

## Nederlandse Samenvatting

Betuline zuur (BetA) behoort tot de in de natuur veel voorkomende pentacyclische triterpenoiden. Triterpenoiden maken deel uit van de terpenoïde familie. Deze familie bestaat uit een grote en diverse groep van plantaardige stoffen waarvan er vele onderzocht worden als potentieel geneesmiddel. In een belangrijk artikel uit 1995 werd de antikanker activiteit van BetA tegen melanoma voor het eerst beschreven. Het celdood mechanisme waarop de antikanker werking van BetA berust in deze studie was apoptose. Snel daarna werd duidelijk dat ook cellen van andere neuroectodermale kanker soorten gevoelig zijn voor BetA en gedetailleerde studies toonden aan dat BetA een direct effect heeft op de mitochondriën. Deze cellulaire organellen hebben een centrale rol bij het apoptotische proces, waarin ook eiwitten van de Bcl-2 familie een belangrijke rol spelen. De groep van Fulda toonden aan dat SHEP neuroblastoom cellen met overexpressie van Bcl-2 resistent zijn voor BetA-geïnduceerde apoptotische kenmerken zoals het vrijkomen van cytochroom C uit de mitochondriën. Aanvullende studies waarbij tumorcellen van verschillende andere weefsels gebruikt werden, leidden echter niet tot een consistent model van het mechanisme van BetA-geïnduceerde celdood en in het bijzonder de rol van de Bcl-2 familie eiwitten daarbij. Tevens waren er tegenstrijdige resultaten over de gevoeligheid van andere tumorcellen dan melanoom en neuroblastoom cellen voor BetA.

In **hoofdstuk 2** beschrijven wij de effecten van BetA op cellijnen afkomstig van darm, long, borst, prostaat en baarmoederhals kanker, waarbij we gebruik maken van verschillende experimentele methoden. De resultaten bleken sterk afhankelijk van de gebruikte methode. Zo werd 48 uur na behandeling met BetA de levensvatbaarheid van de cel en de hoeveelheid celdood gemeten met respectievelijk de MTT test en de PI test. De resultaten waren verrassend: zo bleek dat de half maximale effectieve concentratie van BetA in de MTT test veel lager lag dan de half maximale effectieve concentratie in de PI test. Tevens onderzochten we het anti-proliferatieve effect van BetA middels de kolonie-formatie assay. De resultaten van deze test zijn niet tijdsafhankelijk: in plaats van het meten van de status op een bepaald tijdstip geeft deze test een eindpunt situatie weer waarin het aantal overlevende en nog delende cellen wordt beoordeeld. Opmerkelijk was dat de concentratie van BetA waarbij er geen kolonie gevormd werden praktisch gelijk lag voor alle geteste cellijnen. Bovendien observeerden wij dat in de aanwezigheid van de pan-caspase remmer zVAD-fmk de apoptotische kenmerken zoals het knippen van het eiwit PARP en de fragmentatie van DNA enerzijds wel bijna geheel geblokkeerd werden, terwijl anderzijds de pan-caspase remmer toch geen bescherming bood tegen celdood. Deze resultaten leerden ons dat het cytotoxische effect van BetA op tumorcellen complexer is dan alleen de inductie van klassieke apoptose.

In de mitochondriale route van apoptose zijn twee pro-apoptotische leden van de Bcl-2 familie, Bax en Bak, essentiële spelers voor het vrijkomen van cytochroom C uit de mitochondriën en de daaropvolgende activatie van caspases. Cellen waarin Bax of Bak ontbreken ondergaan nog steeds apoptose, maar cellen waarin beide eiwitten ontbreken zijn over het algemeen resistent tegen medicijnen die werken op de mitochondriale route van apoptose. Toen wij dit echter voor BetA onderzochten, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**, observeerden wij dat cellen waarin Bax en Bak ontbreken nog steeds gevoelig zijn voor BetA en er ook nog apoptotische verschijnselen, zoals het vrijkomen van cytochroom C, optreden. Deze resultaten toonden aan dat de klassieke Bcl-2 familie afhankelijke route niet nodig is in BetA-geïnduceerde cytotoxiciteit. Daarentegen waren cyclosporine A en bongkrekic acid, beide remmers van de mitochondriale permeabiliteits-transitie (PT) poriën, in staat om zowel apoptose als celdood te blokkeren in cellen die met BetA behandeld waren. Dit suggereerde dat de PT poriën cruciaal betrokken zijn bij de door BetA geïnduceerde cytotoxiciteit. Deze bevinding is van groot belang omdat veel tumorcellen resistent zijn tegen medicijnen die zich richten op klassieke, Bcl-2-familie afhankelijke apoptose. Het feit dat niet alleen apoptose maar ook celdood geremd kan worden in de aanwezigheid van remmers van de PT poriën suggereert dat ter plekke van deze poriën het lot van de met BetA behandelde cellen bepaald wordt. Deze bevindingen kunnen ook de sterk overeenkomende anti-proliferatieve concentratie van BetA voor de verschillende geteste cellijnen in de kolonievormatie test, zoals beschreven in **hoofdstuk 2**, verklaren.

In **hoofdstuk 5** is het onderzoek naar de aard van het effect van BetA op de mitochondriën beschreven. De mitochondriën vertoonden morfologisch gezien een opmerkelijk veranderde modellering na behandeling met BetA. De mitochondriale binnenmembranen (de cristae) verloren hun gebruikelijke langgestrekte structuur en vormden concentrische ringen. Deze morfologische verandering is al eerder geconstateerd in de mitochondriën van patiënten met het zogenaamde Barth syndroom. Karakteristiek voor deze zeldzame ziekte zijn de veranderingen in een mitochondriaal fosfolipide, genaamd cardiolipine, met tot gevolg een verzwakte functie van de mitochondriën. De drastische morfologische effecten veroorzaakt door BetA op de mitochondriën impliceerden ook dat de voornaamste functie van deze organellen, het verzorgen van de energiebehoefte van de cel in de vorm van ATP, waarschijnlijk is aangedaan. Dit leidde tot het onderzoeken van mogelijkerwijs door BetA behandeling geïnduceerde autofagie. De inductie van autofagie is vooral bekend als een overlevingsmechanisme in reactie op stress signalen zoals het verlies van ATP of orgaanschade, maar kan ook een alternatieve route tot celdood zijn. Wij ontdekten dat BetA behandeling een gigantische mate van autofagie induceert. Dit werd - net als vrijkomend cytochroom C en celdood - geblokkeerd door de co-behandeling van de cellen met cyclosporine A. Deze resultaten toonden aan dat de effecten van BetA op de mitochondriën en de inductie van autofagie verwante gebeurtenissen zijn en niet onafhankelijke geïnduceerde processen. In experimenten met cellen waarin de autofagie-route defect is, konden we vervolgens aantonen dat autofagie door BetA geïnduceerd

word als een overlevingsmechanisme en niet als alternatieve celdood route dienst doet. De sterke inductie van autofagie zou kunnen verklaren waarom cellen ondanks de vroege effecten op de mitochondriën in staat zijn om een behandeling met BetA net zo lang te overleven als de celdood die door klassieke apoptose middelen wordt geïnduceerd.

Wij hebben de antikanker effecten van BetA ook *in vivo* onderzocht. Ondanks dat er al enkele publicaties over de toepassing van BetA in proefdieren waren, werd in geen van deze studies een BetA formulatie gebruikt die geschikt is voor toediening in mensen. Daarom was onze focus op het vinden van een formulatie die zowel efficiënt is als ook geschikt voor humane toediening. Door het feit dat BetA een sterk vette (lipofiele) stof is en daarom slecht oplosbaar in water, is het relatief ingewikkeld om een geschikte formulatie te ontwikkelen die aan voorgenoemde eisen voldoet. We besloten om liposomen te testen als mogelijke drager van BetA in een medicijn. Liposomen zijn kleine blaasjes met een dubbel-membraan welke uit fosfolipiden is opgebouwd. Ze kunnen goed worden gebruikt voor de inbouw en systemische toediening van lipofiele stoffen. In **hoofdstuk 3** tonen we de resultaten van muizen die oraal of intraveneus behandeld zijn met BetA-bevattende liposomen. De tumorgroei was aanzienlijk verminderd vergeleken met de groei in de controle groep. Zeer belangrijk is dat er geen systemische toxiciteit werd veroorzaakt door de behandeling met de BetA-liposomen, zelfs niet na enkele maanden van behandeling. Onze *in vivo* resultaten demonstreren dat de BetA-liposomen geschikt zijn voor een effectieve behandeling van tumordragende muizen, hoewel een nog verdergaande groeivertraging van de tumoren nastrevenswaardig is. We gebruikten liposomen met een grote diameter, die niet in mensen in de bloedbaan mogen worden ingespoten. Daarom moet er nu verder gezocht worden naar een andere efficiënte manier om BetA toe te dienen, zowel intraveneus (in de aderen) als ook oraal.

Ook onderzochten we het antikanker effect van betuline. Betuline is de chemische voorloper van BetA, wat zeer rijkelijk beschikbaar is in de natuur, bijvoorbeeld in de bast van de witte berk, en zodoende gemakkelijk en goedkoop te verkrijgen is. Eerder was aangetoond dat betuline slechts een beperkt effect heeft op tumorcellen, doch deze beperkte effecten werden over het algemeen niet in detail beschreven. Wij ontdekten dat de aard van de antikanker effecten van betuline *in vitro* vergelijkbaar zijn met die van BetA, zoals wordt gerapporteerd in **hoofdstuk 6**. Ondanks dat de cytotoxische eigenschappen van betuline vergelijkbaar zijn met BetA, zagen we ook belangrijke verschillen tussen de manier van celdood veroorzaakt door deze twee verwante stoffen. Het opmerkelijkst was dat de gezamenlijke toediening van cholesterol het cytotoxische effect van betuline erg versterkte terwijl dit niet het geval was als we de BetA behandeling combineerde met cholesterol. Deze ontdekking is vooral van belang in het kader van *in vivo* studies, omdat cholesterol alomtegenwoordig aanwezig is in alle humane en dierlijke cellen. Toekomstige experimenten zullen moeten uitwijzen of deze unieke eigenschap van de combinatie van betuline met cholesterol mogelijk gebruikt kan worden op een therapeutische manier of dat deze combinatie mogelijk (te)

schadelijk is voor normale niet-maligne cellen. Een ander belangrijk verschil tussen behandeling met BetA, vergeleken met die van betuline en cholesterol samen, is de andere kinetiek van de cytotoxische effecten die worden geïnduceerd. Betuline met cholesterol veroorzaakt een veel snellere celdood vergeleken met BetA, en daarnaast ontdekten we ook dat de beschermende effecten van cyclosporine A meer uitgesproken waren.

We concluderen uit onze studies dat BetA en mogelijk ook betuline, veelbelovende kandidaten zijn voor verdere evaluatie als antikanker medicijn. Dit is te danken aan de unieke manieren waarop ze hun cytotoxiciteit tegen kankercellen uitoefenen terwijl gelijktijd normale cellen niet getroffen worden. Afgezien van de klinische potentie van BetA als chemotherapeutisch geneesmiddel, helpt de studie naar BetA (en betuline) ons ook om de kwetsbare punten van tumorcellen te ontdekken. Het in kaart brengen daarvan is van grote waarde voor het verder ontwikkelen van krachtige antikanker geneesmiddelen.