri2 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207 (Tris), 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

8.6.4.4 Zelllinie A375

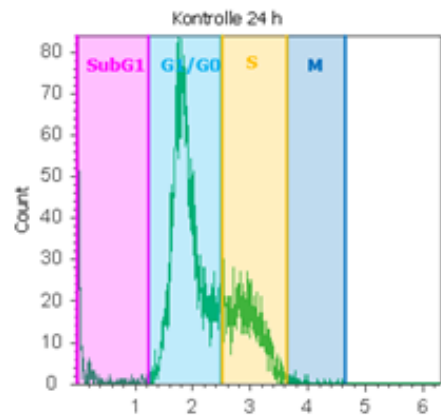
24 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **25_5_20 A375 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle 24 h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	18,550	---	100.000%	81.79
R1	9,570	51.590%	51.590%	42.20
R14	8,857	92.550%	47.747%	39.05
SubG1	475	5.363%	2.561%	2.09
G1/G0	6,001	67.754%	32.350%	26.46
S	2,301	25.979%	12.404%	10.15
M	30	0.339%	0.162%	0.13

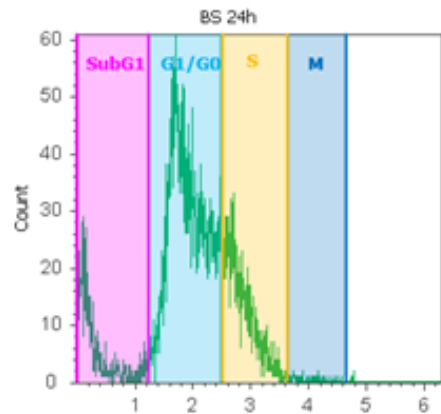


Experiment Name: **25_5_20 A375 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS 24h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	15,712	---	100.000%	286.76
R1	9,589	61.030%	61.030%	175.01
R14	8,677	90.489%	55.225%	158.36
SubG1	990	11.409%	6.301%	18.07
G1/G0	5,565	64.135%	35.419%	101.57
S	1,993	22.969%	12.685%	36.37
M	51	0.588%	0.325%	0.93

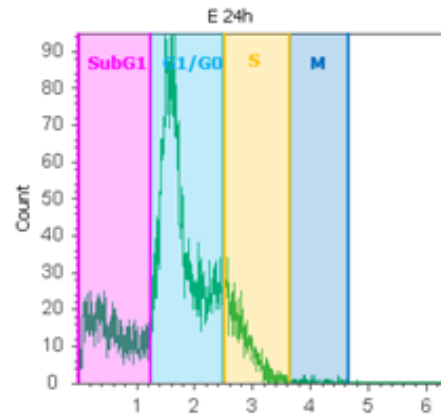


Experiment Name: **25_5_20 A375 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **E 24h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	31,528	---	100.000%	220.28
R1	13,595	43.120%	43.120%	94.99
R14	12,705	93.453%	40.298%	88.77
SubG1	2,744	21.598%	8.703%	19.17
G1/G0	8,196	64.510%	25.996%	57.26
S	1,659	13.058%	5.262%	11.59
M	41	0.323%	0.130%	0.29



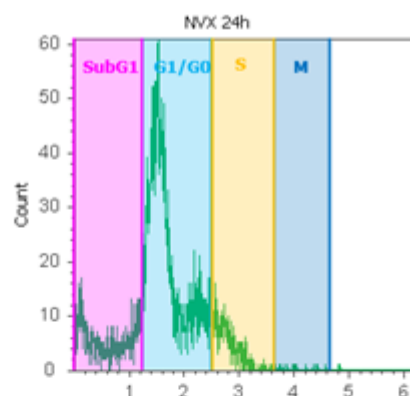
Anhang 87. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie A375 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS) und dem Borkenextrakt der Platane (E). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: **25_5_20 A375 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **NVX 24h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
[-] All Events	17,802	---	100.000%	125.00
[-] R1	6,307	35.429%	35.429%	44.29
[-] R14	5,990	94.974%	33.648%	42.06
[-] SubG1	1,162	19.399%	6.527%	8.16
[-] G1/G0	4,156	69.382%	23.346%	29.18
[-] S	630	10.518%	3.539%	4.42
[-] M	15	0.250%	0.084%	0.11

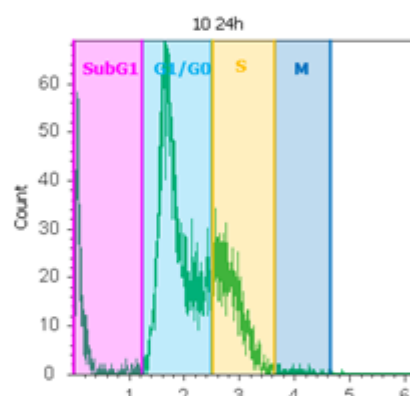


Experiment Name: **25_5_20 A375 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **10 24h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
[-] All Events	15,299	---	100.000%	321.52
[-] R1	9,313	60.873%	60.873%	195.72
[-] R14	8,369	89.864%	54.703%	175.88
[-] SubG1	945	11.292%	6.177%	19.86
[-] G1/G0	5,205	62.194%	34.022%	109.39
[-] S	2,124	25.379%	13.883%	44.64
[-] M	39	0.466%	0.255%	0.82

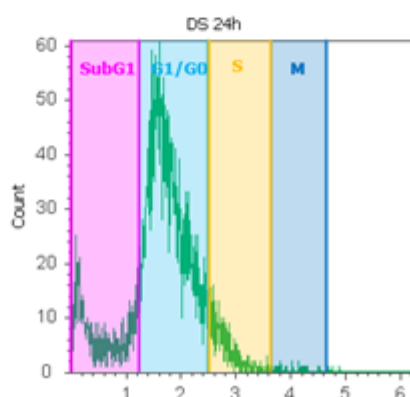


Experiment Name: **25_5_20 A375 24h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **DS 24h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentration
[-] All Events	20,083	---	100.000%	316.06
[-] R1	8,467	42.160%	42.160%	133.25
[-] R14	7,954	93.941%	39.606%	125.18
[-] SubG1	1,397	17.563%	6.956%	21.99
[-] G1/G0	5,882	73.950%	29.288%	92.57
[-] S	619	7.782%	3.082%	9.74
[-] M	27	0.339%	0.134%	0.42



Anhang 88. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie A375 nach 24 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207, 10 und 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

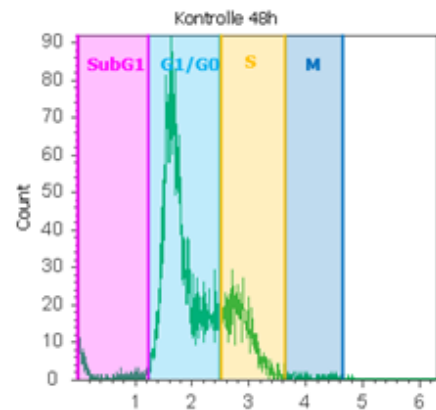
48 Stunden Behandlungsdauer:

Experiment Name: **25_5_20 A375 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **Kontrolle 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	12,634	---	100.000%	310.99
R1	10,000	79.151%	79.151%	246.15
R14	8,335	83.350%	65.973%	205.17
SubG1	257	3.083%	2.034%	6.33
G1/G0	6,057	72.669%	47.942%	149.10
S	1,917	22.999%	15.173%	47.19
M	59	0.708%	0.467%	1.45

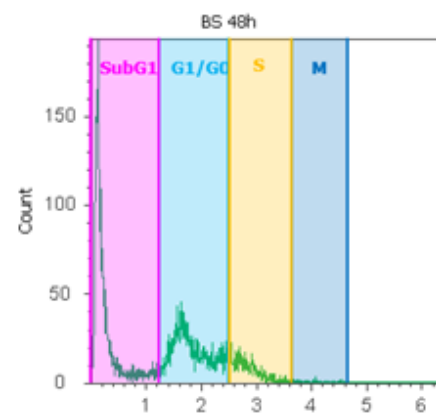


Experiment Name: **25_5_20 A375 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **BS 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	16,645	---	100.000%	533.35
R1	10,000	60.078%	60.078%	320.43
R14	9,384	93.840%	56.377%	300.69
SubG1	4,620	49.233%	27.756%	148.04
G1/G0	3,595	38.310%	21.598%	115.19
S	1,095	11.669%	6.579%	35.09
M	46	0.490%	0.276%	1.47

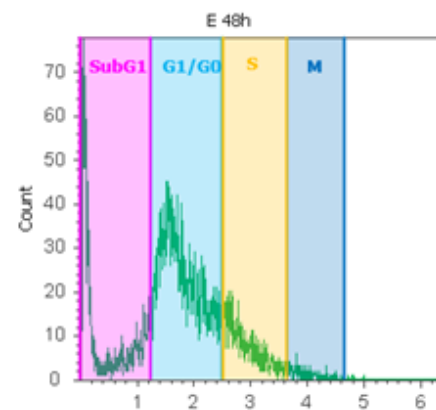


Experiment Name: **25_5_20 A375 48h**

Specimen Name: **Specimen**

Sample Name: **E 48h**

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	20,416	---	100.000%	1,016.56
R1	10,000	48.981%	48.981%	497.93
R14	8,325	83.250%	40.777%	414.52
SubG1	2,070	24.865%	10.139%	103.07
G1/G0	4,736	56.889%	23.197%	235.82
S	1,334	16.024%	6.534%	66.42
M	150	1.802%	0.735%	7.47



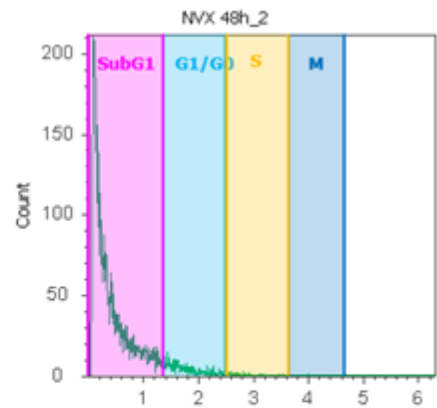
Anhang 89. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie A375 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen Betulinsäure (BS) und dem Borkenextrakt der Platane (E). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

Experiment Name: 30_5_20 A375 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: NVX 48h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	30,941	---	100.000%	1,414.45
R1	10,000	32.320%	32.320%	457.14
R14	9,536	95.360%	30.820%	435.93
SubG1	8,805	92.334%	28.457%	402.51
G1/G0	671	7.036%	2.169%	30.67
S	53	0.556%	0.171%	2.42
M	1	0.010%	0.003%	0.05

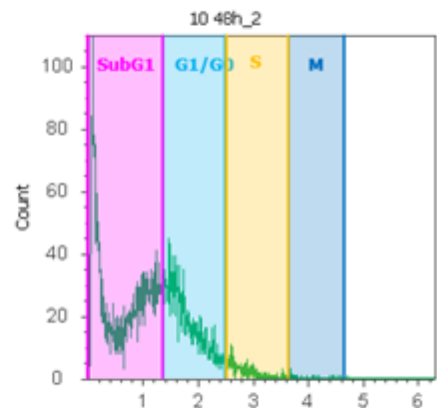


Experiment Name: 30_5_20 A375 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: 10 48h_2

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	18,231	---	100.000%	728.03
R1	10,000	54.852%	54.852%	399.33
R14	9,387	93.870%	51.489%	374.86
SubG1	5,785	61.628%	31.732%	231.01
G1/G0	3,212	34.218%	17.618%	128.27
S	358	3.814%	1.964%	14.30
M	23	0.245%	0.126%	0.92

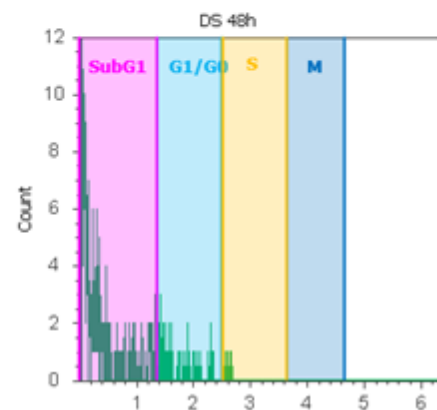


Experiment Name: 30_5_20 A375 48h

Specimen Name: Specimen

Sample Name: DS 48h

Name	Event Count	% Parent	% Total	Concentratio
All Events	3,860	---	100.000%	27.33
R1	436	11.295%	11.295%	3.09
R14	367	84.174%	9.508%	2.60
SubG1	310	84.469%	8.031%	2.19
G1/G0	51	13.896%	1.321%	0.36
S	5	1.362%	0.130%	0.04
M	0	0.000%	0.000%	0.00



Anhang 90. Zellzyklusanalyse an der Zelllinie A375 nach 48 h von der mitgeführten Kontrolle und den Substanzen NVX-207, 10 und 5 (DS). Links ist der gemessene Dotplot mit den dazu gehörigen Werten auf der rechten Seite (siehe Tabelle).

9. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Anne Funtan	geb. Michaelis
Geburtsdatum:	01.10.1991
Geburtsort:	Lutherstadt Eisleben
Familienstand:	Verheiratet

Berufliche Erfahrung

04/2017 – heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Bereich Medizinisch-Pharmazeutische Chemie (Promotionsstudium)
01/2016 - 03/2017	Wissenschaftliche Hilfskraft Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Bildungsweg

10/2013 – 11/2015 Masterstudium Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit Vertiefung im Bereich Organischer Chemie

10/2010 – 10/2013 Bachelorstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/2004 – 06/2010 Martin-Luther-Gymnasium, Lutherstadt Eisleben

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift
Latein	kleines Latinum

Publikationsliste

Güttler, A.; Eiselt, Y.; Funtan, A.; Thiel, A.; Petrenko, M.; Keßler, J.; Thondorf, I.; Paschke, R.; Vordermark, D.; Bache, M., Betulin Sulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors and Anticancer Agents in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22 (16), 8808.

Petrenko, M.; Güttler, A.; Pflüger, E.; Serbian, I.; Kahnt, M.; Eiselt, Y.; Keßler, J.; Funtan, A.; Paschke, R.; Csuk, R.; Vordermark, D.; Bache, M., MSBA-S – A pentacyclic sulfamate as a new option for radiotherapy of human breast cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 113721.

Petrenko, M.; Güttler, A.; Funtan, A.; Keßler, J.; Emmerich, D.; Paschke, R.; Vordermark, D.; Bache, M., Combined 3-O-acetylbetulin treatment and carbonic anhydrase IX inhibition results in additive effects on human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* **2021**, 333, 109326.

Weber, L. A.; Funtan, A.; Paschke, R.; Delarocque, J.; Kalbitz, J.; Meißner, J.; Feige, K.; Kietzmann, M.; Cavalleri, J.-M. V., In vitro assessment of triterpenoids NVX-207 and betuliny-bis-sulfamate as a topical treatment for equine skin cancer. *PLOS ONE* **2020**, 15 (11), e0241448.

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., Betulinic acid shows anticancer activity against equine melanoma cells and permeates isolated equine skin in vitro. *BMC Veterinary Research* **2020**, 16 (1), 44.

Funtan, S.; Funtan, A.; Paschke, R.; Binder, W. H., Biomimetic Elastin-Like Polypeptides as Materials for the Activation of Mechanophoric Catalysts. *Organic Materials* **2020**, 2 (02), 116-128.

Halle (Saale), den 21.09.2021

Anne Funtan

10. Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Sämtliche Inhalte, die aus anderen Quellen direkt oder dem Sinn nach entnommen worden sind, wurden als solche kenntlich gemacht.

Außerdem erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Halle (Saale), den 21.09.2021

Anne Funtan