

Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

Zelluläre und molekulare Wirkungen von
Dammarenolsäure auf humane Krebszelllinien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ariane Ricarda Bednarz

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Guido Kobbe

Gewidmet meiner Familie

Zusammenfassung (deutsch)

Die Dammarenolsäure ist ein, aus der Spezies *Aglaiia* gewonnener, triterpener Naturstoff. Pflanzenbestandteile dieses Mahagonigewächses werden in der traditionellen Medizin indigener Völker, u.a. zur Behandlung von Tumoren eingesetzt. Da viele Medikamente ihren Ursprung in der Tier- und Pflanzenwelt haben, ist eine Untersuchung dieser Naturstoffe interessant. Für einige triterpene Naturstoffe konnte bereits eine Zytotoxizität nachgewiesen werden. Der Dammarenolsäure sind bisher vor allem antivirale und antibiotische Eigenschaften zugeschrieben. Hinsichtlich der Wirkung auf humane Krebszellen ist die Datenlage jedoch limitiert, so dass die Bestimmung und Charakterisierung der Zytotoxizität von Dammarenolsäure auf Brust (MCF-7) - und Darmkrebszelllinien (Hct-116) ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war. Als eine weitere Zielsetzung sollte geprüft werden, ob Dammarenolsäure als „Sensitizer“ für die zytotoxische Wirkung von TRAIL oder Doxorubicin agieren kann, da einige Tumorzellen Resistenzen gegen diese Substanzen aufweisen. Für beide Zelllinien konnte in den hier vorliegenden Untersuchungen eine dosisabhängige Toxizität beobachtet werden. Diese wurde durch Hinzunahme von Insulin signifikant verstärkt. Eine Inkubation mit Serum haltigem Medium führte zur nahezu vollständigen Aufhebung der zytotoxischen Wirkung von Dammarenolsäure. Dieser Effekt beruht am ehesten auf einer Bindung an Albumin. Lichtmikroskopische Befunde sowie die Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3, 7, 8 und 9 legen nahe, dass die Wirkung der Dammarenolsäure zu einem wesentlichen Teil auf der Induktion des programmierten Zelltodes beruht. Weiterführende Untersuchungen legen nahe, dass in diesen Prozess weder eine Modifikation des pro-apoptotischen Proteins Bax von Relevanz ist, noch eine Modifikation des Redox-Status. Eine interessante Beobachtung war, dass es unter Dammarenolsäure zu einer deutlichen Abnahme der Aktivierung von ERK-Typ MAP Kinasen kommt und zu einer Zunahme der aktivierenden Phosphorylierung der p38 MAP-Kinasen. Diese Beobachtung ist möglicherweise für die Apoptose-induzierende Wirkung von Dammarenolsäure von Bedeutung, da insbesondere über die Erk-Typ MAP Kinasen zumeist Wachstums-fördernde Effekte vermittelt werden. Eine weitere wichtige Beobachtung der hier zusammengefassten Arbeiten war, dass Dammarenolsäure zu einer Sensitivierung beider Karzinom-Zelllinien gegenüber der Wirkung von TRAIL bzw. von Doxorubicin führt. Dieser Effekt ist wahrscheinlich durch eine Verstärkung pro-apoptotischer Effekte zumindest mit bedingt. Bezüglich der molekularen Mechanismen, über die die Wirkung von Dammarenolsäure vermittelt werden, sind weiterführende Untersuchungen erforderlich.

Zusammenfassung (englisch)

Dammarenolic acid can be isolated as a triterpene natural compound from *Aglaia* species. Extracts of these mahogany plants are widely used in traditional medicine of indigenous tribes, especially for treatment of cancer. Since the origin of many drugs derives from nature, it is important to research for natural products with anticancerous properties. Some triterpene natural compounds were proven to act as cytotoxic agents. Scientists have revealed an antiviral and antibacterial capacity of dammarenolic acid, however only minor data is available about cytotoxic activities of this substance. Therefore one main aim of this work was to identify and characterize the cytotoxicity of this natural compound on cell lines derived from breast cancer (MCF-7) and colonic cancer (Hct-116). Another purpose of this work was to inquire if dammarenolic acid works as a sensitizer to enhance the cytotoxic effects of TRAIL and doxorubicin respectively, as some cancer cells develop mechanisms to become resistant against these agents.

After incubation, a dose dependant cytotoxicity was detected in both cell lines. Adding insulin to the nutrient solution leads to a significant increased cytotoxic effect, but with the addition of serum, especially albumin, dammarenolic acid failed to work as a cytotoxic agent. This is probably due to binding to albumin. Microscopic observations and determination of caspase activity 3, 7, 8 and 9 suggest that the cytotoxic effect of dammarenolic acid substantially relies on induction of programmed cell death. Further examinations suggest that neither Bax, nor modulation the redox system is of relevance for this effect. An interesting observation was that dammarenolic acid leads to a decreased activity of ERK MAP kinases, whereas the activity of p38 type MAP kinases declines. This may probably be of relevance for the apoptosis inducing effect, since ERK type MAP kinases mainly exert proliferating effects. Secondary it was shown, that dammarenolic acid sensitizes cancer cells to TRAIL and Doxorubicin. Enhancing the proapoptotic machinery is accounted for this effect to some extent. Regarding molecular mechanisms, further investigations of dammarenolic acid are required.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABTS	<i>2,2'-azinobis -3 -ethylbenzothiazoline- 6- sulphonic acid</i>
Ak	Antikörper
ANOVA	<i>analyses of varianz</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylalmino]-propansulfate</i>
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	<i>effective concentration (50%)</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
pERK	phosphorylierte ERK
Em	Emissionswellenlänge
EtOH	Ethanol
Ex	Anregungswellenlänge
FCS	<i>fetal calf serum</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSA	<i>humane serum albumin</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminale kinase</i>
pJNK	phosphorylierte JNK
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
LSD	<i>least significant difference</i>
Lsg	Lösung
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAPKK	MAPK-Kinasen
MAPKKK	MAPK-Kinasen Kinasen
MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
MP	Milchpulver
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
n	Anzahl der Versuche
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB2	Dammarenolsäure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

pp38	phosphorylierte p38 Kinase
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
RFU	<i>relative fluorescence unit</i>
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAPK	<i>stress- activated protein kinase</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Tab	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline Tween 20</i>
TEAC	<i>Trolox- Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
U	<i>Unit</i>
ü.N.	über Nacht
V	Volt
W	Watt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Wirkungen von Dammarenolsäure und verwandten Stoffen.....	1
1.1.1 Aglaia und die traditionelle Medizin.....	1
1.1.2 Wirkungen von Aglaia- Isolaten und triterpenen Naturstoffen.....	1
1.1.3 Wirkungen der Dammarenolsäure.....	2
1.2 In der Arbeit verwendete Zelllinien.....	4
1.3 Apoptose.....	5
1.3.1 Caspasen.....	6
1.3.2 Bcl-2 Familie.....	8
1.4 Signaltransduktion über MAP- Kinasen.....	9
1.5 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress.....	11
1.6 TRAIL.....	11
1.7 Doxorubicin.....	13
1.8 Ziele der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Zelllinien und Dammarenolsäure.....	16
2.1.2 Medien.....	16
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	16
2.1.4 Proteinstandards.....	18
2.1.5 Antikörper.....	18
2.1.5.1 Primärantikörper.....	18
2.1.5.2 Sekundärantikörper.....	18
2.1.6 Chemikalien und Kits.....	18
2.1.7 sonstige Materialien.....	20
2.1.8 Geräte.....	21
2.1.9 Software.....	21
2.1.10 Statistische Auswertung.....	22
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Zellkultur.....	22
2.2.2 Inkubation und Schädigung.....	23
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	23
2.2.4 TEAC-Assay.....	24

2.2.5 Zytotoxizitätstmessung / MTT-Test	24
2.2.6 Apoptosenachweise	25
2.2.6.1 Caspase 3 / 7 Aktivierung (<i>APO-ONE</i> [®] Assay)	25
2.2.6.2 Caspase 8 und 9 Aktivierung (<i>Caspase-Glo</i> [®] 8 und 9 Assay).....	26
2.2.6.3 Caspase Assay (Caspase 8 / 10 und Caspase 9 Aktivität)	27
2.2.7 Proteinanalysen mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	28
2.2.7.1 Proteinisolation	28
2.2.7.2 Proteinbestimmung nach Lowry	28
2.2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli.....	28
2.2.7.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot).....	30
2.2.7.5 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine	30
2.2.7.6 Chemilumineszenz Detektion	31
2.2.7.7 Coomassie-Färbung von Proteinmembranen.....	32
2.2.7.8 <i>Strippen</i> von PVDF-Membranen.....	32
2.2.8. Nachweis von ROS durch den DCF-Assay	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Zelluläre und molekulare Wirkungen von Dammarenolsäure	33
3.1.1. Einfluss von Serum auf die Dammarenolsäuretoxizität	33
3.1.2 Einfluss von Dammarenolsäure auf die Zellmorphologie.....	37
3.1.3 Apoptose.....	39
3.1.3.1 Aktivierung der Caspasen	39
3.1.3.2 Modulation des proapoptotischen Moleküls Bax	44
3.1.4. Einfluss auf die MAP- Kinasen.....	45
3.1.5. Einfluss von Dammarenolsäure auf den Redox-Status	48
3.2. Koinkubationen mit TRAIL bzw. Doxorubicin	51
3.2.1 Sensitivierung von Krebszellen gegenüber TRAIL	51
3.2.2 Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Doxorubicin.....	54
4. Diskussion.....	57
4.1. Einfluss von Serum auf die Dammarenolsäuretoxizität.....	57
4.1.1. Dammarenolsäure wirkt zytotoxisch.....	57
4.1.2. Serum inhibiert eine zytotoxische Wirkung.....	58
4.1.3. Insulin verstärkt die Toxizität.....	59
4.2. Modulation der Apoptose.....	60
4.2.1. Dammarenolsäure aktiviert Caspasen	60
4.2.2. Einfluss von Dammarenolsäure auf den mitochondrialen Signalweg.....	60

4.3. Einfluss von Dammarenolsäure auf den Redox-Status.....	61
4.4. Modulation der MAPK durch Dammarenolsäure.....	62
4.5. Sensitivierung von Krebszellen durch Dammarenolsäure	63
4.5.1. Sensitivierung gegenüber TRAIL	63
4.5.2. Sensitivierung gegenüber Doxorubicin	65
4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	67
5. Literaturverzeichnis	68
6. Anhang.....	81
7. Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Wirkung von Dammarenolsäure und verwandten Stoffen

1.1.1 Aglaia und die traditionelle Medizin

Die Dammarenolsäure ist ein aus der Spezies *Aglaia* gewonnener triterpener Naturstoff. Verschiedene Sträucher und Bäume dieser Gattung der Mahagonigewächse (*Meliaceae*) kommen vorwiegend in tropischen und subtropischen Regionen wie beispielsweise in Sri Lanka, Indien, Thailand, Vietnam, Bangladesch und Australien vor (Pannell, 1992, Muellner et al., 2009). Die indigene Bevölkerung nutzt Blüten dieser Art zum Süßen von Tees, die Stammbestandteile werden u.a. zum Haus- oder Bootbau verwendet (Ebada et al., 2011).

Vor allem aber finden Pflanzenbestandteile aus der Gattung *Aglaia* eine breite Anwendung in der traditionellen Medizin dieser Regionen. Blüten werden z.B. beim Volk der Orang Asli in Malaysia aufgrund ihrer antipyretischen Eigenschaften (Samuel et al., 2010) genutzt. Extrakte aus der Pflanze sollen gegen Schlangen- und Skorpionbissen (Ayyanar and Ignacimuthu, 2005), gegen die Fischvergiftung Ciguatera (Bourdy et al., 1992) und antiviral gegen Herpesinfektionen (Bhandary, 2011), wie auch antiinsektizid wirken (Nugroho et al., 1999). Ferner wird ein breites Wirkspektrum bei Husten, bakteriellen Infekten, Entzündungen, Tumorerkrankungen, Lepra, Diarrhoen, Dyspepsie, Diabetes, Fieber und Malaria beschrieben (Gupta, 2006, Prasad et al., 2008a, McClatchey, 1996, Faysal, 2008, Koch et al., 2015, Khare, 2008, Kumar et al., 2012, Nirmala et al., 2011). So werden z.B. gekochte Samen der Pflanze *A.roxurghiana* in der Behandlung des Diabetes eingesetzt (Jayakumar G, 2010). Dieses breite Spektrum, jedoch insbesondere die antikanzerogenen Eigenschaften der *Aglaia* - Bestandteile sind für die westliche Medizin äußerst interessant, da eine Vielzahl heutiger Medikamente, wie beispielsweise die Vinca-Alkaloide oder die Taxane, ihren Ursprung in der Pflanzen- oder Tierwelt haben (Nirmala et al., 2011, Cragg and Newman, 2005, Chin et al., 2006).

1.1.2 Wirkungen von Aglaia- Isolaten und triterpenen Naturstoffen

In der Literatur konnten nach Isolation und Aufreinigung von *Aglaia*- Bestandteilen verschiedene Inhaltsstoffe identifiziert und charakterisiert werden, deren Wirkung das angegebene Spektrum der traditionellen Medizin bestätigt.

Eine insektizide Eigenschaft konnte für Rocaglamid-Derivate aus Zweigen von *Aglaia oligophylla* und Extrakten der Zweige und Blättern von *Aglaia odorata* nachgewiesen

werden (Dreyer et al., 2001, Nugroho et al., 1999). Blätter von *Aglaiia roxburghiana* wirken antiinflammatorisch (Janaki et al., 1998). Ein antivirales Potential gegen HSV-1, Polio und Masern wurde für Blattextrakte aus *A. odorata* beschrieben (Lipipun et al., 2003). Ferner wirken Essenzen aus der Rinde von *A. ignea* und den Blättern von *A. duppereana* sowie den Zweigen von *A. cucculata* gegen RSV (Esimone et al., 2008). Es konnten nicht nur antiinflammatorische, antivirale und insektizide Eigenschaften von *Aglaiia*-Isolaten belegt, sondern auch ein zytotoxisches Potenzial gegen verschiedene Krebszelllinien nachgewiesen werden, wie beispielsweise bei Rocaglaol aus der Rinde von *A. crassinervia*, Extrakten aus *A. odorata*, Rocaglamid und Silvestrol (Mi et al., 2006, Cai et al., 2010, Zhu et al., 2007, Kinghorn et al., 2016). Ein ebenso breites Wirkspektrum ist für weitere, der Dammarenolsäure strukturverwandten triterpenen Naturstoffe bekannt. Hierzu zählen beispielsweise die pentazyklische Betulinsäure, Oleanolsäure, Ursolsäure, Lupeol und das tetrazyklische Curcubitacin (Hill and Connolly, 2015). Im Interesse der Forschung stehen hier insbesondere das zytotoxische Potenzial und der Wirkmechanismus gegenüber verschiedenen Krebszelllinien. So besitzen Curcubitacin E, Oleanol- und Ursolsäure die Fähigkeit die Angiogeneese zu hemmen (Dong et al., 2010, Laszczyk, 2009). Lupeol wirkt u.a. zytotoxisch auf die Prostatakarzinom- Zelllinie LNCaP, die Hepatom-Zelllinie HepG2 und die aus einem Pankreaskarzinom isolierte Zelllinie AsPC-1 (He et al., 2011, Saleem et al., 2005, Prasad et al., 2007). Relativ selektiv kann Ursolsäure in der Brustkrebszelllinie MCF-7 eine Apoptose induzieren. In den nicht onkogenen MCF10A Zellen hingegen ließ sich nur eine geringe Zytotoxizität dieser Substanzen beobachten (Mishra et al., 2016). Besonders potent scheint in diesem Zusammenhang die Betulinsäure zu sein. Sie leitet eine Apoptose in Zelllinien von Darmkrebs, des Glioblastoms und Medulloblastoms ein und wirkt *in vivo* zytotoxisch gegenüber Lungen-, Magen- und Melanomzellen. Hierzu sind die zugrunde liegenden Wirkmechanismen bereits genauer untersucht (Laszczyk, 2009, Aisha et al., 2012, Fulda et al., 1999, Cháirez-Ramírez et al., 2016).

1.1.3 Wirkungen der Dammarenolsäure

Anders als die vorangehend beschriebenen Triterpene ist die Dammarenolsäure (20S)-Hydroxy-3,4-seco-4(28),24-dammaradien-3-carbonsäure bisher wenig erforscht (siehe Abb.1). Die Substanz wurde erstmalig 1955 und 1960 mit einer Summenformel und einer Strukturaufklärung beschrieben. Sie wurde hier als trizyklische Verbindung mit Carboxyl- und Hydroxylgruppe identifiziert (Arigoni et al., 1960, Mills and Werner, 1955). Die

Röntgenkristallstruktur konnte erst im Jahre 2004 ermittelt werden und beschreibt die Dammarenolsäure als ein tetrazyklisches Triterpen mit sekundärer Ringöffnung (Eck, 2004). Die farblose Substanz wird aus den Mahagonigewächsen *Aglaia* und *Cabrlea eichleriana* und aus *Shorea javanica* isoliert und stellt eine der Hauptverbindungen von *A. ignea/rubiginosa* dar (Rao et al., 1975, Rivero-Cruz et al., 2004, Ukiya et al., 2010, Eck, 2004).

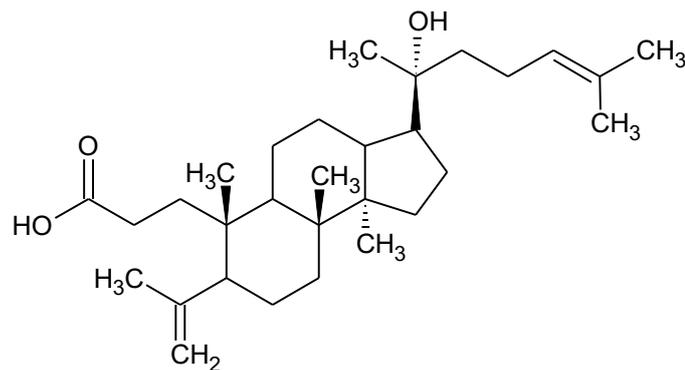


Abb. 1: Strukturformel der Dammarenolsäure, $C_{30}H_{50}O_3$ (modifiziert nach Datenblatt der Firma Alexis Biochemicals)

Bisherige Daten spiegeln vor allem ein breites biologisches Potenzial gegenüber verschiedener Viren wider. Antivirale Eigenschaften sind für das Herpes Simplex Virus (HSV), das *Respiratory- Syncytial- Virus* (RSV), das Humane Immunodefizienz Virus (HIV), das Simiane Immunodefizienz Virus (SIV), das Murine Leukämievirus (MLV) und für das Epstein- Barr- Virus (EBV) bekannt (Poehland et al., 1987, Esimone et al., 2008, Esimone et al., 2010, Ukiya et al., 2010). Es kann eine dosisabhängige Hemmung der Reverse Transkriptase Aktivität nachgewiesen werden (Eck, 2004). Durch Methylierung der Dammarenolsäure wird sowohl der antivirale Effekt gegen RSV als auch gegen HIV aufgehoben. Es wird vermutet, dass die Säurefunktion von Dammarenolsäure entscheidend für diese Effekte ist (Esimone et al., 2008, Esimone et al., 2010).

Auch gewisse antibiotische und antifungizide Wirkungen gehen von der Dammarenolsäure aus. So konnte eine Wachstumshemmung von *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* sowie von den phytopathogenen Pilzen *Cladosporium cucumerinum* und – *herbarum* beobachtet werden. Eine insektizide Eigenschaft gegen die Raupen von *Spodoptera littoralis*, einer Mottenart, bestand hingegen nicht (Eck, 2004).

Auf zellulärer Ebene sind Einflüsse auf Zelllinien nachweisbar, die von verschiedenen Tumoren abgeleitet wurden. Es liegt eine gewisse Zytotoxizität gegen HL60-Leukämiezellen und gegen die Zelllinie L5178Y eines Maus- Lymphoms vor. In der

humanen Melanomzelllinie CRL1579 weisen nur reduzierte oder mit Aminosäuren konjugierte Derivate der Dammarenolsäure einen zytotoxischen Effekt auf (Ukiya et al., 2010, Eck, 2004). In, von einem Rattenphäochromozytom abgeleiteten Zelllinien (PC12) und in HeLa Zellen, einer Zelllinie, die aus einem Zervixkarzinom isoliert wurde, konnte bis zu einer Konzentration von 10µg/ml hingegen kein toxischer Effekt gezeigt werden (Eck, 2004). Bei Letzteren waren höhere Konzentrationen an Dammarenolsäure erforderlich, um zytotoxische Effekte zu erzielen. Dabei kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der S- und G2/M- Phase (Esimone et al., 2010).

1.2 In der Arbeit verwendete Zelllinien

Weltweit stehen die kardiovaskulären Erkrankungen mit bis zu 20% der Todesursachen an erster Stelle, gefolgt von den Krebserkrankungen, wobei jährlich etwa 8,8 Mio. Menschen an einem Malignom versterben (Wang et al., 2016, Townsend et al., 2015). Im Hinblick auf die führenden Krebs- bedingten Todesursachen ist das Mammkarzinom bei Frauen die häufigste Neoplasie mit der höchsten Mortalität während das kolorektale Karzinom bei Männern die zweithäufigste und bei Frauen die dritthäufigste malignom-bedingte Todesursache darstellt (Malvezzi et al., 2015, Ferlay et al., 2015).

Vor dem Hintergrund der Häufigkeit dieser Tumoren stand die Charakterisierung des Einflusses von Dammarenolsäure auf die nachfolgend ausgeführten Darm- und Brustkrebszelllinien im Vordergrund der folgend zusammengefassten Untersuchungen.

Die von einem kolorektalen Karzinom abgeleitete Zelllinie Hct-116 ist hoch aggressiv und nicht mehr differenzierungsfähig (Brattain et al., 1981). Nach Injektion dieser Zellen in Mäuse entstehen auch dort Tumoren und Metastasen (Yeung et al., 2010, Brattain et al., 1981, Céspedes et al., 2007). Sie können unabhängig von Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF proliferieren und reagieren sensitiv auf TRAIL (Boyd et al., 1988, Özören and El-Deiry, 2002). In den Zellen konnte eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden (Bhattacharyya et al., 1994).

MCF-7, benannt nach der *Michigan Cancer Foundation*, ist die in der Forschung am häufigsten benutzte Brustkrebszelllinie (Burdall et al., 2003). Sie wurde 1973 aus dem Pleuraerguss einer 69- jährigen Patientin mit metastasiertem duktalem Mammakarzinom etabliert und exprimiert neben einem Estrogenrezeptor auch Rezeptoren für Androgene, Progesteron und Glucocortikoide (Soule et al., 1973, Brooks et al., 1973, Lippman et al., 1976, Lee et al., 2015). Das besondere an MCF-7 Zellen ist ihre relative Resistenz

gegenüber TRAIL und ein Fehlen der Caspase 3 (Keane et al., 1999, Jänicke et al., 1998, Devarajan et al., 2002).

1.3 Apoptose

Die Einleitung des programmierten Zelltodes in einer Zelle ist für die Regulation von Zellpopulationen essentiell und spielt sowohl in physiologischen, als auch in pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. So ist sie unter anderem für die ungestörte Entwicklung von Organen und Gliedmaßen von zentraler Bedeutung und spielt in der Entwicklung des Immunsystems und in der Ausbildung einer pathogen-spezifischen Immunantwort eine essentielle Rolle (Lawen, 2003, Jacobson et al., 1997). Von der Apoptose, dem „programmierten Zelltod“ im engeren Sinne abzugrenzen ist die Nekrose, welche im Gegensatz zur Apoptose durch einen passiven Prozess gekennzeichnet ist. Hierbei kommt es durch ATP- Verlust zu einem Anschwellen der Zellen. Der Ausbildung von kleinen Vakuolen im Zytoplasma folgt eine Lyse der Zellmembran. Die resultierende unkontrollierte Freisetzung von Zellbestandteilen führt zur Inflammation und Schädigung des umgebenden Gewebes. Diese Entzündungsreaktion fehlt bei der Apoptose (Trump et al., 1997, Edinger and Thompson, 2004, Majno and Joris, 1995).

Letztere stellt hingegen eine aktive Form des Zelltodes dar und setzt die initiale Aktivierung verschiedener Signalkaskaden voraus, die zur Zell- und Chromatinkondensation führen (Kerr et al., 1972). Spezifische Endonukleasen schneiden die DNA zwischen den Nukleosomen und führen so zu DNA- Fragmenten mit etwa 185 Basenpaaren (Majno and Joris, 1995). Die degradierten Zellbestandteile werden schließlich als membranumhüllte apoptotische Körperchen von der Zelle abgeschnürt. Dieser Vorgang wird auch als „*Budding*“ bezeichnet. Während der Apoptose transloziert Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran. Dies trägt dazu bei, dass die abgeschnürten apoptotischen Körperchen von Phagozyten erkannt und rasch abgebaut werden können (Martin et al., 1995, Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).

Manche Autoren beschreiben den unphysiologischen Zelltod, z.B. ischämischer Genese mit dem Wort „Oncosis“, das genauer als das Wort Nekrose auf die morphologisch beschriebene Zellschwellung eingeht. Die Nekrose sei hier die gemeinsame Endstrecke von Oncosis und Apoptose bei der lediglich fragmentierte Zellbestandteile zu erkennen sind. Apoptose und „Oncosis“ stellen für sie somit prämortale Prozesse, die Nekrose demnach einen postmortalen Zustand dar (Majno and Joris, 1995, Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002, Trump et al., 1997).

Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Zelltod trägt wesentlich zur Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer, AIDS, sowie Diabetes mellitus Typ I und anderen Autoimmundefekten bei (Lawen, 2003, Zimmermann et al., 2001, Wyllie, 1997).

Da die Einleitung der Apoptose für die Entfernung beschädigter Zellen von zentraler Bedeutung ist, kommt der fehlerhaften Regulation apoptotischer Prozesse in der Entstehung von Tumoren eine wichtige Bedeutung zu. Insbesondere Mutationen, die zu einer Störung der Funktion von pro- oder anti-apoptotischen Proteinen führen, können ein unkontrolliertes Zellwachstum zur Folge haben und damit eine maligne Transformation entsprechender Zellen begünstigen. Dabei stellen, wie weiter unten etwas detaillierter ausgeführt, anti-apoptotische Proteine eine Gruppe von Proteinen dar, die die Ausführung der Apoptose verhindern. Pro-apoptotische Proteine hingegen treiben die Induktion der Apoptose in der beschädigten Zelle voran, um die Beseitigung derselben sicherstellen. Zu letzteren zählen auch Proteine, wie das p53, die durch zellschädigende Ereignisse und hierbei vor allem Beschädigung der DNA aktiviert werden und die Induktion der Apoptose herbeiführen. Darüber hinaus können auch Mutationen von, den Zellzyklus kontrollierenden Proteinen zu einem unregulierten Zellwachstum führen (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002, Wyllie, 1997, Su et al., 2015).

1.3.1 Caspasen

Eine zentrale Rolle in der Induktion der Apoptose spielen die Caspasen (Cystein- Aspartat-spezifische Proteasen). Diese enthalten Cysteinreste im aktiven Zentrum und spalten ihr Substrat spezifisch nach Aspartatresten (Zimmermann et al., 2001, Thornberry et al., 1997). Caspasen liegen als inaktive Proenzyme (Zymogene) im Zytoplasma vor und setzen sich aus einer N-terminalen Prodomäne sowie einer größeren und kleineren Untereinheit zusammen (Fink and Cookson, 2005).

Von den 14 bekannten Caspasen gehören 11 zur humanen Spezies, die Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10 sind dabei direkt in die Regulation der Apoptose involviert, andere Caspasen, wie die Caspase 1 spielen hingegen eine wichtige Rolle in der Regulation von unter anderem entzündlichen Prozessen. Man unterscheidet die Initiator- von den Effektorcaspasen. Letztere werden von den Initiatorcaspasen aktiviert (Fink and Cookson, 2005, Riedl and Shi, 2004, Goldar et al., 2015).

Die Initiatorcaspasen (2, 8, 9 und 10) haben eine lange Prodomäne. Erst durch Dimerisierung werden sie aktiviert. Dies wird vermittelt durch Bindung der Prodomäne an

zelluläre Adaptermoleküle. (Fink and Cookson, 2005). Die Procaspasen 2 und 9 tragen am N-terminalen Ende eine sogenannte *caspase recruitment domaine* (CARD), mit der sie an einen Aktivator-Komplex, das Apoptosom, binden können (Boatright and Salvesen, 2003, Man and Kanneganti, 2016). Die Procaspasen 8 und 10 weisen am N-terminalen Ende eine *death effector domaine* (DED) auf und werden über den extrinsischen Signalweg moduliert.

In der Caspasenkaskade aktivieren die Initiatorcaspasen die Effektorcaspasen (3, 6 und 7), die eine kurze Prodomäne aufweisen, durch proteolytische Spaltung (Shi, 2002). Effektorcaspasen vermitteln viele Prozesse, die kennzeichnend für die Apoptose sind. Hierzu gehört zum Beispiel der Abbau von Proteinen des Zytoskeletts, die Degradation der DNA und die Umlagerung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran (Martin et al., 1995, Fink and Cookson, 2005). Die initiale Aktivierung der Caspasenkaskade kann über einen extrinsischen und einen intrinsischen Signalweg erfolgen.

Der extrinsische Signalweg wird über die Bindung von Todesliganden wie z.B. TNF α , TRAIL und FasL an Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt. Man unterscheidet verschiedene, zur TNF-Superfamilie gehörende Todesrezeptoren, wie z.B. den TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) 1, den CD95 und die TRAIL-Rezeptoren TRAILR1 und TRAILR2. Sie besitzen eine zytoplasmatisch gelegene Todesdomäne (*DD/death domaine*) über die Adaptermoleküle rekrutiert und eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert wird. So kommt es nach Bindung des CD95 Liganden zur Oligomerisierung der Rezeptortodesdomänen und konsekutiver Anlagerung des Adaptermoleküls FADD (*Fas-associated death domaine*). An diesen, als DISC (*death-inducing signalling complex*) bezeichneten Komplex binden die Procaspasen 8/10 mit ihrer DED (*death effector domaine*) und werden auf diese Weise aktiviert (Boatright and Salvesen, 2003, Ashkenazi and Dixit, 1998, Lavrik et al., 2005, Goldar et al., 2015, Fulda, 2015, Ashkenazi, 2015).

Ergänzend kann die Caspase 8 über die Spaltung von Bid, einem Protein der Bcl-2 Familie, die Bid-vermittelte Freisetzung von Cytochrom C fördern. Folgend kommt es zur Ausbildung des Apoptosoms und damit zur Aktivierung von Caspase 9 (Lavrik et al., 2005, Zimmermann et al., 2001, Koff et al., 2015).

Der intrinsische, mitochondriale Signalweg kann durch extra- und intrazelluläre Stimuli, wie den Entzug von Wachstumsfaktoren, Toxine, Bestrahlung, oxidativen Stress und DNA-Schäden induziert werden (Foo et al., 2005, Riedl and Shi, 2004). Eine zentrale Rolle für die Aktivierung dieses Signalweges spielt die erhöhte Permeabilität der äußeren

Mitochondrienmembran. Hierdurch kommt es u.a. zur Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol (Kroemer et al., 2007).

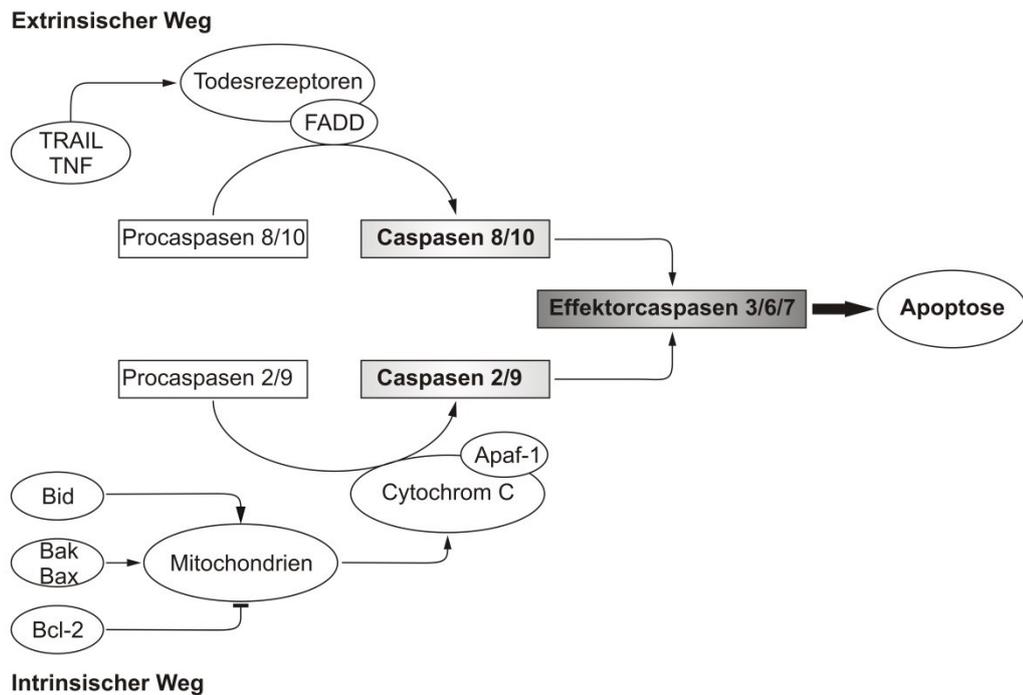


Abb. 2: Vereinfachte, schematische Darstellung der Aktivierung der Apoptose über die Caspase-Kaskade

Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 kann über einen extrinsischen und einen intrinsischen Signalweg erfolgen. Im extrinsischen Signalweg kommt es nach Bindung eines Todesliganden zur Aktivierung der Initiatorcaspase 8. Der intrinsische Signalweg wird über die Freisetzung von Cytochrom C vermittelt und führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase 9. Caspase 8 und 9 aktivieren die Effektorcaspasen (gezeichnet mit Windows Corel Draw)

Die Bindung des Cytochrom C an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor- 1*) ermöglicht eine Anlagerung von ATP und induziert die Oligomerisierung von Apaf. Diesen Komplex aus Apaf, ATP und Cytochrom C nennt man Apoptosom. Die Procaspase 9 lagert sich mit der CARD-Domäne an Apaf und wird dadurch aktiviert. Durch Anlagerung der Procaspase 3 an den Komplex wird diese durch die Caspase 9 gespalten und damit aktiviert (Fulda and Debatin, 2006, Zimmermann et al., 2001, Kroemer et al., 2007, Riedl and Shi, 2004, Boatright and Salvesen, 2003, Goldar et al., 2015).

1.3.2 Bcl-2 Familie

Mitglieder der Bcl-2- Familie spielen eine zentrale Rolle in der Induktion der mitochondrialen Apoptose. Sie werden aufgrund ihrer Funktion und der Anzahl ihrer Bcl-

2- Homologie- Domänen (BH) in 3 Gruppen unterteilt (Chipuk et al., 2006): Die antiapoptotische Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 weisen jeweils alle 4 existierenden BH-Domänen (BH1-BH4) auf. Die proapoptotischen Proteine bestehen aus weniger BH-Domänen und lassen sich in 2 Gruppen unterteilen: Bax und Bak mit jeweils 3 BH-Domänen (BH1-BH3) und die BH-*only* Proteine, z.B. Bid, Baf, Bim und Puma, die nur die BH3- Domäne in ihrer Struktur enthalten (Chipuk et al., 2006, Adams and Cory, 2007). Bax liegt inaktiv im Zytosol vor, Bak an der äußeren Mitochondrienmembran. Unter einem apoptotischen Stimulus oligomerisieren Bax und Bak und bilden einen porenartige Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran, der u.a. zur Freisetzung von Cytochrom C führt (Adams and Cory, 2007, Kroemer et al., 2007). Die antiapoptotischen Proteine, wie z.B. Bcl-xL hemmen Bax und Bak und schützen das Mitochondrium vor Permeabilisierung der Membran. Die BH3-*only* Proteine können über verschiedene Wege die Apoptose induzieren. Entweder sie hemmen die Gruppe der antiapoptotischen Proteine oder agieren als direkte Aktivatoren der proapoptotischen Gruppe wie Bax und Bak (Chipuk et al., 2006, Adams and Cory, 2007, Kroemer et al., 2007, Lopez and Tait, 2015). Über die Caspase 8 induzierte Spaltung von Bid, einem BH-only Protein, und konsekutiver Aktivierung von Caspase 9, kann der extrinsische mit dem intrinsischen Apoptoseweg verbunden werden (Riedl and Shi, 2004).

1.4 Signaltransduktion über MAP- Kinasen

Die Regulation von Zellpopulationen erfolgt durch exogene Stimuli und konsekutiv beeinflusste intrazelluläre Prozesse. Die Familie der MAPK (Mitogen- aktivierte Protein- Kinasen) spielt eine fundamentale Rolle in der Weiterleitung einer Vielzahl von Signalen, über die Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, die zelluläre Stressantwort aber auch die Apoptose reguliert werden (Rossomando et al., 1989, Lu and Xu, 2006, Qi and Elion, 2005). Viele Mutationen bei Tumorzellen betreffen den Signalweg der MAPK, wie z.B. die Mutation von KRAS bei dem kolorektalen Karzinom (Lievre et al., 2006, Dhillon et al., 2007), die mit einer konstitutiven Aktivierung von v.a. ERK 1/2 (*extracellular signal- related kinase*) einhergehen.

Abgesehen von ERK1/2 werden noch die p38 $\alpha/\beta/\gamma$ und JNK 1/2/3 (*c-Jun N-terminale kinase*) zu den Mitgliedern der klassischen MAPK gezählt. Dabei werden JNK auch als SAPK (*stress- activated protein kinase*) bezeichnet. Die Signaltransduktion erfolgt über ein kaskadenartiges Schema, wobei jede Kinase als Substrat der vorgeschalteten fungiert. Die MAP Kinasen ERK, JNK und p38 werden mittels Phosphorylierung an Threonin und

Tyrosinresten aktiviert. Dies geschieht durch vorgeschaltete MAPK-Kinasen (MAPKK), die auch als MEK bzw. MKK 3/6 und 4/7 bezeichnet werden. Diese wiederum müssen erst durch Phosphorylierung von vorgeschalteten MAPK-Kinasen Kinasen (MAPKKK) aktiviert werden. Somit erfolgt die kaskadenartige Phosphorylierung in bestimmter Reihenfolge: MAPKKK > MAPKK > MAPK (siehe Abb.3). Eine Inaktivierung erfolgt durch Abspaltung der Phosphatreste durch MAPK- Phosphatasen (Schaeffer and Weber, 1999, Lu and Xu, 2006, Pearson et al., 2001).

Eine Aktivierung des ubiquitär exprimierten ERK-Signalweges erfolgt z.B. durch Serum, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren. So wird exemplarisch nach Bindung von Liganden an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase das G-Protein Ras aktiviert, welches konsekutiv die MAPKK Raf aktiviert. Letzlich werden Proteine des Zytoskeletts, Transkriptionsfaktoren, Proteinasen, Phosphatasen und Proteine des Apoptosesignalweges wie z.B. die Caspase 9 modifiziert und damit vor allem Signale der Proliferation und Differenzierung weitergeleitet (Pearson et al., 2001, Schaeffer and Weber, 1999, Lu and Xu, 2006, Qi and Elion, 2005, Caunt et al., 2015).

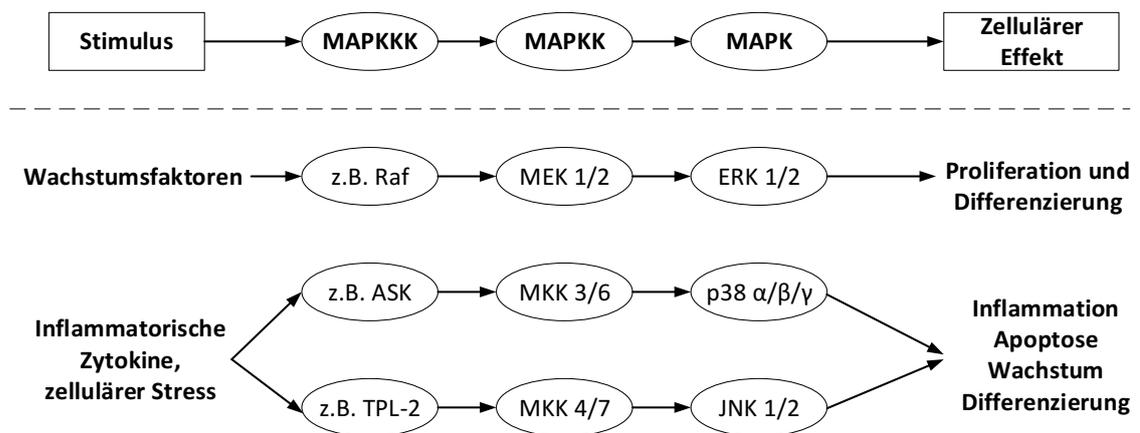


Abb. 3: Vereinfachte, schematische Darstellung der MAPK-Kaskade (gezeichnet mit Windows Visio)

Eine Aktivierung der JNK- und p38- Kaskade erfolgt hingegen unter anderem durch z.B. zelluläre Stressoren wie inflammatorische Zytokine (IL-1 β und TNF), UV- und Röntgenstrahlung, Wasserstoffperoxid, den Entzug von Wachstumsfaktoren sowie thermischen und osmotischen Schock und induziert vorwiegend Inflammation und Apoptose. Auf der anderen Seite können, in Abhängigkeit von Dauer und Intensität des initialen Signals und durch Beeinflussung anderer Signalwege, Prozesse wie Proliferation und Differenzierung resultieren. Modifizierte Substrate dieser Signalwege sind z.B. NF- κ B und p53. Die MAPK-Signalwege modifizieren sich zum Teil gegenseitig, v.a. die p38- und JNK-Kaskade. Auch die Aktivierung des ERK-Signalweges wird in Abhängigkeit des

Kontextes z.B. durch p38 gehemmt (Lu and Xu, 2006, Wagner and Nebreda, 2009, Qi and Elion, 2005, Ichijo, 1999, Garrington and Johnson, 1999, Sui et al., 2014).

1.5 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Unter physiologischen Bedingungen liegt ein zelluläres Gleichgewicht zwischen der Bildung und der Elimination von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vor. Diese Homöostase ist wichtig für die Funktion und das Überleben der Zelle. Reaktive Sauerstoffspezies umfassen u.a. freie Radikale wie die Hyperoxide und Hydroxylradikale, aber auch Wasserstoffperoxid. Sie können nicht nur durch exogene Faktoren wie Strahlung, Chemikalien und Schadstoffe aus der Luft induziert, sondern auch endogen produziert werden. Die Atmungskette ist die bedeutendste ROS-Quelle. Weitere ROS-Bildner sind z.B. Peroxisomen, die NAD(P)H-Oxidase und die Xanthinoxidase (Trachootham et al., 2008, Fruehauf and Meyskens, 2007, Sies, 1986).

Der Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies wird durch verschiedene Antioxidantien wahrgenommen. Mitglieder des enzymatischen Systems wie die Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase und die Katalase werden durch nicht-enzymatische Antioxidantien wie u.a. Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), Glutathion und Flavonoide in der Elimination von ROS unterstützt (Trachootham et al., 2008).

Reichen die antioxidativen Kapazitäten der Zelle nicht aus, kommt es zur Akkumulation von ROS, auch als oxidativer Stress bezeichnet. Geringe Mengen reaktiver Sauerstoffspezies wirken proliferativ. So ist in vielen neoplastischen Zellen das basale ROS-Niveau erhöht. Unter größeren Mengen an ROS kommt es zur direkten Modifikation von Proteinen, Lipiden und der DNA. Zelluläre Zielmoleküle der Signaltransduktion von oxidativem Stress sind u.a. der Akt und MAPK-Signalweg, die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP1 und p53, aber auch Bcl-2 und Onkogene wie z.B. Ras. Oxidativer Stress spielt nicht nur eine Rolle in der Pathogenese von Malignomen, sondern auch bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, im Alterungsprozess und bei der hepatischen Enzephalopathie (Trachootham et al., 2008, Valko et al., 2007, Valko et al., 2006, Ray et al., 2012, Sies et al., 2017, Häussinger and Görg, 2010).

1.6 TRAIL

TNF- *Related Apoptosis- Inducing Ligand* (TRAIL), auch als Apo2 Ligand (Apo2L) bezeichnet, gehört zu den Zytokinen der TNF- Superfamilie. Das aus 281 Aminosäuren bestehende, Typ II Membranprotein induziert in einer Vielzahl von Krebszelllinien einen

apoptotischen Zelltod (Wiley et al., 1995, Pitti et al., 1996, Ashkenazi et al., 1999). TRAIL wird hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems exprimiert, kann aber nach proteolytischer Spaltung von der Zelloberfläche als lösliche Form vorliegen (Falschlehner et al., 2007, Wang and El-Deiry, 2003). TRAIL kann an verschiedene TNF-verwandte Todesrezeptoren binden. Dazu zählen der TRAIL-Rezeptor 1 oder DR4 (*death-signaling receptor*), sowie der TRAIL-Rezeptor 2, auch als DR5 bezeichnet. Nach Bindung des Moleküls trimerisiert der Rezeptor, rekrutiert über die intrazelluläre Todesdomäne das Adaptermolekül FADD und leitet schließlich über den DISC und die Aktivierung von Caspase 8 den apoptischen Signalweg ein. Darüber hinaus ist TRAIL an der Regulation weiterer Signaltransduktionswege wie z.B. der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der MAPK JNK beteiligt. Neben DR4 und DR5 sind drei weitere Rezeptoren beschrieben: DcR1, DcR2 und Osteoprotegerin. Die kompetitiven Decoy-Rezeptoren (DcR) DcR1 und DcR2 weisen entweder nur eine verkürzte (DcR2) oder gar keine intrazelluläre Todesdomäne (DcR1) auf. Daher bleibt nach Bindung von TRAIL die apoptotische Signaltransduktion aus. Auch der lösliche TRAIL- Rezeptor Osteoprotegerin übt eine antiapoptotische Wirkung aus, indem TRAIL gebunden wird und dadurch einer Aktivierung der Todesrezeptoren DR4 und DR5 nicht mehr zur Verfügung steht (Sheridan et al., 1997, Pan et al., 1997, Falschlehner et al., 2007, Ashkenazi and Dixit, 1998, Ashkenazi, 2015).

TRAIL-Rezeptoren werden auf vielen Zellen exprimiert. Die Eigenschaft von TRAIL, im Gegensatz zu TNF α , insbesondere auf maligne Zellen zytotoxisch zu wirken macht diesen Stoff für die Tumorthapie interessant. Die meisten gesunden Zellen werden nicht beeinträchtigt. Es sind jedoch toxische Effekte in humanen Hepatozyten nachgewiesen, so dass eine genaue Dosisfindung und Evaluation von potenziellen Nebenwirkungen wichtig ist. In multiplen humanen Krebszelllinien konnte eine Toxizität *in vitro* und auch *in vivo* z.B. in Mäusen und Affen nachgewiesen werden. Relevante Nebenwirkungen wurden in den Tieren nicht beobachtet (Ashkenazi et al., 1999, Kelley et al., 2001, Kruyt, 2008, Jo et al., 2000, Lim et al., 2015).

Dieser vielversprechende Effekt gilt jedoch nicht für alle Krebszelllinien. So ist beispielsweise die Brustkrebszelllinie MCF-7, im Gegensatz zu der Kolonkarzinomlinie Hct-116, resistent gegenüber einer Inkubation mit TRAIL (Sanlioglu et al., 2005, Lacour et al., 2001, Ashkenazi et al., 1999). Mechanismen, die der TRAIL-Resistenz zu Grunde sind vielfältig. So können beispielsweise das Expressionsprofil der Rezeptoren, Mutationen der Rezeptoren und Veränderungen der TRAIL-abhängigen Signalkaskaden wie die Bcl-2 Familie, NF- κ B und die MAPK die Resistenz beeinflussen. Resistente Zelllinien können

jedoch durch eine Koinkubation von Chemotherapeutika mit TRAIL sensitiviert werden. Es wurden bereits erste Phase I und II-Studien mit TRAIL oder modifiziertem TRAIL in Patienten durchgeführt (Zhang and Fang, 2005, Kruyt, 2008, Johnstone et al., 2008, Kim et al., 2000, Lim et al., 2015, Leng et al., 2017).

1.7 Doxorubicin

Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthrazykline und wird auch als Adriamycin bezeichnet. Die Anthrazykline spielen eine wichtige Rolle als Zytostatika z.B. in der Chemotherapie von Leukämien, des Bronchial- und Ovarialkarzinoms und vor allem des Mammakarzinoms (Carvalho et al., 2009, von Minckwitz et al., 2011).

Doxorubicin bindet nach Eintritt in die Zelle an die 20 S-Untereinheit des Proteasoms. Dieser Komplex transloziert in den Zellkern. Dort diffundiert das Doxorubicin vom Proteasom und wirkt als Interkalator der DNA, sowie als Hemmstoff der Topoisomerase II. Eine Transkription und Replikation ist daher nicht mehr möglich. Ferner interagiert Doxorubicin mit dem Mitochondrium indem es an Cardiolipin bindet. Doxorubicin fungiert als Elektronenakzeptor und wird dadurch zu einem Semichinon reduziert. Dieser toxische Metabolit kann wiederum ROS induzieren. Kumulativ wird u.a. über diese Prozesse der Zelltod eingeleitet (Gewirtz, 1999, Carvalho et al., 2009).

Einer Chemotherapie mit Anthrazyklinen sind jedoch durch gastrointestinale, myelosuppressive und kardiale Nebenwirkungen Grenzen gesetzt. Hervorzuheben ist die Kardiotoxizität dieser Substanzklasse. Diese kann sich akut in Form von Rhythmusstörungen und EKG-Veränderungen und chronisch als kongestive Herzinsuffizienz äußern. Das Auftreten der Herzinsuffizienz korreliert mit der kumulativ verabreichten Dosis (Lefrak et al., 1973, Swain et al., 2003, Carvalho et al., 2009).

Da Anthrazykline jedoch eine effiziente antitumoröse Wirkung zeigen, wird nach neuen Möglichkeiten gesucht, die Kardiotoxizität zu reduzieren. Neben dem mit Liposomen verkapselten Doxorubicin oder der pegylierten Form scheinen auch antioxidative Eisenchelatoren protektive Effekte zu zeigen (Rivankar, 2014, Batist et al., 2001, Swain et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit ist die Kombinationstherapie von Doxorubicin mit anderen zytotoxischen Stoffen. So kann z.B. durch das Triterpen Betulinsäure in Zellkulturen eine Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Doxorubicin erzielt werden (Fulda and Debatin, 2005).

1.8 Ziele der Arbeit

Der Naturstoff Dammarenolsäure kann aus der Spezies *Aglaia*, ein hauptsächlich in Südostasien vorkommendes Gewächs, gewonnenen werden (Pannell, 1992, Muellner et al., 2009). In der traditionellen Medizin dieser Regionen werden Extrakte aus *Aglaia* aufgrund ihrer antipyretischen und antibakteriellen Eigenschaften genutzt (Samuel et al., 2010, McClatchey, 1996). Ferner wird ein breites Wirkspektrum bei Husten, bakteriellen Infekten, Entzündungen, Tumorerkrankungen, Lepra, Diarrhoen, Dyspepsie, Diabetes, Fieber und Malaria beschrieben (Gupta, 2006, Prasad et al., 2008a, McClatchey, 1996, Faysal, 2008, Koch et al., 2015, Khare, 2008, Kumar et al., 2012, Nirmala et al., 2011).

Zur Entwicklung neuer Medikamente gegen Krebs ist die Grundlagenforschung substanziell. An Stellenwert zugenommen hat in den letzten Jahren vor allem das Interesse an Pflanzenstoffen mit antikanzero gener Wirkung. So ist für zahlreiche, der Dammarenolsäure strukturverwandte Naturstoffe wie z.B. Betulinsäure, Lupeol und Curcubitacin ein zytotoxisches Potenzial an verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen worden (Laszczyk, 2009, Dong et al., 2010).

Für Dammarenolsäure ist bisher eine breite Wirkung gegenüber Viren wie HSV, RSV, HIV und EBV beschrieben (Poehland et al., 1987, Esimone et al., 2008, Esimone et al., 2010, Ukiya et al., 2010).

Bislang liegen jedoch nur limitierte Daten zu den Effekten von Dammarenolsäure auf Krebszellen vor. Insbesondere bestehen noch keine Untersuchungen zum Einfluss dieser Substanz auf das Wachstum von Zelllinien, die sich vom Mammakarzinom bzw. dem Kolonkarzinom ableiten.

Vor diesem Hintergrund war zunächst die Bestimmung und Charakterisierung des zytotoxischen Potenzials von Dammarenolsäure auf zwei humane Krebszelllinien, die sich vom Kolon- (Hct-116) bzw. vom Mammakarzinom (MCF-7) ableiten, wesentliche Zielsetzung der vorliegenden Arbeit. Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Wirkt Dammarenolsäure auf Hct-116 und MCF-7 Zellen zytotoxisch und wenn ja in welchen Konzentrationen?
- 2) Wird die Toxizität durch Inkubation mit Serum- haltigem Medium beeinflusst?
- 3) Welcher Mechanismus liegt der Toxizität zugrunde? Werden die MAPK oder der Redoxstatus der Zellen durch Dammarenolsäure beeinflusst?

Ein zweiter Ansatz dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von Dammarenolsäure als „Sensitizer“ gegenüber TRAIL und Doxorubicin. TRAIL ist aufgrund der spezifischen Wirkungen auf Tumorzellen eine vielversprechende Substanz in der Krebstherapie. Jedoch

nicht alle Krebszellen sind TRAIL- sensibel, wie z.B. die Brustkrebszelllinie MCF-7. Auch die Möglichkeiten der Doxorubicintherapie werden durch resistente Zellen und kardiotoxische Nebenwirkungen eingeschränkt. Es ist daher von Interesse, Strategien zur Sensitivierung von Krebszellen gegenüber TRAIL und Doxorubicin zu entwickeln. Im zweiten Teil sollen daher ermittelt werden, ob:

- 4) Dammarenolsäure als *Sensitizer* die Toxizität von TRAIL erhöhen kann
- 5) und ob Dammarenolsäure Krebszellen gegenüber Doxorubicin sensitivieren kann

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Dammarenolsäure

Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurden an zwei humanen Krebszelllinien durchgeführt:

- Hct-116: humane Kolonkarzinom Zellen
- MCF-7: humane Mammakarzinom Zellen

Die Dammarenolsäure wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Proksch. Ergänzend wurde die Substanz von Alexis biochemicals bezogen. Die Reinheit wurde mit mindestens 97% angegeben.

2.1.2 Medien

DMEM-Medium (Hct116)	+ 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
RPMI-Medium (MCF-7)	+ 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 µg/ml Insulin, 1 % Natriumpyruvat, 1 % nicht essentielle Aminosäuren

2.1.3 Puffer und Lösungen

ABTS Lsg	14 mM in dH ₂ O
ABTS-Stocklsg	ABTS-Lsg 14 mM und APS-Lsg 4,9 mM 1:1 verdünnen, lichtgeschützt lagern
Acrylamid-Lsg	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
Anodenpuffer	200 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4
Antikörper-Inkubationslsg	5 % Milchpulver in TBST
Antikörper-Inkubationslsg	5 % BSA in TBST (für Cell signaling und Epitomics Ak)
APS 10 % [w/v]	1 g APS ad 10 ml dH ₂ O, aliquotiert, Lagerung bei -20°C
APS-Lsg	4,9 mM in dH ₂ O
Assaypuffer (Caspase)	55 mM HEPES, 110 mM NaCl, 110 µM EDTA, pH 7,4 vor Gebrauch ergänzen: 10 mM DTT, 1 mg/ml CHAPS, 10 % Glycerin [w/v]

Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBST
Coomassie-Entfärbelsg.	50 % [v/v] Methanol, 1 % [v/v] Essigsäure
Coomassie-Färbelsg.	40 ml Ethanol, 2 ml Essigsäure, 0,2 g Coomassie Brilliantblau ad 100 ml dH ₂ O
Entwickler (Western Blot)	(Kodak GBX developer and replenisher) 250 ml Entwickler ad 750 ml dH ₂ O
FCS	105 min bei 56°C hitzeinaktiviert, Lagerung bei -20°C
Fixierer (Western Blot)	600 g Natriumthiosulfat, 60 g Kaliumdisulfid ad 2 l dH ₂ O
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 20 % Methanol, 40 mM ε-Aminocaprionsäure, pH 9,4
10 x Laufpuffer	250 mM Tris, 1,92 M Glycin
Lysispuffer (Caspase)	50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 100 µM EDTA, pH 7,4 vor Gebrauch ergänzen: 5 µl 1 M DTT, 1 mg/ml CHAPS
5 x MTT-Stammlsg	3,5 mg/ml MTT in dH ₂ O filtrieren, lichtgeschützt bei 4 °C
MTT-Inkubationslsg	5 x MTT-Stammlsg. 1:5 verdünnt in erwärmtem Zellkulturmedium, kurz vor Gebrauch
MTT-Extraktionslsg	95 % [v/v] Isopropanol, 5 % [v/v] Ameisensäure
10 x PBS	1,36 mM NaCl, 26 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄
Ponceau S Färbelsg	2 g Ponceau Rot S, 30 g Sulfosalicylsäure, 60 ml 50 % Trichloressigsäure, ad 1000 ml dH ₂ O
RIPA-Puffer	50 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % [w/v] NP40, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Deoxycholat
RIPA-Gebrauchspuffer	RIPA-Puffer + 1 mM PMSF (aliquotiert bei -20 °C), 1 x Proteinase-Inhibitor-Cocktail (aliquotiert bei -20 °C)
2 x Sammelgelpuffer	250 mM Tris, 0,2 % [x/v] SDS, pH 6,8
SDS 10 % [w/v]	100 g SDS ad 1 l dH ₂ O unter langsamem Rühren lösen
1 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v] SDS
4 x SDS-Probenpuffer	40 % [w/v] Glycerin, 20 % [v/v] β-Mercaptoethanol, 12 % [w/v] SDS, 0,4 % Bromphenolblau
10 x TBS	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,4
TBST	1 x TBS, 0,1 % [v/v] Tween 20
4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,4 % [w/v] SDS, pH 8,8
Waschpuffer	100 ml 10 x TBS, 1 ml Tween ad 1 l dH ₂ O

2.1.4 Proteinstandards

Unstained-Marker	Page Ruler® Unstained Protein Ladder (Fermentas) 200 / 150 / 120 / 100 / 85 / 70 / 60 / 50 / 40 / 30 / 25 / 20 / 15 / 10 kDA
Prestained-Marker	Page Ruler® Prestained Protein Ladder (Fermentas) 170 / 130 / 95 / 72 / 55 / 43 / 34 / 26 / 17 / 10 kDA

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

<u>Zielprotein</u>	<u>Hersteller / Firma</u>	<u>Größe</u>
Bax	Cell Signaling, #2772	20 kDa
ERK 1 / 2 (K23)	Santa Cruz, sc-94	42 / 44 kDa
p-ERK 1 / 2 (E-4)	Santa Cruz, sc-7383	42 / 44 kDa
JNK 1 (C-17)	Santa Cruz, sc-474	46 kDa
p-SAPK / JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling, # 9251	46 / 54 kDa
p38 (C-20)	Santa Cruz, sc-535	38 kDa
p-p38 (pT180 / pY182)	Epitomics, #1229-1	42 kDa

2.1.5.2 Sekundärantikörper

<i>Goat Anti-Mouse IgG</i>	HRP-Konjugat, Southern Biotechnology, #1030-05
<i>Goat Anti-Rabbit IgG</i>	HRP-Konjugat, Southern Biotechnology, #4030-05

2.1.6 Chemikalien und Kits

ABTS	Sigma
Acrylamid	Merck
Agarose Neeo Ultra	Roth
Ameisensäure	Roth
Aminosäuren, nicht essentielle	GIBCO
APO-ONE® Homogeneous Caspase 3 / 7 Substrat	Promega
APS	Merck

BIO-RAD DC Protein Assay	Bio-Rad
BM Chemiluminescence Blotting Substrate	Roche
Bromphenolblau	Merck
BSA	Calbiochem
Caspase-Glo [®] 8 Substrat	Promega
Caspase Glo [®] 9 Substrat	Promega
Caspasesubstrate	ICN
CHAPS	Fluka
Coomassie Brilliantblau R250	Serva
Dammarenolsäure	Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Prof. Dr. Dr. Proksch, Universität Düsseldorf; Alexis Biochemicals
Deoxycholat	Sigma
DMEM (<i>high glucose</i> , L-Glutamin, Phenolrot)	GIBCO
DMSO	Merck
DTT	Sigma
EDTA	ICN Biomedicals
Entwickler	Kodak
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
FCS gold	PAA Laboratories
Glycerin	Roth
Glycin	Sigma
HEPES	ICN Biomedicals
H ₂ DCF-DA	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdisulfid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
MTT	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck

Natriumchlorid	Merck
Natriumpyruvat	Sigma
Natriumthiosulfat	Merck
Natronlauge	Merck
Penicillin / Streptomycin	GIBCO
Ponceau-S	Sigma
Proteinase Inhibitorcocktail 10 x	Calbiochem
<i>Restore Plus Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Scientefic
RPMI (L-Glutamin, Phenolrot)	PAA
Rotiphorese Gel 30	Roth
SDS	Serva
Stripping-Lsg	Thermo Scientific
TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Merck
Trizma-Base	Sigma
TROLOX	Calbiochem
Trypsin-(EDTA)	Invitrogen
Tween 20	ICN Biomedicals
β -Mercaptoethanol	Merck
ϵ -Aminocaprionsäure	Sigma
2-Butanol	Acros Organics

2.1.7 sonstige Materialien

15 ml Falcons	Greiner bio-one
50 ml Falcons	Greiner bio-one
6-Well Multiwellplatten	Becton Dickinson
96-Well Multiwellplatten	Greiner bio-one
60 mm Petrischalen	BD-Falcon
Chromatographiepapier	3MMCHR, Whatman
Filme	X-OMAT AR Film XAR-5, Kodak
Neubauer-Zählkammer	Welabo
PVDF Western Blotting Membran	Roche
Safe Lock Tubes (1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf
T-75er Zellkulturflaschen	Greiner bio-one

UniFilter-96 GF/C Platten

Perkin Elmer

2.1.8 Geräte

Blotting Apparatur

Peqlab Biotechnology

Eismaschine

Icematic F90, Compact Electronics

Elektrophorese-Kammer

Peqlab Biotechnology

Heizblock

Ori-Block DB3, Techne

Dry Bath System, Starlab

Inkubator

Jouan IG 150

Binder Serie BC

Inverses Lichtmikroskop

Axiovert 100, Zeiss

Photometer

Lambda 12 UV/VIS spectrometer,
Perkin Elmer

pH-Meter

PHM93 Reference pH-Meter

Plattenlesegerät

Wallac Victor 1420 Multilable
Counter, Perkin Elmer

Schüttler

Heidolph MR2002

Swip, Edmund Bühler (EB)

Roto-Shake Genie, Scientific

Sterilbank

Gelaire BSB4

Jouan IC2.12

Waage

Sartorius 3716MP

Sartorius Analysenwaage MC1

Wasserbad

Thermomix 1420, B.Braun

Melsungen AG

Wasser-Deionisierungsanlage

Millipore

Zentrifugen

Centrifuge 5415R, Eppendorf

Hettich universal 30F

Jouan MR 1812

Minifuge2, Heraeus-Christ

2.1.9 Software

Excel, Word, Powerpoint, Formel Editor, Visio

Microsoft Cooperation (2010)

Quantity One 4.1.1

Bio Rad

Wallac 1420 Workstation
Corel Draw X3, Corel Photo X3
GraphPad Prism 6

Perkin Elmer
Corel Corporation (2005)
GraphPad (2012)

2.1.10 Statistische Auswertung

Wenn im Diagramm nicht anders bemerkt, sind alle Daten als Mittelwerte \pm SEM von mindestens 3 unabhängigen Versuchen angegeben. Zur Analyse der statistischen Signifikanz wurde eine einfaktorielle bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse (*one* oder *two way ANOVA*) durchgeführt. Als posthoc Test wurde entweder der *Bonferroni's Multiple Comparison Test* oder der *Tukey's Multiple Comparison Test* durchgeführt. Unterschiede wurden bei $p \leq 0,05$ als signifikant erachtet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Hct-116 Zellen erfolgte in DMEM Komplettmedium (DMEM-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g /ml Streptomycin). Die MCF-7 Zellen wurden in RPMI Komplettmedium (RPMI-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g /ml Streptomycin, 1 % Natriumpyruvat und 1 % nicht essentiellen Aminosäuren) kultiviert. Die Zellkulturen wurden in T75er Kulturflaschen mit ca. 20 ml Medium in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um ein Absterben der Zellen aufgrund einer zu hohen Konfluenz zu verhindern, wurden die Zellen alle 7 Tage subkultiviert. Vor dem Ablösen der Zellen mit Hilfe von 0,5 % -iger Trypsin / EDTA-Lösung erfolgte eine lichtmikroskopische Untersuchung auf Kontamination. Nach Entfernen des Mediumüberstandes wurde 1 ml Trypsin / EDTA-Lösung pro T75er Kulturflasche zugegeben, um die Zellen abzulösen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank für etwa 1-2 Minuten. Durch leichtes Klopfen auf den Flaschenboden konnten die Zellen schließlich abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 μ l der Suspension entnommen und 1:10 mit Medium verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurde mittels der Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration bestimmt:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl der Großquadrate}}$$

Währenddessen wurde die restliche Zellsuspension in 50 ml Falcons 5 Minuten bei 560 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Anschließend erfolgte die Überführung in neue T75er Kulturflaschen oder die Ausplattierung auf 6- oder 96-Well Platten bzw. 60 mm Petrischalen für die jeweiligen Experimente.

2.2.2 Inkubation und Schädigung

Die verschiedenen Zelllinien wurden auf 96 Well-Platten mit Zellzahlen von 4×10^4 Zellen / Well, auf 6-Well Platten mit Zellzahlen von $1,4 \times 10^6$ bis $2,4 \times 10^6$ Zellen / Well und auf 60 mm Petrischalen mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ Zellen / Schale ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das Komplettmedium durch frisches Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure ersetzt und die Kultur 3-24 h lang im Brutschrank inkubiert. Bei den Koinkubationen erfolgten eine 4-stündige Vorinkubation mit Dammarenolsäure und eine konsekutive Koinkubation mit TRAIL und Dammarenolsäure für 20 h. Alternativ wurden die Zellen für 3h mit Doxorubicin vorinkubiert und nach Mediumwechsel für weitere 24h mit Dammarenolsäure geschädigt. Für alle Experimente, außer der Toxizitätsmessung, erfolgte die Schädigung mit FCS-freiem, aber Penicillin und Streptomycin enthaltendem Medium. Bei der Toxizitätsmessung wurden Versuche mit unterschiedlichen Zusätzen durchgeführt: mit FCS oder BSA in verschiedenen Konzentrationen, mit Insulin (0,1%-ig), sowie mit Medium, das nur Penicillin und Streptomycin enthielt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mikroskopisch hinsichtlich Viabilität, Konfluenz, Morphologie und einer möglichen Kontamination beurteilt und anschließend weiter bearbeitet.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde die entsprechende Zellsuspension auf 2 Millionen Zellen/ml eingestellt. 0,5 ml dieser Suspension wurden in einem Kryoröhrchen mit 0,6 ml Einfriermedium (6,2 ml Medium komplett + 1 ml DMSO) gemischt. Das Kryoröhrchen wurde 15 min auf Eis und 2 h bei -20 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Zum Auftauen rieb man das Kryoröhrchen schnell zwischen den Handflächen. Die Zellsuspension wurde in eine T75 er Kulturflasche mit 20 ml Komplettmedium gegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

2.2.4 TEAC-Assay

Der TEAC-Assay (*Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*) ist eine zellfreie Methode zur Bestimmung der antioxidativen (radikalfangenden) Aktivität von Substanzen (Miller et al., 1993). Dabei wird die Entfärbung von ABTS in Anwesenheit von TROLOX oder anderen Substanzen bei 734 nm im Photometer gemessen. In diesem Versuch wurde die antioxidative Eigenschaft von Dammarenolsäure mit der von TROLOX als synthetischem Antioxidanz (Vitamin E Derivat) verglichen.

Vor Beginn des Versuchs wurde die ABTS-Stocklösung 10 min bei 560 rpm zentrifugiert und anschließend 1 ml dieser Lösung mit 30 ml Ethanol (80 %ig) verdünnt, so dass im Photometer die Radikallösung eine Absorption von 1,4 (734 nm) aufwies. Zuvor wurde das Photometer auf Ethanol geeicht. Die zu messenden Substanzen wurden jeweils in doppelter Konzentration angesetzt, da eine 1:1 Verdünnung mit der Radikallösung erfolgte (500 µl Radikallösung + 500 µl doppelt konzentrierte Substanz). Als nicht-antioxidative Kontrolle diente eine 1:1 Verdünnung von Radikallösung und Ethanol, deren Absorption bei ungefähr 0,7 liegt. Die Verdünnungen wurden gevortext und über eine Dauer von 2 Minuten bei 734 nm die Abnahme der Absorption gemessen. Als Positivkontrolle wurde TROLOX mit einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Dammarenolsäure wurde in Konzentrationen von 50 µM und 100 µM auf ihre antioxidativen Eigenschaft getestet.

2.2.5 Zytotoxizitätstmessung / MTT-Test

Der MTT-Assay als Viabilitätstest beruht auf der Aktivitätsmessung mitochondrialer Dehydrogenasen (Mosmann, 1983). Lebende Zellen nehmen das lösliche, gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid) auf und reduzieren es mittels mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem unlöslichen, blauen Formazan (siehe Abb.4) (Riss et al., 2016).

Da diese Reaktion nur in viablen Zellen mit intakten Mitochondrien abläuft, kann über Absorptionsmaximum des entstandenen Formazans die Viabilität der Zellen photometrisch bestimmt werden.

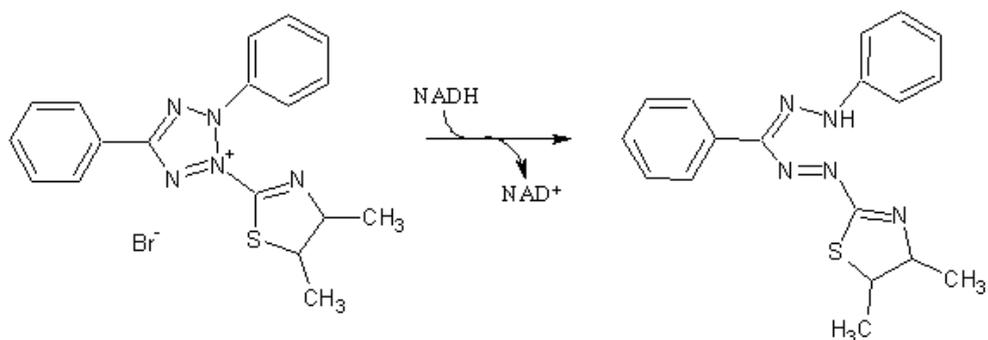


Abb. 4: Enzymatische Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses MTT zum blauen unlöslichen Formazan (modifiziert nach Promega Datenblatt)

Im Anschluss an die Behandlung der Zellen mit Dammarenolsäure erfolgte die Bestimmung der Viabilität. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen für 90 Minuten mit MTT-Inkubationslösung (0,7 mg MTT / ml in FCS-freiem Medium) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach vorsichtigem Abnehmen der Inkubationslösung erfolgte ein Waschschritt mit 1 x PBS. Durch Zugabe der MTT-Extraktionslösung wurde der gebildete blaue Farbstoff aus den Zellen extrahiert. Die Quantifizierung des Formazans erfolgte durch Messung im Plattenlesegerät bei 562 nm, dabei korreliert die Menge des gebildeten Formazans mit der Viabilität der Zellen.

2.2.6 Apoptosenachweise

Zum Nachweis des apoptotischen Zelltodes und der damit verbundenen Aktivierung von Caspasen wurden verschiedene Assays angewendet. Es wurde eine Messung der Aktivität der Effektorcaspasen 3 / 7 sowie der Initiatorcaspasen 8 / 9 / 10 durchgeführt.

2.2.6.1 Caspase 3 / 7 Aktivierung (*APO-ONE*[®] Assay)

Zur Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 / 7 wurde der *APO-ONE*[®] Assay der Firma Promega verwendet. Bei dieser Methode wird ein nicht fluoreszierendes Substrat (Z-DEVD-R110) durch die Caspasen an einer spezifischen Stelle geschnitten, so dass der stark fluoreszierende Farbstoff Rhodamin 110 freigesetzt wird (siehe Abb.5). Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Caspaseaktivität. Für diesen Versuch wurden 4 x 10⁴ Zellen / Well auf einer 96 Well Platte für 24 h mit Dammarenolsäure inkubiert. Danach wurde das Volumen des Mediums auf 50 µl pro Well reduziert und mit 50 µl der *APO-ONE*-Lösung (Caspase-Substrat mit Caspase Puffer gemischt) ergänzt.

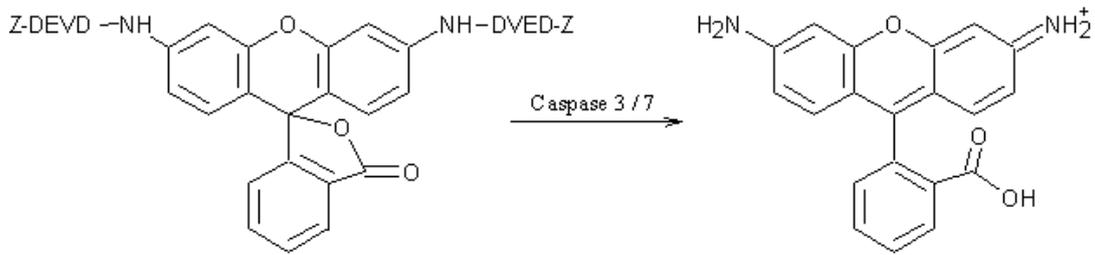


Abb. 5: Spaltung des nicht-fluoreszenten Caspase-Substrates durch Caspase 3 / 7 unter Freisetzung des fluoreszierenden Rhodamin 110 (modifiziert nach Datenblatt „Caspase 3 / 7“ der Firma Promega)

Die Fluoreszenz wurde für 60 min (MCF-7) bzw. 75 min (Hct-116) bei 37 °C im Plattenlesegerät gemessen (Ex: 485 nm, Em: 535 nm). Parallel zur Bestimmung der Caspaseaktivität erfolgte auf der gleichen Platte eine Viabilitätsmessung (MTT).

2.2.6.2 Caspase 8 und 9 Aktivierung (*Caspase-Glo*[®] 8 und 9 Assay)

Diese Methode beruht auf einer spezifischen Spaltung eines nicht lumineszenten Substrates durch die jeweiligen Initiatorcaspasen 8 bzw. 9. Dabei entsteht Aminoluciferin, welches durch Luciferase unter Freisetzung von Licht umgesetzt wird (siehe Abb.6). Die Quantität des gemessenen Lichtes entspricht der Caspase-Aktivität.

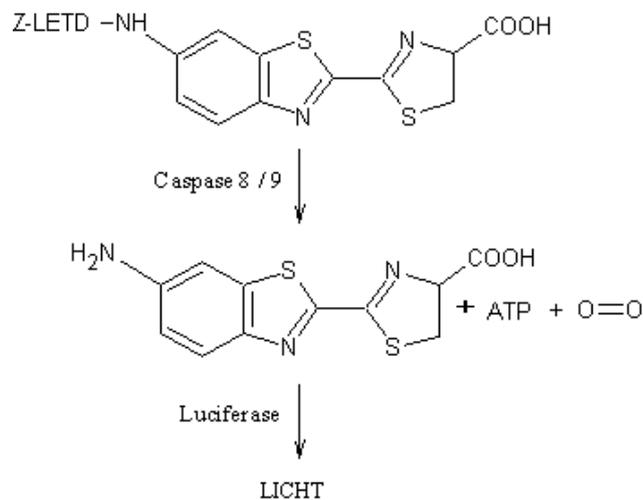


Abb. 6: Spaltung des Substrates durch Caspase 8 bzw. 9 zu Aminoluciferin mit anschließender Produktion von Licht (modifiziert nach Datenblatt „Caspase 8 / 9“ der Firma Promega)

Für diesen Versuch wurden 4×10^4 Zellen / Well auf einer 96 Well Platte für 24 h mit Dammarenolsäure inkubiert. Danach wurde das Volumen des Mediums auf 50 µl pro Well reduziert und mit 50 µl der Caspase-Glo-Lösung (Caspase-Substrat mit Caspase Puffer und 60 µM Protease-Inhibitor MG 132 gemischt) ergänzt. Die Platte wurde mit Parafilm verschlossen, 2 min mit 400 rpm geschüttelt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur

inkubiert. 90 µl der jeweiligen Überstände wurden auf eine weiße 96 Well Platte umpipettiert und im Plattenlesegerät über 3,5 h bei Raumtemperatur gemessen. Parallel dazu wurde mit den Zellen auf der ursprünglichen Platte ein MTT-Test durchgeführt um die Viabilität zu bestimmen.

2.2.6.3 Caspase Assay (Caspase 8 / 10 und Caspase 9 Aktivität)

Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass ein Caspase Substrat zu den gewonnenen Zelllysaten gegeben wird. Dieses Substrat besitzt spezifische, mit p-Nitroanilin konjugierte Schnittstellen für die entsprechenden Caspasen. Die Prozessierung dieser Substrate führt zur Freisetzung von p-Nitroanilin. Die Menge des freigesetzten p-Nitroanilins kann im Plattenlesegerät bei 405 nm detektiert werden und ist somit direkt proportional zur Aktivität der jeweiligen Caspase.

Für diesen Assay wurden 3×10^6 MCF-7 Zellen auf 60 mm Petrischalen für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dammarenolsäure inkubiert. Der Medium-Überstand wurde abgenommen und in ein Falcon überführt. Die Zellen wurden abgekratzt, in Medium aufgenommen und in dasselbe Falcon gegeben. Die Suspension wurde 10 min bei 560 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml kaltem PBS aufgenommen und für 2 min bei 5000 rpm erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes, wurde das Pellet für 1 h bei -80 °C zur Lyse eingefroren und anschließend in 150 µl Lysispuffer aufgenommen. Die Lysate wurden für 15 min bei 4 °C mit einem kleinen Rührfisch einer weiteren Lyse unterzogen. Nach anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Mit der Methode nach Lowry wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und die Proben konnten im Anschluss bei -80°C gelagert werden. Für den Caspase-Assay wurden 80 µg Protein in einem Endvolumen von 90 µl Assaypuffer auf einer 96 Well Platte vorgelegt und für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Pro Well wurden 10 µl des verdünnten Caspase-Substrates (1:50 in Assaypuffer) hinzu pipettiert und erneut bei 37 °C inkubiert. Die Messwerte wurden nach 24 h Inkubation bei 405 nm im Plattenlesegerät erfasst. Die Auftragung der Proteinisolate für die MCF-7 Zellen zur Messung der Caspasen 8 und 9 wurden freundlicherweise von Dr. Yvonne Chovolou und Hermine Kannengießer durchgeführt.

2.2.7 Proteinanalysen mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

2.2.7.1 Proteinisolation

Für die Proteinisolation wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen pro 60 mm Petrischale ausgesät, über Nacht anhaften lassen und mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure für 30 min, 3 h, 6 h und 24 h inkubiert. Das Medium wurde entfernt und der Zellrasen zweimal mit jeweils 2 ml 1 x PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch eine 2 bis 3-minütige Inkubation mit 500 μ l Trypsin pro Schale im Inkubator. Die Zellen wurden in 2 ml 1 x PBS aufgenommen und in ein Falcon überführt. Es wurde zweimal für 5 min bei 560 rpm zentrifugiert, wobei dazwischen das Pellet erneut in 1 x PBS gewaschen wurde. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in RIPA-Puffer mit Zusätzen (Proteinase-Inhibitor und PMSF) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben zweimal für mindestens 1 h bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut. Nach dem zweiten Auftauen wurde das Lysat 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Menge des vorhandenen Proteins bestimmt.

2.2.7.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951) erfolgte mit dem „*BIO-RAD DC Protein Assay*“ auf 96 Well Platten. Dazu wurden pro Well 25 μ l *Working Reagent A* vorgelegt, ein Teil der Lysate 1:5 mit dH₂O verdünnt und je 5 μ l der verdünnten Proteine hinzugegeben. 200 μ l *Working Reagent B* wurden ergänzt und die Platte nach 15 min Inkubation bei RT im Plattenlesegerät bei 595 nm gemessen. Als Referenzprobe wurde der RIPA-Puffer genutzt, in dem die Proteine gelöst wurden. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen (0,05 mg/dl bis 1 mg/dl) an BSA angesetzt und ebenfalls unter den gleichen Bedingungen gemessen.

2.2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Bei der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dazu dienen Polyacrylamidgele, die aus einem Sammel- und Trenngel bestehen. Abhängig von der Proteingröße muss das Trenngel in einer bestimmten Prozentigkeit gegossen werden um eine scharfe Auftrennung in dem gesuchten kDa- Bereich zu erhalten. Dementsprechend wurde für Bax (kleineres Molekül) ein 15 % iges und für die anderen Proteine ein 10 % iges Gel gegossen. Für p-

JNK wurde ein 12 % iges Gel gegossen (siehe Tabelle 1). Zur Polymerisation der Gele wurde APS zu einer Lösung aus Acrylamid und Bisacrylamid gegeben. Dadurch reagiert das Acrylamid zu langen Ketten, die durch Bisacrylamid vernetzt werden. Diese Reaktion wird durch das ebenfalls zugegebene TEMED katalysiert. Die Polymerisation der Gele erfolgte zwischen zwei Glasplatten, die mit Spacern und Agarose abgedichtet wurden. Um eine ebene Oberfläche zu erhalten wurde das Trenngel mit Butanol überschichtet. Nach einstündiger Polymerisation wurde das Butanol abgegossen, die Reste mit dH₂O abgespült und die Wasserrückstände mit Whatman-Papier entfernt. Auf das Trenngel wurde nun das Sammelgel gegossen und luftblasenfrei der Kamm eingeschoben. Nach 40-minütiger Polymerisation wurde das Gel mit den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt, mit 1 x SDS Laufpuffer übergossen und der Kamm gezogen. Die Slots wurden mit Laufpuffer ausgespült.

	Trenngel [10 %]	Trenngel [12 %]	Trenngel [15 %]	Sammelgel [4,5 %]
Acrylamid-Bisacrylamidsg 30 %	2 ml	2,4 ml	3 ml	0,608 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	2 ml
dH ₂ O	2,5 ml	2,1 ml	1,5 ml	1,380 ml
APS 10 %	30 µl	30 µl	30 µl	24 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	4 µl

Tabelle 1: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

Da eine Proteinauftrennung nach der Größe nur in denaturierter Form erfolgen kann, wurden die aufzutragenden Proteine mit SDS-Probenpuffer versetzt (¼ des Gesamtvolumens). Dieses enthält β-Mercaptoethanol, welches zur Auflösung der Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren führt. Das Detergens SDS lagert sich an die Proteine an, denaturiert diese und löst somit die Sekundär-, Tertiär und Quartärstrukturen auf. Durch die Sulfatgruppen im SDS erhalten die Proteine eine einheitliche negative Ladung, so dass die Auftrennung im Gel nur noch von der Größe des Moleküls abhängt. Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden 10 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert, sofort auf Eis gestellt und kurz abzentrifugiert. Die Auftragung der Proteine erfolgte mit einer Hamiltonpipette in die entsprechenden Geltaschen. Ergänzend wurde der *prestained* und der *unstained* Marker mit aufgetragen. Zunächst erfolgte die Elektrophorese für 15 bis 20 min bei ca. 15 mA um ein Sammeln der Proben im

Sammelgel zu ermöglichen. Nach Erreichen des Trenngels wurden die Proteine über 1,5 – 2 h bei 150 V aufgetrennt.

2.2.7.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Um die aufgetrennten Proteine mit Antikörpern nachweisen zu können, müssen diese zunächst auf PVDF-Membranen übertragen werden. Dies erfolgte mit Hilfe des „*semi-dry*“-Blots in einer Blottingapparatur. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgte dabei von der Kathode zur Anode in einem Sandwich aus Whatman-Papieren. Dazu werden zuvor je drei Whatman-Papiere in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde in Methanol für 10 s aktiviert und danach in dH₂O gelagert um ein Austrocknen zu verhindern. Das Gel wurde auf die passende Größe geschnitten und in Kathodenpuffer eingelegt. Je nach Aufbau der Blotting-Apparatur wurden zuerst drei in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere luftblasenfrei aufgelegt. Gel und PVDF-Membran wurden so aufgelegt, dass jeweils das Gel den Kontakt zu den in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren hatte. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 5 mA/cm². Für die Proteine Bax, pJNK und JNK wurde 20 min, für pERK, ERK, p38 und pp38 wurde 30 min geblottet.

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran kurz in Ponceau Rot S geschwenkt, wodurch die Proteinbanden reversibel gefärbt wurden. Die Entfärbung erfolgte in destilliertem Wasser.

2.2.7.5 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine

Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran unter leichtem Schütteln über Nacht mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Je nach Antikörper erfolgte die Verdünnung in 5 %-iger Milchpulver-TBST-Lösung oder in 5 %-iger BSA-TBST-Lösung. Vor der Inkubation mit Antikörpern, die in BSA-TBST verdünnt wurden, musste 2 x 5 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen werden.

Nach Ende der ersten Antikörperinkubation wurde die Membran mit TBST-Waschpuffer unter leichtem Schütteln gewaschen (siehe Tabelle 2) und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen den

Primärantikörper gerichtet ist, inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde in 5 %-iger Milchpulver-TBST-Lösung verdünnt. Es folgten weitere Waschschritte (siehe Tabelle 2).

Antikörper	aufgetragene Proteinmenge	1.Ak-Verdünnung in 5 % MP o. BSA	2.Ak-Verdünnung in 5 % MP	Waschen [min] nach 1./2.Ak
Bax	20 µg (Hct-116) 10µg (MCF-7)	1 : 1000 / BSA	1 : 2000 goat-anti-rabbit	3 x 5 / 6 x 5
ERK 1 / 2	10 µg	1 : 2000 / MP	1 : 7500 goat-anti-rabbit	4 x 10 / 4 x 10
p-ERK	10 µg	1 : 250 / MP	1:2000 goat-anti-mouse	4 x 10 / 4 x 10
JNK 1	15 µg (Hct-116) 20 µg (MCF-7)	1 : 1000 / MP	1 : 5000 goat-anti-rabbit	4 x 10 / 4 x 10
p-SAPK / JNK	40 µg	1 : 1500 / BSA	1 : 5000 goat-anti-rabbit	3 x 6 / 3 x 6
p38	20 µg	1 : 1000 / MP	1 : 3500 goat-anti-rabbit	3 x 10 / 3 x 10
p-p38	20 µg	1 : 1000 / BSA	1 : 3500 goat-anti-rabbit	3 x 7 / 3 x 5

Tabelle 2: Western Blot Bedingungen für Proteine von Hct-116 und MCF-7 Zellen

Dargestellt sind die jeweiligen Antikörper (Ak), die aufgetragenen Proteinmengen der Zelllysate, die Verdünnung der Ak in BSA (*bovine serum albumin*) oder MP (Milchpulver) und die Waschschritte nach der jeweiligen Inkubation.

2.2.7.6 Chemilumineszenz Detektion

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels des „*BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)*“ von Roche. Dazu wurde die Membran 1-2 min mit dem Substrat inkubiert. Durch Verwendung eines HRP-gekoppelten 2.Antikörpers konnte in Anwesenheit von H₂O₂ das Substrat Luminol durch die Peroxidase zu einem lichtemittierenden Intermediat oxidiert werden. Die entstehenden lichtemittierenden Banden wurden durch entsprechende Belichtung der aufgelegten Filmfolien im Fotolabor detektiert. Die Filme wurden in Entwicklerlösung geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und für 3 min in Fixierlösung gelegt. Nach Ende des Fixiervorgangs wurden die Filme für ca. 30 min gewässert und anschließend luftgetrocknet.

2.2.7.7 Coomassie-Färbung von Proteinmembranen

Um zu kontrollieren, ob gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, erfolgte nach der Detektion der spezifischen Banden eine Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue*. Dieser Triphenylmethan-Farbstoff bindet in saurem Medium durch elektrostatische Wechselwirkungen an freie geladene Imino- und Aminogruppen von Proteinen. Die Membran wurde dazu so lange in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt bis diese eine einheitliche blaue Färbung angenommen hat. Anschließend wurde der Hintergrund mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt, so dass die Proteinbanden gut erkennbar waren.

2.2.7.8 Strippen von PVDF-Membranen

Mit Hilfe des „*strippens*“ ist es möglich eine bereits verwendete PVDF-Membran mit Proteinen erneut mit einem anderen Antikörper umzusetzen. Dazu wurde die Membran durch kurzzeitiges Schwenken in Methanol wieder aktiviert und anschließend 2 x 5 min mit 1 x TBS-Puffer auf dem Schüttler gewaschen. Unter Schütteln folgte eine Inkubation mit vorher erwärmter *Stripping*-Lösung für 25 min bei 37 °C. Nach anschließendem, zweimaligem Waschen mit TBST-Waschpuffer für je 5 min konnte die Membran erneut für 1 h mit Blockierlösung inkubiert und im Anschluss mit dem gewünschten Antikörper versetzt werden.

2.2.8. Nachweis von ROS durch den DCF-Assay

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird fluorimetrisch über die Sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) gemessen. Dieses lipophile Molekül diffundiert über die Zellmembran. Nach Abspaltung des Diacetats durch intrazelluläre Esterasen liegt die eigentliche Fluoreszenzsonde H₂DCF in reduzierter, nicht-fluoreszierender Form vor. Intrazelluläre ROS oxidieren die Sonde zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF). Auf diese Weise können reaktive Sauerstoffspezies indirekt über eine Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden.

Für diesen Versuch wurden 4 x 10⁴ Zellen ausplattiert. Nach Anwachsen wurden die Zellen über 1 h mit 50 µM H₂DCF-DA vorinkubiert. Es erfolgten ein Mediumwechsel mit farblosem DMEM und eine anschließende Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure für 4 h. Die Fluoreszenz wurde ohne erneuten Mediumwechsel bei 37°C über 1 h gemessen (Ex:485nm, Em:525nm). Parallel dazu erfolgte die Inkubation der Zellen mit MTT-Lösung, um die Viabilität zu bestimmen.

3. Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse gliedern sich in zwei Abschnitte. Zunächst wurde die Wirkung von Dammarenolsäure auf die humanen Krebszelllinien Hct-116 und MCF-7 in Abhängigkeit von der Konzentration analysiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Serum auf die zytotoxische Wirkung von Dammarenolsäure untersucht. Anschließend erfolgte im zweiten Abschnitt die Untersuchung des Potentials von Dammarenolsäure, Krebszellen gegenüber TRAIL und Doxorubicin sensitivieren zu können.

3.1. Zelluläre und molekulare Wirkungen von Dammarenolsäure

3.1.1. Einfluss von Serum auf die Dammarenolsäuretoxizität

In ersten Versuchen zum Einfluss der Dammarenolsäure auf die Zelllinien MCF-7 und Hct-116 zeigte sich eine Toxizität in Versuchen mit Serum-freiem, nicht jedoch in Serumhaltigem Medium. Daher erfolgte eine Modifikation des Protokolls, um den im Serum enthaltenen, für die fehlende Toxizität verantwortlichen, Inhaltsstoff zu identifizieren. Dazu wurden Hct-116- und MCF-7- Zellen jeweils 24 Stunden mit Dammarenolsäure und sechs unterschiedlich zusammengesetzten Medien inkubiert. Die anschließende Viabilitätsmessung erfolgte mittels MTT-Test.

Dabei zeigte sich bei den Hct-116 Zellen unter der Inkubation mit FCS-freiem Medium eine dosisabhängige Toxizität mit einem EC_{50} -Wert von $10,8 \mu\text{M}$ (siehe Abb.7A). Eine signifikante Toxizität konnte ab $10 \mu\text{M}$ Dammarenolsäure erreicht werden. Nach 24-stündiger Inkubation mit Insulin war in der Insulinkontrolle eine deutlich stärkere Konfluenz als in der Kontrolle ohne FCS nachweisbar. Entgegen den Erwartungen zeigte sich bei Inkubation mit dem anabolen Hormon Insulin ebenfalls eine dosisabhängige Toxizität. Mit einem EC_{50} Wert von etwa $7,3 \mu\text{M}$ war die Toxizität hier sogar noch stärker ausgeprägt als bei der Inkubation ohne FCS. Dies zeigte sich auch in der Konzentration an Dammarenolsäure, die nötig war um den Tod aller Hct-116 Zellen zu erzielen. So konnten bei der Inkubation mit Insulin schon ab einer Konzentration von $12,5 \mu\text{M}$ Dammarenolsäure keine viablen Zellen mehr nachgewiesen werden. Dieser Zustand wurde bei der Inkubation ohne FCS erst ab einer Konzentration von $15 \mu\text{M}$ erreicht. Im direkten Vergleich dieser beiden Medien bezüglich der Viabilität bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Dammarenolsäure, waren unter begleitender Inkubation mit Insulin 30 % weniger viable Zellen vorhanden (siehe Abb.7A).

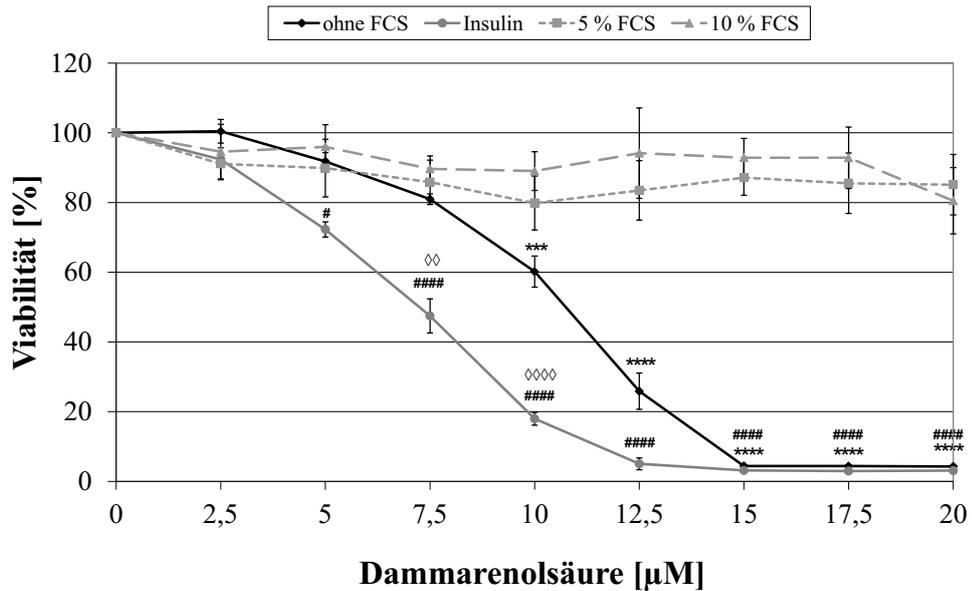
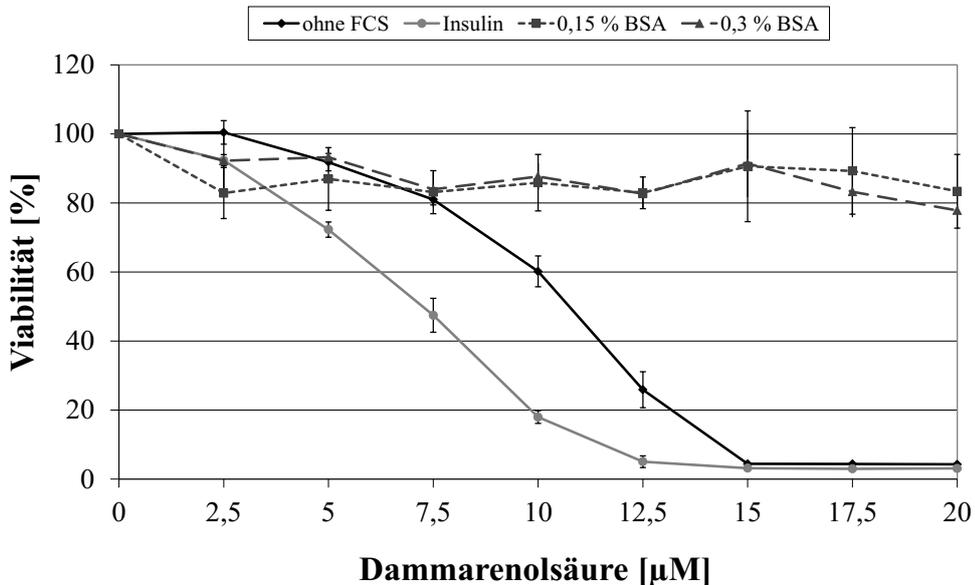
A**B**

Abb. 7: Viabilität von Hct-116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Dammaric acid

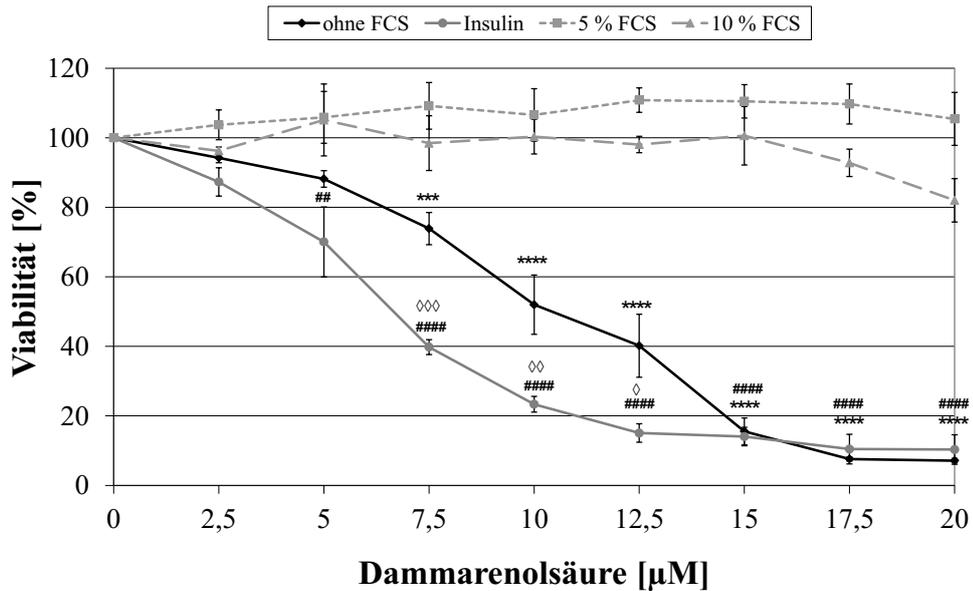
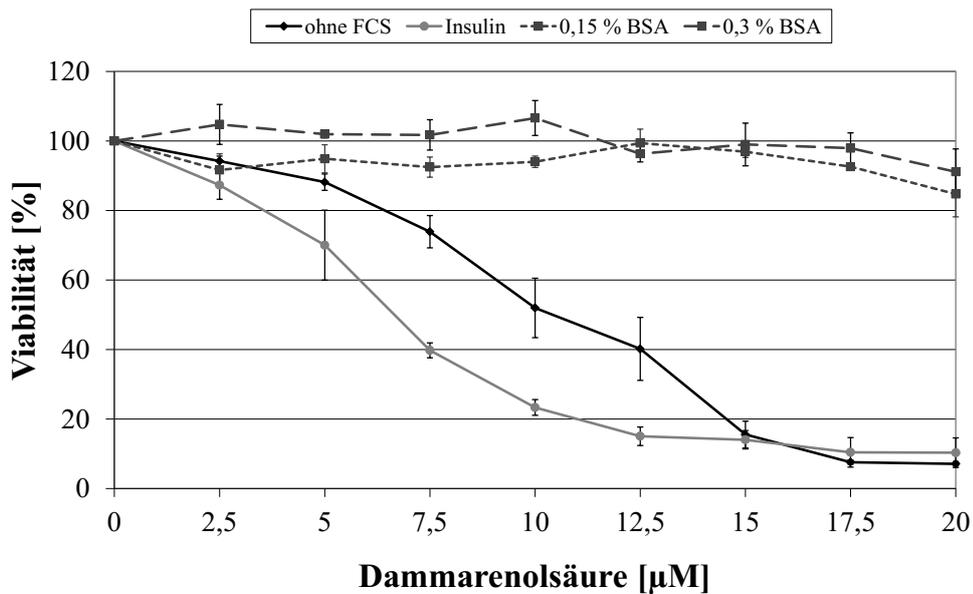
Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammaric acid geschädigt. Nach 24 h wurde die Viabilität mittels MTT-Assay bestimmt. Insgesamt wurden 6 unterschiedlich zusammengesetzte Medien benutzt. Dargestellt sind jeweils die Werte als Prozent der jeweiligen Kontrolle: **(A)** Medium ohne FCS, nur mit Insulin, mit 5 % FCS sowie mit 10 % FCS; ($n=4$, $MW \pm SEM$); * $p \leq 0,05$ signifikant gegen Kontrolle ohne FCS, # $p \leq 0,05$ signifikant gegen Kontrolle mit Insulin, $\diamond p \leq 0,05$ signifikant ohne FCS vs. Insulin, *two way ANOVA*, post hoc Test: *Bonferroni's Multiple Comparison Test* bzw. *Tukey's Multiple Comparison Test* bei Vergleich zwischen Insulin und Medium ohne FCS. **(B)** Medium ohne FCS, nur mit Insulin, abweichend zu (A) statt FCS Medium mit 0,15 % BSA oder mit 0,3 % BSA. ($n=4$, $MW \pm SEM$). FCS (*fetal calf serum*); BSA (*bovine serum albumin*).

Um den Einfluss des Serums bzw. BSA zu verifizieren, wurden verschiedene Konzentrationen von FCS und BSA auf die Viabilität getestet. BSA (Rinderserumalbumin)

stellt den größten Anteil an Serumproteinen im FCS, daher wurden auch, die dem FCS korrespondierenden Konzentrationen an BSA untersucht. Ein Medium mit 10 % FCS enthält dementsprechend 0,3 % BSA und eines mit 5 % FCS enthält 0,15 % BSA (Datenblatt Firma PAA: *Foetal Bovine Serum "GOLD"*). Nach Inkubation mit Dammarenolsäure war weder bei den höheren Proteinkonzentrationen (10 % FCS bzw. 0,3 % BSA) noch bei den niedrigeren Konzentrationen (5 % FCS bzw. 0,15 % BSA) eine Toxizität in den Hct-116-Zellen nachweisbar (siehe Abb.7). Selbst unter den höchsten verwendeten Konzentrationen an Dammarenolsäure von 20 μM , bei der unter Insulinhaltigem und FCS-freiem Medium bereits keine viablen Zellen mehr nachweisbar waren, ließ sich unter dem FCS-/BSA-haltigem Medium kein relevanter Einfluss auf die Viabilität belegen.

Ähnliche Ergebnisse waren auch für die MCF-7 Zellen nachweisbar. Nach 24-stündiger Inkubation mit Dammarenolsäure war bei den MCF-7 Zellen ab einer Konzentration von 7,5 μM unter Abwesenheit von FCS im Medium eine dosisabhängige Toxizität mit statistischer Signifikanz zu beobachten (siehe Abb.8A). Wie bei den Versuchen mit Hct-116 Zellen (siehe Abb.7) waren ab einer Konzentration von 15 μM keine viablen Zellen mehr detektierbar. Lediglich der EC_{50} -Wert lag mit 10,4 μM minimal unter dem bei den Hct-116 Zellen ermittelten Wert. Insgesamt konnte, im Vergleich zu Hct-116 Zellen, bei MCF-7 Zellen unter FCS-freiem Medium eine Viabilitätskurve mit diskret flacherem Verlauf nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit Dammarenolsäure in Gegenwart von Insulinhaltigem Medium führte zu einer dosisabhängigen Toxizität mit einem EC_{50} -Wert von 6,7 μM . Ab einer Konzentration von 12,5 μM waren hierunter keine viablen Zellen mehr nachweisbar (siehe Abb.8). Auch hier ließen sich im Vergleich beider Medien bei einer Konzentration von 10 μM Dammarenolsäure unter Insulinhaltigem Medium ca. 30 % weniger viable Zellen nachweisen als im Insulin- und FCS-freiem Medium. Neben diesen beiden Medien wurde auch bei den MCF-7 Zellen der Einfluss von Serum und Albumin auf die Viabilität untersucht. Hierbei konnte, analog zu den Hct-116 Zellen, belegt werden, dass der Zusatz von FCS bzw. BSA zu den Kulturmedien in den eingesetzten Konzentrationen die Toxizität von Dammarenolsäure nahezu vollständig neutralisiert. Selbst bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen an Dammarenolsäure von 20 μM war auch hier, vergleichbar zu den Befunden bei den Hct-116 Zellen noch eine Viabilität von über 80 % nachweisbar.

A**B****Abb. 8: Viabilität von MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit Dammarenolsäure**

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure geschädigt. Nach 24 h wurde die Viabilität mittels MTT-Assay bestimmt. Insgesamt wurden 6 unterschiedlich zusammengesetzte Medien benutzt. Dargestellt sind jeweils die Werte als Prozent der jeweiligen Kontrolle: **(A)** Medium ohne FCS, nur mit Insulin, mit 5 % FCS sowie mit 10 % FCS; (n=3-5, MW \pm SEM); * $p \leq 0,05$ signifikant gegen Kontrolle ohne FCS, # $p \leq 0,05$ signifikant gegen Kontrolle mit Insulin, \diamond $p \leq 0,05$ signifikant ohne FCS vs. Insulin, *two way ANOVA*, post hoc Test: *Bonferroni's Multiple Comparison Test* bzw. *Tukey's Multiple Comparison Test* bei Vergleich zwischen Insulin und Medium ohne FCS. **(B)** Medium ohne FCS, nur mit Insulin, abweichend zu (A) statt FCS Medium mit 0,15 % BSA oder mit 0,3 % BSA. (n=3-5, MW \pm SEM). FCS (*fetal calf serum*); BSA (*bovine serum albumin*).

Zusammenfassend ließ sich somit feststellen, dass Dammarenolsäure sowohl auf Hct-116 als auch auf MCF-7 Zellen nach einer 24- stündigen Inkubation dosisabhängig toxisch wirkte. Dieser Effekt war unter dem Zusatz von Insulin noch stärker ausgeprägt.

Die zytotoxische Wirkung von Dammarenolsäure wird jedoch durch Zusatz von FCS zum Kulturmedium nahezu vollständig aufgehoben. Ein dem FCS vergleichbarer protektiver Effekt kann auch unter Zugabe von Albumin (BSA) anstelle von FCS zum Kulturmedium beobachtet werden. Es ist daher anzunehmen, dass das Serumalbumin, zumindest zu einem wesentlichen Anteil, für den protektiven Effekt von FCS verantwortlich ist.

Die weiteren Versuche zur Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung von Dammarenolsäure wurden daher mit FCS-freiem Medium durchgeführt.

3.1.2 Einfluss von Dammarenolsäure auf die Zellmorphologie

Neben der Toxizitätsmessung durch den MTT-Test wurde die Zellmorphologie nach 24 Stunden lichtmikroskopisch beurteilt. In FCS- freiem Medium waren in der Kontrolle fibroblastenartig imponierende Hct-116 Zellen nachweisbar. Diese veränderten sich unter 10 μM Dammarenolsäure zu kleineren, rundlichen Zellen mit einem vesikelartigem Erscheinungsbild (siehe Abb.9).

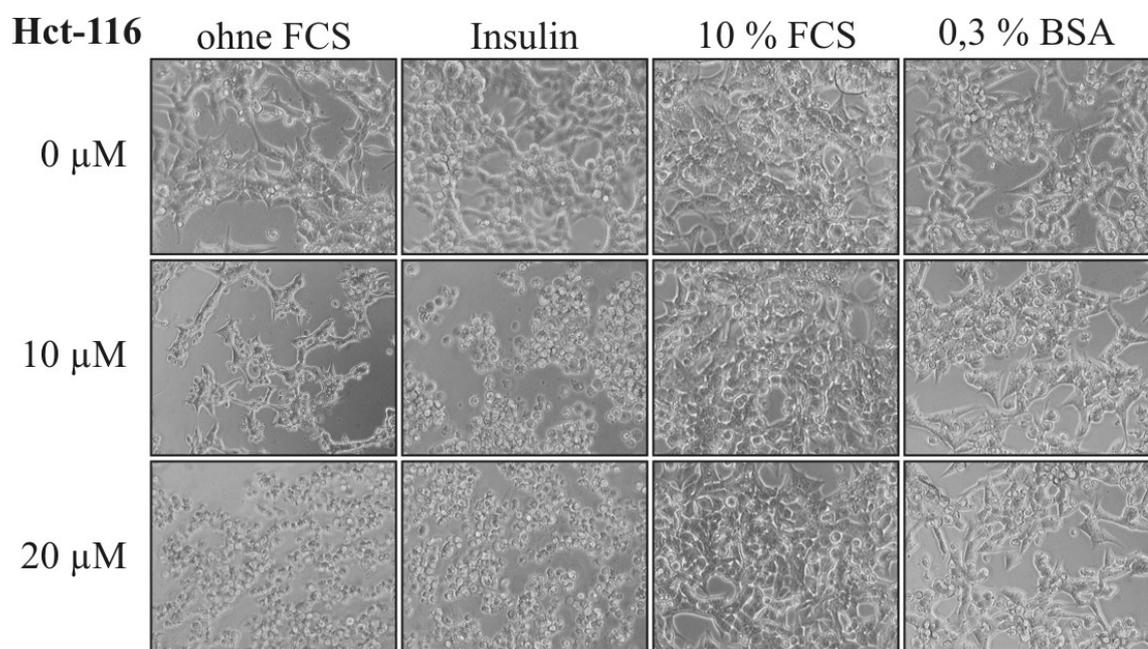


Abb. 9: Morphologie von Hct-116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Dammarenolsäure

In den Zeilen sind jeweils die Konzentration der Dammarenolsäure in μM (Mikromolar) und in den Spalten die verschiedenen Inkubationsmedien dargestellt. FCS (*fetal calf serum*); BSA (*bovine serum albumin*). Vergrößerung 40x.

Auch die Konfluenz war deutlich reduziert. Bei der höchsten Konzentration im gleichen Medium waren nur noch kleine, rundliche, im Medium schwimmende Zellen bzw. Zellpartikel erkennbar. Nach Zusatz von Insulin zum Inkubationsmedium war in der Kontrolle eine stärkere Konfluenz und eine leicht rundlichere Morphologie zu beobachten als ohne Insulin. Ab einer Konzentration von 10 μ M Dammarenolsäure waren unter Kultur mit Insulin-haltigem Medium nahezu ausschließlich kleine bis mittelgroße, runde, im Medium schwimmende Hct-116 Zellen bzw. Zellfragmente erkennbar. Besonders bei der Konzentration von 10 μ M Dammarenolsäure trat der schon durch den MTT-Test beschriebene Viabilitätsunterschied, der unter Zusatz von Insulin zum Kulturmedium zu beobachten ist, deutlich hervor. Übereinstimmend mit den Messungen der Zellviabilität mittels MTT-Assay ließ sich auch in der lichtmikroskopischen Beurteilung der protektive Einfluss von FCS als Zusatz zum Inkubationsmedium nachweisen, so dass hier unter allen verwendeten Konzentrationen kein relevanter Einfluss von Dammarenolsäure auf die Morphologie von Hct-116 Zellen nachweisbar war. Eine morphologische Veränderung der Zellen unter Inkubation mit Dammarenolsäure war weder in Medium mit 10 % FCS noch mit 0,3 % BSA feststellbar (siehe Abb.9).

Die in der Kontrolle polygonal erscheinenden MCF-7 Zellen wiesen unter 10 μ M Dammarenolsäure ein insgesamt rundlicheres Erscheinungsbild mit vergrößertem Kern und verdichtetem Chromatin auf (siehe Abb.10). Die Zellstruktur blieb ansonsten unter dieser Konzentration weitestgehend erhalten, nur einzelne abgestorbene im Medium schwimmende Zellen waren zu erkennen. Auch bei MCF-7 Zellen waren bei einer Konzentration von 20 μ M Dammarenolsäure nur noch kleine rundliche Zellen mit vesikelartiger Struktur bzw. Zellfragmente zu beobachten. Unter Zusatz von Insulin zum Inkubationsmedium kam es bei MCF-7 Zellen bereits unter 10 μ M zu vergleichbaren Effekten, so dass auch die lichtmikroskopischen Befunde dafür sprechen, dass die Zytotoxizität von Dammarenolsäure in Gegenwart von Insulin etwas erhöht ist.

Analog zu den für Hct-116 Zellen beschriebenen Befunden und übereinstimmend mit den Befunden aus den Viabilitätsassays, wurden die Effekte von Dammarenolsäure auf das lichtmikroskopische Erscheinungsbild von MCF-7 Zellen unter Zusatz von 10 % FCS bzw. 0,3 % BSA nahezu vollständig aufgehoben (siehe Abb.10).

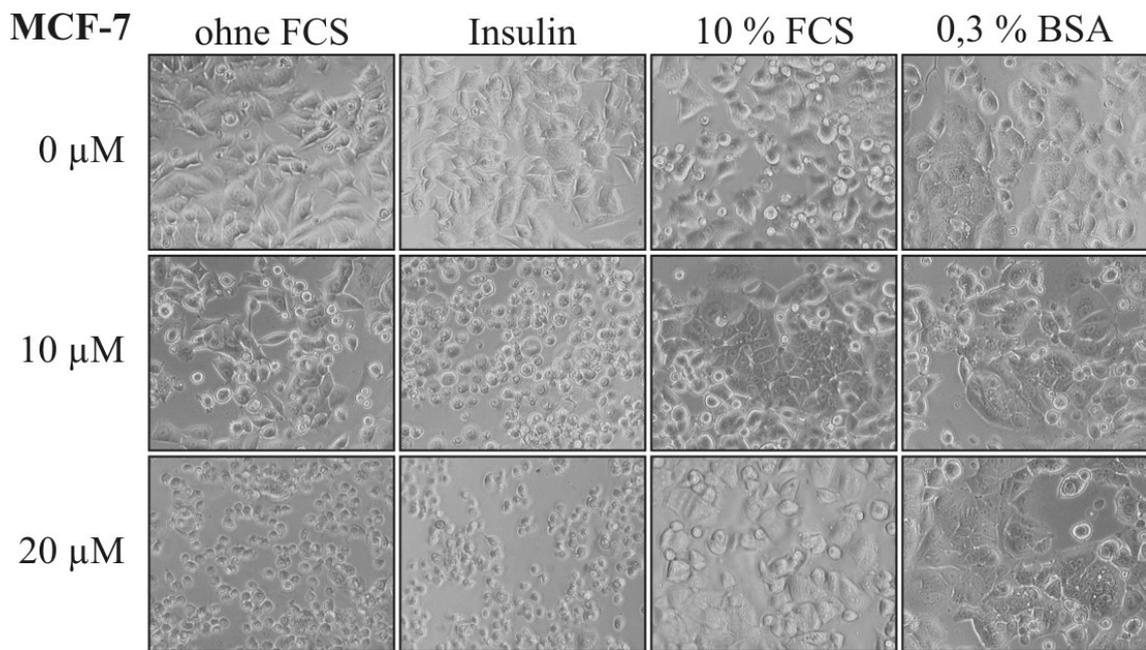


Abb. 10: Morphologie von MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit Dammarenolsäure

In den Zeilen sind jeweils die Konzentration der Dammarenolsäure in μM (Mikromolar) und in den Spalten die verschiedenen Inkubationsmedien dargestellt. FCS (*fetal calf serum*); BSA (*bovine serum albumin*). Vergrößerung 40x.

3.1.3 Apoptose

3.1.3.1 Aktivierung der Caspasen

Bereits die lichtmikroskopischen Befunde legten nahe, dass der Apoptose- Induktion eine relevante Rolle für die zytotoxischen Effekte von Dammarenolsäure zukommt. Um zu prüfen, ob der programmierte Zelltod für die Wirkung von Dammarenolsäure von Bedeutung ist, wurde zum einen die Aktivität der Effektorcaspasen 3/7 mittels *APO One Assay* gemessen und zum anderen die Aktivierung der Initiatorcaspasen 8/10 und 9 mittels *APO Glow Assay* bzw. den Caspase Assay bestimmt.

In Abbildung 11 ist die Caspase 3/7 Aktivität von Hct-116 Zellen nach 24- stündiger Inkubation mit Dammarenolsäure dargestellt. Es ließ sich eine deutliche Caspasenaktivierung, mit statistischer Signifikanz ab 16 μM nachweisen. Werden die Rohdaten auf die Viabilität normiert, so konnte unter 18 μM Dammarenolsäure eine etwa 120- fache Induktion der Effektorcaspasen erzielt werden (nicht dargestellt).

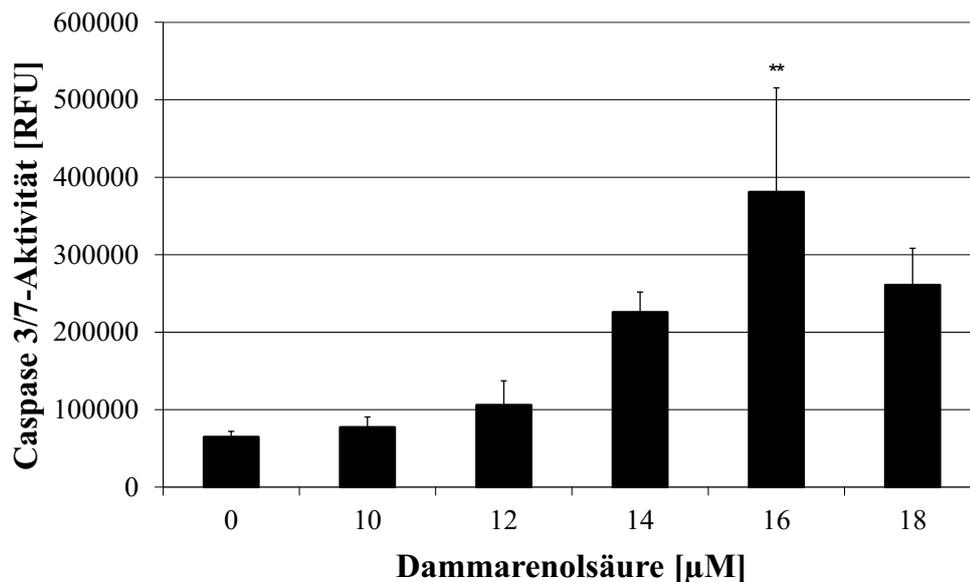


Abb. 11: Caspase 3/7 Aktivität von Hct-116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure 24 h lang geschädigt. Nach Inkubation wurde das Medium auf 50 µl reduziert und mit 50 µl *APO-ONE*-Lösung der Firma Promega ergänzt. Die Fluoreszenz/RFU (*relative fluorescence unit*) wurde für 75 min bei 37 °C im Plattenlesegerät gemessen (Ex 485 nm, Em 535 nm). Parallel dazu wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt sind die Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit der Dammarenolsäurekonzentration in µM (Mikromolar) (n=4, MW ± SEM, ** p≤0,01 vs. Kontrolle, ANOVA, post hoc Test: *Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

Da bei den Hct-116 Zellen nach 24 Stunden unter Serum-freien Kulturbedingungen eine starke Aktivierung der Effektorcaspasen nachweisbar war, wurden darüber hinaus die Initiatorcaspasen 8 und 9 untersucht (siehe Abb.12). Hierbei konnte eine dosisabhängige Aktivierung gemessen werden. Statistisch signifikante Daten wurden ab 14µM für die Caspase 8 (siehe Abb.12A) und ab 16µM für die Caspase 9 (siehe Abb.12B) erhoben. Normiert auf die Viabilität induzierte die Inkubation mit 18µM Dammarenolsäure bei der Caspase 8 eine Aktivitätssteigerung auf das 40-fache, bei der Caspase 9 auf das etwa 45-fache (nicht dargestellt).

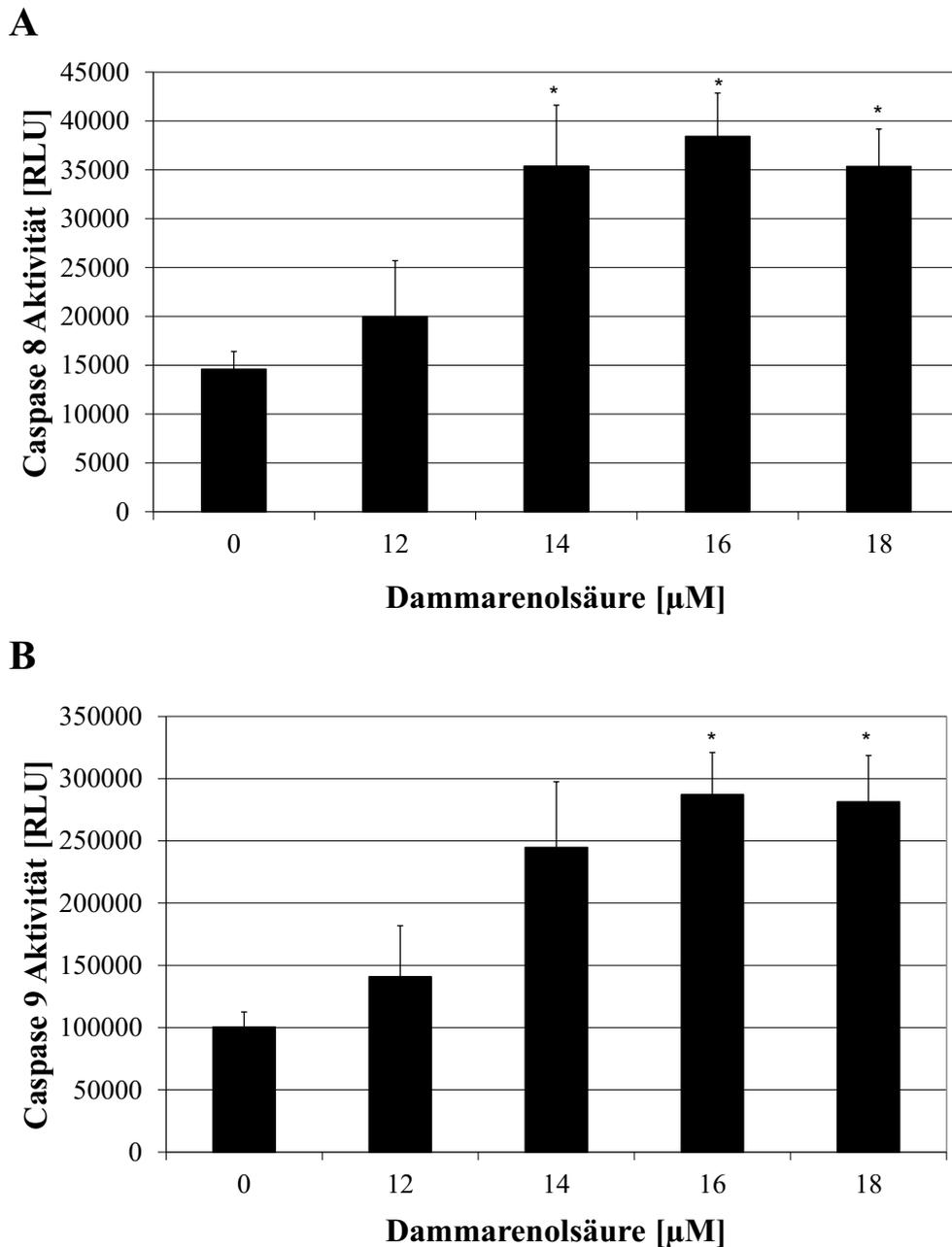


Abb. 12: Caspase 8 und 9 Aktivität von Hct-116 Zellen nach 24 h Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure 24 h lang geschädigt. Nach der Inkubation wurde das Medium auf 50 µl reduziert und mit 50 µl *Apo-Glo*-Lösung ergänzt. Die Platte wurde 2 min bei 400 rpm geschüttelt und 30 min bei RT inkubiert. 90 µl des Lysates wurden auf eine weiße 96 Well Platte umpipettiert. Die Messung erfolgte im Plattenlesegerät über 3,5 h bei RT. Dargestellt sind die Rohdaten als RLU (*relative light unit*) in Abhängigkeit der Dammarenolsäurekonzentration in µM (Mikromolar) ($n=3$, MW \pm SEM); * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle, *one way ANOVA*, post hoc Test: *Bonferroni's Multiple Comparisons Test*.

Nach Inkubation mit Dammarenolsäure ließ sich auch bei den Mammakarzinomzellen eine dosisabhängige, ab 16 µM signifikante Induktion der Caspase 3/7 messen (siehe Abb.13).

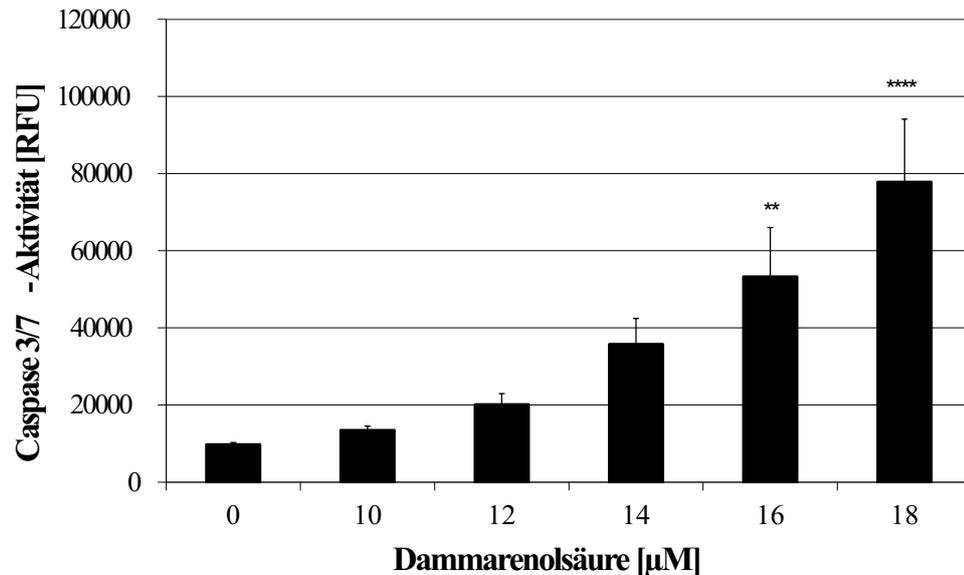


Abb. 13: Caspase 3/7 Aktivität von MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure 24 h lang geschädigt. Nach Inkubation wurde das Medium auf 50 µl reduziert und mit 50 µl *APO-ONE*-Lösung der Firma Promega ergänzt. Die Fluoreszenz wurde für 60 min bei 37 °C im Plattenlesegerät gemessen (Ex 485 nm, Em 535 nm). Dargestellt sind die Rohdaten der Fluoreszenzwerte/ RFU (*relative fluorescence unit*) in Abhängigkeit der Dammarenolsäurekonzentration in µM (Mikromolar) (n=7, MW ± SEM); ** p ≤ 0,01 vs. Kontrolle, *one way ANOVA*, post hoc Test: *Bonferroni's Multiple Comparisons Test*.

Die Aktivitätsmessung der Initiatorcaspasen 8 und 9 mit dem *Apo-Glo Assay* in MCF-7 Zellen führte, trotz Verwendung des gleichen Protokolls, zu einer vom Datenblatt des Herstellers und auch vom Versuch mit den Hct-116 Zellen abweichenden Reaktionskinetik. Ein weiteres Problem bestand in einer nicht ausreichenden Signalstabilität. Auch nach Rücksprache mit dem Hersteller und einem veränderten Protokoll konnten diese Fehler nicht behoben werden. Aus diesem Grund wurde für die MCF-7 Zellen eine andere Methode zum Nachweis einer Induktion der Initiatorcaspasen verwendet. Diese bestand in der Schädigung von MCF-7 Zellen mit Dammarenolsäure, anschließender Proteinisolation und Auftragung gleicher Proteinmengen zur Caspasemessung.

Hierunter konnte auch im Falle der MCF-7 Zellen eine dosisabhängige Aktivierung sowohl der Caspase 8/10 als auch der Caspase 9 (siehe Abb.14) nachgewiesen werden. Statistisch signifikante Werte wurden ab einer Konzentration von 12,5µM ermittelt, wobei die Caspase 8 etwa 2,2-fach und die Caspase 9 etwa 1,6- fach induziert wurden.

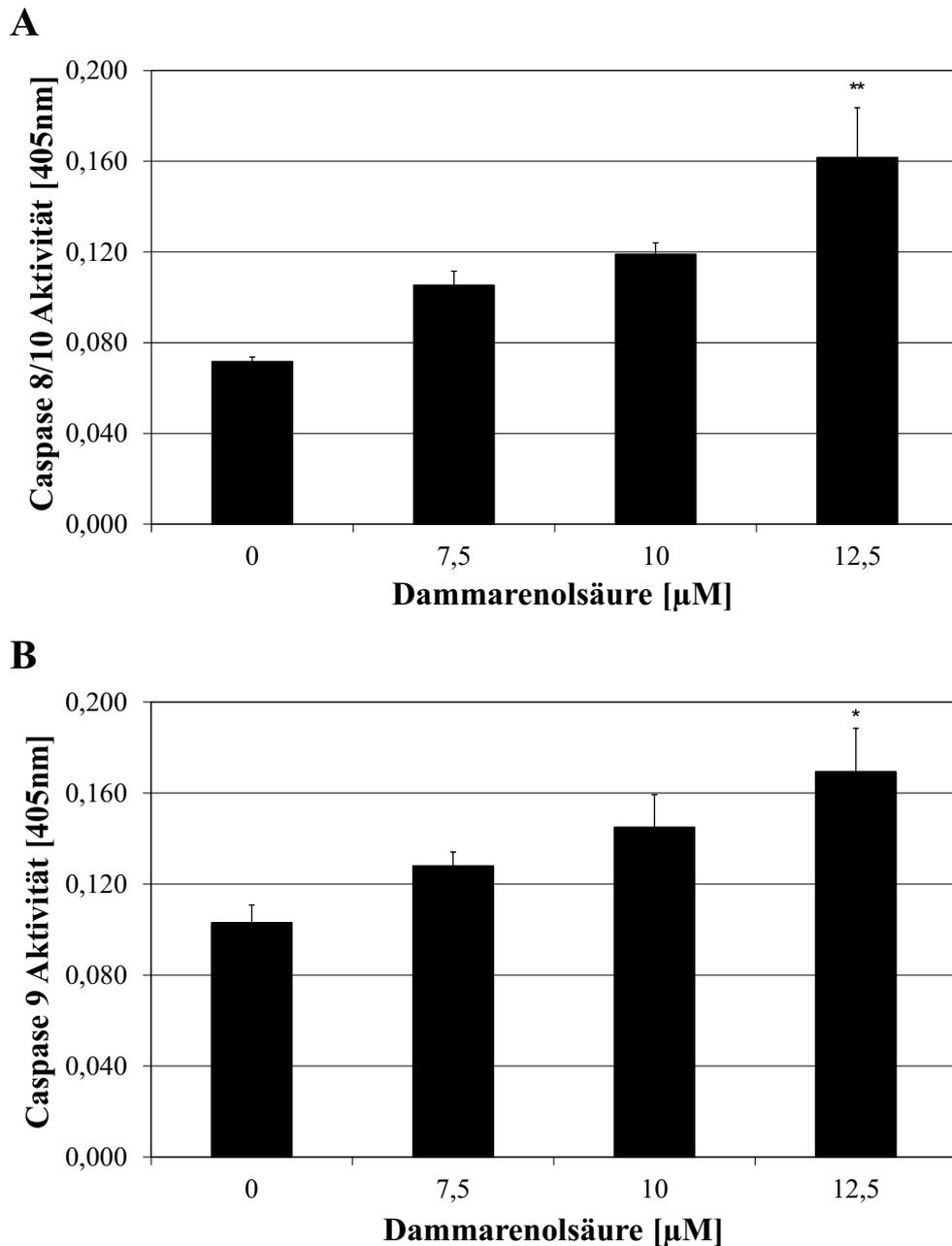


Abb. 14: Caspase 8/10 und Caspase 9 Aktivität in MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf 60 mm Schalen wurden 3×10^6 MCF-7 Zellen ausgesät und für 48 h inkubiert. Nach Mediumwechsel wurde für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dammarenolsäure geschädigt. Die Zellen wurden aufgearbeitet und gleiche Mengen nach Proteinbestimmung mit Caspase-Substrat und Assaypuffer versetzt, für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend im Plattenlesegerät gemessen (405 nm). (n=3, MW \pm SEM, * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle, *one way ANOVA*, post hoc Test: *Bonferroni's Multiple Comparison Test*). Dargestellt ist die Lichtemission bei 405 nm (Nanometer) in Abhängigkeit der Dammarenolsäurekonzentration in μM (Mikromolar)

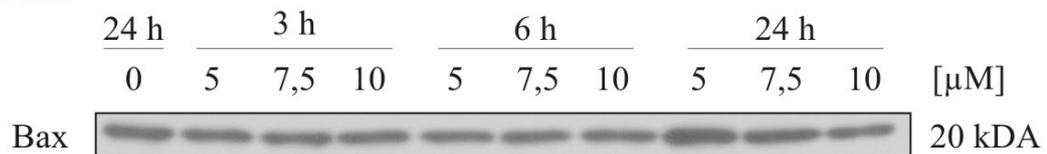
Im direkten Vergleich der erhobenen Daten von MCF-7 und Hct-116 Zellen, konnte in der Kolonkarzinomzelllinie ein höheres Basallevel an Caspase 3/7 Aktivität gemessen werden (siehe Abb.11 und 13). Nach Inkubation mit Dammarenolsäure trat innerhalb der MCF-7 Zellen eine leicht stärkere Aktivierung von Caspase 8/10 im Vergleich zur Caspase 9 auf (siehe Abb.14). In den Hct-116 Zellen hingegen war die Caspase 9 leicht stärker aktiviert

als die Caspase 8 (siehe Abb.12). Trotz unterschiedlicher Methoden im Nachweis der Caspasen 8 und 9 ließen sich, nach Normierung auf die Viabilität bzw. die Proteine, in der Gegenüberstellung der Werte unter einer Konzentration von 12 μM bei den Hct-116 Zellen bzw. 12,5 μM bei den MCF-7 Zellen ähnlich starke Aktivierungen der Initiatorcaspasen durch Dammarenolsäure detektieren (siehe Abb.12 und 14, Daten siehe Anhang).

3.1.3.2 Modulation des proapoptotischen Moleküls Bax

Unter proapoptotischen Einflüssen kann es über den mitochondrialen Weg zum programmierten Zelltod kommen. Dabei führt u.a. das proapoptotische Molekül Bax zu einer Freisetzung des Cytochrom C aus den Mitochondrien. Da vorangehend ausgeführte Befunde belegen, dass unter Behandlung von MCF-7 bzw. Hct-116 Zellen Initiator- wie auch Effektor-Caspasen aktiviert werden, sollte nun geprüft werden, ob es, als Hinweis auf eine Apoptose-Induktion über den mitochondrialen Signalweg, zu einer gesteigerten Expression von Bax kommt. Dazu wurden MCF-7 und Hct-116 Zellen über verschiedene Zeiträume mit Dammarenolsäure behandelt und die gewonnenen Proteine mittels Western Blot analysiert.

Hct-116



MCF-7

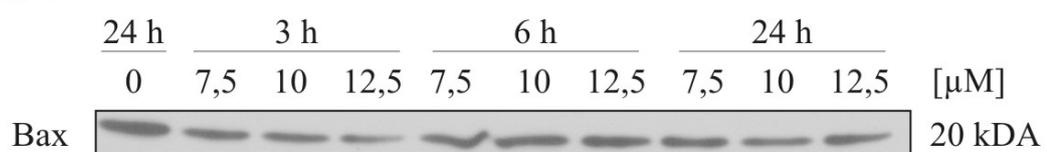


Abb. 15: Expression von Bax nach Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf 60 mm Schalen wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und für 3 h, 6 h oder 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure geschädigt. Es wurden 10 μg Protein der MCF-7 Zellen und 20 μg Protein der Hct-116 Zellen aufgetragen. Die erste Antikörperinkubation mit Bax erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Ak) *goat-anti rabbit* erfolgte mit einer Verdünnung von 1:5000 über 1 h bei Raumtemperatur. Nach den Antikörpern wurde die Membran zunächst 3 x 5 min und nach dem 2. Ak 3 x 6 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Die Exposition erfolgte nach Inkubation mit Roche-Chemilumineszenz. Rechts angegeben ist die Proteingröße in Kilodalton (kDA).

Dabei ließ sich bei den Hct-116 Zellen ein größtenteils einheitliches Bandenmuster nachweisen (siehe Abb.15), lediglich die 5 μM Bande nach 24 h Schädigung zeigte ein leicht stärkeres Signal als die Kontrolle. Es war somit weder eine dosis- noch eine

zeitabhängige Änderung der Bax- Expression in den Hct-116 Zellen erkennbar. Dieses Ergebnis traf auch auf die MCF-7 Zellen zu. Hier war abgesehen von leicht schwächer detektierbaren Banden nach 3 h Inkubation ebenfalls keine Änderung der Bax- Expression nachweisbar (siehe Abb.15).

3.1.4. Einfluss auf die MAP- Kinasen

Signaltransduktionen über die MAP- Kinasen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Inflammation und Apoptose. Daher wurden mittels Western Blot der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivierung der Mitglieder der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK, p38 und JNK hinsichtlich eines potentiellen Wirkmechanismus der Dammarenolsäure untersucht. Nach sechsständiger Inkubation konnte lichtmikroskopisch keine Toxizität detektiert werden.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der ERK Western Blots dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die phosphorylierte ERK 2 mit 42 kDA bei den Hct-116 Zellen generell stärkere Banden als die pERK 1 zeigte. Bei den MCF-7 Zellen waren die pERK 1 Banden stärker ausgeprägt als die pERK 2 Banden.

In den Hct-116 Zellen konnten nach Exposition gegenüber Dammarenolsäure geringgradig größere Proteinmengen von pERK in den Kurzzeitinkubationen von 0,5 h und 3 h beobachtet werden. Neben einer minimalen Abnahme der Phosphorylierung nach einer halbstündigen Inkubation waren nach 3 h Schädigung keine Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Dammarenolsäure erkennbar. Nach 6 h Inkubation war eine deutliche, aber nur leichte dosisabhängige Abnahme an phosphorylierter ERK 2 nachweisbar. Die generell schwach ausgeprägten pERK 1 Banden in den Hct-116 Zellen waren nach 6-stündiger Inkubation mit Dammarenolsäure nicht mehr detektierbar (siehe Abb.16). Für die unphosphorylierte Form der ERK-Typ Kinasen ließen sich keine Veränderungen nachweisen.

In den MCF-7 Zellen fiel vor allem eine zeitabhängige Reduktion der ERK-Phosphorylierung auf. Wie in Abbildung 16 dargestellt, kam es nach 3- stündiger Inkubation zu einer deutlichen, leicht dosisabhängigen Abnahme von pERK, wobei hier die pERK 2 mit 42 kDA schon nicht mehr detektierbar war. Eine Behandlung mit Dammarenolsäure über 6 h führte zu einem annähernd vollständigen Verlust der ERK-Phosphorylierung. Analog zu den Hct-116 Zellen, kam es auch bei MCF-7 Zellen nicht zu einer nennenswerten Veränderung der Proteinmenge von ERK-gesamt.

Somit ließ sich in beiden Zelllinien eine Abnahme der phosphorylierten MAP-Kinase ERK nachweisen, in den MCF-7 Zellen jedoch schon nach kürzeren Inkubationszeiten.

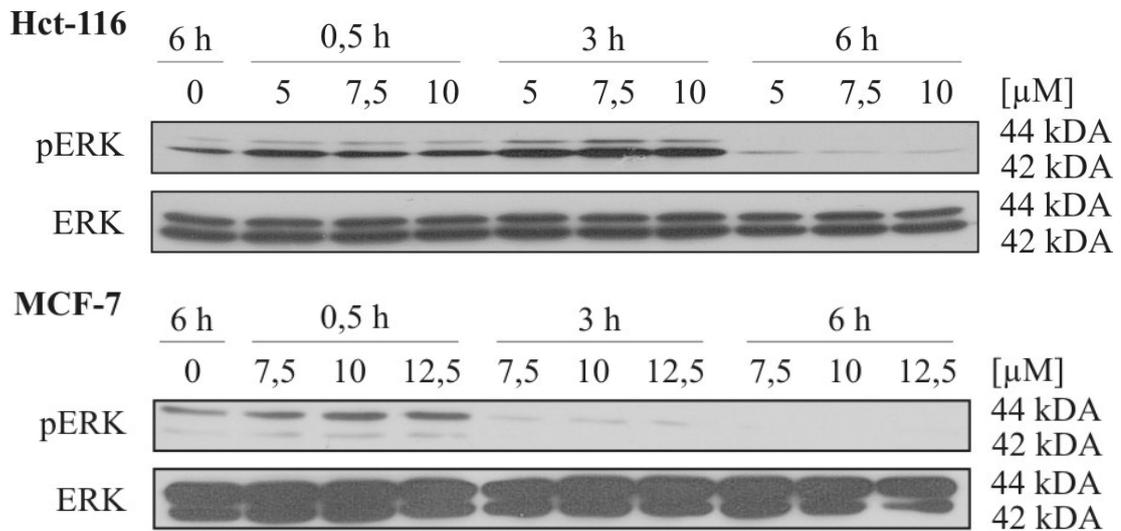


Abb. 16: ERK - Phosphorylierung nach Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf 60 mm Schalen wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und für 0,5 h, 3 h oder 6 h mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure geschädigt. 10 μg Protein wurden aufgetragen und mit dem ersten Antikörper (Ak) pERK 1:250 bzw. ERK 1:2000 über Nacht inkubiert. Die Inkubation mit dem 2. Ak *goat-anti mouse* 1:2000 für pERK bzw. *goat-anti-rabbit* 1:7500 für ERK erfolgte über 1 h bei RT. Nach den Antikörpern wurde die Membran jeweils 4 x 10 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Die Exposition erfolgte nach Inkubation mit Roche-Chemilumineszenz. Rechts angegeben ist die Proteingröße in Kilodalton (kDA).

Die Untersuchung der vorwiegend in Apoptose und Inflammation involvierten MAP-Kinase p38 ergab eine schwache basale Phosphorylierung in der Kontrolle der Hct-116 Zellen (siehe Abb.17). Schon nach einer halbstündigen Inkubation mit Dammarenolsäure kam es zu einer zunächst dosisabhängigen Phosphorylierung von p38, die im Untersuchungszeitraum von 3 bzw. 6 h an Intensität weiter zunahm, wobei sich im Verlauf die Unterschiede zwischen den Konzentrationen nivellierten. Die Proteinmenge von p38 blieb über die Zeit und Dosis hinaus relativ konstant.

Eine konstante Expression von p38 war auch in den MCF-7 Zellen nachweisbar (siehe Abb.17). Auch in dieser Zellpopulation kam es nach 30- minütiger Inkubation zu einer dosisabhängigen Aktivierung von p38. Diese blieb über 3 h und 6 h Inkubation weitestgehend konstant (siehe Abb.17). Somit ließ sich die Aktivität der stressinduzierten p38 bei den Hct-116 Zellen zeit- und zumindest initial auch dosisabhängig bis zu 6 h Inkubation steigern, während die stärkste Induktion bei den MCF-7 schon nach 0,5 h erreicht war.

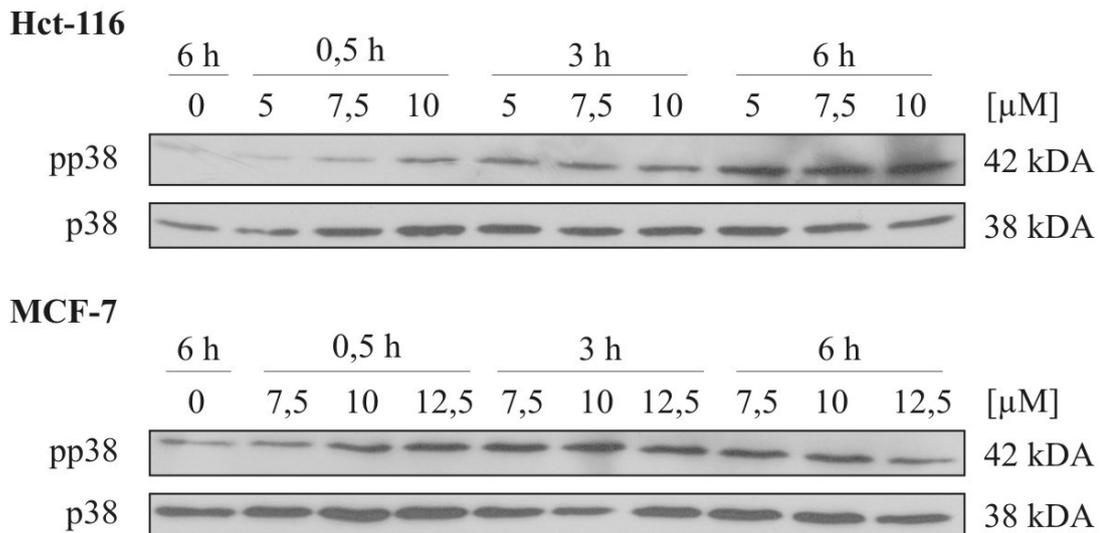


Abb. 17: p38 - Phosphorylierung nach Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf 60 mm Schalen wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und für 0,5 h, 3 h oder 6 h mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure geschädigt. Für p38 und pp38 wurden jeweils 20 μ g Protein aufgetragen und mit dem 1. Antikörper (Ak) p38 1:1000 bzw. pp38 1:1000 über Nacht inkubiert. Die Inkubation mit dem 2. Ak *goat-anti rabbit* erfolgte für beide Antikörper mit einer Verdünnung von 1:3500 über 1 h bei RT. Nach den Antikörpern wurde die Membran für p38 jeweils 3 x 10 min und für pp38 zuerst 3 x 7 min und nach dem 2. AK 3 x 5 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Die Exposition erfolgte nach Inkubation mit Roche-Chemilumineszenz. Rechts angegeben ist die Proteingröße in Kilodalton (kDA).

Es wurde auch der Einfluss von Dammarenolsäure auf die MAP- Kinase- Mitglieder JNK untersucht. Letztere ist überwiegend in die Signalweiterleitung von Prozessen involviert, über die Inflammation und Apoptose reguliert werden. Dabei konnte in beiden Zelllinien eine stärkere Phosphorylierung der JNK 2/3 mit einem Molekulargewicht von 54 kDA beobachtet werden, während die Phosphorylierung der JNK 1 (46 kDA) auf den Blots kaum zu detektieren war (siehe Abb.18). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte keine wesentliche Änderung der Aktivität von JNK in den Hct-116 Zellen beobachtet werden. Die Proteinmenge an unphosphorylierter JNK war zu allen untersuchten Konditionen konstant. In den MCF-7 Zellen waren die pJNK- Banden insgesamt stärker ausgeprägt, die kleinere pJNK 1 war zu erkennen, jedoch ebenfalls schwächer ausgeprägt als die JNK2/3. Auch in dieser Inkubation konnte unter Berücksichtigung der Ladungskontrolle keine nennenswerte Änderung der Phosphorylierung von JNK nachgewiesen werden (siehe Abb.18).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass es unter Inkubation mit Dammarenolsäure in beiden untersuchten Zellpopulationen zu einer Abnahme der ERK- Phosphorylierung kommt. Die MAP- Kinase p38 wurde hingegen durch die Behandlung der beiden Zellpopulationen mit Dammarenolsäure aktiviert, wobei die Zunahme der Aktivierung in den Hct-116 Zellen kräftiger auszufallen scheint als in MCF-7 Zellen. In

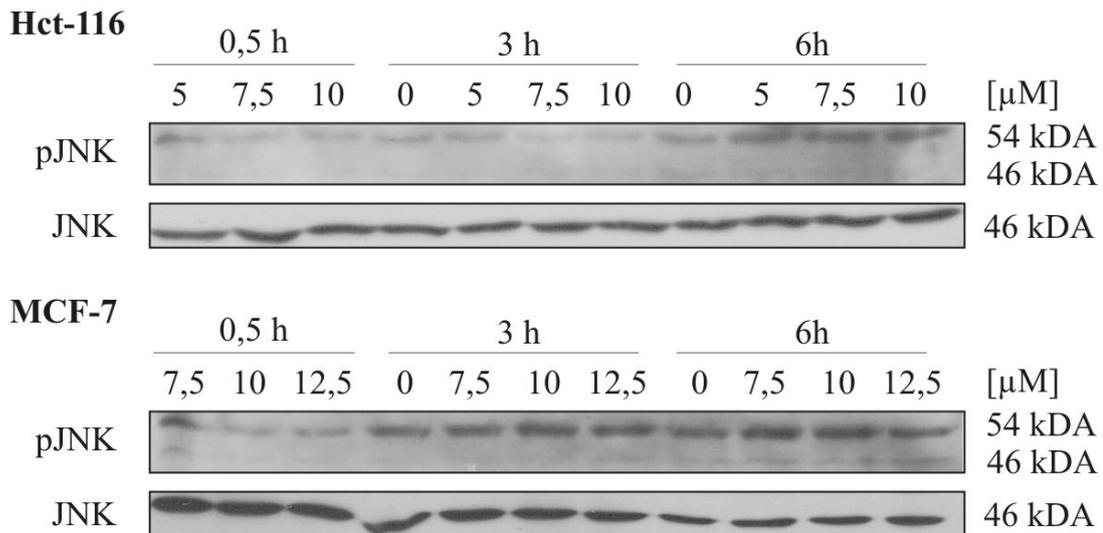


Abb. 18: JNK - Phosphorylierung nach Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf 60 mm Schalen wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und für 0,5 h, 3 h oder 6 h mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure geschädigt. Für JNK wurden $15 \mu\text{g}$ und für pJNK $40 \mu\text{g}$ Protein aufgetragen und mit dem 1. Antikörper (Ak) JNK 1:1000 bzw. pJNK 1:1500 über Nacht inkubiert. Die Inkubation mit dem 2. Ak *goat-anti rabbit* erfolgte für beide Proteine mit einer Verdünnung von 1:5000 über 1 h bei RT. Nach den Antikörpern wurde die Membran für JNK jeweils 4×10 min und für pJNK jeweils 3×6 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Die Exposition erfolgte nach Inkubation mit Roche-Chemilumineszenz. Rechts angegeben ist die Proteingröße in Kilodalton (kDA).

beiden Zelllinien ließ sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen kein signifikanter Effekt der Dammarenolsäure auf die Phosphorylierung der JNK nachweisen.

3.1.5. Einfluss von Dammarenolsäure auf den Redox-Status

Unter physiologischen Bedingungen herrscht in Zellen ein Gleichgewicht zwischen der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und deren Elimination durch Antioxidantien und antioxidative Enzyme. Da für viele Naturstoffe ein antioxidatives Potential berichtet wird, stellte sich die Frage, ob auch Dammarenolsäure diese Eigenschaft aufweist. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde ein Teac-Assay durchgeführt.

Nach einer Messung über zwei Minuten konnte keine Entfärbung von ATBS und damit auch keine radikalbindende Eigenschaft der Dammarenolsäure bestimmt werden. Die erhobenen Werte entsprachen denen unter Kontrollbedingungen mit Ethanol (siehe Abb.19). Unter der Positivkontrolle mit Trolox wurde ABTS jedoch deutlich entfärbt. Somit konnte kein antioxidatives Potenzial für Dammarenolsäure nachgewiesen werden.

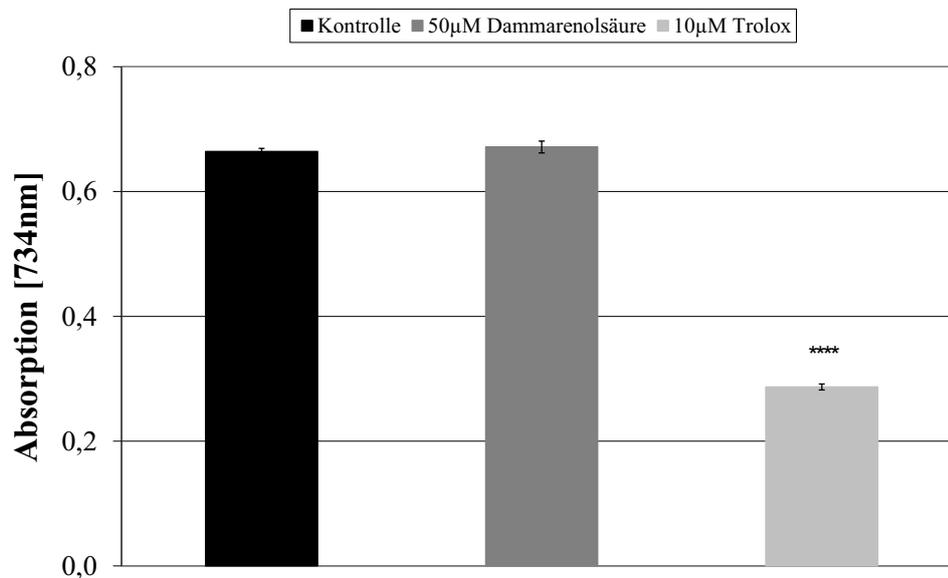


Abb. 19: Teac Assay zur Bestimmung des antioxidativen Potentials von Dammarenolsäure

Für TROLOX bzw. Dammarenolsäure wurde die Entfärbung von ATBS bei 734 nm im Photometer bestimmt. Als Kontrolle diente Ethanol. TROLOX, ein synthetisches Antioxidans, wurde als Positivkontrolle eingesetzt. (n=3 MW ± SEM); **** p ≤ 0,0001 vs. Kontrolle, One way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's Multiple Comparisons Test)

Oxidativer Stress kann unter anderem zum apoptotischen Zelltod führen. Die hier zusammengefassten Befunde legen nahe, dass die Inkubation mit Dammarenolsäure in Hct-116 bzw. MCF-7 Zelllinien vermutlich zur Induktion einer Apoptose führt. Daher wurde mittels DCF-Assay getestet ob Dammarenolsäure zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt. Nach vierstündiger Inkubation konnte eine schwache Toxizität (etwa 88 % Viabilität mit 10 µM bzw. 80 % mit 15 µM Dammarenolsäure) in den Hct-116 Zellen und eine stärkere Toxizität (etwa 73 % Viabilität mit 10 µM bzw. 45 % mit 15 µM) in den MCF-7 Zellen nachgewiesen werden.

Betrachtet man die reinen Rohdaten ohne die Viabilität einzubeziehen ist unter 15µM eine etwa 1,3-fache (Hct-116) bzw. eine 1,15-fache (MCF-7) Bildung an ROS zu detektieren (nicht dargestellt, siehe Rohdaten). Nach Normierung auf die Viabilität konnte in den Hct-116 Zellen eine leichte dosisabhängige Akkumulation von ROS im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Unter 15 µM Dammarenolsäure trat eine signifikante, etwa 1,5- fache Induktion der ROS auf (siehe Abb.20A). Eine Akkumulation von ROS war auch in den MCF-7 Zellen nach Normierung auf die Viabilität nachweisbar. Hier war mit dem 2,5-fachen der Kontrolle die stärkste Bildung von Radikalen unter einer toxischen Inkubation mit 15 µM nachweisbar (Abb.20B). Das Signifikanzniveau konnte ab 15µM erreicht werden.

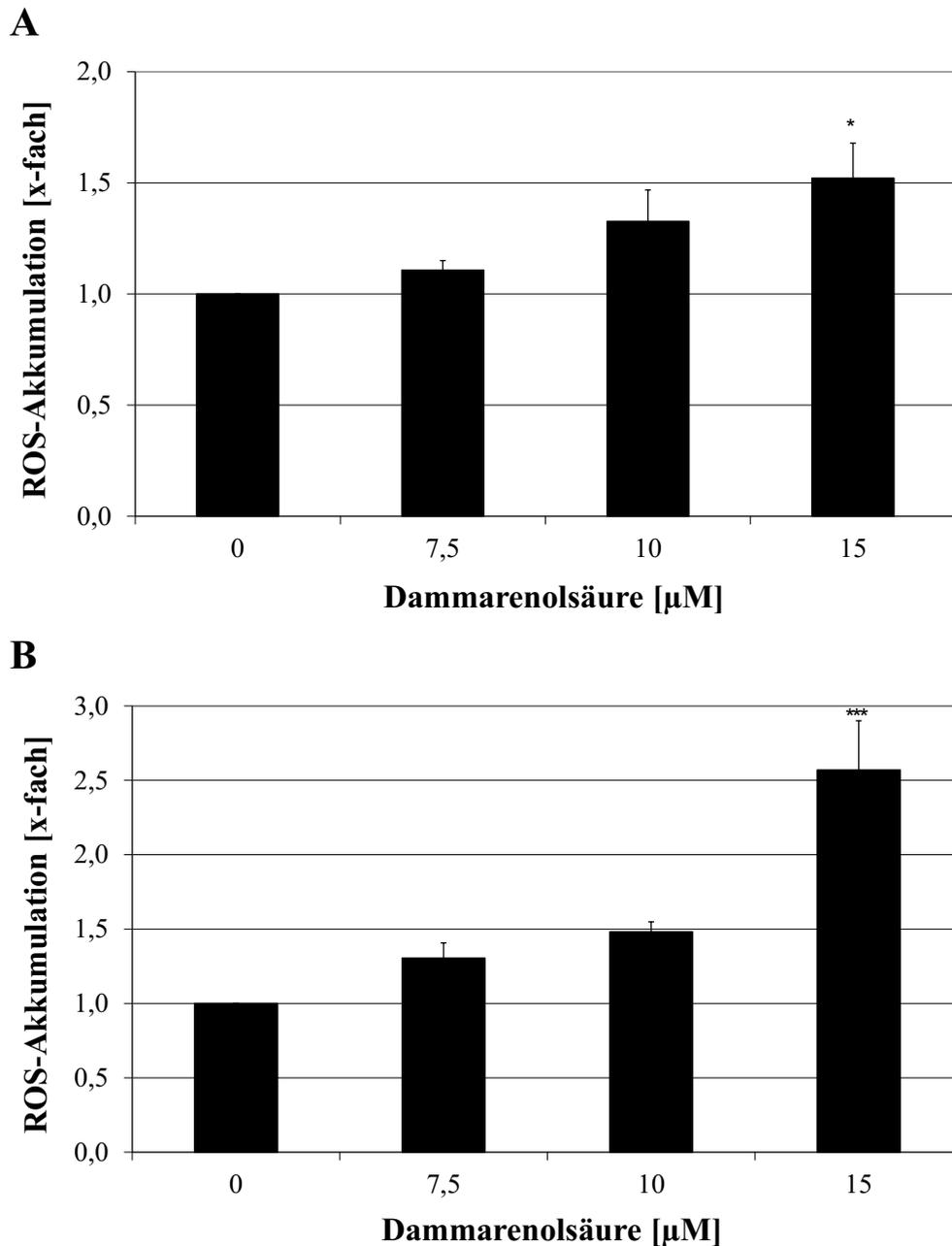


Abb. 20: Akkumulation von ROS nach Inkubation mit Dammarenolsäure

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel für 1 h mit $50 \mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ vorinkubiert. Nach erneutem Mediumwechsel mit farblosem DMEM und verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure wurden die Zellen für 4 h geschädigt. Die Messung von ROS erfolgte über 1 h bei 37°C im Plattenlesegerät (Ex: 485 nm, Em: 525 nm). Parallel dazu wurde die Viabilität durch einen MTT-Test gemessen. Dargestellt ist eine Normierung der Fluoreszenzwerte auf die Viabilität und die Kontrolle. **(A)** Hct-116 Zellen ($n=3$; MW \pm SEM); * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle, *One way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's multiple comparisons Test.* **(B)** MCF-7 Zellen ($n=3$, MW \pm SEM); * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle, *One way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's Multiple Comparisons Test.*

3.2. Koinkubationen mit TRAIL bzw. Doxorubicin

3.2.1 Sensitivierung von Krebszellen gegenüber TRAIL

TRAIL wirkt insbesondere auf maligne Zellen zytotoxisch, eine Eigenschaft, die dieses Zytokin für die Tumorthherapie interessant macht. Jedoch nicht alle Krebszellen reagieren auf TRAIL, deshalb ist es von Interesse Stoffe zu finden, die Krebszellen gegenüber TRAIL sensitivieren können. Daher wurde in diesem zweiten Teil untersucht, ob Dammarenolsäure das Potenzial besitzt, als so genannter *Sensitizer* zu wirken. Es erfolgte eine Normierung auf die jeweiligen Kontrollen, um die Eigentoxizitäten der Dammarenolsäure zu eliminieren.

In den Hct-116 Zellen war eine signifikante Eigentoxizität von TRAIL ab einer Konzentration von 5 ng/ml nachweisbar. Selbst unter der verwendeten maximalen Konzentration von 25 ng/ml TRAIL konnte jedoch kein EC_{50} -Wert erreicht werden (siehe Abb.21).

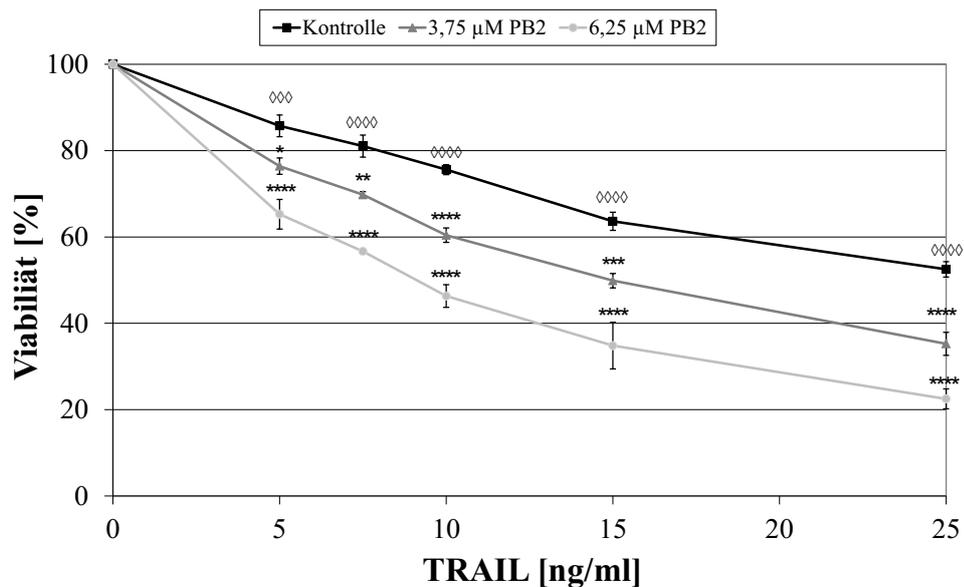


Abb. 21: Viabilität von Hct-116 Zellen nach Koinkubation mit TRAIL und Dammarenolsäure

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure (=PB2) vorinkubiert. Nach 4 h wurde TRAIL in unterschiedlichen Konzentrationen ohne Mediumwechsel dazu pipettiert und für weitere 20 h inkubiert. Zur Viabilitätsmessung wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt sind die Werte als Prozent der jeweiligen Kontrolle. (n=3, MW \pm SEM); \diamond $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle ohne TRAIL und ohne PB2 (Eigentoxizität TRAIL); * $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrollinkubation mit TRAIL; two way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test bzw. Tukey's Multiple Comparisons Test).

Die Eigentoxizität von Dammarenolsäure war mit Viabilitäten von 97 % bei 3,75 µM bzw. 80 % bei 6,25 µM recht niedrig und nicht signifikant. Schon unter einer zusätzlichen Gabe von 3,75 µM Dammarenolsäure wurde unter einer Konzentration von 25 ng/ml TRAIL

eine Toxizitätssteigerung um bis zu fast 20 % erreicht. Dieser Effekt ließ sich durch 6,25µM Dammarenolsäure weiter auf 30 % steigern. Die Befunde legen nahe, dass sich durch eine Koinkubation mit Dammarenolsäure in den Hct-116 Zellen eine stärkere Toxizität von TRAIL erzielen lässt. Hct-116 Zellen lassen sich folglich durch Dammarenolsäure gegenüber TRAIL sensitivieren.

MCF-7 Zellen reagieren weitgehend resistent auf TRAIL. Aus diesem Grund wurden zur Untersuchung der Sensitivierung in MCF-7 Zellen dreifach höhere Konzentrationen von TRAIL verwendet als bei den Hct-116 Zellen (siehe Abb.22). Unter 25 ng/ml TRAIL, die höchste bei den Hct-116 Zellen verwendete Konzentration, konnte in den MCF-7 Zellen eine Viabilität von etwa 80 % detektiert werden. Selbst unter der Einzelinkubation mit 75 ng/ml TRAIL lag die Viabilität bei über 70%.

Die Einzelinkubation mit dem Naturstoff führte zu Viabilitäten von 81 % unter 2,5 µM bzw. etwa 60 % unter 5 µM Dammarenolsäure. In der Koinkubation mit 2,5 µM konnte kaum eine Toxizitätssteigerung im Vergleich zur TRAIL- Einzelinkubation erreicht werden (siehe Abb.22A). Unter Verwendung der höheren Konzentration an Dammarenolsäure, bei der schon in der Einzelinkubation eine deutliche Reduktion der Viabilität gemessen werden konnte, war eine Steigerung der Toxizität um 20-30 % nachweisbar. Die maximale und signifikante Viabilitätsreduktion in der Koinkubation konnte unter 50 ng/ml TRAIL und 5 µM Dammarenolsäure detektiert werden.

Neben der reinen Toxizität wurde bei den MCF-7 Zellen ergänzend auch geprüft, ob die Effektorcaspasen 3/7 aktiviert werden (siehe Abb.22B). Dabei blieb selbst unter der höchsten Einzelinkubation mit TRAIL eine Aktivierung der Effektorcaspasen aus. Auch mittels 5µM Dammarenolsäure konnte kein signifikanter Anstieg der Caspasen gesehen werden. Durch eine Koinkubation konnte jedoch im Vergleich zur Einzelinkubation mit TRAIL ab einer Konzentration von 10µM eine relevante Induktion der Effektorcaspasen gemessen werden. Bei den MCF-7 Zellen waren Konzentrationen an Dammarenolsäure, die schon in Einzelinkubation die Viabilität beeinflussen notwendig um die Zellen effektiv gegenüber TRAIL sensitivieren zu können.

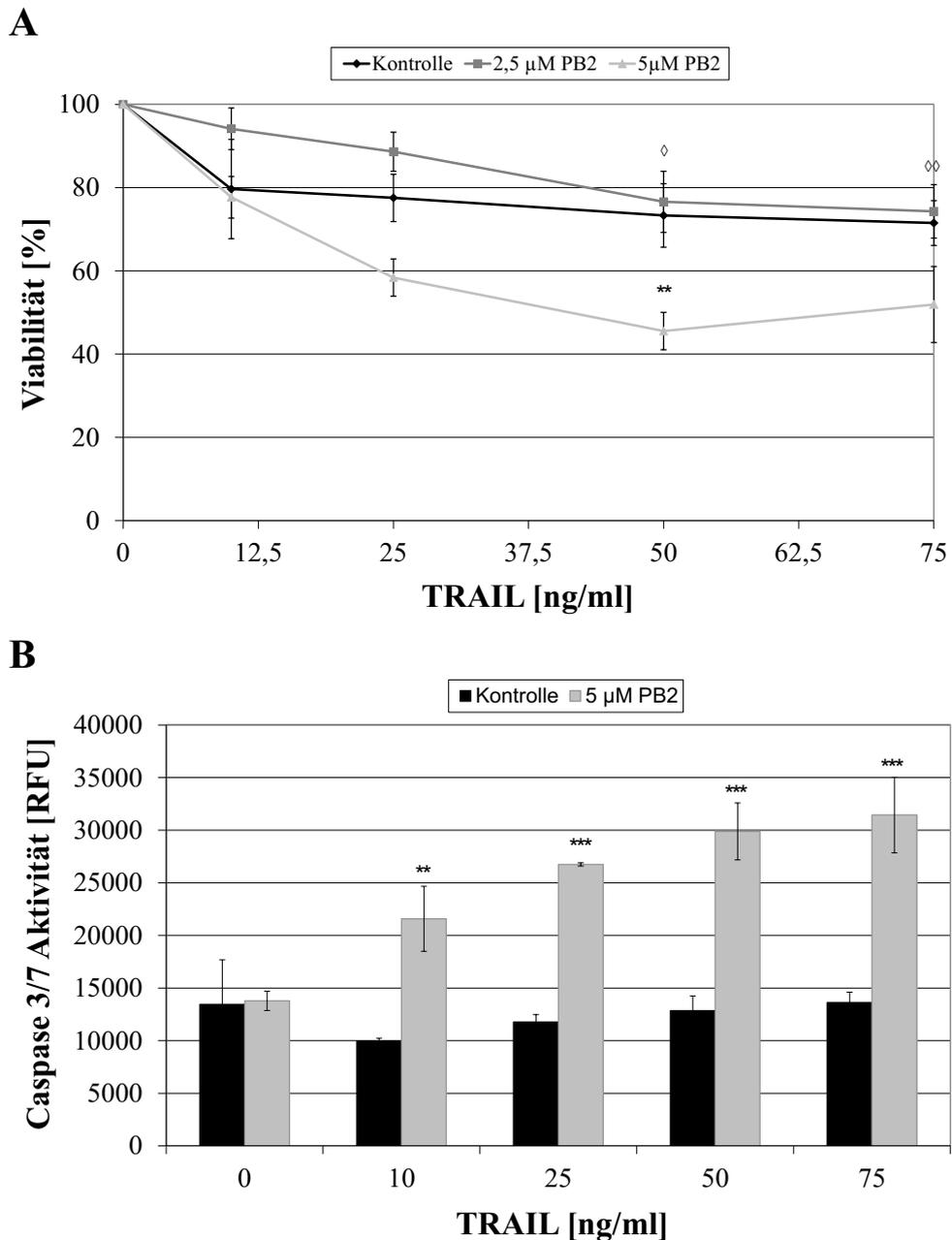


Abb. 22: Viabilität und Apoptose von MCF-7 Zellen nach Koinkubation mit TRAIL und Dammarenolsäure

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure (=PB2) vorinkubiert. Nach 4 h wurde TRAIL in unterschiedlichen Konzentrationen ohne Mediumwechsel dazu pipettiert und für weitere 20 h inkubiert. Zur Viabilitätsmessung wurde ein MTT-Assay durchgeführt. **(A)** Die Werte sind normiert auf die Viabilität und die jeweilige Kontrolle. ($n=3$, $MW \pm SEM$; $\diamond p \leq 0,05$ vs. Kontrolle ohne TRAIL und ohne PB2 (Eigentoxizität TRAIL); $* p \leq 0,05$ vs. jeweilige Kontrollinkubation mit TRAIL; *Two way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*) **(B)** Nach Inkubation wurde das Medium auf 50 μ l reduziert und mit 50 μ l *APO-ONE*-Lösung der Firma Promega ergänzt. Die Fluoreszenz wurde für 60 min bei 37 °C im Plattenlesegerät gemessen (Ex 485 nm, Em 535 nm). Dargestellt sind die Fluoreszenzwerte ($n=3$, $MW \pm SEM$); $* p \leq 0,05$ vs. jeweilige Einzel/Kontrollinkubation mit TRAIL, *Two way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

3.2.2 Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Doxorubicin

Das Anthrazyklin Doxorubicin ist ein in der onkologischen Therapie häufig eingesetztes Zytostatikum. Besonders durch kardiotoxische Nebenwirkung ist die kumulative Dosis oft limitiert. Daher wird an Möglichkeiten geforscht, die unerwünschten Wirkungen zu reduzieren. Dies kann z.B. in Form einer Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Doxorubicin erzielt werden. Aus diesem Grund sollte ferner geprüft werden, ob sich MCF-7 und Hct-116 Zellen durch Dammarenolsäure gegenüber diesem Zytostatikum sensitivieren lassen.

Unter Inkubation mit Doxorubicin alleine kam es bei Hct-116 Zellen ab einer Konzentration von etwa 2 μM zu toxischen Effekten. In der Einzelinkubation mit Dammarenolsäure war bei 3,75 μM im Mittel eine Viabilität von 75 % und bei 6,25 μM eine deutliche Toxizität mit etwa 52 % viablen Zellen nachweisbar. Es stellte sich heraus, dass sich durch Hinzugabe der niedrigeren Konzentration an Dammarenolsäure keine Steigerung der Doxorubicin-Toxizität erzielen ließ (siehe Abb.23). Erst ab einer Dammarenolsäurekonzentration von 6,25 μM kam es zu einer deutlichen Zunahme der Toxizität von Doxorubicin unter Koinkubation mit Dammarenolsäure (siehe Abb.23).

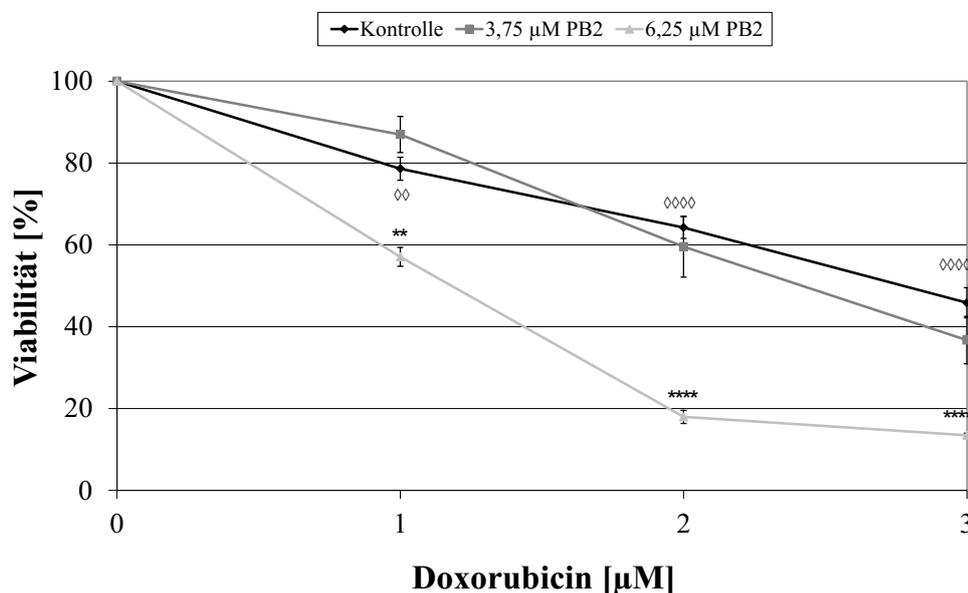


Abb. 23: Viabilität von Hct-116 Zellen nach Koinkubation mit Doxorubicin und Dammarenolsäure

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit Doxorubicin für 3 h vorinkubiert. Nach erneutem Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure (=PB2) wurde für weitere 24 h inkubiert. Zur Viabilitätsmessung erfolgte ein MTT-Assay. Dargestellt sind die Werte als Prozent der jeweiligen Kontrolle. (n=4, MW \pm SEM; ∞ $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle ohne Doxorubicin und ohne PB2 (Eigentoxizität Doxorubicin); ** $p \leq 0,01$ vs. jeweilige Einzel-/Kontrollinkubation mit Doxorubicin, *Two way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

In der gegenüber Doxorubicin deutlich unempfindlicheren Brustkrebszelllinie MCF-7

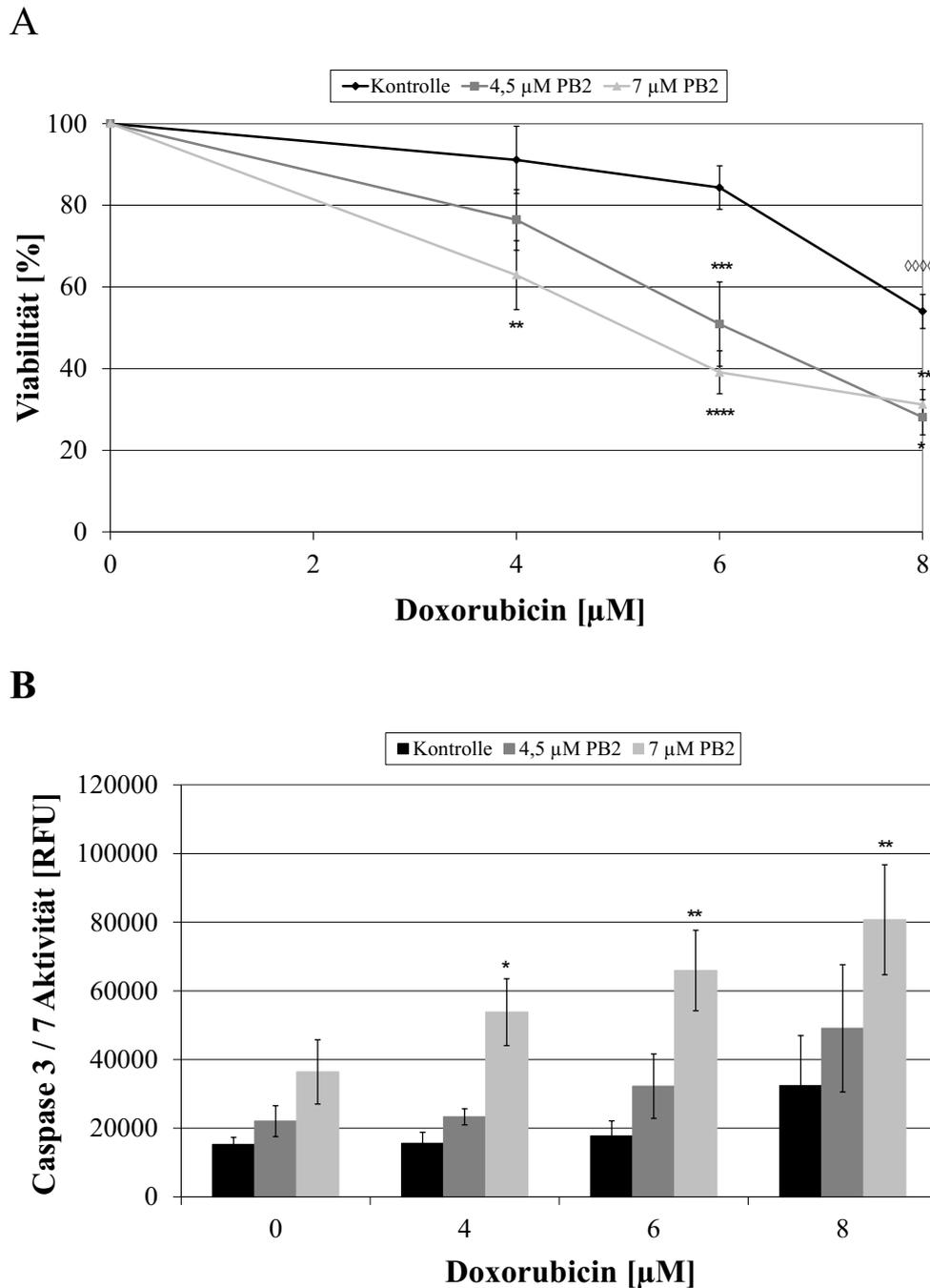


Abb. 24: Viabilität und Apoptose von MCF-7 Zellen nach Koinkubation mit Doxorubicin und Dammarenolsäure

Auf einer 96 Well Platte wurden 4×10^4 Zellen / Well ausgesät, für 24 h inkubiert und nach Mediumwechsel mit Doxorubicin für 3 h vorinkubiert. Nach erneutem Mediumwechsel mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure (=PB2) wurde für weitere 24 h inkubiert. Zur Viabilitätsmessung erfolgte ein MTT-Assay. **(A)** Die Werte sind normiert auf die Viabilität und die Kontrolle. ($n=4$, $MW \pm SEM$; $\diamond p \leq 0,05$ vs. Kontrolle ohne Doxorubicin und ohne PB2 (Eigentoxizität Doxorubicin); * $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Einzel-/Kontrollinkubation mit Doxorubicin; *Two way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*). **(B)** Nach Inkubation wurde das Medium auf 50 μ l reduziert und mit 50 μ l APO-ONE-Lsg der Firma Promega ergänzt. Die Fluoreszenz wurde für 75 min bei 37 °C im Plattenlesegerät gemessen (Ex 485 nm, Em 535 nm). Dargestellt sind die Fluoreszenzwerte. ($n=3$, $MW \pm SEM$; * $p \leq 0,05$ vs. jeweilige Einzel-/Kontrollinkubation mit Doxorubicin, *Two way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni's Multiple Comparison Test*)

konnte trotz der verwendeten, höheren Konzentrationen des Zytostatikums kein EC₅₀-Wert in der Einzelinkubation erreicht werden.

Eine messbare Eigentoxizität des Anthrazyklins trat erst ab 8 µM auf (siehe Abb.24A). Die Einzelinkubation mit 4,5 µM Dammarenolsäure wies eine Viabilität von etwa 78 % auf. Unter der höheren Dammarenolsäurekonzentration (7 µM) war schon unter Inkubation mit Dammarenolsäure alleine eine deutlich Reduktion der Viabilität auf etwa 57 % zu beobachten. Durch 4,5 µM Dammarenolsäure konnte nach Vorinkubation mit 6 µM Doxorubicin die Toxizität signifikant gesteigert werden (siehe Abb.24A). Unter der 7µM Dammarenolsäure wurde die Toxizität bereits ab 4µM Doxorubicin gesteigert (siehe Abb.24 A).

Ergänzend zur Viabilitätsmessung bei den MCF-7 Zellen erfolgte die Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität als Nachweis des apoptotischen Zelltods (siehe Abb.24B). Unter 4,5µM bzw. 7µM Dammarenolsäure wurde ein 1,4- facher bzw. 2,4-facher Anstieg der Effektorcaspasenaktivität detektiert. Nach Einzelinkubation ließ sich erst ab einer Konzentration von 8µM Doxorubicin eine mäßige Aktivierung der Caspasen nachweisen. Durch eine Koinkubation mit Dammarenolsäure konnten die Caspasen deutlich induziert werden. Das Signifikanzniveau wurde bei der Koinkubation von 7µM Dammarenolsäure mit 4µM Doxorubicin erreicht (siehe Abb.24B).

4. Diskussion

Die Dammarenolsäure ist ein aus der Gattung *Aglaiia*, einem Mahagonigewächs, gewonnener Naturstoff. In vorangegangenen Arbeiten anderer konnte vor allem ein antivirales Potenzial u.a. gegen RSV, HSV, EBV, HIV identifiziert werden. Ebenso weist die Substanz gewisse antibakterielle und fungizide Eigenschaften auf (Esimone et al., 2008, Esimone et al., 2010, Eck, 2004, Ukiya et al., 2010). Die Datenlage zur Wirkung auf Tumorzellen ist limitiert. Bisherige Arbeiten beobachteten eine Zytotoxizität in L51784-Mauslymphomzellen und in HL60- Leukämiezellen. In der Zervixkarzinomzelllinie HeLa ließ sich eine Proliferationshemmung erst ab 15 µg/ml nachweisen, in der Melanomzelllinie CRL1579 hingegen konnte keine Zytotoxizität ermittelt werden (Ukiya et al., 2010, Eck, 2004, Esimone et al., 2010). Daher sollte nun geprüft werden, ob der Naturstoff auch in anderen Krebszelllinien, wie der Kolonkarzinom-Zelllinie Hct-116 und der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7, zytotoxische Eigenschaften aufweist. Darüber hinaus sollten Untersuchungen auf mögliche Wirkmechanismen erfolgen.

4.1. Einfluss von Serum auf die Dammarenolsäuretoxizität

4.1.1. Dammarenolsäure wirkt zytotoxisch

Mittels MTT-Tests konnte eine dosisabhängige Toxizität der Dammarenolsäure nach 24-stündiger Inkubation beobachtet werden. Mit EC₅₀- Werten von 10,4 µM (MCF-7) und 10,8 µM (Hct-116) (siehe Abb.7 und 8) entsprach diese in etwa der, in den HL60-Leukämiezellen detektierten Toxizität von Dammarenolsäure (Ukiya et al., 2010). Vergleichbare Einflüsse auf MCF-7 und Hct-116 Zellen wurden in der Literatur bereits für die Betulinsäure beschrieben. Dieses pentazyklische Triterpen wies nach Inkubation in der Brustkrebszelllinie MCF-7 einen EC₅₀-Wert von 13,5 µg/ml, bzw. 8,9 µg/ml in den Hct-116 Zellen auf. Der Zelltod wird durch Induktion der Apoptose vermittelt (Damle et al., 2013, Aisha et al., 2012). Vorangegangene Arbeiten erhoben ähnliche Daten für weitere Triterpene wie Lupeol (Tarapore et al., 2013, Saleem, 2009), die Ursolsäure (Mishra et al., 2016, Prasad et al., 2012) und Curcubitacine (Kong et al., 2014), die nicht nur ein zytotoxisches Potenzial für die, in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, sondern auch in anderen Zellkulturen aufwiesen. Für die Dammarenolsäure konnte in dieser Arbeit erstmalig eine dosisabhängige Toxizität auf MCF-7 bzw. Hct-116 Zelllinien beschrieben werden.

4.1.2. Serum inhibiert eine zytotoxische Wirkung

Unter der Inkubation mit Serum- haltigem Medium war jedoch keine Toxizität nachweisbar, so dass die Ursache dieses Phänomens genauer untersucht wurde. Dazu wurden dem Medium unterschiedliche Konzentrationen an FCS (*fetal calf serum*) bzw. BSA (*bovine serum albumin*) hinzugefügt. Albumin macht mit etwa 60 % den größten Anteil an Plasmaproteinen aus und fungiert als Transportmolekül körpereigener Stoffe, wie z.B. Bilirubin (Schmidt et al., 2004). Es kann jedoch auch einige Medikamente binden und damit deren Pharmakokinetik- und -dynamik beeinflussen. In der Regel können nur die nicht Protein-gebundenen Medikamente ihre Wirkung entfalten. Je höher die Bindungsaffinität ist, desto weniger freie Substanz liegt im Plasma vor und desto weniger Wirkung kann durch diese ausgelöst werden. Ferner beeinflusst die Proteinbindung die renale Elimination (Yamasaki et al., 2013, Smith et al., 2010). Standardgemäß enthielt das Inkubationsmedium für die Zellkultur 10 % FCS. Unter der Annahme, dass Albumin möglicherweise die fehlende Toxizität bedingen könnte und um eine Dosisabhängigkeit zu evaluieren, wurden Inkubationen mit einem Anteil von jeweils 10 % und 5 % FCS oder den entsprechenden Konzentrationen von 0,3 % und 0,15% Albumin im Medium durchgeführt. Unabhängig von der Konzentration an BSA oder FCS ließ sich in beiden Zelllinien unter Hinzugabe von Dammarenolsäure stets eine Viabilität von mindestens 80% beobachten (siehe Abb.7 und 8). Wie oben bereits ausgeführt vermag Albumin durch Proteinbindung die Wirkung diverser Pharmaka nachhaltig zu beeinflussen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieser Effekt von Albumin auch für den Wirkungsverlust von Dammarenolsäure in Gegenwart von FCS bzw. Albumin verantwortlich ist. Diese Überlegung konnte bereits für andere Triterpene belegt werden. So binden Betulinsäure und Oleanolsäure an humanes Serumalbumin (Subramanyam et al., 2009, Rada et al., 2011). Auch für das, dem humanen Albumin in Struktur und Funktion ähnelnde BSA ist eine Affinität verschiedener Triterpene, wie der Maslinsäure, der Oleanolsäure und der Ursolsäure beschrieben. Die Gemeinsamkeit dieser Komplexbildung scheinen vor allem Wasserstoffbrückenbindungen zu sein (Molina-Bolívar et al., 2014, Molina-Bolívar et al., 2015, Peng et al., 2014). Für die Oleanolsäure konnte eine höhere Bindungsaffinität für HSA (*human serum albumin*) im Vergleich zu BSA festgestellt werden (Yang et al., 2014). Parallel zu dem in dieser Arbeit beobachteten Verlust der Zytotoxizität, konnten vergleichbare Effekte in HepG2 Zellen für die Ginsenoside, triterpene Saponine, identifiziert werden. Unter dem Einfluss von Kälberserum, BSA und HSA wurde der Apoptose-induzierende Effekt der Ginsenoside verhindert (Lin et al., 2016). Es wäre daher

sinnvoll in weiterführenden Arbeiten die Bindungsaffinität von Dammarenolsäure an BSA bzw. humanes Serumalbumin detaillierter zu untersuchen.

4.1.3. Insulin verstärkt die Toxizität

Ergänzend wurde Insulin als Wachstumsfaktor untersucht. Entgegen der Erwartung einer a.e. reduzierten Zytotoxizität unter der Inkubation mit dem anabolen Hormon, konnte, im Vergleich zur Inkubation ohne Serum, mit EC₅₀-Werten von 7,3 µM (Hct-116) und 6,7 µM (MCF-7) eine deutlich stärkere Toxizität der Dammarenolsäure in Gegenwart von Insulin detektiert werden (siehe Abb.7 und 8). Normalerweise führt die Rezeptorbindung von Insulin über die Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden wie dem PI3K/AKT oder dem ERK-Signalweg zu Proliferation und gesteigertem Metabolismus. In Tumoren liegen z.T. Mutationen in dieser Signaltransduktion vor (Pollak, 2008, Yang and Yee, 2012). Einige Autoren konnten eine Einflussnahme von Triterpenen auf den Insulinsignalweg feststellen. So beruhte die antidiabetische Wirkung von Triterpenoid Saponinen auf der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges (Hu et al., 2014). Auch der Ursolsäure und der Oleanolsäure wurden insulinsensitivierende Eigenschaften zugeschrieben (Jung et al., 2007, Zhang et al., 2006, Castellano et al., 2013). Auf der anderen Seite ließ sich für die Ursolsäure auch eine Induktion der Apoptose in Pankreaskarzinomzellen über eine Hemmung des PI3K/AKT- und Induktion des JNK-Signalweges nachweisen (Li et al., 2012). Ferner wurden Modifikationen des Insulinsignalesweges durch Abnahme der AKT-Phosphorylierung, u.a. für die Asiatsäure, Lupeol und Iripallidal, ein bizyklisches Triterpenoid, beschrieben (Koul et al., 2010, Ren et al., 2016, Saleem et al., 2005). Es gibt kaum Quellen über eine verstärkte Zytotoxizität bestimmter Substanzen in Anwesenheit von Insulin (Alabaster et al., 1981), vor allem nicht zu Triterpenen. Auf welche Weise Insulin die Zytotoxizität von Dammarenolsäure verstärkt, ist unklar und muss ggf. im Rahmen weiterführender Untersuchungen aufgeklärt werden. In den Folgeexperimenten erfolgten die Inkubationen mit Dammarenolsäure standardgemäß ohne FCS und ohne Insulin.

4.2. Modulation der Apoptose

4.2.1. Dammarenolsäure aktiviert Caspasen

In der lichtmikroskopischen Begutachtung der Zellen im Anschluss an die Inkubation konnten morphologische Aspekte beobachtet werden, welche die Möglichkeit eines apoptotischen Zelltodes nahelegten (siehe Abb.9 und 10), so dass im Folgenden der Einfluss von Dammarenolsäure auf die Caspaseaktivität untersucht wurde. Nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure wurde eine dosisabhängige Steigerung der Effektorcaspasen 3/7 sowohl in den Hct-116, als auch in den MCF-7 Zellen gemessen (siehe Abb.11 und 13). Vergleicht man beide Zelllinien, so lässt sich in den MCF-7 Zellen ein geringeres Niveau an Caspase 3/7 nachweisen. Ein Grund hierfür könnte der Verlust der Caspase 3 in MCF-7 Zellen sein (Jänicke et al., 1998). Zur Klärung, ob die Apoptose über den extrinsischen oder intrinsischen Weg eingeleitet wird, wurden ergänzend die Initiatorcaspasen betrachtet. Nach Inkubation mit Dammarenolsäure über 24 Stunden erfolgte die Messung in den Hct-116 Zellen mittels *ApoGlo Assay* der Firma Promega. Hierbei konnte eine dosisabhängige Induktion sowohl der Caspase 8, als auch der Caspase 9 beobachtet werden (siehe Abb.12). Bei den MCF-7 Zellen wurde jedoch, obgleich analoge Versuchsbedingungen vorlagen, keine adäquate Reaktionskinetik erzielt. Dieses Problem konnte trotz Rücksprachen mit dem Hersteller und Modifikationen des Protokolls nicht behoben werden, so dass die Analyse der Initiatorcaspasen in den MCF-7 Zellen schließlich mit dem Caspase-Assay durchgeführt wurde. Dabei wurde eine Aktivierung sowohl der Caspase 8 als auch der Caspase 9 festgestellt (siehe Abb.14). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse in beiden Zelllinien einen durch Dammarenolsäure induzierten, apoptotischen Zelltod vermuten.

4.2.2. Einfluss von Dammarenolsäure auf den mitochondrialen Signalweg

Da sowohl die Caspase 8, als auch die Caspase 9 aktiviert wurden, sollte ergänzend exemplarisch das proapoptische Molekül Bax, das die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien vermittelt, mittels Western Blot untersucht werden. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte weder eine zeit- noch eine dosisabhängige Modifikation von Bax festgestellt werden (siehe Abb.15). Es ist bereits bekannt, dass Triterpene in verschiedenen Zelllinien eine Apoptose herbeiführen. Nach Inkubationen mit Betulinsäure wird die Apoptose über den intrinsischen Signalweg vermittelt. Eine zentrale Rolle scheint dabei die Störung des mitochondrialen Membranpotenzials zu spielen, die wiederum einen Anstieg der Aktivität der Caspasen 3 und 8 bedingt. Der Einfluss von Bax ist

unterschiedlich beschrieben. So ist zum einen ein Anstieg des Proteinlevels für das proapoptotische Molekül nach Inkubation mit Betulinsäure beschrieben. Andere Autoren schließen auf einen Bax- unabhängigen Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Betulinsäure (Fulda and Kroemer, 2009, Laszczyk, 2009, Mullauer et al., 2009, Fulda et al., 1999). Die Ursolsäure vermittelt die Apoptose über den extrinsischen Weg und führt dementsprechend zur Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 3/7 (Mishra et al., 2016, Li et al., 2012). Morphologisch konnte auch für Lupeol ein apoptotischer Zelltod festgestellt werden, der über die Aktivierung der Caspase 8, 9, sowie 3/7 und Bax vermittelt wird (Saleem et al., 2005, Prasad et al., 2008c). Gleiche Effekte werden dem Celastrol zugeschrieben (Kannaiyan et al., 2011, Feng et al., 2013). Zusammenfassend scheint die Dammarenolsäure zumindest über die Aktivierung der Caspasen 8, 9 sowie 3 und 7 ähnliche Mechanismen wie ihre strukturverwandten Naturstoffe zu vermitteln. In wie weit Dammarenolsäure die Apoptose über den intrinsischen oder extrinsischen Weg aktiviert lässt sich jedoch anhand der bisherigen Daten noch nicht abschliessend beurteilen und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

4.3. Einfluss von Dammarenolsäure auf den Redox-Status

Unter physiologischen Bedingungen liegt in Zellen eine Homöostase zwischen der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und deren Elimination durch Antioxidantien und antioxidative Enzyme vor. Durch die Akkumulation von ROS kann dieses Gleichgewicht gestört werden und zum Zelltod führen. Aber auch einige Krebsarten und andere Erkrankungen sind mit einem erhöhten ROS-Level assoziiert (Waris and Ahsan, 2006, Valko et al., 2007, Trachootham et al., 2008, Sies et al., 2017).

Verschiedene Naturstoffe, vor allem Flavonoide, weisen antioxidative und damit protektive Eigenschaften auf (Rice-Evans and Miller, 1996). In vorangegangenen Arbeiten wurden auch für Triterpene wie Lupeol oder die Maslinsäure antioxidative Eigenschaften identifiziert (Prasad et al., 2008b, Tchimine et al., 2016, Montilla et al., 2003). Daher sollte der Einfluss von Dammarenolsäure auf den Redox-Status evaluiert und in experimentellen Untersuchungen geprüft werden, ob die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zur Einleitung des Zelltodes durch Dammarenolsäure beiträgt. Mittels TEAC-Assay konnte selbst unter einer hohen Konzentration an Dammarenolsäure kein antioxidatives Potenzial festgestellt werden. TROLOX, ein Vitamin E- Derivat diente als Positivkontrolle (siehe Abb.19). Analoge Daten wurden auch für Erythrodiol und die

Oleanolsäure erhoben, für die mittels TEAC-Assay ebenfalls kein antioxidatives Potenzial nachgewiesen werden konnte (Allouche et al., 2010).

Die Modifikation des Levels an reaktiven Sauerstoffspezies scheint eine Rolle in der Apoptoseinduktion verschiedener Triterpene zu spielen. Eine 24-stündige Inkubation mit Betulinsäure führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Gliomzellen (Wick et al., 1999). Celastrol, Ursolsäure und CDDO-Im, ein Oleanantriterpenoid-Derivat, induzierten in verschiedenen Zelllinien eine Akkumulation von ROS. Die Inkubationszeiten lagen dabei zwischen 2 und 24h (Chen et al., 2011, Mishra et al., 2016, Ikeda et al., 2004). Da in MCF-7 Zellen zu einem frühen Zeitpunkt die Bildung von ROS beobachtet wurde (Ren et al., 2015) erfolgte ein ähnliches Versuchsprotokoll. Nach vierstündiger Inkubation mit Dammarenolsäure konnte in beiden Zelllinien nur eine sehr geringe Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beobachtet werden. Erst bezogen auf die Viabilität wurden unter 15µM ein 1,5-facher Anstieg an ROS in den Hct-116 Zellen und ein 2,5-facher Anstieg in den MCF-7 Zellen induziert (siehe Abb.20). Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für das tetrazyklische Curcubitacin B beschrieben. Eine 2-stündige Inkubation mit dieser Substanz induzierte einen etwa 1,7-fachen Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen (Ren et al., 2015). In der Darmkrebszelllinie SW480 gelang es mittels 24-stündiger Curcubitacin B-Inkubation einen etwa 3-fachen Akkumulation von ROS zu induzieren (Yasuda et al., 2010). Die hier vorgelegten Befunde legen nahe, dass Dammarenolsäure eine ROS-Induktion hervorruft. Da dieser Effekt jedoch sehr gering ausgeprägt war, ist wenig wahrscheinlich, dass die hier beschriebenen zytotoxischen bzw. Apoptose-induzierenden Effekte von Dammarenolsäure über die Bildung von ROS vermittelt werden.

4.4. Modulation der MAPK durch Dammarenolsäure

Mitglieder der MAP Kinasen Familie sind für die Weiterleitung von Wachstums- und Differenzierungssignalen relevant aber auch in die Regulation zellulärer Entzündungsreaktionen oder die Induktion des programmierten Zelltodes involviert (Schaeffer and Weber, 1999, Pearson et al., 2001). Vor diesem Hintergrund wurde überprüft, ob Dammarenolsäure Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK-, p38- und JNK hat, um erste Hinweise auf Signalwege zu erhalten, die möglicherweise an der Vermittlung der toxischen Effekte von Dammarenolsäure beteiligt sind.

Die hier ausgeführten Untersuchungen belegen, dass es in beiden Zelllinien unter Inkubation mit Dammarenolsäure zu einer Abnahme der ERK-Phosphorylierung und in

Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu einer nahezu vollständigen Blockierung des Erk-Signals kommt (siehe Abb.16). Erk-Typ MAP Kinasen sind wesentlich für die Übertragung von Wachstumssignalen und anti-apoptotischen Effekten (Schaeffer and Weber, 1999). Es ist daher denkbar, dass durch die Blockade ihrer Aktivierung in den betroffenen Zellpopulationen das Gleichgewicht zugunsten pro-apoptotischer Signale verschoben wird.

Bereits nach 30-minütiger Inkubation war für die p38 eine dosisabhängige Zunahme der Phosphorylierung in beiden Zelllinien zu beobachten (siehe Abb.17). Die Gesamtmenge der p38 wurde analog zur ERK nicht beeinflusst. Ein Effekt auf die pJNK konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb.18). Damit konnte erstmalig belegt werden, dass Dammarenolsäure Einfluss auf die Aktivierung bestimmter Mitglieder der MAPK-Familie hat. Zahlreiche Arbeiten belegen auch für andere Triterpene einen Einfluss auf diese Signalmoleküle. Durch Konopleva et al. wurde in Leukämiezelllinien eine Abnahme der ERK- und eine Zunahme der p38-Phosphorylierung nach 3-stündiger Inkubation mit dem Triterpenoid CDDO-Me beobachtet (Konopleva et al., 2005). Die Apoptose in MCF-7 Zellen durch die Asiatsäure wird zu einem frühen Zeitpunkt durch eine Aktivierung von p38 und nicht durch JNK induziert, so dass die Aktivierung der p38 möglicherweise auch für die Apoptose-induzierende Wirkung von Dammarenolsäure verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den hier für die Dammarenolsäure beschriebenen Effekten nimmt jedoch die ERK-Phosphorylierung unter Behandlung von MCF-7 Zellen durch Asiatsäure zu (Hsu et al., 2005). In einer anderen Brustkrebszelllinie, MDA-MB 468, konnte das tetrazyklische Curcubitacin E nach 24 Stunden eine Abnahme der pERK, bei Zunahme der pJNK bewirken (Kong et al., 2014). Weitere vorangegangene Arbeiten belegen Modifikationen der MAPK u.a. für die Betulinsäure, Celastrol, Lupeol und die Ursolsäure (Tan et al., 2003, Chen et al., 2011, Kannaiyan et al., 2011, Fulda and Kroemer, 2009, Saleem et al., 2005, Li et al., 2014, Wu et al., 2016).

4.5. Sensitivierung von Krebszellen durch Dammarenolsäure

4.5.1. Sensitivierung gegenüber TRAIL

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Dammarenolsäure Krebszellen gegenüber TRAIL und Doxorubicin sensitivieren kann. TRAIL wirkt auf diverse Tumorzelllinien toxisch, ohne dass es eine Wirkung auf die meisten gesunden Zellen ausübt und ist damit eine interessante potenzielle Substanz für die Tumorthherapie. Da

jedoch einige Zelllinien resistent sind und u.a. hepatotoxische Effekte beobachtet wurden, sind die Möglichkeiten einer alleinigen Chemotherapie mit TRAIL limitiert (Ashkenazi et al., 1999, Kruyt, 2008, Jo et al., 2000, Nitsch et al., 2000, Zhang and Fang, 2005). Auch die, in dieser Arbeit verwendete Zelllinie MCF-7 weist eine Resistenz auf (Sanlioglu et al., 2005, Ashkenazi et al., 1999). Einige Autoren konnten bereits durch Koinkubationen mit anderen Substanzen eine Sensitivierung gegenüber TRAIL erzielen, die eine Dosisreduktion bzw. eine Therapie überhaupt erst möglich macht (Johnstone et al., 2008, Cui et al., 2009, Hyer et al., 2005, Lacour et al., 2001). Daher wurde geprüft, ob auch die Dammarensäure eine Sensitivierung der in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien gegenüber TRAIL bewirken kann.

Im Anschluss an eine vierstündige Vorinkubation mit kaum toxischen Konzentrationen an Dammarensäure folgte eine Koinkubation mit verschiedenen Dosierungen an TRAIL (siehe Abb.21). Hct-116 Zellen reagieren sensitiv auf TRAIL. In etwa übereinstimmend mit vorangegangenen Arbeiten anderer konnte mit der hier höchsten eingesetzten Konzentration von 25ng/ml TRAIL eine Toxizität von maximal 50 % erzielt werden (Özören and El-Deiry, 2002). Unter der Koinkubation war durch zusätzliche Gabe von Dammarensäure in beiden verwendeten Konzentrationen (2,5 μ M und 5 μ M) eine deutliche Steigerung der Wirkung von TRAIL zu beobachten. Somit scheint eine Sensitivierung der Darmkrebszelllinie durch Dammarensäure gegenüber TRAIL möglich.

Aufgrund der vorbeschriebenen Resistenz wurden in den MCF-7 Zellen dreifach höhere Konzentrationen an TRAIL verwendet. Selbst unter 75 ng/ml waren noch mehr als 70% viable Zellen nachweisbar (siehe Abb.22). Dies entspricht in etwa den in der Literatur beschriebenen Werten (Ashkenazi et al., 1999, Hyer et al., 2005). Nach entsprechender Koinkubation mit Dammarensäure wurde eine deutliche Toxizitätssteigerung unter der höheren Konzentration von 5 μ M beobachtet. Im Versuch mit 2,5 μ M Dammarensäure hingegen war kein zusätzlicher Effekt im Vergleich zur Einzelinkubation mit TRAIL zu verzeichnen. Somit wäre denkbar, dass bei den MCF-7 Zellen eine gewisse Vorschädigung induziert werden muss, um eine Sensitivierung gegenüber TRAIL zu erreichen, da in dieser Versuchsreihe für die Einzelinkubationen mit 2,5 μ M Dammarensäure eine etwa 80 %-ige und für 5 μ M eine etwa 60 %-ige Viabilität gemessen wurde. Zur weiteren Charakterisierung dieser Wirkung erfolgte ergänzend die Messung der Effektorcaspasen in den MCF-7 Zellen. Hierbei konnte eine dosisabhängige Aktivierung der Caspasen 3/7 identifiziert werden (siehe Abb.22). Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine

Sensitivierung der Krebszelllinien Hct-116 und MCF-7 gegenüber TRAIL durch eine Koinkubation mit Dammarenolsäure.

Ähnliche Effekte wurden bereits für andere Triterpene beschrieben. Verschiedene Mechanismen können einer TRAIL-Resistenz zu Grunde liegen. So vermitteln eine verringerte Expression der proapoptotischen TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5, aber auch erhöhte Spiegel des antiapoptotischen FLIP, welches mit der Caspase 8 am DISC konkurriert, eine Resistenz (Kim et al., 2002, Kruyt, 2008, Zhang and Fang, 2005). Ferner lassen sich zwei Zelltypen in der TRAIL-Signaltransduktion unterscheiden. Typ II Zellen weisen nur eine geringe DISC-Bildung auf und benötigen zur ausreichenden Caspaseaktivierung eine Induktion des mitochondrialen Signalweges (Scaffidi et al., 1998). Fulda et al. gelang es, Neuroblastom- Glioblastom,- Medulloblastom,- und Melanomzellen durch eine Koinkubation mit der, über den mitochondrialen Weg wirkenden, Betulinsäure gegenüber TRAIL zu sensitivieren. Hierbei konnte unter der Inkubation mit dem Triterpen eine verstärkte Expression von DR4 und DR5 identifiziert werden (Fulda et al., 2004). Für die Ursolsäure ist ebenfalls eine Hochregulation von DR5 beschrieben, u.a. in Hct-116 und MCF-7 Zellen. Ebenso konnte eine Sensitivierung von Prostatakarzinomzellen gegenüber TRAIL belegt werden (Shin and Park, 2013). Darüber hinaus sind für weitere Triterpene/Triterpenoide wie das Lupeol, Celastrol und CDDO, ein synthetisches Derivat der Oleanolsäure, TRAIL-sensitivierende Eigenschaften in Pankreaskarzinomzellen, Darmkrebs- und Brustkrebszellen beschrieben. Diese beruhen auf einer verminderten FLIP-Expression bzw. ebenfalls einer Hochregulation der proapoptotischen Rezeptoren. Durch kombinierte Gabe dieser Substanzen mit TRAIL konnte ein Wachstum der entsprechenden Xenograft- Tumoren im Mausmodell vermindert werden (Murtaza et al., 2009, Hyer et al., 2005, Zhu et al., 2010). Daher sollten entsprechende Zielmoleküle auch für die Dammarenolsäure untersucht werden, da TRAIL und TRAIL-Kombinationstherapien bereits in ersten Phase I und II Studien getestet wurden (Johnstone et al., 2008, Dimberg et al., 2013, Younes et al., 2010, Lim et al., 2015, Leng et al., 2017).

4.5.2. Sensitivierung gegenüber Doxorubicin

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, ob die Dammarenolsäure Krebszellen gegenüber Doxorubicin sensitivieren kann, da Anthrazykline eine wichtige Rolle u.a. in der Behandlung des Mammakarzinoms spielen. Vor allem kardiotoxische Nebenwirkungen limitieren eine Chemotherapie mit dieser Substanzklasse (Lefrak et al., 1973, Carvalho et al., 2009). Eine Möglichkeit, Nebenwirkungen zu minimieren, ist eine Dosisreduktion

durch Sensitivierung von Zielzellen. Da bereits für strukturverwandte Naturstoffe solche Effekte nachgewiesen werden konnten (Fulda and Debatin, 2005, Villar et al., 2014), wurde nun auch Dammarenolsäure als *Sensitizer* getestet.

Nach Toxizitätstestung wurden für die Hct-116 Doxorubicinkonzentrationen bis $3\mu\text{M}$ verwendet. Im Anschluss an eine 3-stündige Vorinkubation mit dem Anthrazyklin erfolgte nach dem Mediumwechsel eine 24-stündige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Dammarenolsäure. Hierbei konnte durch $6,25\mu\text{M}$ Dammarenolsäure eine deutliche Toxizitätssteigerung im Vergleich zu den Einzelinkubationen beobachtet werden (siehe Abb.23). Ähnlich wie zuvor beschrieben, scheint jedoch zur Sensitivierung eine gewisse Eigentoxizität notwendig zu sein, da unter der geringeren Dosis der Dammarenolsäure keine Sensitivierung festzustellen war.

In den MCF-7 wurde nach Toxizitätstestung eine höhere Dosis an Doxorubin verwendet. Mit etwa knapp 80 % ($4,5\mu\text{M}$), respektive etwa 60 % ($7\mu\text{M}$) viablen Zellen unter den verwendeten Konzentrationen an Dammarenolsäure konnte bereits unter der geringeren Dammarenolsäuredosis eine deutliche Toxizitätssteigerung durch die Vorinkubation beobachtet werden. Die parallel durchgeführte Messung der Caspase 3/7-Aktivität lässt eine Sensitivierung und einen apoptotischen Zelltod vermuten, dies lässt sich vor allem an den Koinkubationen mit 4 und $6\mu\text{M}$ Doxorubicin ablesen, die in der jeweiligen Einzelinkubation keinen Anstieg der Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle aufweisen (siehe Abb. 24).

Die hier vorgelegten Daten legen nahe, dass Dammarenolsäure die Darmkrebszelllinie Hct-116, als auch die Brustkrebszelllinie MCF-7 gegenüber TRAIL und Doxorubicin sensitiviert. Die gesteigerte Toxizität durch Vor- bzw. Koinkubation wird vermutlich durch einen apoptotischen Zelltod vermittelt. Vergleichbare Daten konnten für Doxorubicin bereits durch Villar et al erhoben werden, die Oleanolsäure, Maslinsäure und Ursolsäure als *Sensitizer* für Doxorubicin in Sarkomzelllinien identifizierten (Villar et al., 2014, Villar et al., 2016). Ebenso beruht die gesteigerte Toxizität durch eine Koinkubation von Betulinsäure und Doxorubicin in Neuroblastom- und Medulloblastomzellen auf einem apoptotischen Zelltod (Fulda and Debatin, 2005). Auch in Zellen des Magenkarzinoms und des hepatozellulären Karzinoms konnten die Pomolsäure bzw. ein Ginsenosid, ein triterpenes Saponin, Sensitivierungen gegenüber Doxorubicin induzieren (Kim et al., 2014, Fu et al., 2017).

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die hier zusammengefassten Befunde legen nahe, dass Dammarenolsäure ein vielversprechender triterpener Naturstoff mit zytotoxischer Wirkung auf Tumorzellpopulationen ist, dessen weitere Charakterisierung erfolgen sollte. Dies insbesondere, da bisherige Daten ein breites zytotoxisches Potenzial von Triterpenen nahelegen, *in vivo* Versuche in Mäusen ein relativ geringes Nebenwirkungsspektrum annehmen lassen und bereits erste Phase I und II Studien durchgeführt wurden (Shanmugam et al., 2014, Speranza et al., 2012, Hong et al., 2012, Song et al., 2006, Smith et al., 2007, Zhu et al., 2013). In weiteren Versuchen sollte die Bindungsaffinität gegenüber Albumin und eine mögliche Beeinflussung des Insulinsignalweges geprüft werden. Ferner ist eine detaillierte Untersuchung der Interaktion von Dammarenolsäure mit dem Apoptosesignalweg notwendig, um verantwortliche Wirkmechanismen besser zu verstehen, über die die Effekte von Dammarenolsäure vermittelt werden. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Dammarenolsäure auf zwei verschiedene Zelllinien geprüft, es ist jedoch interessant, wie die Substanz auf andere Zelllinien wirkt und ob auch ein zytotoxischer Effekt in normalem Gewebe bzw. nicht tumorösen Zellen nachgewiesen werden kann bzw. ob die Substanz krebsspezifisch wirkt.

5. Literaturverzeichnis

- ADAMS, J. & CORY, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26, 1324-1337.
- AISHA, A. F. A., ABU-SALAH, K. M., ISMAIL, Z. & MAJID, A. M. S. A. 2012. α -Mangostin Enhances Betulinic Acid Cytotoxicity and Inhibits Cisplatin Cytotoxicity on HCT 116 Colorectal Carcinoma Cells. *Molecules*, 17, 2939.
- ALABASTER, O., VONDERHAAR, B. K. & SHAFIE, S. M. 1981. Metabolic modification by insulin enhances methotrexate cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 17, 1223-1228.
- ALLOUCHE, Y., WARLETA, F., CAMPOS, M. A., SÁNCHEZ-QUESADA, C., UCEDA, M., BELTRÁN, G. & GAFORIO, J. J. 2010. 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*, 59, 121-130.
- ARIGONI, D., BARTON, D. H. R., BERNASCONI, R., DJERASSI, C., MILLS, J. S. & WOLFF, R. E. 1960. 379. The constitutions of dammarenolic and nycanthic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1900-1905.
- ASHKENAZI, A. 2015. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. *The Journal of Clinical Investigation*, 125, 487-489.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305.
- ASHKENAZI, A., PAI, R. C., FONG, S., LEUNG, S., LAWRENCE, D. A., MARSTERS, S. A., BLACKIE, C., CHANG, L., MCMURTREY, A. E. & HEBERT, A. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of clinical investigation*, 104, 155-162.
- AYYANAR, M. & IGNACIMUTHU, S. 2005. Traditional knowledge of Kani tribals in Kouthalai of Tirunelveli hills, Tamil Nadu, India. *J Ethnopharmacol*, 102, 246-55.
- BATIST, G., RAMAKRISHNAN, G., RAO, C. S., CHANDRASEKHARAN, A., GUTHEIL, J., GUTHRIE, T., SHAH, P., KHOJASTEH, A., NAIR, M. K. & HOELZER, K. 2001. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 19, 1444-1454.
- BHANDARY, M. J. C., K R 2011. Herbal therapy for herpes in the ethno-medicine of Coastal Karnataka. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 10, pp.528-532.
- BHATTACHARYYA, N. P., SKANDALIS, A., GANESH, A., GRODEN, J. & MEUTH, M. 1994. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 6319-6323.
- BOATRIGT, K. M. & SALVESEN, G. S. Caspase activation. Biochemical Society Symposia, 2003. Portland Press Limited, 233-242.
- BOURDY, G., CABALION, P., AMADE, P. & LAURENT, D. 1992. Traditional remedies used in the western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *J Ethnopharmacol*, 36, 163-74.
- BOYD, D. D., LEVINE, A. E., BRATTAIN, D. E., MCKNIGHT, M. K. & BRATTAIN, M. G. 1988. Comparison of Growth Requirements of Two Human Intratumoral Colon Carcinoma Cell Lines in Monolayer and Soft Agarose. *Cancer Research*, 48, 2469-2474.
- BRATTAIN, M. G., FINE, W. D., KHALED, F. M., THOMPSON, J. & BRATTAIN, D. E. 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer research*, 41, 1751-1756.

- BROOKS, S. C., LOCKE, E. R. & SOULE, H. D. 1973. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem*, 248, 6251-3.
- BURDALL, S. E., HANBY, A. M., LANSDOWN, M. R. & SPEIRS, V. 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, 5, 89.
- CAI, X. H., WANG, Y. Y., ZHAO, P. J., LI, Y. & LUO, X. D. 2010. Dolabellane diterpenoids from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry*, 71, 1020-4.
- CARVALHO, C., SANTOS, R. X., CARDOSO, S., CORREIA, S., OLIVEIRA, P. J., SANTOS, M. S. & MOREIRA, P. I. 2009. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current medicinal chemistry*, 16, 3267-3285.
- CASTELLANO, J. M., GUINDA, A., DELGADO, T., RADA, M. & CAYUELA, J. A. 2013. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*, 62, 1791-1799.
- CAUNT, C. J., SALE, M. J., SMITH, P. D. & COOK, S. J. 2015. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nature reviews Cancer*, 15, 577-592.
- CÉSPEDES, M. V., ESPINA, C., GARCÍA-CABEZAS, M. A., TRIAS, M., BOLUDA, A., GÓMEZ DEL PULGAR, M. T., SANCHO, F. J., NISTAL, M., LACAL, J. C. & MANGUES, R. 2007. Orthotopic Microinjection of Human Colon Cancer Cells in Nude Mice Induces Tumor Foci in All Clinically Relevant Metastatic Sites. *The American Journal of Pathology*, 170, 1077-1085.
- CHÁIREZ-RAMÍREZ, M. H., MORENO-JIMÉNEZ, M. R., GONZÁLEZ-LAREDO, R. F., GALLEGOS-INFANTE, J. A. & ROCHA-GUZMÁN, N. E. 2016. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. *EXCLI Journal*, 15, 758-771.
- CHEN, G., ZHANG, X., ZHAO, M., WANG, Y., CHENG, X., WANG, D., XU, Y., DU, Z. & YU, X. 2011. Celastrol targets mitochondrial respiratory chain complex I to induce reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in tumor cells. *BMC cancer*, 11, 170.
- CHIN, Y. W., BALUNAS, M. J., CHAI, H. B. & KINGHORN, A. D. 2006. Drug discovery from natural sources. *AAPS J*, 8, E239-53.
- CHIPUK, J., BOUCHIER-HAYES, L. & GREEN, D. 2006. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death & Differentiation*, 13, 1396-1402.
- CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*, 100, 72-9.
- CUI, D., HUANG, Y., MAO, S., CHEN, S., QIU, M., JI, L. & YI, C. 2009. Synergistic antitumor effect of TRAIL and adriamycin on the human breast cancer cell line MCF-7. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42, 854-862.
- DAMLE, A., PAWAR, Y. & NARKAR, A. 2013. Anticancer activity of betulinic acid on MCF-7 tumors in nude mice. *Indian journal of experimental biology*, 51, 485.
- DEVARAJAN, E., SAHIN, A. A., CHEN, J. S., KRISHNAMURTHY, R. R., AGGARWAL, N., BRUN, A. M., SAPINO, A., ZHANG, F., SHARMA, D., YANG, X. H., TORA, A. D. & MEHTA, K. 2002. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, 21, 8843-51.
- DHILLON, A. S., HAGAN, S., RATH, O. & KOLCH, W. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26, 3279-3290.
- DIMBERG, L. Y., ANDERSON, C. K., CAMIDGE, R., BEHBAKHT, K., THORBURN, A. & FORD, H. L. 2013. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene*, 32, 1341.
- DONG, Y., LU, B., ZHANG, X., ZHANG, J., LAI, L., LI, D., WU, Y., SONG, Y., LUO, J., PANG, X., YI, Z. & LIU, M. 2010. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes

- compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. *Carcinogenesis*, 31, 2097-104.
- DREYER, M., NUGROHO, B. W., BOHNENSTENGEL, F. I., EBEL, R., WRAY, V., WITTE, L., BRINGMANN, G., MUHLBACHER, J., HEROLD, M., HUNG, P. D., KIET, L. C. & PROKSCH, P. 2001. New insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia oligophylla*. *J Nat Prod*, 64, 415-20.
- EBADA, S. S., LAJKIEWICZ, N., PORCO, J. A., LI-WEBER, M. & PROKSCH, P. 2011. Chemistry and Biology of Rocaglamides (= Flavaglines) and Related Derivatives from *Aglaia* Species (Meliaceae). *Progress in the chemistry of organic natural products*, 94, 1-58.
- ECK, G. 2004. *Triterpene aus Arten der Gattung Aglaia (Meliaceae)*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- EDINGER, A. L. & THOMPSON, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*, 16, 663-669.
- ESIMONE, C. O., ECK, G., DUONG, T. N., UBERLA, K., PROKSCH, P. & GRUNWALD, T. 2008. Potential anti-respiratory syncytial virus lead compounds from *Aglaia* species. *Pharmazie*, 63, 768-73.
- ESIMONE, C. O., ECK, G., NWORU, C. S., HOFFMANN, D., UBERLA, K. & PROKSCH, P. 2010. Dammarenolic acid, a secodammarane triterpenoid from *Aglaia* sp. shows potent anti-retroviral activity in vitro. *Phytomedicine*, 17, 540-7.
- FALSCHLEHNER, C., EMMERICH, C. H., GERLACH, B. & WALCZAK, H. 2007. TRAIL signalling: decisions between life and death. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39, 1462-1475.
- FAYSAL, M. 2008. Justification of use of some Medicinal Plants to Treat Various Diseases in Khulna, Bangladesh. *Ethnobotanical Leaflets*, 2008, 165.
- FENG, L., ZHANG, D., FAN, C., MA, C., YANG, W., MENG, Y., WU, W., GUAN, S., JIANG, B. & YANG, M. 2013. ER stress-mediated apoptosis induced by celastrol in cancer cells and important role of glycogen synthase kinase-3 β in the signal network. *Cell death & disease*, 4, e715.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D. & BRAY, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, E359-E386.
- FINK, S. L. & COOKSON, B. T. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73, 1907-1916.
- FOO, R. S.-Y., MANI, K. & KITSIS, R. N. 2005. Death begets failure in the heart. *The Journal of clinical investigation*, 115, 565-571.
- FRUEHAUF, J. P. & MEYSKENS, F. L. 2007. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical Cancer Research*, 13, 789-794.
- FU, Y., ZHAO, J., PARK, J., BAEK, N. & CHOI, G. 2017. Synergistic Effect of Pomolic Acid Inducing Apoptosis on Doxorubicin-Resistant Human Gastric Carcinoma Cells. *J Oncol Res Ther*, 2017, J119.
- FULDA, S. 2015. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39, 20-25.
- FULDA, S. & DEBATIN, K.-M. 2005. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid. *Neoplasia*, 7, 162-170.
- FULDA, S. & DEBATIN, K. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25, 4798-4811.
- FULDA, S., JEREMIAS, I. & DEBATIN, K.-M. 2004. Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells. *Oncogene*, 23, 7611.

- FULDA, S., JEREMIAS, I., STEINER, H. H., PIETSCH, T. & DEBATIN, K. M. 1999. Betulinic acid: A new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *International journal of cancer*, 82, 435-441.
- FULDA, S. & KROEMER, G. 2009. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug discovery today*, 14, 885-890.
- GARRINGTON, T. P. & JOHNSON, G. L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current opinion in cell biology*, 11, 211-218.
- GEWIRTZ, D. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*, 57, 727-741.
- GOLDAR, S., KHANIANI, M. S., DERAKHSHAN, S. M. & BARADARAN, B. 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 2129-2144.
- GUPTA, V. 2006. Plants used in folklore medicine by Bangnis of East Kameng, Arunachal Pradesh. *Natural Product Radiance*, 5 (1).
- HÄUSSINGER, D. & GÖRG, B. 2010. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Current opinion in clinical nutrition & metabolic care*, 13, 87-92.
- HE, Y., LIU, F., ZHANG, L., WU, Y., HU, B., ZHANG, Y., LI, Y. & LIU, H. 2011. Growth inhibition and apoptosis induced by lupeol, a dietary triterpene, in human hepatocellular carcinoma cells. *Biol Pharm Bull*, 34, 517-22.
- HILL, R. A. & CONNOLLY, J. D. 2015. Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 32, 273-327.
- HONG, D. S., KURZROCK, R., SUPKO, J. G., HE, X., NAING, A., WHELER, J., LAWRENCE, D., EDER, J. P., MEYER, C. J., FERGUSON, D. A., MIER, J., KONOPLEVA, M., KONOPLEV, S., ANDREEFF, M., KUFE, D., LAZARUS, H., SHAPIRO, G. I. & DEZUBE, B. J. 2012. A Phase I First-in-Human Trial of Bardoxolone Methyl in Patients with Advanced Solid Tumors and Lymphomas. *Clinical Cancer Research*, 18, 3396-3406.
- HSU, Y.-L., KUO, P.-L., LIN, L.-T. & LIN, C.-C. 2005. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313, 333-344.
- HU, X., WANG, S., XU, J., WANG, D.-B., CHEN, Y. & YANG, G.-Z. 2014. Triterpenoid saponins from *Stauntonia chinensis* ameliorate insulin resistance via the AMP-activated protein kinase and IR/IRS-1/PI3K/Akt pathways in insulin-resistant HepG2 cells. *International journal of molecular sciences*, 15, 10446-10458.
- HYER, M. L., CROXTON, R., KRAJEWSKA, M., KRAJEWSKI, S., KRESS, C. L., LU, M., SUH, N., SPORN, M. B., CRYNS, V. L. & ZAPATA, J. M. 2005. Synthetic triterpenoids cooperate with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to induce apoptosis of breast cancer cells. *Cancer research*, 65, 4799-4808.
- ICHIJO, H. 1999. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene*, 18, 6087.
- IKEDA, T., NAKATA, Y., KIMURA, F., SATO, K., ANDERSON, K., MOTOYOSHI, K., SPORN, M. & KUFE, D. 2004. Induction of redox imbalance and apoptosis in multiple myeloma cells by the novel triterpenoid 2-cyano-3, 12-dioxoolean-1, 9-dien-28-oic acid. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3, 39-45.
- JACOBSON, M. D., WEIL, M. & RAFF, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-354.
- JANAKI, S., VIJAYASEKARAN, S. & RAO, R. B. 1998. PHARMACOLOGICAL INVESTIGATIONS ON AGLAIA ROXBURGHIANA (W. & A) MIQ. VAR. BEDDOMEI LEAVES. *Ancient Science of Life*, 18, 52-57.

- JÄNICKE, R. U., SPRENGART, M. L., WATI, M. R. & PORTER, A. G. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 9357-9360.
- JAYAKUMAR G, A. M. D., SREEDEVI S, VISWANATHAN P K, REMESHKUMAR B 2010. Ethnobotanical survey of the plants used in the treatment of diabetes *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 9, 100-104.
- JO, M., KIM, T.-H., SEOL, D.-W., ESPLIN, J. E., DORKO, K., BILLIAR, T. R. & STROM, S. C. 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nature medicine*, 6, 564-567.
- JOHNSTONE, R. W., FREW, A. J. & SMYTH, M. J. 2008. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8, 782-798.
- JUNG, S. H., HA, Y. J., SHIM, E. K., CHOI, S. Y., JIN, J. L., YUN-CHOI, H. S. & LEE, J. R. 2007. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator. *Biochemical Journal*, 403, 243-250.
- KANNAIYAN, R., MANU, K. A., CHEN, L., LI, F., RAJENDRAN, P., SUBRAMANIAM, A., LAM, P., KUMAR, A. P. & SETHI, G. 2011. Celastrol inhibits tumor cell proliferation and promotes apoptosis through the activation of c-Jun N-terminal kinase and suppression of PI3 K/Akt signaling pathways. *Apoptosis*, 16, 1028-1041.
- KEANE, M. M., ETTENBERG, S. A., NAU, M. M., RUSSELL, E. K. & LIPKOWITZ, S. 1999. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer research*, 59, 734-741.
- KELLEY, S. K., HARRIS, L. A., XIE, D., DEFORGE, L., TOTPAL, K., BUSSIÈRE, J. & FOX, J. A. 2001. Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299, 31-38.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26, 239.
- KHARE, C. P. 2008. *Indian medicinal plants: an illustrated dictionary*, Springer Science & Business Media.
- KIM, D.-G., JUNG, K. H., LEE, D.-G., YOON, J.-H., CHOI, K. S., KWON, S. W., SHEN, H.-M., MORGAN, M. J., HONG, S.-S. & KIM, Y.-S. 2014. 20 (S)-Ginsenoside Rg3 is a novel inhibitor of autophagy and sensitizes hepatocellular carcinoma to doxorubicin. *Oncotarget*, 5, 4438.
- KIM, K., FISHER, M. J., XU, S.-Q. & EL-DEIRY, W. S. 2000. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 6, 335-346.
- KIM, Y., SUH, N., SPORN, M. & REED, J. C. 2002. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 22320-22329.
- KINGHORN, A. D., CARCACHE DE BLANCO, E. J., LUCAS, D. M., RAKOTONDRAIBE, H. L., ORJALA, J., SOEJARTO, D. D., OBERLIES, N. H., PEARCE, C. J., WANI, M. C., STOCKWELL, B. R., BURDETTE, J. E., SWANSON, S. M., FUCHS, J. R., PHELPS, M. A., XU, L., ZHANG, X. & SHEN, Y. Y. 2016. Discovery of Anticancer Agents of Diverse Natural Origin. *Anticancer research*, 36, 5623-5637.
- KOCH, M., KEHOP, D. A., KINMINJA, B., SABAK, M., WAVIMBUKIE, G., BARROWS, K. M., MATAINAHO, T. K., BARROWS, L. R. & RAI, P. P. 2015.

- An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the East Sepik province of Papua New Guinea. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11, 79.
- KOFF, J. L., RAMACHANDIRAN, S. & BERNAL-MIZRACHI, L. 2015. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*, 16, 2942-2955.
- KONG, Y., CHEN, J., ZHOU, Z., XIA, H., QIU, M.-H. & CHEN, C. 2014. Cucurbitacin E Induces Cell Cycle G2/M Phase Arrest and Apoptosis in Triple Negative Breast Cancer. *PLoS ONE*, 9.
- KONOPLEVA, M., CONTRACTOR, R., KURINNA, S. M., CHEN, W., ANDREEFF, M. & RUVOLO, P. P. 2005. The novel triterpenoid CDDO-Me suppresses MAPK pathways and promotes p38 activation in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 19, 1350-1354.
- KOUL, N., SHARMA, V., DIXIT, D., GHOSH, S. & SEN, E. 2010. Bicyclic triterpenoid Iripallidal induces apoptosis and inhibits Akt/mTOR pathway in glioma cells. *BMC cancer*, 10, 328.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87, 99-163.
- KRUYT, F. A. 2008. TRAIL and cancer therapy. *Cancer letters*, 263, 14-25.
- KUMAR, S., SAINI, M., KUMAR, V., PRAKASH, O., ARYA, R., RANA, M. & KUMAR, D. 2012. Traditional medicinal plants curing diabetes: A promise for today and tomorrow. *Asian J Tradit Med*, 7, 178-188.
- LACOUR, S., HAMMANN, A., WOTAWA, A., CORCOS, L., SOLARY, E. & DIMANCHE-BOITREL, M.-T. 2001. Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Research*, 61, 1645-1651.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- LASZCZYK, M. N. 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med*, 75, 1549-60.
- LAVRIK, I., GOLKS, A. & KRAMMER, P. H. 2005. Death receptor signaling. *Journal of cell science*, 118, 265-267.
- LAWEN, A. 2003. Apoptosis—an introduction. *Bioessays*, 25, 888-896.
- LEE, A. V., OESTERREICH, S. & DAVIDSON, N. E. 2015. MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107, djv073-djv073.
- LEFRAK, E. A., PÍTHA, J., ROSENHEIM, S. & GOTTLIEB, J. A. 1973. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, 32, 302-314.
- LENG, Y., HOU, J., JIN, J., ZHANG, M., KE, X., JIANG, B., PAN, L., YANG, L., ZHOU, F., WANG, J., WANG, Z., LIU, L., LI, W., SHEN, Z., QIU, L., CHANG, N., LI, J., LIU, J., PANG, H., MENG, H., WEI, P., JIANG, H., LIU, Y., ZHENG, X., YANG, S. & CHEN, W. 2017. Circularly permuted TRAIL plus thalidomide and dexamethasone versus thalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma: a phase 2 study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79, 1141-1149.
- LI, J., LIANG, X. & YANG, X. 2012. Ursolic acid inhibits growth and induces apoptosis in gemcitabine-resistant human pancreatic cancer via the JNK and PI3K/Akt/NF- κ B pathways. *Oncology reports*, 28, 501-510.
- LI, Y., LU, X., QI, H., LI, X., XIAO, X. & GAO, J. 2014. Ursolic Acid Induces Apoptosis Through Mitochondrial Intrinsic Pathway and Suppression of ERK1/2 MAPK in HeLa Cells. *J Pharmacol Sci*, 125, 202-210.
- LIEVRE, A., BACHET, J.-B., LE CORRE, D., BOIGE, V., LANDI, B., EMILE, J.-F., CÔTÉ, J.-F., TOMASIC, G., PENNA, C. & DUCREUX, M. 2006. KRAS mutation

- status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer research*, 66, 3992-3995.
- LIM, B., ALLEN, J. E., PRABHU, V. V., TALEKAR, M. K., FINNBERG, N. K. & EL-DEIRY, W. S. 2015. Targeting TRAIL in the treatment of cancer: new developments. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19, 1171-1185.
- LIN, Y., LI, Y., SONG, Z.-G., ZHU, H. & JIN, Y.-H. 2016. The interaction of serum albumin with ginsenoside Rh2 resulted in the downregulation of ginsenoside Rh2 cytotoxicity. *Journal of Ginseng Research*.
- LIPUN, V., KUROKAWA, M., SUTTISRI, R., TAWEECHOTIPATR, P., PRAMYOTHIN, P., HATTORI, M. & SHIRAKI, K. 2003. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res*, 60, 175-80.
- LIPPMAN, M., BOLAN, G. & HUFF, K. 1976. The Effects of Androgens and Antiandrogens on Hormone-responsive Human Breast Cancer in Long-Term Tissue Culture. *Cancer Research*, 36, 4610-4618.
- LOPEZ, J. & TAIT, S. W. G. 2015. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*, 112, 957-962.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- LU, Z. & XU, S. 2006. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life*, 58, 621-631.
- MAJNO, G. & JORIS, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, 146, 3.
- MALVEZZI, M., BERTUCCIO, P., ROSSO, T., ROTA, M., LEVI, F., LA VECCHIA, C. & NEGRI, E. 2015. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Annals of Oncology*, 26, 779-786.
- MAN, S. M. & KANNEGANTI, T.-D. 2016. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16, 7-21.
- MARTIN, S., REUTELINGSPERGER, C. P., MCGAHON, A. J. & RADER, J. A. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidyserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl.
- MCCLATCHEY, W. 1996. The ethnopharmacopoeia of Rotuma. *J Ethnopharmacol*, 50, 147-56.
- MI, Q., SU, B. N., CHAI, H., CORDELL, G. A., FARNSWORTH, N. R., KINGHORN, A. D. & SWANSON, S. M. 2006. Rocaglaol induces apoptosis and cell cycle arrest in LNCaP cells. *Anticancer Res*, 26, 947-52.
- MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J., GOPINATHAN, V. & MILNER, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84, 407-412.
- MILLS, J. S. & WERNER, A. E. A. 1955. The chemistry of dammar resin. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3132-3140.
- MISHRA, T., ARYA, R. K., MEENA, S., JOSHI, P., PAL, M., MEENA, B., UPRETI, D. K., RANA, T. S. & DATTA, D. 2016. Isolation, Characterization and Anticancer Potential of Cytotoxic Triterpenes from *Betula utilis* Bark. *PLoS ONE*, 11, e0159430.
- MOLINA-BOLÍVAR, J., GALISTEO-GONZÁLEZ, F., RUIZ, C. C., MEDINA-O'DONNELL, M. & PARRA, A. 2015. Interaction between the anti-cancer drug

- diacetyl maslinic acid and bovine serum albumin: a biophysical study. *Journal of Molecular Liquids*, 208, 304-313.
- MOLINA-BOLÍVAR, J., GALISTEO-GONZÁLEZ, F., RUIZ, C. C., MEDINA-O, M. & PARRA, A. 2014. Spectroscopic investigation on the interaction of maslinic acid with bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, 156, 141-149.
- MONTILLA, M. P., AGIL, A., NAVARRO, M. C., JIMÉNEZ, M. I., GARCÍA-GRANADOS, A., PARRA, A. & CABO, M. M. 2003. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta medica*, 69, 472-474.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- MUELLNER, A. N., GREGER, H. & PANNELL, C. M. 2009. Genetic diversity and geographic structure in *Aglaia elaeagnoidea* (Meliaceae, Sapindales), a morphologically complex tree species, near the two extremes of its distribution. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 54, 207-216.
- MULLAUER, F. B., KESSLER, J. H. & MEDEMA, J. P. 2009. Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion. *Apoptosis*, 14, 191-202.
- MURTAZA, I., SALEEM, M., ADHAMI, V. M., HAFEEZ, B. B. & MUKHTAR, H. 2009. Suppression of cFLIP by lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells. *Cancer research*, 69, 1156-1165.
- NIRMALA, M. J., SAMUNDEESWARI, A. & SANKAR, P. D. 2011. Natural plant resources in anti-cancer therapy - a review. *Research in Plant Biology*, 1, 1-14.
- NITSCH, R., BECHMANN, I., DEISZ, R. A., HAAS, D., LEHMANN, T. N., WENDLING, U. & ZIPP, F. 2000. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Lancet*, 356, 827-828.
- NUGROHO, B. W., EDRADA, R. A., WRAY, V., WITTE, L., BRINGMANN, G., GEHLING, M., PROKSCH, P., NUGROHO, B. W., EDRADA, R. A., WRAY, V., WITTE, L., BRINGMANN, G., GEHLING, M. & PROKSCH, P. 1999. An insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry*, 51, 367-376.
- ÖZÖREN, N. & EL-DEIRY, W. S. 2002. Defining Characteristics of Types I and II Apoptotic Cells in Response to TRAIL. *Neoplasia*, 4, 551-557.
- PAN, G., O'ROURKE, K., CHINNAIYAN, A. M., GENTZ, R., EBNER, R., NI, J. & DIXIT, V. M. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 276, 111-113.
- PANNELL, C. M. R. B. G., KEW & PANNELL, C 1992. A taxonomic monograph of the genus *Aglaia* Lour. (Meliaceae). London: H.M.S.O.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B.-E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1. *Endocrine reviews*, 22, 153-183.
- PENG, W., DING, F., JIANG, Y.-T. & PENG, Y.-K. 2014. Bioavailability and activity of natural food additive triterpenoids as influenced by protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62, 2271-2283.
- PITTI, R. M., MARSTERS, S. A., RUPPERT, S., DONAHUE, C. J., MOORE, A. & ASHKENAZI, A. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 12687-12690.

- POEHLAND, B. L., CARTE, B. K., FRANCIS, T. A., HYLAND, L. J., ALLAUDEEN, H. S. & TROUPE, N. 1987. In vitro antiviral activity of dammar resin triterpenoids. *J Nat Prod*, 50, 706-13.
- POLLAK, M. 2008. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer*, 8, 915-928.
- PRASAD, P. R. C., REDDY, C. S., RAZA, S. H. & DUTT, C. B. S. 2008a. Folklore medicinal plants of North Andaman Islands, India. *Fitoterapia*, 79, 458-464.
- PRASAD, S., KALRA, N. & SHUKLA, Y. 2007. Induction of apoptosis by lupeol and mango extract in mouse prostate and LNCaP cells. *Nutrition and cancer*, 60, 120-130.
- PRASAD, S., KALRA, N., SINGH, M. & SHUKLA, Y. 2008b. Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Asian journal of andrology*, 10, 313-318.
- PRASAD, S., NIGAM, N., KALRA, N. & SHUKLA, Y. 2008c. Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 47, 916-924.
- PRASAD, S., YADAV, V. R., SUNG, B., REUTER, S., KANNAPPAN, R., DEORUKHKAR, A., DIAGARADJANE, P., WEI, C., BALADANDAYUTHAPANI, V. & KRISHNAN, S. 2012. Ursolic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in an orthotopic nude mouse model by targeting multiple cell signaling pathways: chemosensitization with capecitabine. *Clinical cancer research*, 18, 4942-4953.
- QI, M. & ELION, E. A. 2005. MAP kinase pathways. *J Cell Sci*, 118, 3569-3572.
- RADA, M., RUIZ-GUTIÉRREZ, V. & GUINDA, Á. 2011. Determination of triterpenic acids in human serum by high-performance liquid chromatography: triterpenoid interaction with serum protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 2308-2313.
- RAO, M. M., MESHULAM, H., ZELNIK, R. & LAVIE, D. 1975. *Cabralea eichleriana* dc. (meliaceae)—I structure and stereochemistry of wood extractives. *Tetrahedron*, 31, 333-339.
- RAY, P. D., HUANG, B.-W. & TSUJI, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24, 981-990.
- REN, G., SHA, T., GUO, J., LI, W., LU, J. & CHEN, X. 2015. Cucurbitacin B induces DNA damage and autophagy mediated by reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Natural Medicines*, 69, 522-530.
- REN, L., CAO, Q.-X., ZHAI, F.-R., YANG, S.-Q. & ZHANG, H.-X. 2016. Asiatic acid exerts anticancer potential in human ovarian cancer cells via suppression of PI3K/Akt/mTOR signalling. *Pharmaceutical biology*, 54, 2377-2382.
- RICE-EVANS, C. & MILLER, N. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. Portland Press Limited.
- RIEDL, S. J. & SHI, Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5, 897-907.
- RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., DUELLMAN, S., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J. & MINOR, L. 2016. Cell viability assays.
- RIVANKAR, S. 2014. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10, 853.
- RIVERO-CRUZ, J. F., CHAI, H. B., KARDONO, L. B., SETYOWATI, F. M., AFRIATINI, J. J., RISWAN, S., FARNSWORTH, N. R., CORDELL, G. A., PEZZUTO, J. M., SWANSON, S. M. & KINGHORN, A. D. 2004. Cytotoxic constituents of the twigs and leaves of *Aglaia rubiginosa*. *J Nat Prod*, 67, 343-7.

- ROSSOMANDO, A. J., PAYNE, D. M., WEBER, M. J. & STURGILL, T. W. 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6940-6943.
- SALEEM, M. 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters*, 285, 109-115.
- SALEEM, M., KAUR, S., KWEON, M. H., ADHAMI, V. M., AFAQ, F. & MUKHTAR, H. 2005. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. *Carcinogenesis*, 26, 1956-64.
- SAMUEL, A. J., KALUSALINGAM, A., CHELLAPPAN, D. K., GOPINATH, R., RADHAMANI, S., HUSAIN, H. A., MURUGANANDHAM, V. & PROMWICHIT, P. 2010. Ethnomedical survey of plants used by the Orang Asli in Kampung Bawong, Perak, West Malaysia. *J Ethnobiol Ethnomed*, 6, 5.
- SANLIOGLU, A. D., DIRICE, E., AYDIN, C., ERIN, N., KOKSOY, S. & SANLIOGLU, S. 2005. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. *BMC cancer*, 5, 54.
- SCAFFIDI, C., FULDA, S., SRINIVASAN, A., FRIESEN, C., LI, F., TOMASELLI, K. J., DEBATIN, K. M., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal*, 17, 1675-1687.
- SCHAEFFER, H. J. & WEBER, M. J. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology*, 19, 2435-2444.
- SCHMIDT, R. F., LANG, F. & THEWS, G. 2004. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Springer.
- SHANMUGAM, M. K., DAI, X., KUMAR, A. P., TAN, B. K., SETHI, G. & BISHAYEE, A. 2014. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence. *Cancer letters*, 346, 206-216.
- SHERIDAN, J. P., MARSTERS, S. A., PITTI, R. M., GURNEY, A., SKUBATCH, M., BALDWIN, D., RAMAKRISHNAN, L., GRAY, C. L., BAKER, K. & WOOD, W. I. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, 277, 818-821.
- SHI, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, 9, 459-470.
- SHIN, S. W. & PARK, J.-W. 2013. Ursolic acid sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833, 723-730.
- SIES, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition*, 25, 1058-1071.
- SIES, H., BERNDT, C. & JONES, D. P. 2017. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715-748.
- SMITH, D. A., DI, L. & KERNS, E. H. 2010. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 929-939.
- SMITH, P. F., OGUNDELE, A., FORREST, A., WILTON, J., SALZWEDEL, K., DOTO, J., ALLAWAY, G. P. & MARTIN, D. E. 2007. Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-o-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3574-81.
- SONG, M., HANG, T.-J., WANG, Y., JIANG, L., WU, X.-L., ZHANG, Z., SHEN, J. & ZHANG, Y. 2006. Determination of oleanolic acid in human plasma and study of

- its pharmacokinetics in Chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40, 190-196.
- SOULE, H. D., VASQUEZ, J., LONG, A., ALBERT, S. & BRENNAN, M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 51.
- SPERANZA, G., GUTIERREZ, M. E., KUMMAR, S., STRONG, J. M., PARKER, R. J., COLLINS, J., YU, Y., CAO, L., MURGO, A. J., DOROSHOW, J. H. & CHEN, A. 2012. Phase I study of the synthetic triterpenoid, 2-cyano-3, 12-dioxoolean-1, 9-dien-28-oic acid (CDDO), in advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 69, 431-438.
- SU, Z., YANG, Z., XU, Y., CHEN, Y. & YU, Q. 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14, 48.
- SUBRAMANYAM, R., GOLLAPUDI, A., BONIGALA, P., CHINNABOINA, M. & AMOORU, D. G. 2009. Betulinic acid binding to human serum albumin: A study of protein conformation and binding affinity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 94, 8-12.
- SUI, X., KONG, N., YE, L., HAN, W., ZHOU, J., ZHANG, Q., HE, C. & PAN, H. 2014. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Letters*, 344, 174-179.
- SWAIN, S. M., WHALEY, F. S. & EWER, M. S. 2003. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. *Cancer*, 97, 2869-2879.
- TAN, Y., YU, R. & PEZZUTO, J. M. 2003. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clinical Cancer Research*, 9, 2866-2875.
- TARAPORE, R. S., SIDDIQUI, I. A., ADHAMI, V. M., SPIEGELMAN, V. S. & MUKHTAR, H. 2013. The dietary terpene lupeol targets colorectal cancer cells with constitutively active Wnt/ β -catenin signaling. *Molecular nutrition & food research*, 57, 1950-1958.
- TCHIMENE, M. K., NWAEHUJOR, C. O., EZENWALI, M., OKOLI, C. C. & IWU, M. M. 2016. Free radical scavenging activity of lupeol isolated from the methanol leaf extract of *Crateva adansonii* Oliv.(Capparidaceae). *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res*, 8, 419-426.
- THORNBERRY, N. A., RANO, T. A., PETERSON, E. P., RASPER, D. M., TIMKEY, T., GARCIA-CALVO, M., HOUTZAGER, V. M., NORDSTROM, P. A., ROY, S. & VAILLANCOURT, J. P. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 17907-17911.
- TOWNSEND, N., NICHOLS, M., SCARBOROUGH, P. & RAYNER, M. 2015. Cardiovascular disease in Europe — epidemiological update 2015. *European Heart Journal*, 36, 2696-2705.
- TRACHOOTHAM, D., LU, W., OGASAWARA, M. A., VALLE, N. R.-D. & HUANG, P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling*, 10, 1343-1374.
- TRUMP, B. E., BEREZESKY, I. K., CHANG, S. H. & PHELPS, P. C. 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic pathology*, 25, 82-88.
- UKIYA, M., KIKUCHI, T., TOKUDA, H., TABATA, K., KIMURA, Y., ARAI, T., EZAKI, Y., OSETO, O., SUZUKI, T. & AKIHISA, T. 2010. Antitumor-promoting effects and cytotoxic activities of dammar resin triterpenoids and their derivatives. *Chem Biodivers*, 7, 1871-84.

- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39, 44-84.
- VALKO, M., RHODES, C., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160, 1-40.
- VAN CRUCHTEN, S. & VAN DEN BROECK, W. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia*, 31, 214-223.
- VILLAR, V., VÖGLER, O., BARCELÓ, F., GÓMEZ FLORIT, M., MARTÍNEZ SERRA, J., OBRADOR HEVIA, A., MARTÍN BROTO, J., RUIZ GUTIÉRREZ, V. & ALEMANY, R. 2014. Oleanolic and maslinic acid sensitize soft tissue sarcoma cells to doxorubicin by inhibiting the multidrug resistance protein MRP-1, but not P-glycoprotein. *Journal of nutritional biochemistry*, 25, 429-438.
- VILLAR, V. H., VÖGLER, O., BARCELÓ, F., MARTÍN-BROTO, J., MARTÍNEZ-SERRA, J., RUIZ-GUTIÉRREZ, V. & ALEMANY, R. 2016. Down-regulation of AKT signalling by ursolic acid induces intrinsic apoptosis and sensitization to doxorubicin in soft tissue sarcoma. *PloS one*, 11, e0155946.
- VON MINCKWITZ, G., UNTCH, M., NUESCH, E., LOIBL, S., KAUFMANN, M., KUMMEL, S., FASCHING, P. A., EIERMANN, W., BLOHMER, J. U., COSTA, S. D., MEHTA, K., HILFRICH, J., JACKISCH, C., GERBER, B., DU BOIS, A., HUOBER, J., HANUSCH, C., KONECNY, G., FETT, W., STICKELER, E., HARBECK, N., MULLER, V. & JUNI, P. 2011. Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res Treat*, 125, 145-56.
- WAGNER, E. F. & NEBREDA, Á. R. 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9, 537-549.
- WANG, H., NAGHAVI, M., ALLEN, C., BARBER, R. M., BHUTTA, Z. A., CARTER, A., CASEY, D. C., CHARLSON, F. J., CHEN, A. Z. & COATES, M. M. 2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388, 1459-1544.
- WANG, S. & EL-DEIRY, W. S. 2003. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 22, 8628-8633.
- WARIS, G. & AHSAN, H. 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis*, 5, 14.
- WICK, W., GRIMMEL, C., WAGENKNECHT, B., DICHGANS, J. & WELLER, M. 1999. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289, 1306-1312.
- WILEY, S. R., SCHOOLEY, K., SMOLAK, P. J., DIN, W. S., HUANG, C.-P., NICHOLL, J. K., SUTHERLAND, G. R., SMITH, T. D., RAUCH, C. & SMITH, C. A. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *immunity*, 3, 673-682.
- WU, C.-C., CHENG, C.-H., LEE, Y.-H., CHANG, I.-L., CHEN, H.-Y., HSIEH, C.-P. & CHUEH, P.-J. 2016. Ursolic Acid Triggers Apoptosis in Human Osteosarcoma Cells via Caspase Activation and the ERK1/2 MAPK Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 4220-4226.
- WYLLIE, A. H. 1997. Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin*, 53, 451-465.

- YAMASAKI, K., CHUANG, V. T. G., MARUYAMA, T. & OTAGIRI, M. 2013. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830, 5435-5443.
- YANG, H., LIU, Q., ZHAO, L., YUAN, Y., FAN, D., DENG, J. & ZHANG, R. 2014. Fluorescence spectroscopic studies on the interaction of oleanolic acid and its triterpenoid saponins derivatives with two serum albumins. *Journal of Solution Chemistry*, 43, 774-786.
- YANG, Y. & YEE, D. 2012. Targeting insulin and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 1-11.
- YASUDA, S., YOGOSAWA, S., IZUTANI, Y., NAKAMURA, Y., WATANABE, H. & SAKAI, T. 2010. Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. *Molecular nutrition & food research*, 54, 559-565.
- YEUNG, T. M., GANDHI, S. C., WILDING, J. L., MUSCHEL, R. & BODMER, W. F. 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 3722-3727.
- YOUNES, A., VOSE, J., ZELENETZ, A., SMITH, M., BURRIS, H., ANSELL, S. M., KLEIN, J., HALPERN, W., MICELI, R. & KUMM, E. 2010. A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *British journal of cancer*, 103, 1783.
- ZHANG, L. & FANG, B. 2005. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer gene therapy*, 12, 228-237.
- ZHANG, W., HONG, D., ZHOU, Y., ZHANG, Y., SHEN, Q., LI, J.-Y., HU, L.-H. & LI, J. 2006. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760, 1505-1512.
- ZHU, H., LIU, X.-W., DING, W.-J., XU, D.-Q., ZHAO, Y.-C., LU, W., HE, Q.-J. & YANG, B. 2010. Up-regulation of death receptor 4 and 5 by celastrol enhances the anti-cancer activity of TRAIL/Apo-2L. *Cancer letters*, 297, 155-164.
- ZHU, J. Y., LAVRIK, I. N., MAHLKNECHT, U., GIAISI, M., PROKSCH, P., KRAMMER, P. H. & LI-WEBER, M. 2007. The traditional Chinese herbal compound rocaglamide preferentially induces apoptosis in leukemia cells by modulation of mitogen-activated protein kinase activities. *Int J Cancer*, 121, 1839-46.
- ZHU, Z., QIAN, Z., YAN, Z., ZHAO, C., WANG, H. & YING, G. 2013. A phase I pharmacokinetic study of ursolic acid nanoliposomes in healthy volunteers and patients with advanced solid tumors. *International journal of nanomedicine*, 8, 129.
- ZIMMERMANN, K. C., BONZON, C. & GREEN, D. R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & therapeutics*, 92, 57-70.

6. Anhang

Rohdaten zu Abb.7: Toxizitätstest Hct-116 mit verschiedenen Medien

	Dammarenolsäure [μM]								
ohne FCS	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,910	0,836	0,776	0,699	0,599	0,256	0,038	0,038	0,038
Versuch 2 MW	0,915	0,923	0,830	0,762	0,487	0,156	0,039	0,037	0,037
Versuch 3 MW	0,854	0,927	0,827	0,711	0,596	0,339	0,038	0,038	0,038
Versuch 4 MW	0,917	0,922	0,866	0,739	0,476	0,171	0,043	0,043	0,040
Mittelwert	0,899	0,902	0,825	0,728	0,539	0,230	0,040	0,039	0,038
SD	0,030	0,044	0,037	0,028	0,067	0,085	0,003	0,003	0,001
SEM	0,015	0,022	0,019	0,014	0,033	0,042	0,001	0,001	0,001
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	91,8	85,3	76,8	65,8	28,2	4,2	4,2	4,2
Versuch 2 MW	100,0	100,9	90,8	83,3	53,3	17,0	4,2	4,1	4,1
Versuch 3 MW	100,0	108,5	96,8	83,3	69,7	39,7	4,4	4,5	4,4
Versuch 4 MW	100,0	100,5	94,4	80,5	51,9	18,6	4,7	4,7	4,4
Mittelwert	100,0	100,4	91,8	81,0	60,2	25,9	4,4	4,4	4,3
SD	0,0	6,8	5,0	3,1	8,9	10,4	0,2	0,3	0,2
SEM	0,0	3,4	2,5	1,5	4,5	5,2	0,1	0,1	0,1
Insulin	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,914	0,873	0,605	0,363	0,114	0,042	0,040	0,036	0,040
Versuch 2 MW	1,498	1,375	1,148	0,655	0,295	0,041	0,038	0,040	0,037
Versuch 3 MW	1,460	1,374	1,068	0,904	0,295	0,145	0,040	0,038	0,040
Versuch 4 MW	1,477	1,299	1,080	0,657	0,287	0,042	0,042	0,038	0,040
Mittelwert	1,337	1,230	0,975	0,645	0,248	0,068	0,040	0,038	0,039
SD	0,283	0,241	0,249	0,221	0,089	0,052	0,002	0,002	0,001
SEM	0,141	0,121	0,125	0,111	0,045	0,026	0,001	0,001	0,001
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	95,5	66,2	39,7	12,5	4,6	4,4	3,9	4,4
Versuch 2 MW	100,0	91,8	76,7	43,8	19,7	2,7	2,5	2,7	2,5
Versuch 3 MW	100,0	94,1	73,1	61,9	20,2	9,9	2,7	2,6	2,7
Versuch 4 MW	100,0	87,9	73,1	44,4	19,4	2,9	2,9	2,6	2,7
Mittelwert	100,0	92,3	72,3	47,5	18,0	5,0	3,1	2,9	3,1
SD	0,0	3,3	4,4	9,8	3,7	3,4	0,9	0,7	0,9
SEM	0,0	1,6	2,2	4,9	1,8	1,7	0,4	0,3	0,4
5 % FCS	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,668	0,589	0,481	0,517	0,511	0,413	0,550	0,410	0,454
Versuch 2 MW	0,686	0,703	0,696	0,632	0,629	0,621	0,610	0,595	0,510
Versuch 3 MW	0,542	0,437	0,432	0,398	0,321	0,432	0,417	0,553	0,498
Versuch 4 MW	1,426	1,326	1,514	1,431	1,309	1,452	1,432	1,312	1,515
Mittelwert	0,830	0,764	0,781	0,745	0,693	0,729	0,752	0,717	0,744
SD	0,402	0,391	0,502	0,468	0,430	0,491	0,460	0,404	0,515
SEM	0,201	0,195	0,251	0,234	0,215	0,245	0,230	0,202	0,257
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1	100,0	88,2	72,0	77,4	76,6	61,8	82,3	61,3	67,9
Versuch 2	100,0	102,6	101,5	92,2	91,8	90,6	89,0	86,8	74,4
Versuch 3	100,0	80,6	79,8	73,4	59,3	79,7	76,9	102,0	91,8
Versuch 4	100,0	93,0	106,2	100,4	91,8	101,8	100,5	92,0	106,3
Mittelwert	100,0	91,1	89,9	85,8	79,9	83,5	87,2	85,5	85,1
SD	0,0	9,2	16,5	12,6	15,5	17,1	10,1	17,3	17,4
SEM	0,0	4,6	8,3	6,3	7,7	8,5	5,1	8,7	8,7
10 % FCS	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,694	0,560	0,630	0,565	0,530	0,475	0,607	0,650	0,496
Versuch 2 MW	0,864	0,916	0,910	0,778	0,802	0,902	0,690	0,685	0,658
Versuch 3 MW	0,657	0,535	0,529	0,577	0,556	0,513	0,664	0,772	0,434

Versuch 4 MW	1,667	1,837	1,789	1,656	1,705	2,095	1,717	1,350	1,807
Mittelwert	0,970	0,962	0,964	0,894	0,898	0,996	0,920	0,864	0,849
SD	0,473	0,609	0,573	0,517	0,552	0,758	0,533	0,328	0,646
SEM	0,237	0,304	0,286	0,259	0,276	0,379	0,266	0,164	0,323
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	80,7	90,7	81,4	76,4	68,5	87,4	93,6	71,5
Versuch 2 MW	100,0	106,1	105,4	90,1	92,8	104,5	80,0	79,3	76,2
Versuch 3 MW	100,0	81,4	80,5	87,8	84,6	78,1	101,1	117,5	66,0
Versuch 4 MW	100,0	110,1	107,3	99,3	102,3	125,7	103,0	81,0	108,4
Mittelwert	100,0	94,6	96,0	89,7	89,0	94,2	92,9	92,8	80,5
SD	0,0	15,7	12,7	7,4	11,1	25,9	11,1	17,6	19,0
SEM	0,0	7,9	6,3	3,7	5,5	13,0	5,5	8,8	9,5
0,15 % BSA									
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,467	0,290	0,296	0,317	0,321	0,323	0,299	0,325	0,355
Versuch 2 MW	0,460	0,447	0,437	0,429	0,426	0,401	0,357	0,378	0,267
Versuch 3 MW	0,315	0,269	0,334	0,294	0,332	0,275	0,433	0,398	0,341
Versuch 4 MW	1,230	1,065	1,025	0,958	0,941	1,086	1,030	0,975	1,122
Mittelwert	0,618	0,518	0,523	0,500	0,505	0,521	0,530	0,519	0,521
SD	0,414	0,373	0,340	0,311	0,294	0,380	0,338	0,306	0,402
SEM	0,207	0,187	0,170	0,156	0,147	0,190	0,169	0,153	0,201
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	62,2	63,5	67,9	68,8	69,2	63,9	69,5	76,1
Versuch 2 MW	100,0	97,2	94,9	93,3	92,7	87,1	77,6	82,2	58,0
Versuch 3 MW	100,0	85,4	106,0	93,3	105,3	87,1	137,2	126,0	108,1
Versuch 4 MW	100,0	86,6	83,4	77,9	76,6	88,4	83,7	79,3	91,2
Mittelwert	100,0	82,8	86,9	83,1	85,8	82,9	90,6	89,3	83,4
SD	0,0	14,8	18,2	12,4	16,4	9,2	32,1	25,1	21,3
SEM	0,0	7,4	9,1	6,2	8,2	4,6	16,1	12,5	10,7
0,3 % BSA									
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,531	0,562	0,517	0,492	0,496	0,427	0,602	0,332	0,420
Versuch 2 MW	0,319	0,217	0,275	0,232	0,285	0,269	0,225	0,311	0,239
Versuch 3 MW	0,307	0,278	0,278	0,240	0,235	0,223	0,247	0,264	0,238
Versuch 4 MW	0,932	0,976	0,921	0,860	0,850	0,871	0,945	0,809	0,746
Mittelwert	0,522	0,508	0,498	0,456	0,467	0,447	0,505	0,429	0,410
SD	0,292	0,346	0,304	0,295	0,280	0,296	0,341	0,255	0,239
SEM	0,146	0,173	0,152	0,148	0,140	0,148	0,170	0,127	0,120
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	105,8	97,3	92,7	93,5	80,4	113,3	62,5	79,0
Versuch 2 MW	100,0	68,0	86,5	72,7	89,5	84,5	70,7	97,8	75,0
Versuch 3 MW	100,0	90,6	90,6	78,1	76,5	72,4	80,3	85,9	77,4
Versuch 4 MW	100,0	104,6	98,8	92,2	91,2	93,4	101,4	86,8	80,0
Mittelwert	100,0	92,2	93,3	83,9	87,7	82,7	91,4	83,2	77,8
SD	0,0	17,6	5,8	10,1	7,6	8,7	19,4	14,8	2,2
SEM	0,0	8,8	2,9	5,1	3,8	4,4	9,7	7,4	1,1

Rohdaten zu Abb.8: Toxizitätstest MCF-7 mit verschiedenen Medien

	Dammarenolsäure [µM]								
ohne FCS									
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,603	0,573	0,561	0,520	0,449	0,402	0,052	0,041	0,039
Versuch 2 MW	0,449	0,445	0,413	0,371	0,308	0,224	0,127	0,039	0,038
Versuch 3 MW	0,429	0,396	0,363	0,284	0,140	0,129	0,081	0,038	0,037
Versuch 4 MW	0,520	0,487	0,420	0,324	0,182	0,068	0,079	0,040	0,036
Versuch 5 MW	0,696	0,632	0,628	0,499	0,340	0,286	0,047	0,040	0,037
Mittelwert	0,539	0,507	0,477	0,400	0,284	0,222	0,077	0,040	0,037
SD	0,111	0,096	0,112	0,105	0,125	0,131	0,032	0,001	0,001
SEM	0,045	0,039	0,046	0,043	0,051	0,054	0,013	0,001	0,000
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	95,1	93,2	86,3	74,6	66,7	8,7	6,8	6,4
Versuch 2 MW	100,0	99,1	92,0	82,8	68,7	50,0	28,3	8,8	8,5
Versuch 3 MW	100,0	92,3	84,6	66,2	32,6	30,1	18,8	8,8	8,5
Versuch 4 MW	100,0	93,7	80,7	62,3	35,1	13,0	15,2	7,7	6,9
Versuch 5 MW	100,0	90,8	90,3	71,7	48,9	41,1	6,8	5,8	5,3
Mittelwert	100,0	94,2	88,2	73,9	52,0	40,2	15,5	7,6	7,1
SD	0,0	3,2	5,3	10,4	19,1	20,3	8,6	1,3	1,4
SEM	0,0	1,4	2,4	4,6	8,5	9,1	3,9	0,6	0,6
Insulin									
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,200	0,162	0,178	0,082	0,042	0,040	0,038	0,038	0,038
Versuch 2 MW	0,612	0,527	0,335	0,218	0,129	0,089	0,060	0,039	0,036
Versuch 3 MW	0,615	0,584	0,409	0,263	0,171	0,066	0,082	0,037	0,039
Mittelwert	0,476	0,424	0,307	0,188	0,114	0,065	0,060	0,038	0,037
SD	0,239	0,229	0,118	0,094	0,066	0,024	0,022	0,001	0,001
SEM	0,138	0,132	0,068	0,054	0,038	0,014	0,013	0,000	0,001
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	81,0	89,0	41,0	21,1	20,0	18,9	19,0	18,8
Versuch 2 MW	100,0	86,0	54,7	35,6	21,0	14,5	9,8	6,3	5,9
Versuch 3 MW	100,0	94,9	66,4	42,7	27,9	10,8	13,4	6,1	6,3
Mittelwert	100,0	87,3	70,0	39,8	23,3	15,1	14,0	10,4	10,3
SD	0,0	7,0	17,4	3,7	3,9	4,6	4,6	7,4	7,4
SEM	0,0	4,1	10,1	2,2	2,3	2,7	2,6	4,3	4,3
5 % FCS									
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,376	0,396	0,477	0,476	0,446	0,440	0,446	0,442	0,444
Versuch 2 MW	0,519	0,539	0,547	0,561	0,543	0,531	0,539	0,556	0,485
Versuch 3 MW	0,225	0,208	0,218	0,212	0,194	0,242	0,227	0,213	0,205
Versuch 4 MW	1,066	1,206	1,006	1,148	1,247	1,237	1,266	1,275	1,270
Mittelwert	0,547	0,587	0,562	0,599	0,607	0,613	0,619	0,621	0,601
SD	0,367	0,434	0,328	0,395	0,451	0,433	0,451	0,458	0,463
SEM	0,183	0,217	0,164	0,198	0,226	0,217	0,225	0,229	0,231
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	105,5	127,0	126,7	118,6	117,2	118,6	117,6	118,0
Versuch 2 MW	100,0	103,9	105,4	108,1	104,8	102,4	104,0	107,2	93,5
Versuch 3 MW	100,0	92,3	96,6	94,1	85,9	107,6	100,6	94,4	91,0
Versuch 4 MW	100,0	113,1	94,4	107,7	116,9	116,0	118,8	119,5	119,1
Mittelwert	100,0	103,7	105,9	109,1	106,6	110,8	110,5	109,7	105,4
SD	0,0	8,6	14,9	13,4	15,1	7,1	9,6	11,5	15,2
SEM	0,0	4,3	7,4	6,7	7,5	3,5	4,8	5,8	7,6
10 % FCS									
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,367	0,347	0,496	0,443	0,420	0,383	0,461	0,384	0,260
Versuch 2 MW	0,594	0,589	0,607	0,586	0,546	0,573	0,572	0,521	0,482
Versuch 3 MW	0,238	0,225	0,213	0,209	0,239	0,234	0,214	0,217	0,182
Versuch 4 MW	1,389	1,343	1,304	1,207	1,315	1,292	1,263	1,225	1,385
Mittelwert	0,647	0,626	0,655	0,611	0,630	0,621	0,627	0,586	0,577

SD	0,516	0,501	0,463	0,426	0,474	0,468	0,449	0,443	0,553
SEM	0,258	0,251	0,232	0,213	0,237	0,234	0,225	0,222	0,277
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	94,5	135,1	120,6	114,2	104,2	125,4	104,4	70,8
Versuch 2 MW	100,0	99,1	102,1	98,6	91,8	96,5	96,3	87,6	81,0
Versuch 3 MW	100,0	94,6	89,3	87,7	100,5	98,4	89,6	90,9	76,6
Versuch 4 MW	100,0	96,7	93,9	86,9	94,7	93,0	90,9	88,1	99,7
Mittelwert	100,0	96,2	105,1	98,4	100,3	98,0	100,6	92,8	82,0
SD	0,0	2,2	20,7	15,7	9,9	4,7	16,8	7,9	12,5
SEM	0,0	1,1	10,3	7,9	5,0	2,4	8,4	3,9	6,2
0,15 % BSA									
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,444	0,357	0,373	0,445	0,419	0,486	0,431	0,415	0,394
Versuch 2 MW	0,468	0,479	0,451	0,434	0,458	0,437	0,431	0,430	0,378
Versuch 3 MW	0,217	0,206	0,225	0,188	0,195	0,222	0,215	0,196	0,150
Versuch 4 MW	1,084	0,962	1,031	0,978	1,017	1,004	1,076	1,025	1,086
Mittelwert	0,553	0,501	0,520	0,511	0,522	0,537	0,538	0,517	0,502
SD	0,372	0,327	0,353	0,333	0,350	0,332	0,372	0,356	0,405
SEM	0,186	0,163	0,177	0,167	0,175	0,166	0,186	0,178	0,202
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	80,4	84,2	100,3	94,4	109,5	97,2	93,6	88,8
Versuch 2 MW	100,0	102,3	96,4	92,8	97,8	93,4	92,1	91,8	80,8
Versuch 3 MW	100,0	95,1	103,8	86,6	89,9	102,1	99,1	90,4	69,1
Versuch 4 MW	100,0	88,7	95,1	90,2	93,8	92,6	99,2	94,6	100,1
Mittelwert	100,0	91,6	94,9	92,5	94,0	99,4	96,9	92,6	84,7
SD	0,0	9,3	8,1	5,8	3,2	8,0	3,3	1,8	13,1
SEM	0,0	4,7	4,1	2,9	1,6	4,0	1,7	0,9	6,5
0,3 % BSA									
OD	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	0,508	0,612	0,511	0,566	0,478	0,473	0,445	0,539	0,553
Versuch 2 MW	0,382	0,325	0,395	0,351	0,432	0,387	0,450	0,327	0,312
Versuch 3 MW	0,445	0,459	0,447	0,404	0,434	0,405	0,417	0,400	0,337
Versuch 4 MW	0,214	0,230	0,214	0,231	0,229	0,200	0,186	0,230	0,181
Versuch 5 MW	0,967	1,041	1,022	1,033	1,175	0,994	1,055	0,977	1,013
Mittelwert	0,503	0,533	0,518	0,517	0,550	0,492	0,511	0,494	0,479
SD	0,281	0,318	0,303	0,313	0,363	0,298	0,323	0,292	0,327
SEM	0,126	0,142	0,135	0,140	0,162	0,133	0,145	0,131	0,146
(%)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Versuch 1 MW	100,0	120,5	100,6	111,6	94,1	93,1	87,6	106,2	108,9
Versuch 2 MW	100,0	85,0	103,3	91,7	113,1	101,1	117,6	85,4	81,6
Versuch 3 MW	100,0	103,0	100,3	90,7	97,5	91,0	93,5	89,8	75,7
Versuch 4 MW	100,0	107,7	99,9	107,8	106,8	93,5	87,0	107,3	84,6
Versuch 5 MW	100,0	107,6	105,7	106,8	121,5	102,8	109,1	101,0	104,7
Mittelwert	100,0	104,8	102,0	101,7	106,6	96,3	99,0	97,9	91,1
SD	0,0	12,8	2,5	9,8	11,2	5,3	13,7	9,9	14,8
SEM	0,0	5,7	1,1	4,4	5,0	2,4	6,1	4,4	6,6

Rohdaten zu Abb.11: Caspase 3/7-Aktivität in Hct-116

		Dammarenolsäure [μ M]					
RFU	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 1	0	10881	13548	19495	28796	70220	14775
	15	15134	23346	39721	68730	176760	38771
	30	22131	34300	64670	109102	300637	64003
	45	33583	51381	96395	160344	458125	100820
	60	52311	75937	140402	215109	621988	136921
	75	79984	110578	195243	279061	773959	172069
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 2	0	6970	7242	8303	13729	10452	11327
	15	10719	12400	14275	30849	32370	99055
	30	16017	20714	23687	59128	65714	128773
	45	24425	28526	34388	91497	95933	169950
	60	33929	36832	44923	124224	130112	208441
	75	46452	46325	57661	158841	165510	248689
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 3	0	5685	5662	5743	6039	6491	17928
	15	10608	12836	15457	24676	52013	155741
	30	21691	26953	28500	64449	85214	203754
	45	35046	42793	45590	105284	142127	266252
	60	47248	57748	62691	154032	206537	331963
	75	72643	81859	67524	212758	281921	394843
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 4	0	6008	6668	7156	24298	27069	16180
	15	12726	15884	23970	80412	131365	98272
	30	21142	28498	39211	114308	168304	129593
	45	30188	39237	57127	154272	213584	160901
	60	42849	54230	79196	206115	262352	198130
	75	59392	69620	102734	252262	301971	227843
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Mittelwert	75	64618	77096	105791	225731	380840	260861
SD	75	14808	26749	62695	52251	268896	94997
SEM	75	7404	13374	31347	26126	134448	47499
OD MTT	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 1		0,887	0,606	0,440	0,126	0,065	0,045
Versuch 2		1,451	0,949	0,794	0,524	0,264	0,050
Versuch 3		1,427	0,794	0,711	0,460	0,362	0,052
Versuch 4		1,452	0,690	0,661	0,217	0,047	0,047
RFU/ MTT	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 1	75	90151	182327	443435	2208910	11934717	3782126
Versuch 2	75	32004	48808	72583	303294	626542	5006768
Versuch 3	75	50922	103066	94980	462136	779145	7623243
Versuch 4	75	40913	100900	155495	1163866	6382730	4846006
Mittelwert	75	53497	108775	191623	1034551	4930783	5314536
SD	75	25629	55077	171489	867609	5382869	1632243
SEM	75	12814	27539	85744	433805	2691434	816121
RFU/MTT [x-fach]	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 1	75	1,00	2,02	4,92	24,50	132,39	41,95
Versuch 2	75	1,00	1,53	2,27	9,48	19,58	156,44
Versuch 3	75	1,00	2,02	1,87	9,08	15,30	149,70
Versuch 4	75	1,00	2,47	3,80	28,45	156,01	118,45
Mittelwert	75	1,00	2,01	3,21	17,88	80,82	116,64
SD	75	0,00	0,38	1,41	10,06	73,84	52,47
SEM	75	0,00	0,19	0,71	5,03	36,92	26,23

Rohdaten zu Abb.12A: Caspase 8-Aktivität in Hct-116

RFU	t [min]	Dammarenolsäure [µM]				
		0	12	14	16	18
Versuch 1	0	24494	20958	32145	39747	40213
	8	22325	19999	31617	39602	40303
	16	20319	19152	30649	38954	39292
	24	19232	18662	30187	37986	38751
	32	18473	18386	29747	37426	38240
	40	18017	18092	29281	36785	37634
	48	17378	17813	29035	36420	37198
	56	16805	17531	28678	35858	36717
	64	16351	17346	28373	35459	36025
	72	15783	17187	28236	35059	35806
	80	15366	16888	27846	34724	35294
	88	14876	16555	27242	34190	34934
	96	14492	16254	27070	33974	34552
	104	14068	16008	26881	33497	34090
	112	13683	15646	26418	32814	33677
	120	13404	15565	26128	32796	33353
	128	13132	15317	25886	32385	32939
	136	12801	14992	25458	31871	32490
	144	12540	14744	25187	31542	32408
	152	12410	14429	24906	31340	31969
160	12224	14382	24608	30985	31657	
168	11902	14203	24425	30816	31435	
176	11836	14024	24291	30668	31130	
184	11611	13851	23866	30270	31028	
192	11485	13667	23768	29963	30606	
200	11365	13574	23495	29963	30543	
208	11190	13402	23424	29598	30360	
	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 2	0	26534	22000	46156	49260	51744
	8	24892	21020	45338	49132	51411
	16	24221	20899	45244	49020	51214
	24	23581	20662	45168	49064	50986
	32	22957	20513	45526	49200	50964
	40	22592	20464	45157	49224	50565
	48	21882	20058	45119	49109	50449
	56	21394	19799	45101	48807	50123
	64	20847	19516	44932	48653	49866
	72	20303	19349	44388	48457	49449
	80	19842	18891	44231	48159	49022
	88	19293	18455	43791	47806	48414
	96	19009	18143	43276	47587	48305
	104	18530	17903	42910	46890	47727
	112	18251	17575	42488	46631	47310
	120	17773	17232	41876	46104	46834
	128	17498	16984	41557	45805	46268
	136	17192	16784	41301	45268	46017
	144	16993	16468	40786	45063	45531
	152	16752	16265	40481	44611	45207
160	16514	16185	40104	44272	44999	
168	16279	15958	39775	44119	44407	
176	16096	15732	39520	43839	44268	
184	15994	15478	39139	43445	43763	
192	15779	15506	38795	42966	43340	
200	15583	15246	38428	42789	43150	

	208	15342	15124	38362	42581	42852
	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 3	0	24651	35471,6	48522	46855	30498
	8	24333	35544	48955	47163	31293
	16	23829	35719	48837	46972	31828
	24	23577	35540	48624	47016	32142
	32	23071	35495	48487	46832	32450
	40	22602	35434	48387	46815	32829
	48	22088	35299	48187	46699	33056
	56	21696	34904	47807	46214	33095
	64	21139	34814	47501	46210	33060
	72	20669	34449	47408	46077	33136
	80	20372	34092	47190	45709	33198
	88	19926	34058	46730	45290	33155
	96	19569	33848	46549	45160	33219
	104	19258	33304	46318	45029	33177
	112	19034	33313	46131	44595	33116
	120	18792	32983	45890	44490	32892
	128	18696	32857	45681	44197	33068
	136	18430	32481	45286	44163	32862
	144	18316	32463	45262	44060	33042
	152	18033	32162	45174	43745	32977
160	17965	32135	45040	43705	32872	
168	17945	31946	44721	43560	32914	
176	17892	31693	44729	43521	32803	
184	17676	31708	44578	43338	32955	
192	17597	31777	44557	43161	32935	
200	17499	31511	44625	43184	32794	
208	17286	31397	44370	43118	32863	
Mittelwert	208	14606	19974	35385	38433	35358
SD	208	3114	9930	10786	7655	6609
SEM	208	1798	5733	6227	4420	3816
OD MTT	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 1		0,804	0,445	0,397	0,207	0,087
Versuch 2		1,337	1,053	0,706	0,512	0,063
Versuch 3		1,089	0,685	0,441	0,461	0,044
RFU/ MTT	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 1	208	13925	30099	58935	142785	348199
Versuch 2	208	11475	14365	54374	83197	682749
Versuch 3	208	15870	45857	100634	93608	746364
Mittelwert	208	13757	30107	71314	106530	592438
SD	208	2202	15746	25494	31826	213895
SEM	208	1271	9091	14719	18375	123492
RFU/MTT [x-fach]	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 1	208	1,00	1,54	2,65	6,29	15,13
Versuch 2	208	1,00	1,25	4,74	7,25	59,50
Versuch 3	208	1,00	2,89	6,34	5,90	47,03
Mittelwert	208	1,00	2,10	5,10	7,80	43,84
SD	208	0,00	0,82	1,10	2,23	17,47
SEM	208	0,00	0,47	0,64	1,29	10,08

Rohdaten zu Abb.12B: Caspase 9- Aktivität in Hct-116

RFU	t [min]	Dammarenolsäure [µM]				
		0	12	14	16	18
Versuch 1	0	166737	136633	215908	292076	303976
	8	142401	129579	211088	293148	307346
	16	126035	123352	204598	287967	303742
	24	116461	120022	200434	284024	300640
	32	111299	117643	197602	281268	297638
	40	108200	116908	196222	278685	295887
	48	105507	115960	194550	276349	293777
	56	103171	115567	193847	273882	292927
	64	101019	114494	192544	272593	290019
	72	99283	113506	191074	270403	288570
	80	97281	112746	189871	268514	286441
	88	95325	111613	188121	266699	284536
	96	93683	110684	186825	264956	283027
	104	91763	109789	185203	262644	280964
	112	90311	108881	183649	261195	279471
	120	88907	107325	182118	259376	277911
	128	87627	106504	180425	257424	275994
	136	86457	105526	178871	255101	274421
	144	85124	104353	177490	253548	272792
	152	84025	103635	175834	252002	271289
160	82753	102653	174675	250190	269653	
168	82243	101684	173337	248169	268830	
176	81211	100770	171696	246840	267326	
184	80479	100027	170347	245641	265636	
192	79513	99363	169458	243914	264631	
200	78964	98956	168160	243128	263264	
208	78387	97860	167427	241445	262450	
	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 2	0	169168	122132	243498	281102	372694
	8	154217	118388	238501	278303	371919
	16	147116	117974	238838	279697	373905
	24	143195	118343	239730	282259	376502
	32	140420	119112	241790	283860	378410
	40	137727	119640	243023	285166	380842
	48	135300	119591	243906	286238	381950
	56	132889	119125	244506	287282	382299
	64	130392	118560	244465	288132	382415
	72	128339	117756	244262	288046	382554
	80	126092	116888	243604	287080	381990
	88	124182	115879	242708	287151	381174
	96	122282	114963	241463	286330	381066
	104	120503	113631	240071	285548	378967
	112	118782	112522	239391	284289	377375
	120	117463	111217	237719	283066	375805
	128	116110	110395	236404	280953	374342
	136	114746	109499	235242	280224	371970
	144	113795	108566	233254	279052	370502
	152	112192	107637	231651	277715	368189
160	111050	106634	230497	275585	366518	
168	109796	105897	228915	274366	364633	
176	108652	104959	227333	272920	361760	
184	107071	104044	225450	271009	360310	
192	106020	103492	224097	269295	358132	
200	104900	102812	222657	267991	355359	

	208	103674	101921	221579	266733	353270
	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 3	0	139957	228940	345029	362390	196654
	8	138581	228170	344834	360493	200077
	16	137823	228993	345312	359377	203534
	24	137205	230479	346768	359316	206309
	32	136541	230978	347762	359016	209475
	40	135257	231585	348361	359264	211742
	48	134169	231399	348756	359032	213901
	56	132842	231499	349213	359471	215627
	64	131725	231900	349430	358454	216775
	72	130061	230853	348855	358269	218233
	80	128914	230298	349264	358043	219565
	88	127785	229702	348823	357371	220650
	96	126583	229099	349089	357465	221405
	104	125816	228674	348768	356761	222415
	112	125205	228112	348732	356748	222818
	120	124504	227824	348285	356877	224104
	128	123992	227235	348399	355363	224513
	136	123445	227083	347881	355120	225262
	144	123109	226468	347815	355415	225857
	152	122222	225617	347778	354939	225723
160	122175	225296	347514	354928	226604	
168	121466	224758	346974	354059	227036	
176	121122	224176	347079	354088	227234	
184	120889	223846	346523	353838	227269	
192	120655	223765	345847	353648	227849	
200	120165	223509	345857	352803	228041	
208	119524	222699	345368	353316	228461	
Mittelwert	208	100528	140827	244792	287165	281394
SD	208	20748	70932	91213	58668	64525
SEM	208	11979	40953	52662	33872	37254
OD MTT	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 1		0,80	0,45	0,40	0,21	0,09
Versuch 2		1,34	1,05	0,71	0,51	0,06
Versuch 3		1,09	0,68	0,44	0,46	0,04
RFU/ MTT	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 1	208	97547	219785	421246	1164750	3010024
Versuch 2	208	77545	96808	314067	521155	5628587
Versuch 3	208	109733	325257	783323	767037	5188662
Mittelwert	208	94941	213950	506212	817647	4609091
SD	208	16251	114336	245896	324768	1402193
SEM	208	9383	66012	141968	187505	809557
RFU/MTT [x-fach]	t [min]	0	12	14	16	18
Versuch 1	208	1,00	2,25	4,32	11,94	30,86
Versuch 2	208	1,00	1,25	4,05	6,72	72,59
Versuch 3	208	1,00	2,96	7,14	6,99	47,28
Mittelwert	208	1,00	2,16	5,17	8,55	50,24
SD	208	0,00	0,86	1,71	2,94	21,02
SEM	208	0,00	0,50	0,99	1,70	12,14

Rohdaten zu Abb.13: Caspase 3/7- Aktivität in MCF-7

		Dammarensäure [μM]					
RFU	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 1	0	7800	8196	8695	14055	20656	23881
	15	9824	9117	10914	23075	36699	46712
	30	11023	9683	12188	27693	45332	61178
	45	12114	12241	15466	34420	52269	74966
	60	12258	14641	18354	38939	56523	81442
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 2	0	6360	6414	6514	6948	7177	8461
	15	7436	8684	8687	12680	18071	45268
	30	8950	10573	10098	16998	24865	80634
	45	9712	11364	11873	21017	30725	100403
	60	10530	12522	14817	26258	34459	112620
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 3	0	6332	6486	7075	7219	8517	7530
	15	7524	9393	19577	25357	50502	24500
	30	8041	11710	26142	34844	70820	34499
	45	8790	13517	31895	42739	96524	39632
	60	9275	18185	36013	47295	115001	45036
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 4	0	5724	5717	5896	6397	7398	9290
	15	6569	8120	11413	30356	44092	25905
	30	7307	9941	13692	48476	60770	34196
	45	7830	11213	17329	58964	74005	39341
	60	8456	13358	19442	67937	80307	42654
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 5	0	6591	8335	8505	8688	9959	10863
	15	8203	9855	12706	18245	17329	21877
	30	8678	11533	14781	25594	22144	29903
	45	9134	12835	16346	29704	25459	33800
	60	9708	14873	18673	32619	27321	36272
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 6	0	6226	6359	7495	7068	8123	9660
	15	7599	8736	11736	12455	18363	65327
	30	8782	9704	15101	17819	25746	113836
	45	10002	10846	17785	21904	31786	139154
	60	8229	10718	20279	18047	38186	154376
	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 7	0	7116	7005	7589	7443	8068	10364
	15	8294	8676	9635	11531	13146	39732
	30	9015	9462	10765	14057	16548	54090
	45	9607	9712	12026	16219	18830	63380
	60	9960	10040	13348	19431	21112	72363
Mittelwert	60	9774	13477	20132	35789	53273	77823
SD	60	1363	2763	7442	17602	33767	43113
SEM	60	515	1044	2813	6653	12763	16295
OD MTT	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 1		0,427	0,306	0,304	0,212	0,236	0,085
Versuch 2		0,493	0,382	0,339	0,263	0,260	0,078
Versuch 3		0,510	0,277	0,252	0,218	0,077	0,053
Versuch 4		0,408	0,189	0,125	0,067	0,053	0,050
Versuch 5		0,395	0,186	0,146	0,103	0,065	0,068
Versuch 6		0,586	0,325	0,219	0,246	0,184	0,067
Versuch 7		0,632	0,429	0,268	0,149	0,148	0,112
RFU/ MTT	t [min]	0	10	12	14	16	18

Versuch 1	60	28721	47876	60323	183709	239332	957696
Versuch 2	60	21350	32769	43679	99975	132328	1437662
Versuch 3	60	18185	65751	142716	217248	1486824	849403
Versuch 4	60	20704	70550	155708	1019500	1516290	854595
Versuch 5	60	24554	80044	128061	316899	419344	534525
Versuch 6	60	14034	33014	92568	73299	207394	2305959
Versuch 7	60	15771	23428	49800	130242	142989	646211
Mittelwert	60	20474	50490	96122	291553	592072	1083721
SD	60	5071	21861	46425	331174	628495	610390
SEM	60	1917	8263	17547	125172	237549	230705
RFU/MTT [x-fach]	t [min]	0	10	12	14	16	18
Versuch 1	60	1,00	1,67	2,10	6,40	8,33	33,34
Versuch 2	60	1,00	1,53	2,05	4,68	6,20	67,34
Versuch 3	60	1,00	3,62	7,85	11,95	81,76	46,71
Versuch 4	60	1,00	3,41	7,52	49,24	73,24	41,28
Versuch 5	60	1,00	3,26	5,22	12,91	17,08	21,77
Versuch 6	60	1,00	2,35	6,60	5,22	14,78	164,32
Versuch 7	60	1,00	1,49	3,16	8,26	9,07	40,97
Mittelwert	60	1,00	2,47	4,93	14,09	30,06	59,39
SD	60	0,00	0,94	2,50	15,82	32,71	48,29
SEM	60	0,00	0,36	0,95	5,98	12,37	18,25

Rohdaten zu Abb.14A: Caspase 8/10- Aktivität in MCF-7 (Caspase-Assay)

OD	Dammarenolsäure [µM]			
	0	7,5	10	12,5
Versuch 1	0,072	0,110	0,114	0,135
Versuch 2	0,075	0,113	0,114	0,205
Versuch 3	0,068	0,093	0,129	0,145
Mittelwert	0,072	0,105	0,119	0,162
SD	0,004	0,011	0,009	0,038
SEM	0,002	0,006	0,005	0,022
x-fach	0	7,5	10	12,5
Versuch 1	1,00	1,53	1,58	1,88
Versuch 2	1,00	1,51	1,52	2,73
Versuch 3	1,00	1,37	1,90	2,13
Mittelwert	1,00	1,47	1,67	2,25
SD	0,00	0,09	0,20	0,44
SEM	0,00	0,05	0,12	0,25

Rohdaten zu Abb.14B: Caspase 9- Aktivität in MCF-7 (Caspase-Assay)

OD	Dammarenolsäure [µM]			
	0	7,5	10	12,5
Versuch 1	0,090	0,116	0,126	0,131
Versuch 2	0,102	0,132	0,136	0,189
Versuch 3	0,117	0,136	0,173	0,188
Mittelwert	0,103	0,128	0,145	0,169
SD	0,014	0,011	0,025	0,033
SEM	0,008	0,006	0,014	0,019
x-fach	0	7,5	10	12,5
Versuch 1	1,00	1,29	1,40	1,46
Versuch 2	1,00	1,29	1,33	1,85
Versuch 3	1,00	1,16	1,48	1,61
Mittelwert	1,00	1,25	1,40	1,64
SD	0,00	0,07	0,07	0,20
SEM	0,00	0,04	0,04	0,12

Rohdaten zu Abb. 19: Teac-Assay

Absorption [734nm]	0	50µM Dammarensäure	10µM Trolox
Versuch 1	0,658	0,657	0,280
Versuch 2	0,660	0,689	0,296
Versuch 3	0,674	0,668	0,285
Mittelwert	0,664	0,671	0,287
SD	0,009	0,016	0,008
SEM	0,005	0,009	0,005

Rohdaten zu Abb.20A: Akkumulation von ROS- Hct-116

RFU	Dammarensäure [µM]				
	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 1	0	172142	200485	202722	245804
	5	174985	204979	207465	251245
	10	178869	208215	210323	256304
	15	181856	212021	214011	259999
	20	184891	214992	216945	263308
	25	187328	218574	221233	268234
	30	190768	222505	223639	270889
	35	192174	225462	225479	273611
	40	195106	226938	229414	273704
	45	198790	228975	231567	278580
	50	201777	232204	234354	282406
	55	203446	236896	238368	286011
	60	207884	239646	240193	289189
Versuch 2	0	214581	242200	241357	252675
	5	220398	249560	248665	259311
	10	224615	253261	254496	265221
	15	229940	259497	258677	272641
	20	235377	263858	265503	278581
	25	242067	271592	270272	285235
	30	247648	277236	276994	289672
	35	253519	283310	283811	295715
	40	257764	288883	287660	300296
	45	262926	293677	293328	300959
	50	267920	299470	298206	306312
	55	273048	304654	302565	310386
	60	279153	310890	307109	316581
Versuch 3	0	153277	175870	188403	201786
	5	157029	180911	193407	209983
	10	162715	187265	199861	216195
	15	168524	194723	205935	224449
	20	173166	201201	212756	231150
	25	179349	207541	219333	238756
	30	184200	213996	223351	245151
	35	188469	218823	229942	252153
	40	194832	222030	233008	253844
	45	202021	229431	240646	262693
	50	207184	235294	245187	268230
	55	210664	241646	251440	274213
	60	216715	247602	255774	280987
Mittelwert	60	234584	266046	267692	295586
SD	60	38850	39039	35014	18639
SEM	60	22430	22539	20215	10761
OD MTT	t [min]	0	7,5	10	15

Versuch 1		0,538	0,606	0,521	0,591
Versuch 2		1,426	1,395	0,975	0,894
Versuch 3		2,516	2,476	2,518	2,194
RFU/ MTT	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 1	60	386392	395363	460885	489597
Versuch 2	60	195701	222860	314840	354213
Versuch 3	60	86128	100007	101559	128090
Mittelwert	60	222740	239410	292428	323967
SD	60	151947	148372	180709	182642
SEM	60	87727	85663	104332	105448
RFU/MTT [x-fach]	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 1	60	1,00	1,02	1,19	1,27
Versuch 2	60	1,00	1,14	1,61	1,81
Versuch 3	60	1,00	1,16	1,18	1,49
Mittelwert	60	1,00	1,11	1,33	1,52
SD	60	0,00	0,07	0,24	0,27
SEM	60	0,00	0,04	0,14	0,16

Rohdaten zu Abb.20B: Akkumulation von ROS- MCF-7

RFU	Dammarensäure [μM]				
	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 1	0	203370	231892	234572	261062
	5	208718	239062	240762	270884
	10	214757	246663	247710	278563
	15	221301	253392	253832	288428
	20	224721	258516	260611	297027
	25	230197	265458	267171	303421
	30	235094	269861	269903	307818
	35	240097	274767	275339	315746
	40	243529	282965	280355	317999
	45	247736	285890	284943	322400
	50	251470	289064	288049	325355
	55	252523	293946	290366	327307
60	255369	295654	292174	329965	
	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 2	0	271093	268301	276379	291565
	5	277434	274687	284159	297520
	10	284322	281638	290633	304642
	15	290504	288890	300269	313958
	20	296153	296858	308458	321859
	25	303218	305242	316847	330502
	30	308172	312770	324626	337906
	35	315806	319076	335075	346891
	40	322691	326955	341540	356941
	45	328337	333521	349278	363643
	50	333579	340414	356133	370186
	55	340025	347207	361358	378081
60	344772	351987	364890	383396	
	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 3	0	175346	173987	184413	189238
	5	179111	177855	189074	192985
	10	184976	183985	194879	200648
	15	190961	191200	201237	207516
	20	196747	196801	207759	214095
	25	202000	201003	213231	219330
	30	208098	205339	218313	224578
	35	214140	210819	222639	229525

	40	223268	218002	230762	234085
	45	226065	220955	235372	238689
	50	231334	224263	239207	244298
	55	236878	229649	243801	249163
	60	242783	233387	248462	252820
Mittelwert	60	280975	293676	301842	322060
SD	60	55607	59325	58813	65646
SEM	60	32105	34251	33956	37901
OD MTT	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 1		0,300	0,244	0,213	0,121
Versuch 2		0,900	0,660	0,661	0,419
Versuch 3		1,091	0,950	0,801	0,538
RFU/ MTT	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 1	60	852421	1211535	1373684	2737835
Versuch 2	60	383123	533410	551988	914267
Versuch 3	60	222570	245599	310197	470043
Mittelwert	60	486038	663515	745290	1374048
SD	60	327295	495937	557472	1201778
SEM	60	188964	286329	321857	693847
RFU/MTT [x-fach]	t [min]	0	7,5	10	15
Versuch 1	60	1,00	1,42	1,61	3,21
Versuch 2	60	1,00	1,39	1,44	2,39
Versuch 3	60	1,00	1,10	1,39	2,11
Mittelwert	60	1,00	1,31	1,48	2,57
SD	60	0,00	0,18	0,11	0,57
SEM	60	0,00	0,10	0,07	0,33

Rohdaten zu Abb.21: Koinkubation von Dammarenolsäure mit TRAIL- Hct-116

PB2 [µM]	0	0	0	0	0	0
TRAIL [ng/ml]	0	5	7,5	10	15	25
OD						
Versuch 1 MW	0,898	0,748	0,688	0,696	0,597	0,482
Versuch 2 MW	0,643	0,535	0,549	0,472	0,417	0,352
Versuch 3 MW	0,853	0,774	0,691	0,646	0,507	0,418
Mittelwert	0,798	0,685	0,643	0,605	0,507	0,417
SD	0,136	0,131	0,081	0,117	0,090	0,065
SEM	0,079	0,076	0,047	0,068	0,052	0,038
(%)						
Versuch 1 MW	100,0	83,3	76,7	77,5	66,5	53,7
Versuch 2 MW	100,0	83,2	85,5	73,5	64,8	54,8
Versuch 3 MW	100,0	90,8	81,0	75,7	59,5	49,0
Mittelwert	100,0	85,7	81,1	75,6	63,6	52,5
SD	0,0	4,4	4,4	2,0	3,7	3,1
SEM	0,0	2,5	2,5	1,2	2,1	1,8
PB2 [µM]	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
TRAIL [ng/ml]	0	5	7,5	10	15	25
OD						
Versuch 1 MW	0,985	0,716	0,682	0,602	0,524	0,366
Versuch 2 MW	0,557	0,437	0,383	0,319	0,271	0,215
Versuch 3 MW	0,807	0,629	0,575	0,507	0,386	0,242
Mittelwert	0,783	0,594	0,547	0,476	0,393	0,274
SD	0,215	0,142	0,151	0,144	0,126	0,080
SEM	0,124	0,082	0,087	0,083	0,073	0,046
(%)						
Versuch 1 MW	100,0	72,6	69,2	61,1	53,2	37,1

Versuch 2 MW	100,0	78,5	68,9	57,2	48,7	38,7
Versuch 3 MW	100,0	78,0	71,2	62,8	47,8	30,0
Mittelwert	100,0	76,4	69,8	60,4	49,9	35,3
SD	0,0	3,3	1,3	2,9	2,9	4,6
SEM	0,0	1,9	0,7	1,7	1,7	2,7
PB2 [μM]	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
TRAIL [ng/ml]	0	5	7,5	10	15	25
OD						
Versuch 1 MW	0,755	0,511	0,434	0,380	0,271	0,152
Versuch 2 MW	0,513	0,357	0,286	0,243	0,224	0,139
Versuch 3 MW	0,658	0,385	0,373	0,272	0,164	0,133
Mittelwert	0,642	0,418	0,364	0,298	0,220	0,141
SD	0,122	0,082	0,074	0,072	0,054	0,010
SEM	0,070	0,047	0,043	0,042	0,031	0,006
(%)						
Versuch 1 MW	100,0	67,7	57,5	50,3	36,0	20,1
Versuch 2 MW	100,0	69,6	55,8	47,3	43,6	27,1
Versuch 3 MW	100,0	58,5	56,7	41,4	25,0	20,2
Mittelwert	100,0	65,3	56,6	46,3	34,8	22,5
SD	0,0	5,9	0,9	4,5	9,4	4,0
SEM	0,0	3,4	0,5	2,6	5,4	2,3

Rohdaten zu Abb.22A: Koinkubation von Dammarenolsäure mit TRAIL- MCF-7

PB2 [μM]	0	0	0	0	0
TRAIL [ng/ml]	0	10	25	50	75
OD					
Versuch 1 MW	0,518	0,429	0,399	0,380	0,365
Versuch 2 MW	0,452	0,446	0,396	0,391	0,368
Versuch 3 MW	0,663	0,382	0,451	0,399	0,417
Mittelwert	0,545	0,419	0,416	0,390	0,383
SD	0,108	0,033	0,031	0,009	0,029
SEM	0,062	0,019	0,018	0,005	0,017
(%)					
Versuch 1 MW	100,0	82,8	77,0	73,4	70,3
Versuch 2 MW	100,0	98,6	87,7	86,5	81,4
Versuch 3 MW	100,0	57,6	68,0	60,1	62,8
Mittelwert	100,0	79,7	77,6	73,3	71,5
SD	0,0	20,7	9,8	13,2	9,3
SEM	0,0	11,9	5,7	7,6	5,4
PB2 [μM]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
TRAIL [ng/ml]	0	10	25	50	75
OD					
Versuch 1 MW	0,411	0,374	0,374	0,320	0,323
Versuch 2 MW	0,382	0,397	0,364	0,339	0,315
Versuch 3 MW	0,515	0,451	0,410	0,327	0,318
Mittelwert	0,436	0,407	0,383	0,328	0,319
SD	0,070	0,040	0,024	0,010	0,004
SEM	0,041	0,023	0,014	0,006	0,002
(%)					
Versuch 1 MW	100,0	90,8	91,0	77,7	78,6
Versuch 2 MW	100,0	104,0	95,4	88,8	82,6
Versuch 3 MW	100,0	87,6	79,6	63,4	61,7
Mittelwert	100,0	94,1	88,6	76,6	74,3
SD	0,0	8,7	8,1	12,7	11,1
SEM	0,0	5,0	4,7	7,3	6,4
PB2 [μM]	5	5	5	5	5

TRAIL [ng/ml]	0	10	25	50	75
OD					
Versuch 1 MW	0,315	0,216	0,170	0,157	0,126
Versuch 2 MW	0,245	0,192	0,132	0,123	0,171
Versuch 3 MW	0,398	0,341	0,268	0,145	0,184
Mittelwert	0,319	0,250	0,190	0,142	0,160
SD	0,077	0,080	0,070	0,017	0,030
SEM	0,044	0,046	0,040	0,010	0,018
(%)					
Versuch 1 MW	100,0	68,6	53,8	49,7	39,8
Versuch 2 MW	100,0	78,7	54,1	50,4	69,8
Versuch 3 MW	100,0	85,8	67,3	36,6	46,2
Mittelwert	100,0	77,7	58,4	45,5	51,9
SD	0,0	8,7	7,7	7,8	15,8
SEM	0,0	5,0	4,5	4,5	9,1

Rohdaten zu Abb.22B: Koinkubation von Dammarenolsäure mit TRAIL- MCF-7-Caspase 3/7

PB2 [µM]		0	0	0	0	0
TRAIL [ng/ml]	t [min]	0	10	25	50	75
Versuch 1	0	6257	6199	6173	5593	5626
	15	6933	6799	8690	9252	7148
	30	7501	8128	10258	11203	9182
	45	8050	9360	11522	12974	11042
	60	8395	9842	12520	14055	12459
	75	9003	10328	13184	15198	13870
	t [min]					
Versuch 2	0	8178	7498	7567	7379	7763
	15	13938	7795	7966	7719	7962
	30	18419	8321	8750	8207	9078
	45	20653	8652	9562	8878	10062
	60	21750	9105	10702	9633	11111
	75	21927	9345	11109	10331	11803
	t [min]					
Versuch 3	0	6691	7951	6979	7181	7075
	15	7622	8102	7905	8482	9250
	30	8002	8577	8981	9633	11174
	45	8373	9159	9969	11101	12836
	60	8550	9659	10439	12007	14276
	75	9408	10123	11019	13018	15189
Mittelwert	75	13446	9932	11771	12849	13621
SD	75	7348	519	1225	2438	1707
SEM	75	4242	299	707	1408	985
OD MTT	t [min]					
Versuch 1		0,518	0,429	0,399	0,380	0,365
Versuch 2		0,452	0,446	0,396	0,391	0,368
Versuch 3		0,663	0,382	0,451	0,399	0,417
RFU/ MTT	t [min]					
Versuch 1	75	17364	24072	33017	39960	38027
Versuch 2	75	48490	20957	28027	26414	32082
Versuch 3	75	14186	26489	24438	32640	36466
Mittelwert	75	26680	23839	28494	33005	35525
SD	75	18955	2774	4309	6780	3082
SEM	75	10943	1601	2488	3915	1780
RFU/MTT [x-fach]	t [min]					
Versuch 1	75	1,00	1,39	1,90	2,30	2,19
Versuch 2	75	1,00	0,43	0,58	0,54	0,66

Versuch 3	75	1,00	1,87	1,72	2,30	2,57
Mittelwert	75	1,00	1,23	1,40	1,72	1,81
SD	75	0,00	0,73	0,72	1,01	1,01
SEM	75	0,00	0,42	0,41	0,59	0,58
PB2 [µM]						
		5	5	5	5	5
TRAIL [ng/ml]	t [min]	0	10	25	50	75
Versuch 1	0	6775	7514	7542	7964	7553
	15	7869	9879	10094	10776	9922
	30	9399	13421	14721	14533	13997
	45	10401	17719	19662	19478	18947
	60	11996	21062	23457	23227	23230
	75	13169	24431	26840	26646	26322
	t [min]					
Versuch 2	0	7531	7634	7597	7812	8320
	15	8836	9669	9522	9753	11012
	30	9813	11404	12127	13128	14367
	45	11524	16106	16484	17993	19847
	60	13705	20311	22477	23515	25033
	75	15591	24895	26451	27734	29655
	t [min]					
Versuch 3	0	7673	7809	7813	7724	8691
	15	8430	9479	10797	11453	12193
	30	9259	11212	15421	17559	17246
	45	9570	12283	19464	24701	25588
	60	10779	13670	23291	30812	32929
	75	12582	15406	26949	35247	38357
Mittelwert	75	13781	21577	26747	29876	31445
SD	75	1595	5350	262	4683	6214
SEM	75	921	3089	151	2704	3588
OD MTT	t [min]					
Versuch 1		0,315	0,216	0,170	0,157	0,126
Versuch 2		0,245	0,192	0,132	0,123	0,171
Versuch 3		0,398	0,341	0,268	0,145	0,184
RFU/ MTT	t [min]					
Versuch 1	75	41764	112961	158245	170173	209587
Versuch 2	75	63759	129403	200022	224981	173683
Versuch 3	75	31648	45142	100662	242459	209013
Mittelwert	75	45724	95836	152976	212538	197428
SD	75	16418	44665	49889	37715	20565
SEM	75	9479	25787	28803	21775	11873
RFU/MTT [x-fach]	t [min]					
Versuch 1	75	1,00	2,70	3,79	4,07	5,02
Versuch 2	75	1,00	2,03	3,14	3,53	2,72
Versuch 3	75	1,00	1,43	3,18	7,66	6,60
Mittelwert	75	1,00	2,05	3,37	5,09	4,78
SD	75	0,00	0,64	0,36	2,25	1,95
SEM	75	0,00	0,37	0,21	1,30	1,13

Rohdaten zu Abb.23: Koinkubation von Dammarenolsäure mit Doxorubicin- Hct-116

PB2 [μM]	0	0	0	0
Doxorubicin [μM]	0	1	2	3
OD				
Versuch 1 MW	0,942	0,697	0,591	0,373
Versuch 2 MW	0,838	0,734	0,621	0,384
Versuch 3 MW	1,107	0,861	0,723	0,580
Versuch 4 MW	0,881	0,661	0,483	0,401
Mittelwert	0,942	0,738	0,604	0,435
SD	0,118	0,087	0,099	0,098
SEM	0,059	0,044	0,049	0,049
%				
Versuch 1 MW	100,0	74,0	62,7	39,6
Versuch 2 MW	100,0	87,7	74,1	45,9
Versuch 3 MW	100,0	77,8	65,3	52,5
Versuch 4 MW	100,0	75,0	54,8	45,5
Mittelwert	100,0	78,6	64,2	45,8
SD	0,0	6,3	8,0	5,3
SEM	0,0	3,1	4,0	2,6
PB2 [μM]	3,75	3,75	3,75	3,75
Doxorubicin [μM]	0	1	2	3
OD				
Versuch 1 MW	0,553	0,380	0,179	0,100
Versuch 2 MW	0,628	0,637	0,431	0,231
Versuch 3 MW	0,972	0,839	0,791	0,472
Versuch 4 MW	0,681	0,622	0,380	0,296
Mittelwert	0,708	0,620	0,445	0,275
SD	0,184	0,188	0,255	0,155
SEM	0,092	0,094	0,127	0,077
%				
Versuch 1 MW	100,0	68,7	32,4	18,0
Versuch 2 MW	100,0	101,5	68,6	36,8
Versuch 3 MW	100,0	86,3	81,4	48,5
Versuch 4 MW	100,0	91,4	55,8	43,5
Mittelwert	100,0	87,0	59,5	36,7
SD	0,0	13,7	20,9	13,3
SEM	0,0	6,9	10,4	6,7
PB2 [μM]	6,25	6,25	6,25	6,25
Doxorubicin [μM]	0	1	2	3
OD				
Versuch 1 MW	0,433	0,218	0,065	0,060
Versuch 2 MW	0,474	0,284	0,073	0,068
Versuch 3 MW	0,686	0,411	0,145	0,083
Versuch 4 MW	0,398	0,231	0,080	0,054
Mittelwert	0,498	0,286	0,091	0,066
SD	0,129	0,088	0,037	0,012
SEM	0,065	0,044	0,018	0,006
%				
Versuch 1 MW	100,0	50,2	15,0	13,9
Versuch 2 MW	100,0	60,0	15,4	14,4
Versuch 3 MW	100,0	59,9	21,2	12,0
Versuch 4 MW	100,0	58,1	20,2	13,5
Mittelwert	100,0	57,1	18,0	13,5
SD	0,0	4,6	3,2	1,0
SEM	0,0	2,3	1,6	0,5

Rohdaten zu Abb.24A: Koinkubation von Dammarenolsäure mit Doxorubicin- MCF-7

PB2 [μM]	0	0	0	0
Doxorubicin [μM]	0	4	6	8
OD				
Versuch 1 MW	0,280	0,323	0,270	0,143
Versuch 2 MW	0,326	0,273	0,272	0,179
Versuch 3 MW	0,632	0,500	0,446	0,285
Versuch 4 MW	0,326	0,281	0,283	0,211
Mittelwert	0,391	0,344	0,318	0,205
SD	0,162	0,106	0,086	0,061
SEM	0,081	0,053	0,043	0,030
%				
Versuch 1 MW	100,0	115,3	96,4	50,9
Versuch 2 MW	100,0	83,6	83,4	55,0
Versuch 3 MW	100,0	79,1	70,6	45,2
Versuch 4 MW	100,0	86,4	87,0	64,9
Mittelwert	100,0	91,1	84,3	54,0
SD	0,0	16,4	10,7	8,3
SEM	0,0	8,2	5,3	4,2
PB2 [μM]	4,5	4,5	4,5	4,5
Doxorubicin [μM]	0	4	6	8
OD				
Versuch 1 MW	0,225	0,142	0,056	0,043
Versuch 2 MW	0,218	0,187	0,151	0,077
Versuch 3 MW	0,538	0,496	0,351	0,122
Versuch 4 MW	0,252	0,162	0,112	0,089
Mittelwert	0,308	0,247	0,167	0,083
SD	0,154	0,167	0,129	0,033
SEM	0,077	0,083	0,064	0,016
%				
Versuch 1 MW	100,0	63,1	24,7	18,9
Versuch 2 MW	100,0	85,9	69,3	35,4
Versuch 3 MW	100,0	92,2	65,4	22,6
Versuch 4 MW	100,0	64,4	44,2	35,4
Mittelwert	100,0	76,4	50,9	28,1
SD	0,0	14,9	20,6	8,6
SEM	0,0	7,4	10,3	4,3
PB2 [μM]	7	7	7	7
Doxorubicin [μM]	0	4	6	8
OD				
Versuch 1 MW	0,161	0,061	0,038	0,041
Versuch 2 MW	0,207	0,147	0,092	0,059
Versuch 3 MW	0,322	0,227	0,150	0,093
Versuch 4 MW	0,184	0,134	0,078	0,077
Mittelwert	0,219	0,142	0,089	0,068
SD	0,072	0,068	0,046	0,022
SEM	0,036	0,034	0,023	0,011
%				
Versuch 1 MW	100,0	37,6	23,5	25,6
Versuch 2 MW	100,0	70,8	44,2	28,3
Versuch 3 MW	100,0	70,5	46,4	28,9
Versuch 4 MW	100,0	72,6	42,2	42,0
Mittelwert	100,0	62,9	39,1	31,2
SD	0,0	16,9	10,5	7,3
SEM	0,0	8,4	5,3	3,7

Rohdaten zu Abb.24B: Koinkubation von Dammarenolsäure mit Doxorubicin- MCF-7-Caspase 3/7

PB2 [µM]		0	0	0	0
Doxorubicin [µM]	t [min]	0	4	6	8
Versuch 1	0	6567	7296	7157	7246
	15	7290	8278	8258	8260
	30	8599	9161	9545	9967
	45	9772	10792	10488	11534
	60	10647	11814	12085	14361
	75	11924	12735	13108	15798
	t [min]				
Versuch 2	0	6364	6591	7179	7274
	15	7272	8427	8883	10500
	30	9939	12896	12899	18864
	45	14015	17240	18376	40050
	60	16828	19658	23067	55534
	75	19123	22042	26524	61465
	t [min]				
Versuch 3	0	7896	9110	8549	8260
	15	8195	9130	9147	9984
	30	9043	9781	10076	10813
	45	9977	10614	11230	13339
	60	10880	11229	12181	15651
	75	14644	11883	13573	19859
Mittelwert	75	15230	15553	17735	32374
SD	75	3635	5635	7615	25275
SEM	75	2099	3254	4397	14593
OD MTT	t [min]				
Versuch 1		0,326	0,273	0,272	0,179
Versuch 2		0,632	0,500	0,446	0,285
Versuch 3		0,326	0,281	0,283	0,211
RFU/MTT	t [min]				
Versuch 1	75	36587	46733	48243	88178
Versuch 2	75	30274	44102	59511	215397
Versuch 3	75	44975	42255	47930	93919
Mittelwert	75	37279	44363	51894	132498
SD	75	7375	2251	6598	71850
SEM	75	4258	1299	3809	41483
RFU/MTT x-fach	t [min]				
Versuch 1	75	1,00	1,28	1,32	2,41
Versuch 2	75	1,00	1,46	1,97	7,11
Versuch 3	75	1,00	0,94	1,07	2,09
Mittelwert	75	1,00	1,22	1,45	3,87
SD	75	0,00	0,26	0,46	2,81
SEM	75	0,00	0,15	0,27	1,62
PB2 [µM]		4,5	4,5	4,5	4,5
Doxorubicin [µM]	t [min]	0	4	6	8
Versuch 1	0	7013	7199	7603	7636
	15	8180	9515	9259	13766
	30	9462	11805	11960	17217
	45	11925	14417	14628	21059
	60	15544	16892	17153	24319
	75	19060	21246	20285	27626
	t [min]				
Versuch 2	0	6225	6624	6865	8332
	15	8825	9457	11675	18140

	30	14135	15771	20935	37680
	45	20590	19715	31783	59492
	60	26434	24488	43149	75503
	75	30880	28001	50712	86039
	t [min]				
Versuch 3	0	7742	7788	8981	9092
	15	8889	10798	15934	17693
	30	10152	12828	18593	23706
	45	11226	14929	20669	28646
	60	13087	17057	22317	31532
	75	16205	20663	25714	33595
Mittelwert	75	22048	23303	32237	49087
SD	75	7781	4079	16228	32141
SEM	75	4492	2355	9370	18556
OD MTT	t [min]				
Versuch 1		0,218	0,187	0,151	0,077
Versuch 2		0,538	0,496	0,351	0,122
Versuch 3		0,252	0,162	0,112	0,089
RFU/MTT	t [min]				
Versuch 1	75	87390	113366	134248	357461
Versuch 2	75	57437	56479	144293	708079
Versuch 3	75	51913	127245	200117	376041
Mittelwert	75	65580	99030	159553	480527
SD	75	19089	37498	35487	197285
SEM	75	11021	21649	20488	113903
RFU/MTT x-fach	t [min]				
Versuch 1	75	1,00	1,30	1,54	4,09
Versuch 2	75	1,00	0,98	2,51	12,33
Versuch 3	75	1,00	1,98	3,59	5,85
Mittelwert	75	1,00	1,42	2,55	7,42
SD	75	0,00	0,51	1,03	4,34
SEM	75	0,00	0,29	0,59	2,50
PB2 [µM]		7	7	7	7
Doxorubicin [µM]	t [min]	0	4	6	8
Versuch 1	0	7040	8630	8553	10657
	15	14078	21846	24042	34148
	30	17675	28170	31850	41015
	45	19776	33528	38766	51086
	60	21647	36281	43212	57230
	75	23526	39069	46498	60456
	t [min]				
Versuch 2	0	7500	7114	10533	11923
	15	12673	16553	22596	34595
	30	21816	32191	41296	57586
	45	32260	46981	60326	80902
	60	44414	62024	76514	100078
	75	54567	72231	86987	112316
	t [min]				
Versuch 3	0	8693	12131	9898	12816
	15	20174	26047	35833	31940
	30	25064	37822	46281	50533
	45	26596	43330	54764	61001
	60	28912	46650	60261	65776
	75	31116	50115	64313	69413
Mittelwert	75	36403	53805	65933	80728
SD	75	16182	16886	20293	27720

SEM	75	9343	9749	11716	16004
OD MTT	t [min]				
Versuch 1		0,207	0,147	0,092	0,059
Versuch 2		0,322	0,227	0,150	0,093
Versuch 3		0,184	0,134	0,078	0,077
RFU/MTT	t [min]				
Versuch 1	75	113382	265774	507359	1027876
Versuch 2	75	169233	317676	581327	1206983
Versuch 3	75	168796	374566	826979	897452
Mittelwert	75	150470	319339	638555	1044104
SD	75	32120	54415	167319	155402
SEM	75	18544	31416	96601	89722
RFU/MTT x-fach	t [min]				
Versuch 1	75	1,00	2,34	4,47	9,07
Versuch 2	75	1,00	1,88	3,44	7,13
Versuch 3	75	1,00	2,22	4,90	5,32
Mittelwert	75	1,00	2,15	4,27	7,17
SD	75	0,00	0,24	0,75	1,87
SEM	75	0,00	0,14	0,43	1,08

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. Yvonne Chovolou für die Vergabe des interessanten Themas und ihre engagierte Betreuung danken. Die regelmäßig stattfindenden Besprechungen und das gemeinsame Diskutieren der Ergebnisse haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wim Wätjen für die gründlichen Korrekturen, sowie die konstruktive und freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation.

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Johannes Bode, der sich trotz seiner vielfältigen Aufgaben die Zeit genommen hat, meine Arbeit gründlich zu korrigieren. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die Motivation bei der Fertigstellung der Dissertation.

Vielen Dank auch Prof. Dr. Dr. h.c. P. Proksch aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie für die Bereitstellung der Dammarenolsäure.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Institut, insbesondere Frau Kerstin Wolters und Hermine Kannengießner danke ich für die hilfreichen Tipps und die Einarbeitung im Labor. Das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit haben die Durchführung dieser Arbeit sehr erleichtert.

Schließlich möchte ich mich bei meinen guten Freunden und meiner Familie danken, die stets Interesse an meiner Arbeit zeigen. Besonders danke ich meinen Eltern, die mich in meinen Plänen immer unterstützt haben. Abschließend, aber von ganzem Herzen danke ich meinem Mann für seine Unterstützung bei kleinen Formatierungsproblemen, Geduld, Rückhalt und die Motivation während der Zeit im Labor und danach.