

Isolierung und Charakterisierung immunmodulatorischer Wirkstoffe aus Pilzen als Inhibitoren inflammatorischer und fibrotischer Pathomechanismen bei Asthma

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
vorgelegt von

Dipl. Biol. Anna-Kristina Rudolph

Betreuer: PD Dr. Gerhard Erkel
Koreferent: Prof. Dr. John Cullum

Kaiserslautern, 28.8.2015

D 386

3. Abstract

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways characterized by bronchial hyper-responsiveness, reversible airflow obstruction and airway remodeling. Latter refers to the permanent structural changes in the airway wall which contribute to the thickening of bronchial walls and are therefore responsible for the progressive and irreversible decline in lung function seen in asthmatics. The epithelial to mesenchymal transition (EMT), a physiological process by which epithelial cells acquire the motile and invasive phenotype of fibroblasts, is thereby closely associated with epithelial disruption, subepithelial fibrosis and myofibroblast accumulation which occur during airway remodeling. Although growth factors like transforming growth factor- β (TGF- β) are considered crucial for the induction of EMT, recent evidence suggests that inflammatory mediators can modulate the EMT response. One aim of this study was therefore to clarify the effect of the inflammatory cytokines IL-4, IL-17 and IL-22, which are involved in the pathogenesis of allergic (IL-4) and non-allergic (IL-17/ -22) asthma, on TGF- β induced EMT *in vitro*. None of the cytokines were able to induce EMT by themselves, but they potentiated and accelerated TGF- β induced EMT and the combined stimulation with all 3 cytokines even showed an additive effect. Although the cytokines alone induced the temporary synthesis of transcription factors essential for EMT, their transcript levels and protein abundance decreased rapidly. This effect was strongly diminished by additional stimulation with TGF- β suggesting that the mRNA stabilizing effect of the growth factor might be an essential factor for the induction of EMT.

Although inhaled corticosteroids form the gold standard treatment for asthma, 5-10% of asthmatics remain therapy resistant. Additionally, long-term therapy with corticosteroids does not abrogate airway remodeling and therefore, new therapeutic strategies need to be developed. Natural products with their structural complexity and broad range of biological activities can thereby serve as potential lead compounds. The second aim of this study was to examine the therapeutic potential of the natural products Cyclonerodiol and Oxacyclododecindione on asthma-relevant pathomechanisms *in vitro*. Cyclonerodiol, which had already been characterized as an inhibitor of IL-4 signaling beforehand, also inhibited the IL-13 signaling pathway which is closely related to allergic asthma. On mRNA- and protein-level, the natural compound reduced the expression of inflammatory cytokines and chemokines involved in the pathogenesis of allergic asthma. Studies on the mode of action demonstrated that Cyclonerodiol inhibited the interaction of the transcription factor STAT6 with the MAP-kinases p38 and ERK1/2 which reduced the serine phosphorylation of STAT6 and consequently decreased its ability to interact with the transcriptional coactivator p300. Oxacyclododecindione, which had already been identified as a potent inhibitor of the expression of inflammatory and fibrotic genes, inhibited hallmark features of severe, glucocorticoid-resistant asthma such as IL-17 induced expression of inflammatory genes. The substance also impeded TGF- β induced EMT in a more pronounced fashion than the potent glucocorticoid dexamethasone. Studies regarding the mode of action indicate that Oxacyclododecindione might be a kinase inhibitor with TAK1 as a potential target.

3. Zusammenfassung

Bei Asthma handelt es sich um eine chronische Entzündung der Atemwege, die durch bronchiale Hyperreagibilität, reversible Atemwegsobstruktion und airway remodeling gekennzeichnet ist. Letzteres bezieht sich dabei auf die permanenten strukturellen Veränderungen in den Atemwegen, die zur Verdickung der Bronchialwand beitragen und für die bei Asthmatikern auftretende progressive und irreversible Abnahme der Lungenfunktion verantwortlich sind. Die epithelial zu mesenchymale Transition (EMT), ein physiologischer Prozess bei dem epitheliale Zellen den motilen und invasiven Phänotyp von Fibroblasten übernehmen, ist dabei eng mit der Zerstörung der epithelialen Barriere, subepithelialer Fibrose und der Akkumulation von Myofibroblasten assoziiert, die bei airway remodeling auftreten. Obwohl Wachstumsfaktoren wie der transforming growth factor β (TGF- β) als wichtige Induktoren von EMT gelten, weisen jüngste Ergebnisse auf eine EMT-modifizierende Wirkung von inflammatorischen Mediatoren hin. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Effekt der inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-17 und IL-22, die in der Pathogenese von allergischem (IL-4) bzw. nicht-allergischem (IL-17/-22) Asthma involviert sind, auf die TGF- β induzierte EMT *in vitro* zu untersuchen. Keines der Zytokine war dabei in der Lage, selbstständig EMT induzieren, allerdings verstärkten und beschleunigten sie den EMT-Prozess in Kombination mit TGF- β , wobei die kombinierte Stimulation mit allen 3 Zytokinen einen additiven Effekt zeigte. Obwohl die Zytokine allein kurzzeitig die Transkription von EMT-essentiellen Transkriptionsfaktoren förderten, nahm deren Transkriptmenge sowie Proteinabundanz rasch wieder ab. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Stimulation mit TGF- β jedoch stark verringert, was auf eine essentielle Rolle des mRNA-stabilisierenden Effektes von TGF- β bei der Induktion von EMT hindeutet.

Obwohl inhalierte Kortikosteroide als goldene Standardtherapie in der Asthmabehandlung gelten, verbleiben 5-10% der Asthmatiker therapieresistent. Desweiteren wird airway remodeling durch die Langzeit-Behandlung mit Kortikosteroiden nicht unterdrückt, weswegen neue therapeutische Ansätze entwickelt werden müssen. Naturstoffe mit ihrer strukturellen Komplexität sowie ihrem breiten Spektrum an biologischen Aktivitäten können dabei als potentielle Leitstrukturen dienen. In dieser Arbeit wurde das therapeutische Potenzial der Naturstoffe Cyclonerodiol und Oxacyclododecindion bezüglich Asthma-relevanter Pathomechanismen *in vitro* untersucht. Cyclonerodiol, das zuvor bereits als Inhibitor des IL-4 Signalweges charakterisiert wurde, hemmte auch den IL-13 Signalweg, der ebenfalls mit allergischem Asthma assoziiert ist. Auf mRNA- und Proteinebene reduzierte der Naturstoff die Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine, die an der Pathogenese von allergischem Asthma beteiligt sind. Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigten, dass Cyclonerodiol die Interaktion des Transkriptionsfaktors STAT6 mit den MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 und somit die Serin-Phosphorylierung von STAT6 reduziert, wodurch auch die Interaktion mit dem transkriptionellen Coaktivator p300 verringert wird. Oxacyclododecindion, das bereits als potenter Inhibitor der Expression von inflammatorischen sowie fibrotischen Genen identifiziert wurde, hemmte charakteristische Merkmale von schwerem, Glukokortikoid-resistentem Asthma wie die durch IL-17 induzierte Expression inflammatorischer Gene. Die Substanz inhibierte zudem die durch TGF- β induzierte EMT wesentlich stärker als das potente Glukokortikoid Dexamethason. Studien zum Wirkmechanismus weisen darauf hin,

dass es sich bei Oxacyclododecindion um einen Kinaseinhibitor mit TAK1 als potentieller Zielstruktur handeln könnte.

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract	I
Zusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Definition und Epidemiologie von Asthma bronchiale	2
1.2 Ätiologie und pathobiologische Heterogenität	2
1.2.1 Pathogenese von T _H 2-vermitteltem Asthma	6
1.2.2 Pathogenese von nicht T _H 2-vermitteltem Asthma	8
1.3 Die Rolle des respiratorischen Epitheliums	10
1.4 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	12
1.4.1 TGF- β Signaltransduktion	14
1.4.2 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf EMT	17
1.5 Momentane Therapiestrategien für Asthma	17
1.6 Zielsetzung	18
2. Material & Methoden	21
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen	24
2.1.3 Antikörper	29
2.1.4 Inhibitoren	31
2.1.5 Kits	31
2.1.6 Oligonukleotide	32
2.1.7 Plasmide	36
2.1.8 Zytokine und Wachstumsfaktoren	37
2.1.9 Anzucht von Pilzen und Bakterien	37
2.1.10 Zellkultur	39
2.2 Methoden	40
2.2.1 Kultivierung von Pilzen	40
2.2.2 Fermentation in Submerskultur im 20 l-Maßstab	40
2.2.3 Fermentationsanalysen	40
2.2.4 Säulenchromatographische Auftrennung der Rohextrakte ..	41
2.2.5 HPLC-Analyse	41
2.2.6 Kultivierung von Bakterien	42
2.2.7 Präparation von Nukleinsäuren	42
2.2.8 Restriktion und Gelelektrophorese	43

2.2.9	Kultivierung eukaryotischer Zellen	44
2.2.10	Transfektionsmethoden	45
2.2.11	Reporterassays	46
2.2.12	Epithelial-mesenchymale Transition.....	47
2.2.13	Isolation von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese.....	47
2.2.14	Quantitative Real-Time PCR.....	48
2.2.15	Isolierung von Proteinen, SDS-PAGE und Western Blot ...	51
2.2.16	ProteomProfiler	53
2.2.17	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	53
2.2.18	Nachweis von Apoptose/Nekrose per Durchflusszytometrie	55
3.	Ergebnisse	57
3.1	Isolierung von Cyclonerodiol aus <i>Fusarium sp.</i>.....	58
3.1.1	Fermentation von <i>Fusarium sp.</i> und Optimierung der Ausbeute von Cyclonerodiol	58
3.2	Biologische Charakterisierung von Cyclonerodiol	59
3.2.1	Wirkung von Cyclonerodiol in verschiedenen Reporterassays in A549-Zellen	59
3.2.2	Effekt von Cyclonerodiol auf die mRNA-Expression Asthma-relevanter Gene in A549-Zellen	62
3.2.3	Effekt von Cyclonerodiol auf die Expression Asthma-relevanter Proteine in A549-Zellen.....	64
3.2.4	Wirkung von Cyclonerodiol in verschiedenen Reporterassays in Jurkat-Zellen.....	66
3.3	Untersuchungen zum Wirkmechanismus.....	69
3.3.1	Tyrosin-Phosphorylierung von STAT6.....	69
3.3.2	Translokation von aktiviertem STAT6 in den Nukleus	69
3.3.3	Aktivierung des IRS-1/2 Signalweges	70
3.3.4	Interaktion von STAT6 mit dem Coaktivator CBP/p300	74
3.3.5	Bindung von STAT6 an den Eotaxin-Promoter.....	75
3.4	Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf EMT.....	76
3.4.1	Zellmorphologie & Expression von Markergenen.....	76
3.4.2	EMT-assoziierte Signalwege.....	79
3.4.3	EMT-assoziierte Transkriptionsfaktoren	82
3.5	Oxacyclododecindion aus <i>Exserohilum rostratum.</i>.....	85
3.5.1	Wirkung auf Asthma-relevante Signalwege	85
3.5.2	Wirkung auf die epithelial-mesenchymale Transition	88
3.5.3	Untersuchungen zum Wirkmechanismus	90

4. Diskussion	97
4.1 Suche nach neuen Wirkstoffen	98
4.2 Cyclonerodiol aus <i>Fusarium sp.</i>	99
4.2.1 Biologische Charakterisierung	101
4.2.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus	105
4.3 Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf EMT.....	110
4.3.1 Induktion von EMT	110
4.3.2 Aktivierung EMT-assoziiierter Signalwege	111
4.3.3 Expression EMT-assoziiierter Transkriptionsfaktoren.....	114
4.4 Oxacyclododecindion zur Behandlung von Asthma.....	119
4.4.1 Inhibierung inflammatorischer Pathomechanismen.....	120
4.4.2 Inhibierung von EMT.....	123
4.4.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus	125
4.5 Perspektiven für Single- und Multi-Target-Drugs.....	130
Literatur	133
Abkürzungsverzeichnis	155
Curriculum Vitae	161
Danksagung	165
Eigenständigkeitserklärung	167

EINLEITUNG

1.

3.1 Definition und Epidemiologie von Asthma bronchiale

Bei Asthma bronchiale handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege charakterisiert durch variable Atemwegsobstruktion sowie bronchiale Hyperreagibilität¹. Dabei besteht eine Überempfindlichkeit der Bronchien gegenüber diversen Stimuli, die eine konstriktive Antwort der glatten Muskelzellen auslöst. Die so verursachte Obstruktion der Atemwege wird durch Schleimhautschwellungen und Mucussekretion noch verstärkt und hat typische Symptome wie Husten und Atemnot zur Folge. Aufgrund des erhöhten Atemwegswiderstandes findet während eines Asthmaanfalls kein kompletter Luftaustausch beim Ein- und Ausatmen mehr statt, wodurch die bereits in den Alveolen vorhandene Luft nicht mehr vollständig entweichen kann. Als Folge überbläht die Lunge, wodurch auch das Einatmen zunehmend schwieriger wird und sich die Sauerstoffabgabe an das Blut stetig verringert. Erfolgen keine medizinischen Gegenmaßnahmen und die schwere Symptomatik hält an, spricht man von einem *Status asthmaticus*, bei dem es sich um einen lebensbedrohlichen Zustand handelt, da die lang anhaltende, reduzierte Sauerstoffsättigung zum Koma und schließlich zum Atemstillstand führen kann². Langfristig gesehen verursacht die chronische Entzündung in den Atemwegen aufgrund reparativer Prozesse strukturelle Veränderungen der Bronchialwand, die unter dem Begriff *airway remodeling* zusammengefasst werden und eine irreversible Abnahme der Atemwegsfunktion zur Folge haben. Diese Veränderungen, zu denen u.a. subepitheliale Fibrose, Hypertrophie (Größenzunahme) der glatten Muskelzellen und Hyperplasie (Zunahme der Zellzahl) der Mucus-produzierenden Becherzellen zählen, verstärken zusätzlich auch die Hyperreaktivität der Bronchien³.

Asthma stellt eine schwere medizinische und wirtschaftliche Belastung mit steigender Prävalenz dar und tritt in allen Ländern auf, unabhängig von deren Entwicklungsstand⁴. Laut Schätzungen der World Health Organization (WHO) ist Asthma die bei Kindern am häufigsten auftretende chronische Krankheit und weltweit sind mehr als 300 Millionen Menschen betroffen⁵.

3.2 Ätiologie und pathobiologische Heterogenität

Der Begriff Asthma bronchiale fasst mehrere heterogene Krankheitsbilder mit unterschiedlichen Phänotypen zusammen, die alle mit den klinischen Symptomen bronchialer Hyperreagibilität und Atemwegsobstruktion einhergehen. Diese Heterogenität spiegelt sich auch wider in der medizinischen Klassifikation von Asthma in vier Schweregrade (intermittierend, leicht, mittelgradig und schwer), die anhand der Symptome, des Ausmaßes der Atemwegsobstruktion sowie der Variabilität der Lungenfunktion erfolgt. Die Therapie orientiert sich an dem vorliegenden Schweregrad und kann bei mangelnder Asthmakontrolle stufenweise intensiviert werden⁶. Die komplexen Krankheitsbilder von Asthma entstehen aus dem Zusammenspiel genetischer Risikofaktoren und multiplen Kofaktoren wie Umwelteinflüssen und Lebensgewohnheiten. Als Risikofaktoren, die die Entstehung von Asthma fördern, werden primär genetische Faktoren eingestuft, die z.B. für Atopie (Neigung zu allergischen Reaktionen) oder Hyperreagibilität prädisponieren, aber auch das Geschlecht und Adipositas

sind entscheidend. Die spezifischen Mechanismen jedoch, über die Risikofaktoren zur Pathogenese von Asthma beitragen, sind noch nicht vollständig geklärt. Außerdem scheinen einzeln vorliegende, genetische Risikofaktoren nicht mit einem erhöhten Asthmarisiko zu korrelieren, da z.B. lediglich eine Minderheit aller Atopiker (7%) auch Asthma entwickelt. Desweiteren rücken entwicklungspezifische Aspekte, wie z.B. die Reifung des Immunsystems sowie der Kontakt mit Infektionserregern und Allergenen im Kindesalter, immer mehr in den Fokus der Forschung als Faktoren, die das Asthmarisiko zusätzlich modifizieren. Zu den Auslösern von Asthma, den sogenannten Triggern, zählen Umweltfaktoren wie Allergene (z.B. Tierhaare, Pollen, Hausstaubmilben), Aktiv- und Passivrauchen, Luftverschmutzung, virale Infekte, u.v.m.⁷⁻¹⁰.

Eine erste Differenzierung in verschiedene Asthmaformen erfolgte 1947 durch Rackemann, der zwischen extrinsischem (allergischem) und intrinsischem (nicht-allergischem) Asthma unterschied. Laut Rackemann wurde extrinsisches Asthma bei Allergikern durch extrinsische Faktoren ausgelöst, während mit intrinsischem Asthma weder eine allergische Vorgeschichte noch extrinsische Faktoren wie Allergene assoziiert waren¹¹. Allerdings wurde

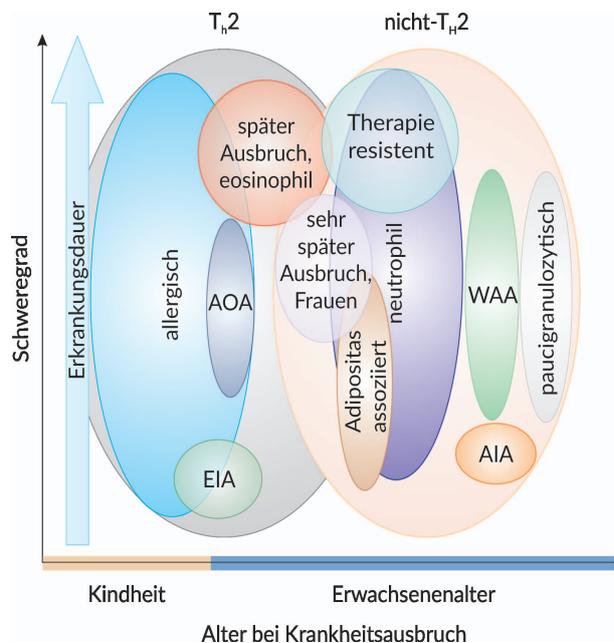


Abbildung 1: Theoretische Gruppierung der bisher klassifizierten Subtypen von Asthma basierend auf Auslösern, klinischen sowie immunpathologischen Parametern.

Die unterschiedlichen Subtypen sind anhand des Schweregrades der asthmatischen Erkrankung und Alters bei Krankheitsausbruch aufgetragen. Immunpathologisch wird unterschieden zwischen T_H2 - und nicht T_H2 -vermittelter Immunantwort sowie der dominanten Granulozytenart (eosinophil, neutrophil, paucigranulozytisch) in den Atemwegen. T_H2 -polarisiertes Asthma kann sich bereits im Kindesalter entwickeln oder erst im Erwachsenenalter auftreten, während für nicht T_H2 -Phänotypen das späte Auftreten im Erwachsenenalter charakteristisch ist. Bei allen Subtypen korreliert dabei der Schweregrad der Krankheit mit der Erkrankungsdauer. AIA: aspirin induced asthma; AOA: allergic occupational asthma; EIA: exercise induced asthma; T_H2 : T-Helferzellen Typ 2; WAA: work-aggravated asthma.

die These von Rackemann bzgl. der nicht vorhandenen externen Trigger bei intrinsischem Asthma mittlerweile revidiert, da dieses häufig durch eine bakterielle oder virale Infektion der Atemwege ausgelöst wird ¹².

Allergisches Asthma tritt bei über 80% der Asthmatiker auf, ist die dominante Ausprägungsform bei Kindern und wird durch eine deregulierte allergische Immunantwort ausgelöst ¹³. Bei der intrinsischen Variante hingegen entsteht die Entzündung ohne allergische Reaktion, die Betroffenen reagieren stattdessen hypersensibel auf unspezifische Reize wie körperliche Anstrengung oder Kälte. Diese Form liegt weniger häufig vor und tritt tendenziell vermehrt bei neu erkrankten Erwachsenen auf ¹². Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass das Konzept nach Rackemann der Bandbreite an asthmatischen Phänotypen nicht gerecht wird. Mittlerweile wird Asthma anhand von auslösenden Faktoren (z.B. Allergene, körperliche Anstrengung, Medikamente), klinischen Parametern (Alter bei Krankheitsausbruch, Schweregrad) und immunpathologischen Merkmalen (dominanter Immunzelltyp) klassifiziert, wobei auch Mischformen der einzelnen Phänotypen auftreten (s. Abb.1) ¹⁴. Bei der Unterteilung nach klinischen Phänotypen unterscheidet man z.B. Alter-bezogenes Asthma mit frühem (Kindheit) oder spätem (Erwachsenenalter) Ausbruch und therapieresistentes Asthma, das meist auch durch eine hohe Anzahl neutrophiler Granulozyten gekennzeichnet ist. Die

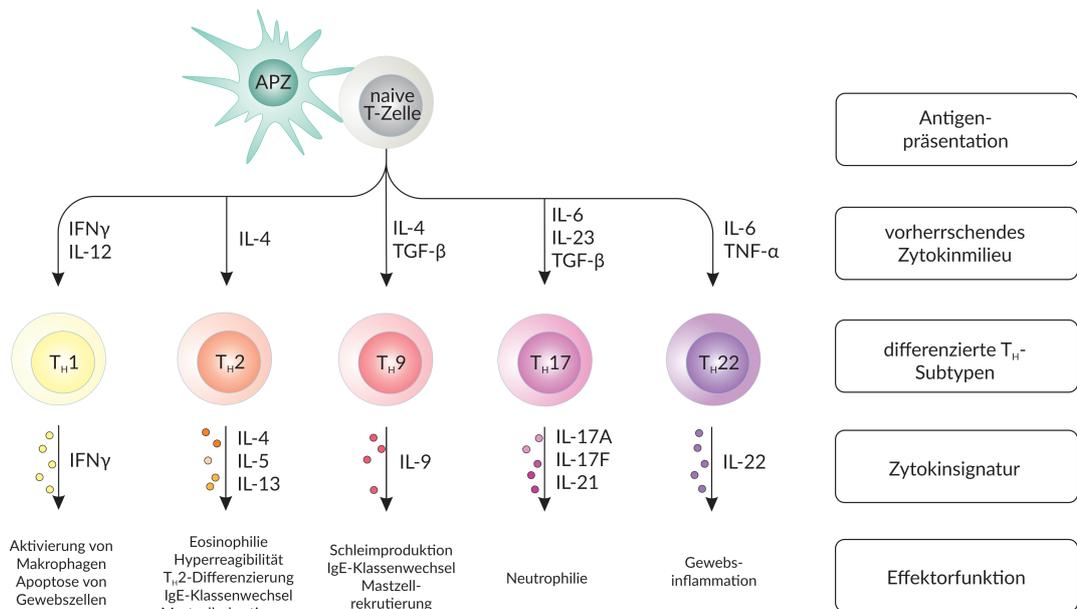


Abbildung 2: Asthma-relevante Differenzierungsmöglichkeiten einer naiven T-Zelle in T-Helferzellen und deren Asthma-spezifischen Effektorfunktionen.

Nach Aktivierung durch ein präsentiertes Antigen legt das Zytokinmilieu den weiteren Differenzierungsweg der naiven T-Zelle fest. Die verschiedenen T_H-Zell-Subtypen unterscheiden sich voneinander u.a. durch ihr charakteristisches Zytokinmuster und beeinflussen dadurch die Immunantwort. Das Profil der vorherrschenden T_H-Subtypen ist deshalb von entscheidender Bedeutung bei der Pathogenese der unterschiedlichen asthmatischen Phänotypen. APZ: Antigen-präsentierende Zelle; IFN: Interferon; IgE: Immunglobulin E; IL: Interleukin; T_H: T-Helferzelle; TGF: Transforming growth factor; TNF: Tumor necrosis factor.

Einteilung unter immunpathologischen Aspekten erfolgt anhand der Präsenz dominanter Immunzelltypen (T_H2 -Zellen, Eosinophile, Neutrophile) oder deren Abwesenheit (nicht- T_H2 , weder eosinophil noch neutrophil (paucigranulozytisch)). Zudem findet auch eine Gruppierung mittels auslösender Faktoren statt, zu denen Belastung (exercise induced asthma), Medikamente (z.B. aspirin induced asthma) und pathogene Stoffe am Arbeitsplatz (work-aggravated asthma & allergic occupational asthma) zählen. Für alle Phänotypen gilt dabei, dass der Schweregrad der Krankheit mit der Erkrankungsdauer korreliert. Obwohl es noch keine anerkannte standardisierte Methode der Klassifikation gibt, hat die detaillierte Klassifikation vor allem in der Asthmathherapie eine immense Bedeutung, da sie es in Zukunft ermöglichen kann, geeignete Therapiekonzepte individuell für jeden Patienten zu erstellen ^{6,15-17}.

Das pathologische Hauptmerkmal aller Asthmaphänotypen ist die chronische Entzündungsreaktion, die durch eine komplexe Interaktion zwischen residenten Zellen der Atemwege und infiltrierenden Immunzellen entsteht und langfristig aufrechterhalten wird. Obwohl eine Vielzahl von Zellen an diesem Prozess beteiligt ist, ist die Zusammenstellung der differenzierten T-Helferzellen im Lungengewebe maßgeblich an der Ausprägung des asthmatischen Phänotyps beteiligt. Durch die Produktion von Zytokinen, die charakteristisch sind für jeden Subtyp der T-Helferzellen, koordinieren sie entzündliche Kaskaden und rekrutieren spezifisch weitere Immunzellen in die Atemwege ¹⁸. Die verschiedenen T_H -Subtypen differenzieren dabei aus Vorläuferzellen, die das Oberflächenantigen CD4 besitzen ($CD4^+$). Nach dem momentanen Stand können $CD4^+$ -Zellen in sechs unterschiedliche T-Helferzellen differenzieren, wobei die Art der Antigenpräsentation sowie das vorherrschende Zytokinmilieu den Differenzierungsweg determinieren. Die T_H -Subtypen unterscheiden sich voneinander durch ihr charakteristisches Zytokinprofil, durch welches sie ihre immunologische Effektorfunktion ausüben, und die asthmatischen Phänotypen werden entscheidend durch die spezifische Zusammenstellung sowie verhältnismäßige Relation der T-Helferzellen geprägt (s. Abb. 2) ¹⁹.

Während eine kurzzeitige Imbalance im Verhältnis der T_H -Subtypen eine effiziente zelluläre Immunabwehr ermöglicht, führen dauerhaft gestörte Gleichgewichte zur Ausbildung von Krankheiten. So sind Auto-Immunprozesse wie Diabetes mellitus oder Morbus Crohn mit einem immunologischen Ungleichgewicht zugunsten von T_H1 -Zellen assoziiert, während T_H2 -dominierte Immunantworten allergische Reaktionen auslösen. Auch im Fall von allergischem Asthma tritt eine T_H2 -polarisierte Immunantwort auf, während bei nicht T_H2 -vermitteltem Asthma vor allem T_H1 - und T_H17 -Zellen die Immunantwort dominieren. T_H9 und T_H22 -Zellen können zusätzlich zu den bereits genannten T-Helferzellen in den Atemwegen von Asthmatikern auftreten, spielen allerdings bisherigen Kenntnissen zufolge nur eine untergeordnete Rolle bei der Ausprägung des asthmatischen Phänotyps ¹⁹. Die Differenzierung der T-Zellen gehört dabei zu den ersten zellulären Mechanismen in der Pathogenese von Asthma und der dominante T_H -Zelltyp prägt auch die Therapieantwort maßgeblich ²⁰.

3.2.1 Pathogenese von T_H2 -vermitteltem Asthma

Bei allergischem Asthma führt der initiale Kontakt mit einem inhalierten Antigen zu einer Sensibilisierung des Immunsystems, die bei erneutem Kontakt mit derselben Antigenart eine allergische Atemwegsinfektion auslöst. Das Antigen wird bei Erstkontakt von Antigen-präsentierenden Zellen (APZs) über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen und zu Peptiden prozessiert, die an neu synthetisierte major histocompatibility complex (MHC) Moleküle gebunden werden. Diese MHC-Peptid-Komplexe werden in die Zellmembran der Antigen-präsentierenden Zelle integriert und in den Lymphknoten an Lymphozyten präsentiert. In Anwesenheit spezifischer Zytokine wie Interleukin-4 (IL-4) differenzieren naive T-Zellen nach Antigenpräsentation zu T_H2 -Zellen, die daraufhin B-Lymphozyten zur Bildung von Antigen-spezifischem Immunglobulin E (IgE) anregen. In den Atemwegen sezernieren die differenzierten T-Zellen zudem T_H2 -spezifische Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13, welche die Immunantwort bei erneutem Allergenkontakt verstärken²¹. Dabei fördert IL-4 in einer positiven Rückkopplung die Differenzierung weiterer T_H2 -Zellen, während IL-5 die Proliferation, Differenzierung, Reifung, Migration sowie das Überleben von eosinophilen Granulozyten begünstigt²². IL-13 reguliert hingegen die IgE-Synthese und induziert die Expression von

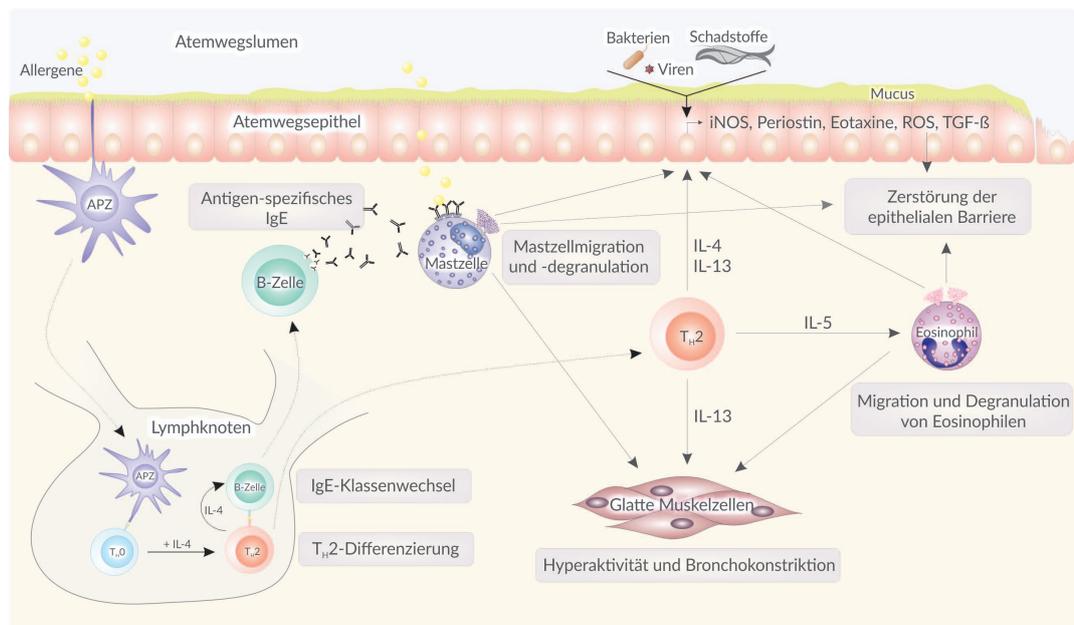


Abbildung 3: T_H2 -vermittelte Immunantwort bei allergischem Asthma.

Aufgenommene Allergene werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) prozessiert und die Antigene in den Lymphknoten an Lymphozyten präsentiert, was eine Immunantwort über T_H2 -Zellen fördert. Deren produzierte Zytokine IL-4, -5 und -13 lösen in den Atemwegen bei erneutem Allergenkontakt eine allergische Inflammation aus, die durch IgE-Produktion und Degranulation von Mastzellen gekennzeichnet ist. Desweiteren fördern die T_H2 -Zytokine eine eosinophile Inflammation und führen zur Hyperreagibilität von glatten Muskelzellen. Die verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch bronchiale Epithelzellen in Kombination mit eosinophilen Proteasen führt zur dauerhaften Schädigung des Atemwegsepitheliums. APZ: Antigen-präsentierende Zelle; IgE: Immunglobulin E; IL: Interleukin; iNOS: inducible NO-synthase; ROS: reactive oxygen species; T_H2 : T-Helferzelle Typ 2; TGF- β : transforming growth factor β .

Adhäsionsmolekülen sowie Chemokinrezeptoren, wodurch weitere Immunzellen rekrutiert werden²³. Zudem modelliert IL-13 die Funktion von residenten Zellen der Atemwege wie Epithelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen und trägt somit auch zur chronischen Inflammation, der Hyperreagibilität von glatten Muskelzellen sowie fibrotischen Prozessen bei (s. Abb. 3)^{24,25}.

Die Immunantwort nach erneutem Allergenkontakt wird in zwei Phasen unterteilt: in der frühen Phase, die innerhalb von Minuten eintritt, bindet das Allergen spezifisch an IgE, das an der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen an hoch-affinen IgE Rezeptoren (FcεR) gebunden ist. Dies führt zur Degranulation und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie Histamin und Leukotrienen. Diese verursachen in den Atemwegen eine Bronchokonstriktion und erhöhte Mucusproduktion, die Kurzatmigkeit und Atemnot auslösen, die klassischen Symptome eines akuten Asthmaanfalls. Die freigesetzten Mediatoren bewirken zudem eine Dilatation der Blutgefäße, was den Influx weiterer Immunzellen in das Lungengewebe verstärkt. Diese infiltrierenden Immunzellen prägen die späte Phase der allergischen Reaktion, die etwa 4-6 Stunden nach Allergenkontakt beginnt und vor allem durch eosinophile Granulozyten und der von ihnen verursachten eosinophilen Inflammation gekennzeichnet ist²¹. Die durch IL-5 angelockten eosinophilen Granulozyten sekretieren dabei Lipidmediatoren wie Cysteinylleukotriene, die zur Bronchokonstriktion beitragen, die vaskuläre Permeabilität erhöhen und weitere Immunzellen rekrutieren²¹. Eosinophile Granulozyten zeichnen sich zudem ihre azidophilen Granula aus, in denen sie proteolytische Enzyme wie Proteasen und Lysophospholipasen speichern sowie das major basic protein-1 (MBP-1), die antibakteriell und zytotoxisch wirken und an der Immunabwehr beteiligt sind²⁶⁻²⁸. Die Deregulation der späten Phase bei allergischem Asthma führt zu einer verstärkten Akkumulation von Eosinophilen und einer persistierenden eosinophilen Inflammation, die durch erhöhte Konzentrationen von eosinophilen Granulaproteinen und Mediatoren im Lungengewebe gekennzeichnet ist. Zudem wirkt MBP-1 nicht nur zytotoxisch auf Bakterien und Helminthen, sondern auch auf Säugetierzellen, indem es Brüche in Membranen verursacht und so das Bronchialepithel schädigt²⁹. Desweiteren erhöht es die Reaktivität der glatten Muskelzellen und stimuliert in alveolaren Makrophagen sowie Neutrophilen die Produktion von Superoxiden³⁰⁻³². Reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid lösen in glatten Muskelzellen Kontraktionen aus und agieren in Epithel- sowie Immunzellen als Botenstoffe, indem sie Transkriptionsfaktoren wie nuclear factor-κB (NFκB) und activator protein-1 (AP-1) aktivieren³³⁻³⁵. Die direkte Gabe von MBP-1 in die Atemwege von Mäusen konnte zudem auch die epitheliale Produktion von transforming growth factor β (TGF-β) auslösen, der die Proliferation von Fibroblasten sowie die Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix fördert und somit zur subepithelialen Fibrose bei Asthma beiträgt³⁶. Während die späte Phase einer allergischen Reaktion bei gesunden Menschen nach ein bis zwei Tagen wieder abklingt, persistiert sie bei Asthmatikern und stellt den wesentlichen pathologischen Prozess für die Chronifizierung der Entzündung dar^{37,38}.

3.2.2 Pathogenese von nicht T_H2 -vermitteltem Asthma

Im Vergleich zu T_H2 -vermitteltem Asthma gibt es momentan nur wenige Erkenntnisse über die pathologischen Zusammenhänge bei nicht T_H2 -vermitteltem Asthma. Ein Vergleich der beiden asthmatischen Subtypen bezüglich der zellulären Zusammenstellung erfolgte dabei von Amin *et al.*: Während die Atemwegsinflammation bei Patienten mit T_H2 -vermitteltem Asthma vor allem durch eine hohe Anzahl an Eosinophilen und Mastzellen charakterisiert war, wurden bei Patienten mit nicht T_H2 -vermitteltem Asthma neben Mastzellen vor allem Neutrophile vermehrt nachgewiesen³⁹. Das Ausmaß der Neutrophilie korreliert dabei mit dem Schweregrad von Asthma und neutrophile Inflammationen treten vor allem bei Patienten mit schwerem, Steroid-resistentem Asthma auf. Neutrophile Granulozyten werden im Gegensatz zu eosinophilen durch Glukokortikoide kaum in ihrer Funktion beeinflusst. Stattdessen wird die Apoptose von Neutrophilen durch Glukokortikoide inhibiert, was die verstärkte Akkumulation dieser Zellen sowie Therapie-Resistenz bei Patienten mit schwerem, Steroid-resistentem Asthma erklären könnte⁴⁰⁻⁴².

Zu den Induktoren einer neutrophilen Inflammation zählt u.a. IL-17 und erhöhte Konzentrationen dieses Zytokins konnten bereits im Sputum (abgehustetes Sekret) von Patienten mit schwerem Asthma nachgewiesen werden. Desweiteren wird die Expression von IL-17 bei Asthmatikern durch die Gabe von Glukokortikoiden nicht inhibiert⁴³⁻⁴⁵. Als Hauptproduzenten von IL-17 werden T_H17 -Zellen angesehen. So konnte in Mäusen, in die zuvor Ovalbumin (OVA)-spezifische T_H17 -Zellen transferiert wurden, eine Hyperreagibilität der Atemwege sowie Steroid-insensitive Inflammation durch OVA-Reizung hervorgerufen werden, was für eine Beteiligung von T_H17 -Zellen in der Pathogenese von nicht T_H2 -vermitteltem Asthma spricht⁴⁶. Zudem geht dem Ausbruch von nicht T_H2 -vermitteltem Asthma häufig eine virale oder bakterielle Infektion voraus und IL-17 ist eng assoziiert mit Immunreaktionen in den Atemwegen, die durch Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Klebsiella pneumoniae* ausgelöst werden⁴⁷. Ebenso wurde von Wiehler *et al.* auf eine Rolle von IL-17 bei der Rekrutierung von Neutrophilen bei viralen Infektionen hingewiesen⁴⁸. Ungeklärt ist allerdings noch, welcher Zelltyp bei Asthma in den verschiedenen Phasen für die Produktion von IL-17 in den Atemwegen verantwortlich ist. Obwohl IL-17 ursprünglich als Produkt von T_H17 -Zellen identifiziert wurde, konnten mittlerweile auch $\gamma\delta$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Gedächtniszellen, Neutrophile sowie Monozyten als Quelle ermittelt werden⁴⁹. Zwar gelten T_H17 -Zellen als die hauptsächlichen Produzenten von IL-17, aber vor allem $\gamma\delta$ T-Zellen werden als Quelle von IL-17 in der frühen Phase inflammatorischer Antworten diskutiert, da sie in der Lage sind, direkt nach ihrer Aktivierung IL-17 zu sekretieren. Somit könnten sie in der frühen Phase den Hauptanteil an IL-17 produzierenden Zellen darstellen, da zu diesem Zeitpunkt die Differenzierung von T_H17 -Zellen noch nicht vollendet ist⁵⁰. Desweiteren benötigen $\gamma\delta$ T-Zellen zur Aktivierung keine Antigenpräsentation, sondern reagieren auf endogene Stressmarker, sogenannte DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules), die einen Pathogenbefall signalisieren⁵¹⁻⁵³. Diese DAMPs sind u.a. im Inneren von Zellen zu finden und werden bei Schädigung freigesetzt. Die Gruppe der DAMPs setzt sich dabei aus äußerst unterschiedlichen Molekülen zusammen wie z.B. ATP, RNA oder

DNA, die durch Bindung an Immunzellen diverse Immunantworten initiieren können⁵⁴. Bei nicht- T_H2 getriebenem Asthma werden durch die Schädigung der bronchialen Epithelzellen DAMPs freigesetzt, wobei die Schädigungen durch jahrelange Belastung mit Schadstoffen oder Zigarettenrauch verursacht werden. Die freigesetzten DAMPs aktivieren Makrophagen, welche wiederum weitere Immunzellen wie Neutrophile sowie T_H17 -Zellen rekrutieren und so eine neutrophile Inflammation verursachen. Ein Befall mit Viren oder Bakterien leitet die Differenzierung von T_H17 -Zellen ein, welche durch ihre sekretierten Zytokine IL-17 und IL-22 in Epithelzellen die Expression weiterer proinflammatorischer Chemokine fördern, was die Entzündungsreaktion zusätzlich verstärkt (s. Abb. 4)⁵⁵.

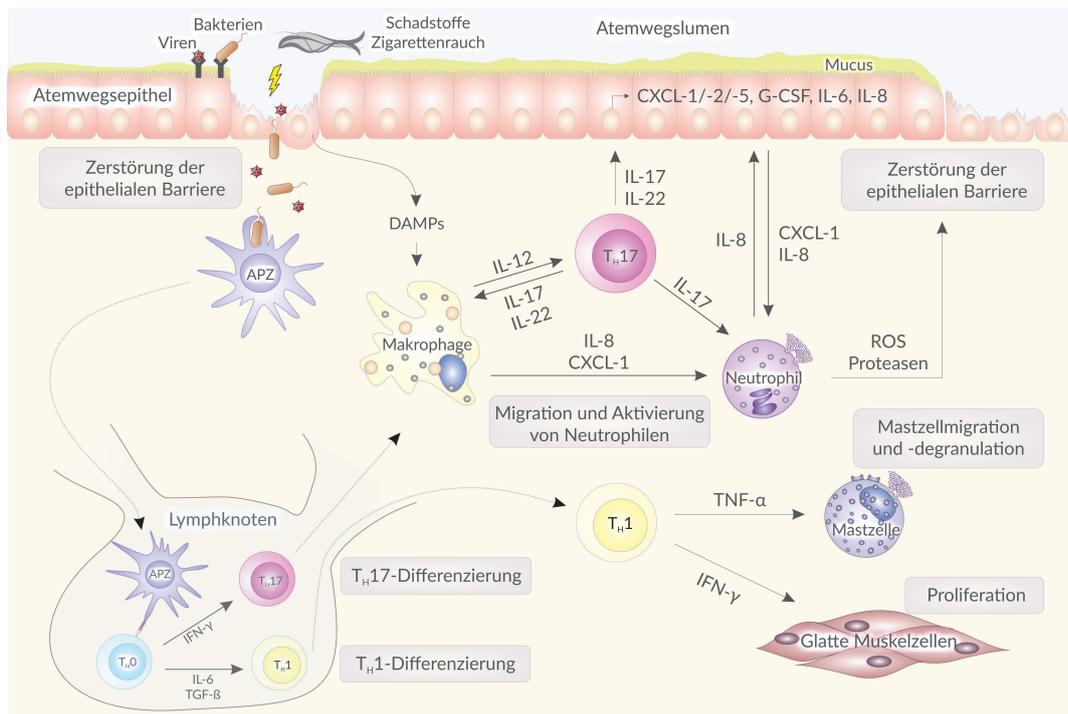


Abbildung 4: Potentielle Faktoren, die nach dem momentanen Stand der Forschung an der Pathogenese von nicht T_H2 -vermitteltem Asthma beteiligt sind.

Zu den möglichen Auslösern von nicht T_H2 -vermitteltem Asthma werden oxidativer Stress, virale bzw. bakterielle Infektionen, Zigarettenrauch und Schadstoffe gezählt. Verursachen diese Faktoren Schädigungen des Epithels, werden DAMPs (damage-associated molecular pattern molecules) aus dem Zellinneren der Epithelzellen frei, die durch Bindung an Immunzellrezeptoren eine Immunantwort initiieren. Antigen-präsentierende Zellen (APZs) fördern zudem bei Viren- und Bakterienbefall die Differenzierung von T_H1 - sowie T_H17 -Zellen. Durch ihre Produktion von IL-17 und IL-22 aktivieren T_H17 -Zellen Makrophagen, rekrutieren Neutrophile und induzieren die Expression von Chemo- und Zytokinen in Epithelzellen. Durch ihre Produktion von ROS sowie Proteasen schädigen Neutrophile zusätzlich die epitheliale Barriere. T_H1 -Zellen wird wegen ihrer TNF- α Sekretion eine Rolle bei der Aktivierung von Mastzellen zugesprochen, während T_H1 -spezifisches IFN- γ die Proliferation von glatten Muskelzellen fördert.

APZ: Antigen-präsentierende Zelle; CXCL: Chemokin (C-X-C motif) Ligand; DAMP: damage-associated molecular pattern molecules; G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor; IFN: Interferon; IL: Interleukin; ROS: reactive oxygen species; TGF: transforming growth factor; T_H : T-Helferzelle; TNF- α : tumor necrosis factor α .

Auch T_H1 -Zellen werden in der Pathogenese von nicht T_H2 -vermitteltem Asthma kontrovers diskutiert. Sie fördern durch ihre Sekretion von TNF- α die Aktivierung von Mastzellen und Makrophagen, wobei letztere durch ihre Produktion von IL-27 eine Steroid-insensitive Inflammation sowie Hyperreagibilität induzieren können⁵⁶. Desweiteren fördern sie durch IFN- γ die Proliferation von glatten Muskelzellen, wodurch Bronchokonstriktionen verstärkt werden. Einen Zusammenhang zwischen T_H1 -Zellen und der pulmonären neutrophilen Inflammation wurde dabei von Kim *et al.* gezeigt, die Mäuse zunächst gegen Hausstaubmilben sensibilisierten und danach durch Milben-Provokation eine neutrophile Inflammation in den Atemwegen von Mäusen auslösen konnten, die nicht nur durch eine Ansammlung von T_H17 -Zellen, sondern auch T_H1 -Zellen geprägt war⁵⁷.

3.3 Die Rolle des respiratorischen Epitheliums

Die Lunge ist mit einer geschätzten Oberfläche von 100 m² die größte Oberfläche des menschlichen Körpers, die in ständigem Kontakt mit der Außenwelt steht. Täglich passieren die Lunge etwa 10.000 l inhalede Luft, die Allergene, Erreger und Schadstoffe beinhalten können. Das Lungenepithel stellt dabei die erste Kontaktfläche zwischen Körper und potentiellen Schadstoffen dar.

Angrenzende Epithelzellen sind adhäsiv über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden, die als selektive Permeabilitätsschranke fungieren. Hierdurch bildet das Epithel eine effiziente physische Barriere, die zusammen mit dem mukoziliären Apparat die erste Abwehrlinie gegen Pathogene darstellt⁵⁸. Die Epithelzellen der Lunge agieren jedoch nicht nur passiv bei der Immunabwehr in Form einer physischen Barriere, sondern regulieren auch aktiv die Immunantwort⁵⁹. So sind die sekretorischen Zellen des Epitheliums Produzenten von immunmodulatorischen Mediatoren, zu denen antioxidative Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase) und antibakterielle Stoffe (Lactoferrin, Lysozym) zählen. Desweiteren sekretieren sie Komponenten des Komplement-Systems wie Opsonine und β -Defensine, die sich an Bakterienzellen anlagern und so die Phagozytose durch Makrophagen erleichtern^{60,61}. Epithelzellen weisen eine polare Struktur auf, wobei sich die dem Lumen zugewandte (apikale) Membran strukturell und funktionell von der seitlichen (lateralen) und der basalen Membran unterscheidet. Auf der Lumenseite ist das respiratorische Epithel von einem kontinuierlichen, viskosen Flüssigkeitsfilm bedeckt, der abgelagerte Fremdpartikel im Flüssigkeitsfilm einbindet. Zusammen mit dem Flüssigkeitsfilm werden die Fremdpartikel durch den koordinierten Zilienschlag der Epithelzellen rachenwärts und somit wieder aus der Lunge transportiert (Mukoziliärtransport). Einige Partikel verbleiben allerdings Tage bis Wochen im Flüssigkeitsfilm, eng assoziiert mit dem Epithel. Diese Partikel werden von Makrophagen, die sich im Alveolarraum befinden, phagozytiert, wodurch diese in der Lage sind, kleine Inocula an Mikroben zu eliminieren, die täglich in die Lunge gelangen⁶².

Sind die Atemwege mit größeren Mengen an Mikroben konfrontiert, sekretieren Alveolarmakrophagen Zytokine (IL-1, -6 und TNF- α) und Chemokine (IL-8), die die Mikroumgebung zugunsten einer Inflammation verändern⁶³. Darauf reagieren auch residente Epithelzellen, indem sie Zytokine und Chemokine exprimieren, die mit der Initiierung und

Aufrechterhaltung der asthmatischen Inflammation in Verbindung gebracht werden. Hierzu zählen vor allem Chemokine und Zytokine (IL-5, C-C motif ligand 5 (CCL-5), Eotaxin und macrophage chemotactic peptides (MCPs)), die Leukozyten wie Eosinophile, Basophile, T-Zellen und Makrophagen rekrutieren und deren Proliferation sowie Überleben fördern⁶⁴⁻⁶⁶. Die von Epithelzellen sekretierten Chemokine wie der C-C motif ligand 17 und 22 (CCL-17, CCL-22) sind zudem Schlüsselzytokine in der spezifischen Rekrutierung von T_H2-Zellen. Durch die Produktion des Zytokins thymic stromal lymphopoietin (TSLP) ist das Atemwegsepithel zudem in der Lage, eine T_H2-dominierte Inflammation noch zu verstärken, indem es in Monozyten und Mastzellen die Ausschüttung von von T-Zell anlockenden Chemokinen induziert. Über TSLP können Epithelzellen auch direkt mit Antigen-präsentierenden Zellen kommunizieren, die durch das Zytokin aktiviert und zur Produktion von IL-4 angeregt werden, wodurch eine T_H2-polarisierte allergische Immunantwort ausgelöst bzw. potenziert wird^{67,68}. Epithelzellen können aber auch selbst als Sensor für einen Pathogenbefall fungieren und eine Immunantwort auslösen. Sie exprimieren hierfür Zellrezeptoren wie den Protease-aktivierten Rezeptor (PAR), dessen N-terminaler Teil durch exogene Proteasen abgespalten wird und danach selbst als Ligand an den Rezeptor bindet, um diesen zu aktivieren⁶⁹. Nekrotische Epithelzellen setzen zudem endogene damage-associated molecular patterns (DAMPs), sogenannte Alarmine, frei, die eine Inflammation auslösen bzw. verstärken können. Zu diesen Alarminen zählt das in Epithelzellen konstitutiv exprimierte IL-33, das bei einer epithelialen Schädigung freigesetzt wird und an den ST2 Rezeptor auf T_H2-Zellen bindet. Mit Hilfe genomweiter Assoziationsstudien konnten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) der Gensequenzen für IL-33 und dessen Rezeptor ST2 mit Asthma assoziiert werden. Das Zytokin und dessen Signaltransduktion waren bis dato relativ unerforscht gewesen und mit Asthma nicht in Verbindung gebracht worden^{70,71}. Das Zytokin verstärkt die Bildung von IL-5 und -13 in T_H2-Zellen und wirkt in Mäusen sowie im Menschen chemotaktisch für T_H2-Zellen. IL-33 ist zudem in der Lage, durch Bindung an den ST2-Rezeptor auf Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen deren Zytokinsekretion zu forcieren, ohne dabei deren Degranulation auszulösen⁷²⁻⁷⁵.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass das respiratorische Epithel bei Asthmatikern geschädigt ist und aufgrund des ständigen Zyklus von Schädigung und inkompletter Wundheilung eine Beeinträchtigung der Barrierefunktion vorliegt. Durch diesen Prozess werden dauerhaft Wachstumsfaktoren sekretiert, die irreversible strukturelle Veränderungen der Atemwege fördern, was unter dem Begriff airway remodeling zusammengefasst wird⁷⁶. Airway remodeling konnte bereits bei allen Asthma-Phänotypen nachgewiesen werden und das Ausmaß der strukturellen Veränderungen korreliert mit dem Schweregrad der Krankheit⁷⁷. Dabei sind alle Gewebsschichten in der Lunge betroffen, wobei Schädigungen des Epithels, Hyperplasie (Zunahme der Zellzahl) von Mucus-produzierenden Zellen, subepitheliale Fibrose sowie Hypertrophie (Zellvergrößerung) glatter Muskelzellen zu den prominentesten Merkmalen zählen⁷⁶. Diese Veränderungen werden als beständige, bereits früh auftretende Komponente von Asthma aufgelistet und treten auch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung auf (chronic obstructive pulmonary disease, COPD). Da

diese Veränderungen selbst nach jahrelanger Kortisongabe auftreten und die Lungenfunktion irreversibel verringern, liegt die Entwicklung von Strategien zur Therapie von airway remodeling verstärkt im Focus der Forschung^{76,78}.

3.4 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Ein charakteristisches Merkmal des airway remodelings stellt die subepitheliale Fibrose dar, die mit einer Zunahme der Fibroblasten-Zellzahl einhergeht. Ging man zunächst davon aus, dass diese Zunahme auf einer verstärkten Proliferation bereits vorhandener Fibroblasten beruht, konnten histologische Untersuchungen zeigen, dass in Gewebeproben von Patienten mit pulmonärer Fibrose Epithelzellen auftreten, die sowohl epitheliale als auch mesenchymale Markerproteine aufweisen. In diesem Zusammenhang entstand die Hypothese, dass epitheliale Zellen zu mesenchymartigen Fibroblasten redifferenzieren durch einen Prozess, der bereits aus der Embryonalentwicklung bekannt ist und als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird⁷⁹. EMT ist in den frühen Passagen der embryonalen Entwicklung fundamental an der Gastrulation, der Bildung des Herzens sowie des Skelettmuskels und des peripheren Nervensystems beteiligt^{80,81}. Der entgegengesetzte Prozess, MET (mesenchymal-epitheliale Transition), findet hingegen während der Somitogenese sowie Nierenentwicklung statt⁸². Die Reaktivierung von EMT im adulten Organismus wird zur Wundheilung sowie zur Kontrolle von Inflammation eingesetzt⁸⁰. Der Prozess spielt jedoch auch pathophysiologisch bei der Tumprogression eine große Rolle, da entartete Epithelzellen durch EMT einen invasiven Phänotyp erlangen, was die Metastasierung von epithelialen Tumoren ermöglicht⁸³. Mittlerweile konnte EMT auch bei chronisch fibrotischen Erkrankungen der Lunge, Niere, Leber, Augen und des Darms nachgewiesen werden, in denen die Transformation sowohl zur Degeneration epithelialer Strukturen sowie zur übermäßigen Ablagerung von extrazellulärer Matrix beiträgt^{79,84-87}.

Durch EMT nehmen Epithelzellen den charakteristischen Phänotyp von Mesenchymzellen an, was mit erhöhter Migrationskapazität, Invasivität, erhöhter Apoptoseresistenz und verstärkter Produktion von extrazellulären Komponenten einhergeht⁸³. Zu den charakteristischen Merkmalen von Epithelzellen zählen u.a. spezielle Zell-Zell-Kontakte wie Tight junctions, Gap junctions, Adherens junctions und Desmosomen (s. Abb. 5). Tight junctions säumen gürtelartig die Epithelzellen im lateralen Bereich und verbinden über ihre extrazellulären Domänen benachbarte Zellen eng miteinander, wodurch eine Diffusionsbarriere entsteht, die das parazelluläre Eindringen von Molekülen und Mikroorganismen sowie den Ausstrom von Körperflüssigkeiten verhindert. Desweiteren ermöglichen Tight junctions die Polarität von Epithelzellen, indem sie die Fluidität der Membran einschränken und eine laterale Diffusion von Membrankomponenten verhindern⁸⁸. Die Adherens junction verläuft ebenfalls gürtelförmig unter der Tight junction und ihre transmembranöse Verbindung entsteht durch E-Cadherine. Unter den Adherens junctions befinden sich die Desmosomen, deren interzelluläre Haftverbindung ebenfalls aus Cadherinen besteht⁸⁹. Direkt unterhalb der Plasmamembran sind die Cadherine in Proteinplaques aus Desmoplakin verankert, durch welche die Desmosomen auch in Verbindung zu den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts

stehen. Gap junctions verbinden als Poren-bildende Komplexe zwei benachbarte Zellen miteinander und ermöglichen den Austausch von kleinen Molekülen. Dicht unter der Plasmamembran befindet sich die Rinde der Zelle, der sogenannte Kortex, der bei polarisierten Epithelzellen durch kortikale Aktinfasern gekennzeichnet ist. Dieses dichte Maschenwerk aus Aktinfilamenten verleiht der Zelle Stabilität und trägt entscheidend zur Zellform bei. Das periphere Aktinnetz ist zudem mit intrazellulären Proteinen der Tight junctions und Adherens Junctions verbunden, wodurch Epithelzellen mechanisch stabilisiert werden. Die unter der Epithelschicht liegende Basalmembran trennt das Epithel vom Bindegewebe und dient der Verankerung der Epithelzellen mittels Hemidesmosomen ⁹⁰.

Mesenchymzellen bilden im Gegensatz zu epithelialen Zellen keine Schicht kuboidaler Zellen mit interzellulären Adhäsionskomplexen; sie weisen stattdessen eine langgezogene Zellform mit anterior-posterior Polarität auf. Auch das Zytoskelett von Epithelzellen wird während EMT umstrukturiert, wobei kontraktile Stressfasern ausgebildet werden, die aus Bündeln kurzer Aktinfilamente mit eingelagerten Myosinfilamenten bestehen und über Integrine und fokale Adhäsionskomplexe an der Innenseite der Plasmamembran verbunden sind

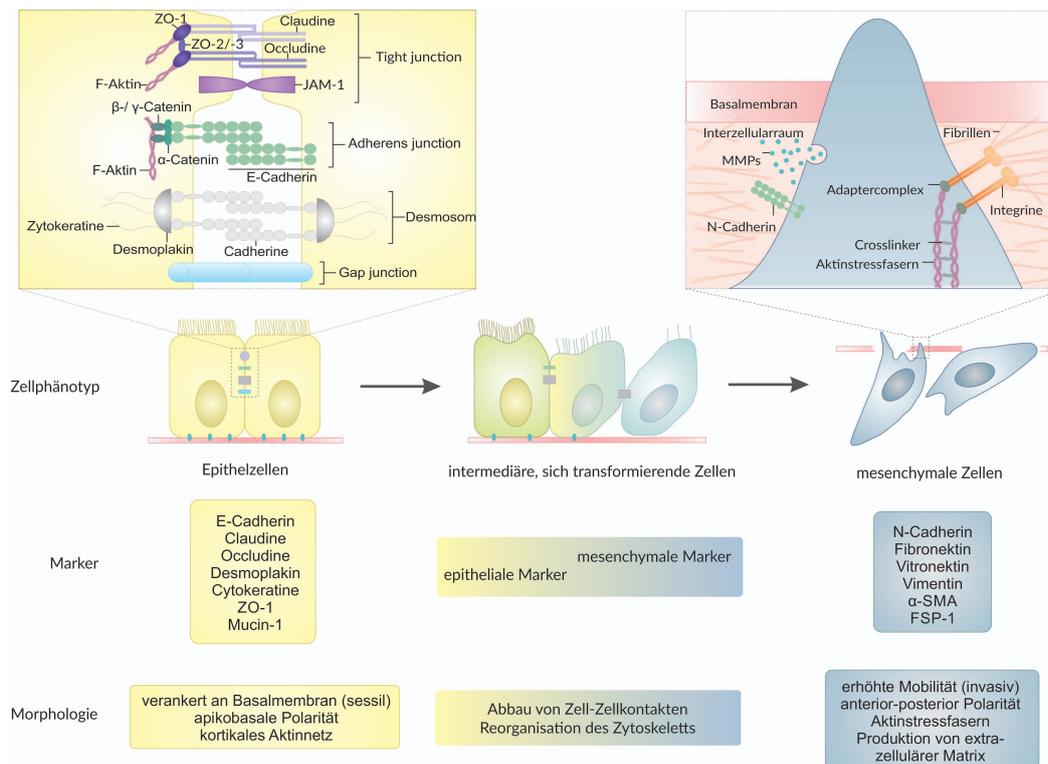


Abbildung 5: Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Während EMT verlieren polarisierte Epithelzellen, die miteinander über Zell-Zell-Kontakte und mit der Basalmembran über Hemidesmosomen verbunden sind, ihre charakteristischen Merkmale und transformieren sich zu mobilen mesenchymalen Zellen, die Proteine (z.B. Fibronectin) der extrazellulären Matrix sekretieren. Aufgelistet sind epitheliale und mesenchymale Markerproteine, wobei das parallele Auftreten von Markerproteinen beider Zelltypen typisch ist für einen intermediären Zelltyp während EMT. α-SMA: α-smooth muscle actin; FSP-1: Fibroblast-specific protein 1; JAM-1: Junctional adhesion molecule 1; MMPs: Matrix-Metalloproteasen; ZO-1: Zonula occludens 1.

⁹¹. Die Kontraktion dieser Stressfasern ermöglicht es, den Zellkörper vorwärts zu bewegen ⁹². Während der EMT werden die Hemidesmosomen abgebaut, wodurch sich die Epithelzellen von der Basalmembran lösen. Durch die Sekretion Matrix-degradierender Enzyme, sogenannter Matrix-Metalloproteasen (MMPs), werden Bestandteile der Basallamina abgebaut, so dass die transformierten Zellen die Basalmembran passieren und aus dem Epithelverbund in das Bindegewebe migrieren können ^{93,94}. Im Bindegewebe vorkommende mesenchymale Zellen werden als Fibroblasten bezeichnet und produzieren Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), zu denen hauptsächlich Kollagen vom Typ I gehört, das zusammen mit den ebenfalls gebildeten Proteoglykanen zur Stabilität der ECM beiträgt. Fibroblasten sind mit der extrazellulären Matrix lediglich über fokale Adhäsionskomplexe verankert, die kurzfristig auf- und abgebaut werden können, was wiederum die Migration der Mesenchymzellen fördert ⁹⁵. Bei Asthmatikern ist die Komposition der extrazellulären Matrix verändert und es liegt eine Ungleichgewichts zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Proteine vor, was mit einer verringerten Elastizität des Gewebes sowie Reduktion der Atemwegsfunktion verbunden ist ⁹⁶.

Die Induktion von EMT wird über ein komplexes Netzwerk extrazellulärer Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen initiiert. EMT fördernde Wirkungen wurden bereits für die Wachstumsfaktoren epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF) und hepatocyte growth factor (HGF) beschrieben. Am besten ist jedoch die Wirkung des profibrotischen Wachstumsfaktors transforming growth factor β (TGF- β) untersucht, der zu den wichtigsten EMT-induzierenden Proteinen zählt ⁹⁷.

3.4.1 TGF- β Signalweg

TGF- β gehört zu einer 42 Proteine umfassenden Familie und diverse zelluläre Prozesse unterliegen der Regulation durch TGF- β , zu denen Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung von embryonalen sowie adulten Zellen zählen. Drei bekannte, hoch homologe Isoformen (TGF- β 1-3) werden in Säugerzellen exprimiert ⁹⁸. Obwohl alle drei Isoformen über denselben Signaltransduktionsweg ihre Wirkung entfalten und sich in ihrer biologischen Aktivität ähneln, werden sie gewebs- und entwicklungsabhängig differentiell exprimiert und Tiere mit defizienten TGF- β Isoformen weisen erhebliche phänotypische Unterschiede auf ⁹⁹. Bei Asthmatikern wurden in bronchialen Biopsieproben erhöhte TGF- β Konzentrationen nachgewiesen, die mit einer erhöhten Fibroblasten-Anzahl korrelieren und sich durch Therapie mit oralen Kortikosteroiden weder verhindern noch senken lassen ¹⁰⁰.

Das TGF- β Signal wird an Zellen über heteromere Komplexe zweier Transmembranrezeptoren vermittelt, bei denen es sich um Serin-/Threonin-Kinasen vom Typ I und II handelt. Bisher konnten fünf Typ II und sieben Typ I Rezeptoren identifiziert werden, die auch als activin receptor-like kinases (ALKs) bezeichnet werden ⁹⁹. Zusätzliche Typ III Co-Rezeptoren sind dabei in Lage, den Zugang der Liganden an die Rezeptoren zu regulieren. Nach Bindung von TGF- β an die extrazelluläre Domäne des Typ II Rezeptors dimerisiert dieser mit dem Typ I Rezeptor, was die Phosphorylierung der Rezeptoren ermöglicht. Die Signalweiterleitung erfolgt hiernach auf zwei Wegen: durch Proteine der Smad-Familie über den kanonischen Signalweg oder Smad-unabhängig über den nicht-kanonischen Signalweg (s.

Abb. 6) ¹⁰¹. Im Smad-abhängigen (kanonischen) Signalweg führt die Aktivierung des TGF- β Rezeptors vom Typ I (TGF β RI bzw. ALK5) zur Phosphorylierung der Rezeptor-spezifischen Smads (R-Smads) Smad2 und Smad3. Diese komplexieren mit dem kooperativen Smad-Protein (Co-Smad) Smad4, worauf der Komplex in den Nukleus transloziert und die Transkription reguliert ¹⁰². Dadurch wird auch die Expression des inhibitorischen Smads (I-Smad) Smad7 induziert, das in einer negativen Rückkopplung den TGF- β Signalweg inhibiert. Smad7 bildet

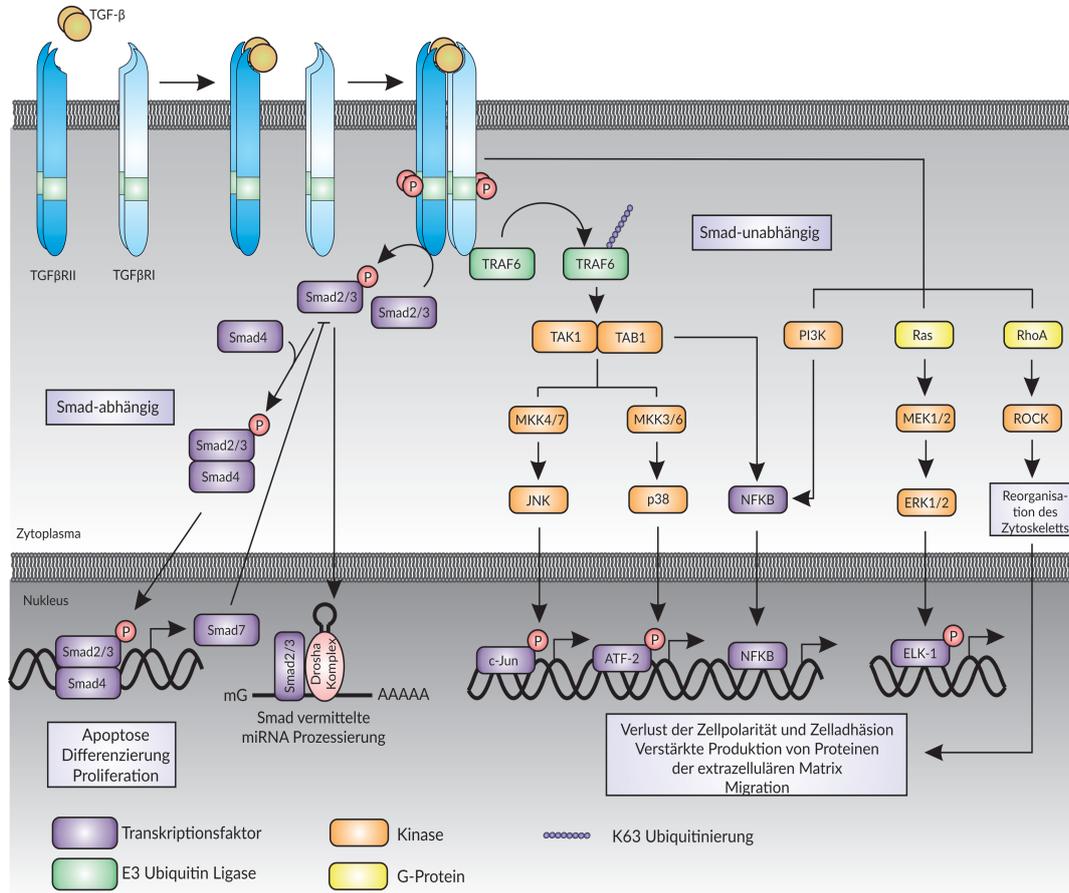


Abbildung 6: Der TGF- β Signalweg

Das TGF- β Signal wird intrazellulär über Smad-abhängige und Smad-unabhängige Signalwege transloziert. Bei der Smad-abhängigen Signalkaskade phosphoryliert der aktivierte TGF- β -Rezeptorkomplex die Transkriptionsfaktoren Smad2 und Smad3, die nach Bindung an Smad4 in den Nukleus translozieren und dort die Expression Smad-abhängiger Gene regulieren. Phosphoryliertes Smad2/3 fungiert zudem auch als Regulator der miRNA-Prozessierung. Bei der Smad-unabhängigen Signalkaskade aktiviert der TGF- β -Rezeptorkomplex Kinasen und G-Proteine, die die Genexpression regulieren, aber auch direkt z.B. eine Reorganisation des Zytoskeletts bewirken können. Dem Smad-unabhängigen Signalweg wird dabei eine wichtige Rolle bei der epithelialen zu mesenchymalen Transition zugesprochen.

Akt: Proteinkinase B; ATF-2: activating transcription factor 2; ELK: ETS-domain containing protein; ERK-1: extracellular signal-regulated kinase 1; IKK α : I κ B-Komplex α ; JNK: c-Jun N-terminale Kinase; MKK: mitogen-activated protein kinase kinase; NFKB: nuclear factor κ B; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; RhoA: Ras homolog gene family member A; ROCK: Rho-associated protein kinase; TAB: TGF- β activated kinase binding protein; TAK: TGF- β activated kinase; TGF- β : transforming growth factor β ; TGF β RI/II: TGF β -Rezeptor Typ I/II; TRAF6: TNF receptor-associated factor 6.

dazu einen stabilen Komplex mit dem Typ I Rezeptor, wodurch keine weitere Bindung und Phosphorylierung der R-Smads mehr stattfinden kann¹⁰³. Die aktivierten R-Smads Smad2/3 können zudem auch unabhängig von Smad4 die miRNA-Biogenese posttranskriptional regulieren, indem sie die Reifung spezifischer miRNAs stimulieren. Phosphoryliertes Smad2/3 wird hierzu an den Drosha-Komplex rekrutiert und bindet miRNAs, die in ihrer Stammregion ein smad binding element (SBE) aufweisen¹⁰⁴.

Im nicht-kanonischen Weg wird das TGF- β Signal über ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Kinasen, E3 Ubiquitin Ligasen, G-Proteinen und Transkriptionsfaktoren transloziert. So bewirkt die Bindung von TGF- β an den Rezeptor I eine Auto-Ubiquitinierung der E3 Ubiquitin Ligase TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), die daraufhin sich selbst an Lysin 63 ubiquitiniert, was die Rekrutierung und Aktivierung der TGF- β aktivierten Kinase (TAK1) ermöglicht. TAK1 aktiviert daraufhin zusammen mit TGF- β activated kinase binding protein (TAB1) mehrere mitogen-activated protein kinase kinases (MKKs/MAP2-Kinasen), die mitogen activated protein (MAP)-Kinasen wie die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38 phosphorylieren. Diese translozieren in den Nukleus und aktivieren kerneigene Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und activating transcription factor 2 (ATF-2)¹⁰⁵. TAK1 sowie die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktivieren zudem den Transkriptionsfaktor NF κ B. Hierbei phosphoryliert die PI3-Kinase die Proteinkinase Akt, die wiederum die I κ B Kinase α (IKK α) aktiviert. IKK α phosphoryliert daraufhin den zytosolischen Inhibitor (I κ B) von NF κ B, was zum Abbau des Inhibitors und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt¹⁰⁶. Der aktivierte TGF- β Rezeptorkomplex reguliert zudem die G-Proteine Ras und RhoA (Ras homolog gene family member A). Ras aktiviert über eine Signalkaskade die MAP-Kinase extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK-1), die im Nukleus den Transkriptionsfaktor ETS-domain containing protein 1 (ELK-1) phosphoryliert⁹⁹.

Die über den Smad-unabhängigen Weg aktivierten Transkriptionsfaktoren bewirken die Expression von Genen, die zum Verlust der Zellpolarität und Zelladhäsion führen. Über das durch den TGF- β Rezeptorkomplex aktivierte G-Protein RhoA wird zudem direkt die Aktin-Organisation sowie zelluläre Kontraktilität beeinflusst. Die durch RhoA aktivierte Rho-associated protein kinase (ROCK) beeinflusst die zelluläre Kontraktilität durch die Phosphorylierung weiterer Kinasen, die einerseits den Auf- und Abbau von Aktin-Polymeren und andererseits die Aktivität des Motorproteins Myosin II regulieren¹⁰⁷. Die TGF- β Signaltransduktion wird zudem durch weitere Signalwege beeinflusst, zu denen Hedgehog (HH), Notch, Interferon (IFN), TNF und WNT gehören. Diese komplexe Interaktion mit weiteren Signalwegen sowie die dynamische Kombination des kanonischen und nicht-kanonischen Signalweges ermöglichen es dem Wachstumsfaktor TGF- β , pleiotrope und z.T. ambivalente Effekte zu entfalten. So wurden für dieses Zytokin apoptotische, aber auch proliferationsfördernde Effekte beschrieben und es kann sowohl proinflammatorisch als auch immunsuppressiv wirken⁹⁹.

3.4.2 Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf EMT

Obwohl TGF- β als primärer und wichtigster Induktor von EMT angesehen wird, ist ein komplexes Signalnetzwerk aus verschiedenen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren für die Ausbildung und Aufrechterhaltung des mesenchymalen Phänotypes verantwortlich. Da inflammatorische Zellen sowohl in der Mikroumgebung von Tumoren auftreten als auch bei Vorgängen der chronischen Wundheilung und somit bei allen pathophysiologischen Prozessen präsent sind, die in engem Zusammenhang mit EMT stehen, sind Immunzellen und deren sezernierte proinflammatorischen Zytokine in den letzten Jahren in den Fokus der EMT-Forschung gerückt. Für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α sowie IL-1 β konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sie in Kombination mit TGF- β die Progression von EMT beschleunigen, obwohl sie allein nicht in der Lage sind, EMT auszulösen¹⁰⁸. Dabei induzieren sie intrazellulär durch Aktivierung des NF κ B-Signalweges die Expression EMT-spezifischer Transkriptionsfaktoren wie Snail, Twist und ZEB. Diese sind essentiell für die Induktion von EMT, da sie die Expression epithelialer Proteine unterdrücken sowie die Expression von mesenchymalen Proteinen fördern⁹⁵. Für das proinflammatorische Zytokin IL-6 konnte sogar eine EMT-auslösende Wirkung in zwei epithelialen Zelllinien nachgewiesen werden, unabhängig von TGF- β ^{109,110}. In diesem Zusammenhang wird proinflammatorischen Zytokinen zumindest eine partielle Rolle in der Entstehung von EMT zugesprochen, wobei die genauen pathologischen Zusammenhänge, vor allem bei Asthma, noch nicht eruiert sind¹¹¹.

3.5 Momentane Therapiestrategien für Asthma

Derzeit gibt es keine Heilungsmöglichkeit für Asthma bronchiale, weswegen die momentane Behandlungsstrategie auf eine Suppression der Entzündungsreaktionen sowie Reduktion der bronchialen Hyperreagibilität und Atemwegsobstruktion abzielt. In den meisten Fällen können die Symptome durch die gängige Standardtherapie, nämlich einer Kombination aus inhalierten Kortikosteroiden (ICS) und β_2 -Adrenorezeptor-Agonisten, gelindert werden¹¹². Inhalierte β_2 -Sympathomimetika relaxieren dabei die glatten Muskelzellen und erweitern somit die Bronchien. Während schnell wirksame β_2 -Adrenorezeptor-Agonisten als relievier bei akuten Asthmaanfällen Anwendung finden, dienen langwirksame in der Dauertherapie als controller¹¹³. Allerdings müssen langwirksame β_2 -Sympathomimetika zusammen mit Kortikosteroiden verabreicht werden, da sie allein verwendet das Risiko für schwere Asthmaanfälle erhöhen¹¹⁴.

Kortikosteroide entfalten ihre Wirkung über eine Reduktion der zugrunde liegenden Atemwegsinfammation. Der Nachteil dieser Therapie liegt jedoch vor allem in der langjährigen Verwendung von ICS, die zu lokalen Nebenwirkungen wie Bronchospasmen sowie zu systemischen Nebenwirkungen wie Osteoporose und Glaukome (grüner Star) führen kann¹¹⁵. Vor allem bei präpubertierenden Kindern ist der Gebrauch umstritten, da diese sensitiv auf wachstumssupprimierende Effekte der Kortikosteroide reagieren können¹¹⁶. Desweiteren verbleiben 5-10% der Asthmatiker therapieresistent und ohne adäquate Kontrolle ihrer Symptome, was für Betroffene erhebliche Einschränkungen in ihrer Lebensqualität bedeutet.

Diese Patientengruppe wird u.a. mit oralen Kortikosteroiden behandelt, die jedoch bei langjähriger Einnahme wesentlich stärkere systemische Nebenwirkungen verursachen als inhalierte, wodurch die Betroffenen sowohl unter ihren asthmatischen Beschwerden als auch unter den starken Nebenwirkungen der Medikamente leiden ¹¹⁷.

Weitere Medikationsmöglichkeiten bieten Leukotrienrezeptor-Antagonisten wie Montelukast, die die Bindung von Leukotrienen an deren Rezeptoren verhindern. Da Kortikosteroide keinen Einfluss auf die Bildung und Freisetzung dieser Entzündungsmediatoren ausüben, wird diese Medikamentengruppe meist ergänzend zu ICS bei leichtem bis mittelschwerem Asthma verabreicht ¹¹⁸. Zur ergänzenden Behandlung von moderatem bis schwerem allergischen Asthma ist in Deutschland seit 2005 auch ein rekombinanter monoklonaler Antikörper gegen IgE (Omalizumab) zugelassen, der mit freiem IgE einen inaktiven Komplex bildet und somit ein Binden des IgEs an den FcεRI-Rezeptor auf Immunzellen verhindert ¹¹⁹. Die Konzentration an freiem IgE kann so um über 90% gesenkt werden und allergische Reaktionen werden drastisch abgeschwächt. Aufgrund des hohen Kostenfaktors ist Omalizumab allerdings nur als Zusatzbehandlung für Patienten mit schwerem allergischen Asthma zugelassen, bei denen trotz ICS und langwirksamen β₂-Sympathomimetika Asthmaanfälle auftreten ¹²⁰.

Trotz dieser bislang erzielten medizinischen Fortschritte werden neue verbesserte Behandlungsmöglichkeiten mit Augenmerk auf spezifischer Wirksamkeit und besserer Verträglichkeit benötigt, vor allem für Patienten mit therapieresistentem Asthma. Zudem ging man bisher davon aus, dass die strukturellen Veränderungen des airway remodelings als Folge des langjährigen Entzündungsprozesses auftreten, weswegen eine antiinflammatorische Therapie als Grundstein für die Behandlung des airways remodelings angesehen wurde. Neueren Erkenntnissen zufolge können sich beide Merkmale jedoch unabhängig voneinander ausbilden und die strukturellen Veränderungen treten selbst nach jahrelanger Gabe von Kortikosteroiden auf, weswegen auch Therapieansätze für airway remodeling entwickelt werden müssen ¹²¹.

3.6 Zielsetzung

In der Zeitspanne von 2000 bis 2010 stellten Naturstoffe oder davon abgeleitete Derivate ca. 50% der zugelassenen small-molecule drugs des pharmazeutischen Marktes, was die Bedeutung von Naturstoffen als Quelle molekularer Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente unterstreicht ¹²². Vor allem das Reich der Pilze verfügt mit seiner biologischen Artenvielfalt sowie seinem facettenreichen Sekundärmetabolismus über ein reichhaltiges Reservoir an Naturstoffen. Angesichts einer geschätzten Gesamtzahl von 1,5 Millionen Pilzarten, von denen bisher lediglich etwa 70.000 identifiziert und kultiviert wurden, und des breiten strukturellen sowie funktionellen Spektrums der bisher isolierten pilzlichen Naturstoffe (Antibiotika, Antimykotika, Immunsuppressiva, Cholesterinsenker, Anti-Tumormittel) geht man davon aus, dass das Reich der Pilze noch ein großes, bisher unentdecktes Potential an Naturstoffen beherbergt ^{123,124}.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das therapeutische Potential zweier Natustoffe pilzlicher

Herkunft zur Behandlung von Asthma bronchiale untersucht werden. Zum einen sollte die Wirkung des Sesquiterpens Cyclonerodiol, das bereits in eigenen Vorarbeiten als Inhibitor des IL-4 Signalweges beschrieben worden war, auf die Expression inflammatorischer und krankheitsrelevanter Gene auf mRNA- sowie Proteinebene untersucht werden. Desweiteren sollte der Effekt des Makrolaktons Oxacyclododecindion, das anti-inflammatorische und anti-fibrotische Eigenschaften vereint, auf Pathomechanismen getestet werden, die mit Steroid-insensitivem Asthma sowie airway remodeling assoziiert sind. Als Vergleich diene hierbei das synthetische Glukokortikoid Dexamethason, das auch in der Klinik bei schweren Asthmaanfällen eingesetzt wird und momentan als eines der stärksten Glukokortikoide gilt. Für Cyclonerodiol sowie Oxacyclododecindion sollten zudem potentielle Zielstrukturen identifiziert sowie ihre Wirkmechanismen genauer eruiert werden.

Da der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Progression von EMT bei Asthma bisher nur marginal untersucht wurde, sollte zusätzlich der Effekt der Interleukine 4, 17 und 22, die eng mit der Pathogenese von allergischem Asthma (IL-4) bzw. nicht-allergischem Asthma (IL-17 und -22) assoziiert sind, auf die Entstehung und den Verlauf der epithelialen zu mesenchymalen Transition ermittelt werden.

MATERIAL &
—
METHODEN
2.

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

LÖSUNGSMITTEL HPLC/P.A.

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cyclohexan	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylacetat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt

BESTANDTEILE FÜR MIKROBIELLE FEST- UND FLÜSSIGMEDIEN

Bacto Yeast Extract	BD Difco, Heidelberg
Bacto Agar	BD Difco, Heidelberg
Bacto Pepton	BD Difco, Heidelberg
Glukose	Stockmeier Food, Herford
Hefeextrakt	Hartge H., Hamburg
Malzextrakt	Dr. Fränkle und Eck, Fellbach
Nutrient B	BD Difco, Heidelberg
Pepton	BD Difco, Heidelberg
Spanagar	Carroux, Hamburg
Trypton	BD Difco, Heidelberg
Zinksulfat-Heptahydrat	Riedel de Haen, Seelze

WEITERE CHEMIKALIEN

Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Hamburg
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Hambu
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Hamburg
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim

Diabur-Test 5000 (Glukoseteststreifen)	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Sigma-Aldrich, Hamburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glukose-6-Phosphatdehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
α -Glukosidase	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hexokinase	Roche Diagnostics, Mannheim
HEPES	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kälberserum, fötales	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Lachssperma-DNA	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
NADP-Dinatriumsalz	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumborat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Tetra-Natriumdiphosphat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Hamburg
di-Natriumhydrogenphosphat	Riedel de Haen, Seelze
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumvanadat	Roth, Karlsruhe
NP-40	Roth, Karlsruhe
OptiMEM 1 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol-/Chloroform-Lösung	Roth, Karlsruhe
Phosphat buffered Saline (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
PIPES	Sigma-Aldrich, Hamburg

PMA	Sigma-Aldrich, Hamburg
Protein A/G PLUS	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg
Proteinase K	QIAGEN, Hilden
RNase	Roth, Karlsruhe
Roti-Load 1 (4x)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (32%), p.a.	Riedel de Haen, Seelze
Schwefelsäure (96-98%), p.a.	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
TPA	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trichloressigsäure (99%)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg
TRIZOL Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung (10x konzentriert)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

BLOCKING PUFFER (WESTERN BLOT)

Magermilchpulver 5 % (w/v) in TBST

CaCl₂-LÖSUNG (HERSTELLUNG KOMPETENTER E.COLI-ZELLEN)

CaCl₂ 0,1 M

CaCl₂/GLYCERIN-LÖSUNG (HERSTELLUNG KOMPETENTER E.COLI-ZELLEN)

CaCl₂ 0,1 M
Glycerin 30 % (v/v)

CHIP-DILUTIONSPUFFER

Tris-HCl, pH 8,0 16,7 mM
NaCl 167 mM
EDTA 1,2 mM
SDS 0,01% (w/v)
Triton X-100 1,1% (v/v)

CHIP-ELUTIONSPUFFER

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1% (w/v)

CHIP-LYSEPUFFER

PIPES, pH 8,0	5 mM
KCl	85 mM
NP-40	0,5 % (v/v)

HEBS-PUFFER (1x) (ELEKTROPORATION)

NaCl	137 mM
HEPES	20 mM
Glukose	6 mM
KCl	5 mM
Na ₂ HPO ₄	0,7 mM
pH	7,05

HIGH-SALT CHIP-WASCHPUFFER

HEPES, pH 7,9	50 mM
NaCl	500 mM
EDTA	1 mM
SDS	0,1% (w/v)
Natriumdeoxycholat	0,1% (w/v)

KERN-LYSEPUFFER (CHIP)

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1% (w/v)

LAEMMLI-PUFFER, 5x (SDS-PAGE)

Tris-HCl, pH 6,8	312,5 mM
EDTA	5,0 mM
SDS	15 %
Bromphenolblau	0,015 %
Glycerin	50 %
DTT	40 mM

LAUF-PUFFER, 5X (SDS-PAGE)

Tris	124 mM
Glycin	960 mM
SDS	17,3 mM

LÖSUNG 1 (MAXI-PRÄPARATION)

Glukose	50 mM
Tris-HCl (ph 7,5)	25 mM
EDTA	10 mM

LÖSUNG 2 (MINI-/MAXI-PRÄPARATION)

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

LÖSUNG 3 (MAXI-PRÄPARATION)

Kaliumacetat	3 M
Eisessig	5 M

LÖSUNG A: LOW SALT BUFFER (NUKLEÄRE PROTEINEXTRAKTION)

HEPES pH 7,9	50 mM
KCl	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
EGTA pH 8,0	1 mM
DTT	1mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	1 mM
NaF	20 mM

DTT und Protease-Inhibitor (nach Herstellerangaben) frisch hinzu

LÖSUNG B: LOW SALT SUCROSE BUFFER (NUKLEÄRE PROTEINEXTRAKTION)

HEPES pH 7,9	50 mM
Saccharose	1 M
KCl	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
EGTA pH 8,0	1 mM
DTT	1mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	1 mM

NaF 20 mM
DTT und Protease-Inhibitor (nach Herstellerangaben) frisch hinzu

LÖSUNG C: HIGH SALT BUFFER (NUKLEÄRE PROTEINEXTRAKTION)

HEPES pH 7,9 50 mM
KCl 400 mM
EDTA pH 8,0 1 mM
EGTA pH 8,0 1 mM
DTT 1mM
Na₃VO₄ 1 mM
Na₄P₂O₇ 1 mM
NaF 20 mM
Glycerin 10 % (v/v)
DTT und Protease-Inhibitor (nach Herstellerangaben) frisch hinzu

NEUTRALISIERUNGSLÖSUNG (MINI-PRÄPARATION)

Kaliumacetat 3 M
pH 5,5

NP-40 LYSEPUFFER (IP/CO-IP)

Tris-HCl pH 7,4 25 mM
NaCl 150 mM
EDTA 1 mM
NP-40 1%
Glycerin 5%
Protease-Inhibitor (nach Herstellerangaben) frisch hinzu

RESUSPENDIERUNGSLÖSUNG (MINI-PRÄPARATION)

Tris 50 mM
EDTA 10 mM
RNase 100 µg/ml
pH 8,0

RIPA-PUFFER (PROTEINISOLATION)

Tris-HCl, pH 7,4 50 mM
NaCl 150 mM
NP-40 1 %
EDTA 2 mM

Glycerin	10 %
Protease-Inhibitor (nach Herstellerangaben)	frisch hinzu

STRIP-PUFFER (WESTERN BLOT)

NaOH	100 mM
SDS	2 % (w/v)
DTT	0,5 % (w/v)

TBE-PUFFER (AGAROSE-GELELEKTROPHORESE)

Tris-HCl	89 mM
Natriumborat	89 mM
EDTA	2 mM

TBS-PUFFER (10X) (WESTERN BLOT)

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

TBST-WASCHPUFFER (WESTERN BLOT)

Tween-20	0,1 % (v/v) in 1x TBS
----------	-----------------------

TE-PUFFER (CHIP)

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM

TOTEX-PUFFER (PROTEINISOLATION)

HEPES	20 mM (pH 7,9)
NaCl	350 mM
Glycerin	20% (v/v)
NP-40	1% (v/v)
MgCl ₂	1 mM
EDTA	0,5 mM
EGTA	0,1 mM
DTT	0,5 mM
NaF	10 mM
β-Glycerophosphat	10 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Protease-Inhibitor nach Herstellerangaben	frisch hinzu

TRANSFER-PUFFER (WESTERN BLOT)

Tris-HCl, pH 8,3	25 mM
Glycin	960 mM
Methanol	20 %

WASCH-PUFFER (WESTERN BLOT)

Tween-20	0,1 % (v/v) in 1x TBS
----------	-----------------------

3.1.3 Antikörper*PRIMÄR-ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT ANALYSEN*

Primärantikörper	Firma	Molekulargewicht des detektierten Proteins
Anti-Acetyliertes Lysin	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	
Anti-Akt	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	60 kDa
Anti-P-Akt	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	60 kDa
Anti-β-Aktin	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	45 kDa
Anti-Cyclophilin A	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	18 kDa
Anti-E-Cadherin	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	135 kDa
Anti-Eotaxin-1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	13 kDa
Anti-ERK1/2	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	42 und 44 kDa
Anti-P-ERK1/2	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	42 und 44 kDa
Anti-Histon 3 (H3)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	17 kDa
Anti-Histon 3 mit acetyliertem Lysinrest 9 (H3K9ac)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	17 kDa
Anti-IκBα	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	40 kDa
Anti-P-IκBα	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	40 kDa
Anti-K63-verknüpfte Ubiquitinkette	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	
Anti-MKK3/6	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	40 und 41 kDa

Anti-P-MKK3/6	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	40 und 41 kDa
Anti-MKK4/7	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	44 kDa
Anti-P-MKK4/7	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	44 kDa
Anti-MMP2	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	72 kDa
Anti-N-Cadherin	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	140 kDa
Anti-p300	Upstate/ Millipore, Darmstadt	300 kDa
Anti-Acetyl-p300	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	300 kDa
Anti-p38	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	43 kDa
Anti-P-p38	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	43 kDa
Anti-RORyt	Abcam, Cambridge, England	58 kDa
Anti-SAPK/JNK	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	46 und 54 kDa
Anti-P-SAPK/JNK	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	46 und 54 kDa
Anti-Ser/Thr/Tyr-Phosphorylierung	Clontech, Mountain View, USA	
Anti-Slug	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	30 kDa
Anti-Smad2/3	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	52 und 60 kDa
Anti-P-Smad2/3	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	52 und 60 kDa
Anti-Snail	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	29 kDa
Anti-STAT3	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	86 kDa
Anti-P-STAT3	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	52 und 60 kDa
Anti-STAT6	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	110 kDa
Anti-P-STAT6 (Tyr)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	110 kDa
Anti-TAK1	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	82 kDa
Anti-TRAF6	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	60 kDa

Anti-Twist1	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	26 kDa
Anti-Twist2	Abcam, Cambridge, England	18 kDa
Anti-Vimentin	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	57 kDa
Anti-ZEB1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	200 kDa
Anti-ZEB2	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg	157 kDa
Anti-Zonula occludens 1(ZO-1)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	220 kDa

SEKUNDÄRANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT ANALYSEN

Sekundärantikörper	Firma
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Abcam, Cambridge, England
Anti-goat IgG, HRP-linked	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Anti-mouse IgG, HRP-linked	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

SONSTIGE

Antikörper	Firma
Kaninchen-Immunglobulin G (IgG)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

3.1.4 Inhibitoren

AG490	Sigma-Aldrich, Hamburg
Camptothecin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Hamburg
SB202190	Sigma-Aldrich, Hamburg
U0126	Sigma-Aldrich, Hamburg

3.1.5 Kits

Annexin V-FITC Kit	Beckman Coulter, Krefeld
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Dual-Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
ProteomProfiler	
humane cytokine array (panel A)	R&D Systems, Wiesbaden
Reporteragen Assay	
Phospha-Light SEAP	Applied Biosystems, Darmstadt
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
RevertAid First Strand	
cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden

3.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg hergestellt.

QRT-PCR PRIMER

Stickstoffmonoxid-Synthase 1

RefSeq (mRNA): NM_000620

inos(for): 5'-TCCCGAAGTTCTCAAGGCAC-3'

inos(rev): 5'-TCCAAGGACAGGCCATCTCT-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 167 bp

Chemokine (C-C motif) ligand 2

RefSeq (mRNA): NM_002982

ccl-2(for): 5'-ATCAATGCCCCAGTCACC-3'

ccl-2(rev): 5'-AGTCTTCGGAGTTTGGG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 216 bp

Chemokine (C-C motif) ligand 5

RefSeq (mRNA): NM_001278736

ccl-5(for): 5'-TACCATGAAGGTCTCCGC-3'

ccl-5(rev): 5'-GACAAAGACGACTGCTG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 199 bp

Chemokine (C-C motif) ligand 1

RefSeq (mRNA): NM_002986

ccl-11(for): 5'-TACCCCTTCAGCGACTAGAGAG-3'

ccl-11 (rev): 5'-GAGTTGGAGATTTTGGTCCAG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 162 bp

Chemokine (C-X-C motif) ligand 1

RefSeq (mRNA): NM_001511

cxcl-1(for): 5'-AGGCAGGGGAATGTATGTGC-3'

cxcl-1 (rev): 5'-AGCCCCTTTGTTCTAAGCCA-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 224 bp

Chemokine (C-X-C motif) ligand 3

RefSeq (mRNA): NM_002090

cxcl-3(for): 5'-TGGTCACTGAACTGCGCT -3'

cxcl-3 (rev): 5'-ATGCGGGGTTGAGACAAG -3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 159 bp

Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

RefSeq (mRNA): NM_002046

gapdh(for): 5'-CCTCCGGGAAACTGTGG-3'

gapdh(rev): 5'-AGTGGGGACACGGAAG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 140 bp

E-Cadherin

RefSeq (mRNA): NM_004360

cdh1(for): 5'-TCGCTTACACCATCCTCAGCCA-3'

cdh1(rev): 5'-GGAAACTCTCTCGGTCCAGCC-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 117 bp

Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

RefSeq (mRNA): NM_000758

gm-csf(for): 5'-GGGAGCATGTGAATGCCATC-3'

gm-csf(rev): 5'-GGCTCCTGGAGGTCAAACAT-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 118 bp

Intracellular adhesion molecule-1

RefSeq (mRNA): NM_000201

icam-1(for): 5'-GAGGCACAAGGCACAACAG-3'

icam-1(rev): 5'-GTGGTGGTCCGAGATTCGTA-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 242 bp

Interleukin-1 β

RefSeq (mRNA): NM_000576

il-1 β (for): 5'-AAGCTGAGGAAGATGCTG-3'il-1 β (rev): 5'-ATCTACACTCTCCAGCTG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 390 bp

Interleukin-6

RefSeq (mRNA): NM_000600

il-6(for): 5'-TCTCCACAAGCGCCTTCG-3'

il-6(rev): 5'-CTCAGGGCTGAGATGCCG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 193 bp

Matrix-Metalloprotease-2

RefSeq (mRNA): NM_001127891

mmp-2(for): 5'-AGCTAAATCGGGTCGTAG-3'

mmp-2(rev): 5'-CAGGGATATTGACTCCGA-3'

Assay: SYBR-Green

Produktgröße: 186 bp

Matrix-Metalloprotease-9

RefSeq (mRNA): NM_004994

MMP-9(for): 5'-TGGGGGGCAACTCGGC-3'

MMP-9(rev): 5'-GGAATGATCTAAGCCCAG-3'

Assay: SYBR-Green

Produktgröße: 225 bp

N-Cadherin

RefSeq (mRNA): NM_001794

cdh2(for): 5'-TGGAGGGAGCCACAGAGAGG-3'

cdh2(rev): 5'-GCAGCCAGTAGACACCACTTT-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 84 bp

Periostin

RefSeq (mRNA): NM_001135934

postn(for): 5'-CCGTGACTGTCTATAAGCCAA-3'

postn(rev): 5'-CTTCAAATAAATGACCATCACCACC-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 237 bp

Snail1

RefSeq (mRNA): NM_005985

snail1(for): 5'-ACCACTATGCCGCGCTCTT-3'

snail1(rev): 5'-GGTCGTAGGGCTGCTGGAA-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 115 bp

Transforming growth factor- β

RefSeq (mRNA): NM_000660

tgf- β (for): 5'-GCCCTGGACACCAACTATTG-3'tgf- β (rev): 5'-CGTGTCCAGGCTCCAAATG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 168 bp

Tumor necrosis factor- α

RefSeq (mRNA): NM_000594

tnf- α (for): 5'-TCTTCTGCCTGCTGCACTTTGG-3'tnf- α (rev): 5'-ATCTCTCAGCTCCACGCCATTG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 224 bp

Twist1

RefSeq (mRNA): NM_000474

twist1(for): 5'-TACGCCTTCTCGGTCTGGAG-3'

twist1(rev): 5'-CCCCACGCCCTGTTTCTTTG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 238 bp

Vimentin

RefSeq (mRNA): NM_003380

vim(for): 5'-AGGCGAGGAGAGCAGGATTT-3'

vim(rev): 5'-GGGTATCAACCAGAGGGAGTGA-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 95 bp

Zinc finger E-box binding homeobox 1

RefSeq (mRNA): NM_001128128

zeb1(for): 5'-TATTCTCATTGTGGAGAGATGACTT-3'

zeb1 (rev): 5'-AGTCAGCTGCATCTGTAACACT-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 240 bp

Zonula occludens-1

RefSeq (mRNA): NM_001301025

zo1(for): 5'-GGGGACAAGATGAAGTACCAGA-3'

zo1(rev): 5'-AGAGGGTTTTTCCTTGGCTGA-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 168 bp

OLIGONUKLEOTIDE FÜR CHIP-ASSAY

pai-1 Promoter

pai1(for): 5'-CCTCCAACCTCAGCCAGACAAG-3'

pai1(rev): 5'-CCCAGCCCAACAGCCACAG-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 221 bp

ccl-11 Promoter

ccl11(for): 5'-CACTTCTGTGGCTGCTGCT-3'

ccl11(rev): 5'-GCTCTGGAGGTGGTTACCTT-3'

Assay: SYBR Green

Produktgröße: 110 bp

Als Kontrolle wurden die Simple CHIP human GAPDH Exon 1 Primer der Fa. New

England Biolabs GmbH verwendet, die ein Produkt von 171 bp erzeugen.

3.1.7 Plasmide

FOLGENDE PLASMIDE WURDEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT ALS VEKTOREN VERWENDET:

(CAGA)_{9x}-MLP-Luc: Reporter-genvektor auf dem Plasmid pGL3-Basic (Fa. Promega, Mannheim, Madison) basierend; die Luciferaseexpression steht unter der Kontrolle eines Oligomers (9x) der Smad3/4-Konsensussequenz; neben den Konsensusoligomeren enthält dieses Reporter-genkonstrukt noch einen minimalen Promotor (TATA-Box und Adenovirus „major late“ Promotor, MLP)¹²⁵. Der Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. S. Dooley zur Verfügung gestellt.

pGE3-GAS/ISRE: Reporter-genvektor, dessen Reporter-gen unter Kontrolle eines Thymidin-Kinase-Promotors und fünf vorangeschalteten Kopien der GAS/ISRE-Konsensussequenz steht (Promega, Mannheim, Mannheim).

pGAS-TA-Luc: Reporter-genvektor, dessen Luciferasegen unter Kontrolle einer zweifachen Kopie der Interferon- γ Aktivierungssequenz (GAS) upstream eines TA-Minimalpromoters steht.

pMW-IRF7: Reporter-genvektor, bei dem die SEAP-Expression unter der Kontrolle eines Oligomers (8x) des IL-6RE II (IL-6 „responsive element“ der Klasse II) steht¹²⁶.

pGL3-TK-7xN₄: Reporter-genvektor, bei dem die Luciferase-Expression unter der Kontrolle eines Oligomers (7x) der C/EBP-N4-Konsensussequenz (Bindungsstelle für das „signal transducer and activator of transcription“ (STAT6)-Homodimer) steht; das Plasmid enthält weiterhin einen HSV-TK Promotor.

TOPO/STAT6: Expressionsvektor für konstitutiv exprimierten, humanen STAT6 basierend auf dem Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Karlsruhe); das Gen steht unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Cytomegalie Virus (CMV)-Promotors.

TOPO/-: Leerer pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor mit CMV-Promoter; Bestandteil des Eukaryotic TOPO TA Cloning Kits der Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Karlsruhe.

pRL-EF1 α : Reporter-genvektor, bei dem die *Renilla reniformis* Luciferase durch den konstitutiv aktiven Promotor des Elongationsfaktors α kontrolliert wird (Fa. Promega, Mannheim, Mannheim)

pJR-TNFpro: Reporter-genvektor, bei dem das Reporter-gen Luciferase unter Kontrolle des 1,2 kb (1052 bis +126 nt) großen humanen „tumor necrosis factor- α “ (TNF- α)-Promotor steht¹²⁷.

pGL3-IL8pro: Reporter-genvektor, bei dem das Reporter-gen Luciferase unter Kontrolle des humanen IL8-Promotors steht (1,5 kb; -1481 bis +45 nt).

pNFAT-Luc: Reporter-genvektor, bei dem die Expression der Luciferase durch einen minimalen Promotor (TATA-Box plus induzierbares „cis-enhancer“ Element) reguliert wird, der vier direkte Wiederholungen der „nuclear factor of activated T-cells“ (NFAT)-Konsensussequenz enthält (Fa. Stratagene, La Jolla, USA).

pNFκB-Luc: Reporter-genvektor, bei dem die Luciferase-Expression durch vier Kopien der „nuclear factor-κB“ (NFκB)-Konsensussequenz und einen minimalen HSV-TK Promotor reguliert wird (Fa. BD Clontech, Heidelberg).

pTK-AP1: Luciferasevektor, dessen Reporter-genexpression unter der Kontrolle eines dreifachen Oligomers des „TPA responsive elements“ (TRE)-Konsensussequenz steht.

MIGR-RORyt: Expressionsvektor für konstitutiv exprimiertes, murines RORyt basierend auf dem Vektor pMIGR1.

pIL17-TA-Luc: Reporter-genvektor, bei dem die Expression der Luciferase unter der Kontrolle des 1171 bp (-1125 bis +46) großen humanen Interleukin 17 (IL-17)-Promoters steht.

CMV-p300: Expressionsvektor für konstitutiv exprimiertes, humanes p300, wobei das codierende Gen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalie Virus (CMV)-Promoters steht (Fa. Promega, Mannheim, Madison).

3.1.8 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Alle verwendeten Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren wurden von der PeproTech GmbH, Hamburg bezogen.

3.1.9 Anzucht von Pilzen und Bakterien

NÄHRMEDIEN FÜR PILZE UND BAKTERIEN

Die Angaben beziehen sich, sofern nicht anderweitig angegeben, auf 1 Liter deionisiertes Wasser. Vor dem Autoklavieren (121 °C, 25 min bzw. 40 min bei Fermentern und 1 bar) wurde der pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt. Bei Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2% (w/v) Spanagar hinzugefügt.

M1: HMG-Medium

Malzextrakt	10,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Glucose, Dextropur	10,0 g
Leitungswasser	ad 1 l
pH	5,5

M2: HA-Medium

Malzextrakt	10,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
Glucose, Dextropur	4,0 g
Leitungswasser	ad 1 l
pH	5,5

M3: Doppelmalz-Medium

Malzextrakt	40,0 g
Leitungswasser	ad 1 l
pH	5,5

M4: BAF-Medium

Maltose	20,0 g
Glucose, Dextropur	10,0 g
Pepton	2,0 g
Hefeextrakt	0,2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g
FeCl_3	10,0 mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,78 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	100,0 mg
Thiamin-Hydrochlorid	50,0 μg
Biotin	1,0 μg
Folsäure	100,0 μg
myo-Inosit	50,0 μg
pH	5,8 – 6,3

M5: Malz-Medium

Malzextrakt	20,0 g
Leitungswasser	ad 1 l
pH	5,5

M6: LB-Medium

Bacto Trypton	10,0 g
Bacto Yeast Extract	5,0 g
NaCl	5,0 g
pH	7,2

M6a: LB-Medium mit Ampicillin

wie M6, jedoch mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin (Zugabe erfolgt nach dem Autoklavieren)
Medien, Puffer und Lösungen

BAKTERIENKULTUR

Für Klonierungen wurde der *Escherichia coli*-Stamm TOP 10^F verwendet.

3.1.10 Zellkultur

MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR

Zur Herstellung von Zellkulturmedien und Puffern wurde ultrafiltriertes Wasser (PURELAB Ultra, Fa. ELGA LabWater, Celle) verwendet. Die von der Fa. Invitrogen, Karlsruhe (Karlsruhe) bezogene Antibiotikallösung enthielt Penicillin G (6,5 mg/ml) und Streptomycin (10 mg/ml). Das fötale Kälberserum wurde zur Zerstörung des Komplementsystems vor Verwendung 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Die fertig angesetzten Medien wurden vor Gebrauch auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

M7: DMEM Medium mit 10% FKS

DMEM Medium	89 ml
Kälberserum, fötales	10 ml
Penicillin-Streptomycin Lösung	1 ml

M7a: DMEM Medium mit 0,5% FKS

wie M8, jedoch mit nur 0,5% Kälberserum

M7b: DMEM Medium mit 0,05% FKS

wie M8, jedoch mit nur 0,05% Kälberserum

M8: RPMI Medium mit 10% FKS

RPMI Medium	89 ml
Kälberserum, fötales	10 ml
Penicillin-Streptomycin Lösung	1 ml

M8a: RPMI Medium mit 0,5% FKS

wie M8, jedoch mit nur 0,5% Kälberserum

ZELLINIEN

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle
A549	humane Lungenkarzinomzellen	DSMZ (ACC 107)
BEAS-2B	humane Bronchialzelllinie, SV40 transformiert	ATCC (CRL-9609)
HepG2	humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie	ATCC (HB-8065)
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie-Linie	DSMZ (ACC 282)

3.2 Methoden

Grundlegende molekularbiologische Arbeitsmethoden, die hier nicht gesondert aufgeführt sind, wurden den Laborhandbüchern Molecular Cloning entnommen ¹²⁸.

3.2.1 Kultivierung von Pilzen

Alle Arbeitsvorgänge wurden an einer Sicherheitsbank der Klasse I (Horizontal-Flow Werkbank Typ HF, BDk Luft- und Reinraumtechnik GmbH) durchgeführt. Die verwendeten Pilze wurden in Petrischalen auf sterilen Festmedien für 4-6 Wochen kultiviert und danach auf neue Medienplatten überimpft. Hierzu wurden jeweils zwei 1 cm² große Agarstücke der alten, bewachsenen Platte auf neue Platten überimpft.

3.2.2 Fermentation in Submerskultur im 20 l-Maßstab

Für die Fermentation im 20 l-Maßstab (Typ C6, Fa. Biolafitte, Paris, Frankreich) wurde eine Vorkultur mit 250 ml Medium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben angelegt, indem Mycelstückchen einer gut bewachsenen Festmediumplatte als Inokulum eingesetzt wurden. Die Fermentationen erfolgten nach dem Standardverfahren von Witter *et al.* bei Raumtemperatur mit einer Rührerdrehzahl von 120 U/min und einer Belüftung von 3 l Luft/min. Vor dem Autoklavieren der Fermenter wurden 3 bis 5 ml Silicon-Entschäumer zugegeben und bei Bedarf während der Fermentation erneut steril hinzugefügt. Während der Fermentation wurde täglich eine Probe (100 ml) entnommen. Anhand dieser Probe wurde der pH-Wert, der Glucosegehalt und nach Trennung von Kulturfiltrat und Mycel auch das Myceltrockengewicht bestimmt. Das Kulturfiltrat wurde mit einem Volumen Ethylacetat extrahiert und anschließend in Methanol gelöst, um einen Extrakt definierter Konzentration zu erhalten. Ein Aliquot des Kulturfiltrates wurde für die enzymatische Bestimmung des Glucose- und Maltosegehaltes eingefroren. Nach Beendigung der Fermentation wurde das Mycel mittels Filtration vom Kulturfiltrat getrennt. Anschließend erfolgte zweimal die Extraktion des Kulturfiltrates mit je einem Volumenteil Ethylacetat an. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend bei 40 °C *in vacuo* bis zur Trockene eingeengt.

3.2.3 Fermentationsanalysen

pH-WERT UND MYCELTOCKENGEWICHT

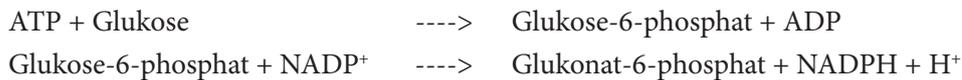
Der pH-Wert der Kulturbrühe wurde mit einem pH-Meter (MP220, Fa. Mettler-Toledo) gemessen. Das vom Kulturfiltrat abgetrennte Mycel wurde auf einem zuvor ausgewogenen Filterpapier (Rundfilter 595, Fa. Schleicher & Schüll) 2 h bei 80 °C getrocknet und gewogen.

ENZYMATISCHE BESTIMMUNG DES GLUKOSE- UND MALTOSEGEHALTES

Der Glukosegehalt wurde während der Fermentation zunächst mittels Diabur-Test 5000

Teststreifen (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) grob bestimmt. Nach Beendigung der Fermentation erfolgte anhand der Kulturfiltrat-Aliquots eine enzymatische Bestimmung der freien Glukose und Maltose im Kulturfiltrat. Hierzu wurden die Aliquots 5 min bei 95°C erhitzt, bei 1000xg für 5 min abzentrifugiert. Da die Glukosemenge im Testansatz die Menge von 100 µg nicht übersteigen darf, wurden die Probelösungen noch verdünnt, falls dies erforderlich war.

Die Messung basiert auf der folgenden Reaktion:



Zunächst wird Glukose durch das Enzym Hexokinase (HK) und ATP zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert unter gleichzeitiger Bildung von ADP. In Gegenwart des Enzyms Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase wird Glukose-6-Phosphat zu Glukonat-6-phosphat oxidiert, wobei reduziertes NADPH entsteht. Die während der Reaktion gebildete Menge an NADPH dient aufgrund seiner Absorption bei 365 nM als Messgröße.

WIRKSTOFFBESTIMMUNG MIT HILFE DER ANALYTISCHEN HPLC

Die Wirkstoffbestimmung von Cyclonerodiol erfolgte mittels analytischer HPLC. Hierzu wurde die Probe mit einem internen Standard versetzt und das Verhältnis der Signale von Analyt und internem Standard zur Berechnung der Wirkstoffkonzentration genutzt.

3.2.4 Säulenchromatographische Auftrennung der Rohextrakte

Die Rohextrakte wurden zunächst durch Chromatographie an Kieselgel 60 (0,063-0,2 mm, Fa. Merck, Darmstadt) und Elution mit einem Cyclohexan-Ethylacetat-Methanol-Gradienten unter Normaldruck aufgetrennt. Mit Hilfe einer präparativen HPLC (Jasco PU-1586 mit „Multiwavelength“-Detektor UV-1570 M, Fa. Jasco) erfolgte die Reindarstellung der Substanzen. Als Säulen wurden entweder eine C18-Säule (Nucleosil 100-7, 7 µm, 250 x 21 mm; Fa. Macherey-Nagel) oder eine RP18-Säule (LiChrosorb, 7 µm, 250 x 25 mm; Fa. Merck, Darmstadt) verwendet, wobei immer Wasser-Acetonitril-Gradienten als Eluenten verwendet wurden. Zuvor wurden die Proben mittels einer Extraktionssäule zur Probenvorbereitung filtriert (Chromobond C18 ec, Fa. Merck, Darmstadt).

3.2.5 HPLC-Analyse

Die Bestimmung der Retentionszeiten, sowie der UV- und Massenspektren isolierter Substanzen erfolgte über eine HPLC-Analyse. Bereits bekannte Verbindungen konnten durch die Suche in der hauseigenen HPLC-DAD Datenbank identifiziert werden. Reinsubstanzen, Kulturfiltrat- und Mycelextrakte wurden filtriert (Opti-Flow 13 NYL Einmalfilter, 0,45 µm, Fa. Wicon) und falls erforderlich verdünnt. Es stand eine mit einem Dioden-Array-Detektor ausgerüstete HPLC-Anlage (HP 1090 Series U, Hewlett-Packard) zur Verfügung. Das Gerät war mit einer RP 18-Trennsäule (LiChrospher, 5 µm, 125 x 4 mm, Fa. Merck, Darmstadt) ausgestattet.

Als Eluenten wurden Wasser und Acetonitril verwendet. Die Analysen wurden bei 40 °C durchgeführt, das Einspritzvolumen betrug 5 bis 25 µl. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Verwendete Gradient (Wasser/Acetonitril) eines HPLC-Laufs

Säulenmaterial	Flussrate [ml/min]	Zeit [min]	Acetonitril [%]
RP18	1,0	0	1
		20	100
		24	100
		25	1

3.2.6 Kultivierung von Bakterien

Alle Arbeitsvorgänge wurden an einer Sicherheitsbank der Klasse I (Horizontal-Flow Werkbänke Typ HF, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH) durchgeführt. Zur Lagerung der transformierten Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden Übernachtskulturen in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angesetzt. Jeweils 0,8 ml der Bakterienkultur wurde mit 0,8 ml sterilem Glycerin (85%) vermischt und bei -80 °C gelagert.

HERSTELLUNG UND TRANSFORMATION KOMPETENTER E. COLI-ZELLEN

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mittels CaCl_2 ¹²⁸. Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen wurde die Plasmid-DNA zugegeben (maximales Volumen 10 µl), der Ansatz vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C. Danach wurde sofort 1 ml LB-Medium zupipettiert und 1 h bei 37 °C unter Schütteln (200 U/min) inkubiert. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 5 min bei 4500xg pelletiert, 900 µl des überschüssigen Mediums abgenommen und das Pellet im verbleibenden Volumen resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Festmediumplatten mit entsprechenden Zusätzen (Antibiotika) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien auf „master plates“ des gleichen Mediums überimpft. Mit diesen Kolonien wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt.

3.2.7 Präparation von Nukleinsäuren

PLASMID-MINIPRÄPARATION

Zur Gewinnung von DNA für Restriktionen wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt¹²⁸. Zunächst wurden 3 ml des Mediums M1a mit einem *E. coli*-Klon, der das gewünschte Plasmid enthielt, angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (200 U/min) inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 14000 U/min in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß pelletiert. Anschließend erfolgte die Resuspension des Pellets in 200 µl

Resuspendierungslösung. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde bis zur Bildung eines Homogenisats vorsichtig invertiert. Nach einer fünfminütigen Lyse bei Raumtemperatur erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 200 µl Neutralisierungslösung. Das Lysat wurde bei Raumtemperatur für 15 min (14000 U/min) pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Volumeneinheit Isopropanol für 20 min bei -20 °C gefällt und anschließend 30 min (14000 U/min) bei Raumtemperatur pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{UF} aufgenommen.

MAXI-PRÄPARATION

Mit Hilfe dieser Methode wurden größere Plasmid-DNA-Mengen aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst 3 ml mit Ampicillin (100 µg/ml) versetztes LB-Medium mit dem entsprechenden Bakterienklon (*E. coli* TOP 10F[']) inokuliert und für 6-8 h unter Schütteln (120 U/min) bei 37°C inkubiert. 500 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) wurden mit dieser Vorkultur angeimpft und über Nacht unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 4 °C für 10 min (5000xg) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml Lösung 1 resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden zur Lyse der Bakterien 12 ml Lösung 2 zugegeben, vorsichtig gemischt und die Zellbestandteile durch Zugabe von 7,5 ml eiskalter Lösung 3 auf Eis gefällt. Nach 10 min wurde die Suspension bei 4 °C für 15 min (12000xg) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,7-1 Volumen Isopropanol 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurde die Suspension bei Raumtemperatur für 30 min (12000xg) zentrifugiert und das Pellet in 5 ml sterilem H₂O_{UF} mit 50 µl RNase A (Stammlösung 5 mg/ml) gelöst. Nach einer Inkubation von 45-60 min bei 37 °C folgten 2-3 Extraktionen mit einer Phenol-Chloroform-Lösung (12000xg, 15 min, 4 °C). Die DNA wurde mit 0,1 Volumenäquivalent 3 M Natriumacetat-Lösung und 2-3 Volumenäquivalenten eis kaltem Ethanol p.a. über Nacht aus dem Überstand gefällt, 30 min bei 12000xg und 4 °C abzentrifugiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl sterilem H₂O_{UF} aufgenommen.

BESTIMMUNG DER KONZENTRATION SOWIE QUALITÄT VON NUKLEINSÄUREN

Die Bestimmung der Qualität und Quantität von DNA- und RNA-Proben erfolgte photometrisch mittels UV/Vis-Spektralphotometrie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific).

3.2.8 Restriktion und Gelelektrophorese

RESTRIKTION VON DNA

Die Restriktionen wurden nach Sambrook *et al.* durchgeführt¹²⁸. Der Reaktionsansatz betrug 20 µl. In der Reaktion wurden die für die verwendeten Enzyme spezifischen, von den Herstellern empfohlenen Inkubationspuffer verwendet. Die Enzymreaktionen wurden bei 37 °C für 1 bis 2 Stunden durchgeführt und durch Hitze oder Zugabe des Auftragspuffers beendet.

AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde gemäß Sambrook *et al.* durchgeführt¹²⁸, wobei als Laufpuffer und zum Lösen der Agarose TBE-Puffer verwendet wurde. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurde ein 0,8–2%-iges Agarosegel verwendet. Die aufgetragenen Probemengen betragen zwischen 10 ng bis maximal 1 µg. Die Elektrophorese wurde bei 5-6 Volt/cm durchgeführt. Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente dienten die Molekulargewichtsmarker der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot. Die Färbung erfolgte mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes GelRED, der den Proben vor dem Auftragen auf das Gel hinzugefügt wurde (prestaining).

3.2.9 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeitsvorgänge wurden steril an einer Sicherheitsbank der Klasse II (MSC-Advantage, Thermo Scientific) durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in einem Brutschrank (Modell Heracell) der Fa. Thermo Scientific. Als Kulturgefäße dienten Polyethylenflaschen mit Filter-Top und einer Wachstumsfläche von 75 bzw. 175 cm² (Fa. Greiner BIO-One). Die verwendeten Kulturmedien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt. Jede Zelllinie wurde dabei in einem für sie optimalen Medium mit Zusatz von Antibiotika kultiviert.

SUBKULTIVIERUNG DER ZELLEN

Bei einer Konfluenz von mind. 80 % wurden adhärente Zellen passagiert. Hierzu wurden die Monolayerkulturen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um Medienrückstände und darin enthaltene Proteine zu entfernen, und danach durch Zugabe von Trypsinlösung vom Untergrund abgelöst. Der enzymatische Verdau wurde durch vorsichtiges Resuspendieren in frischem Medium abgestoppt und ein Teil der Zellen für neue Kulturen verwendet. Bei Suspensionszellen wurde alle 2-3 Tage das alte Medium durch Zentrifugation von den Zellen entfernt. Nach Resuspendieren in 10 ml frischem Medium wurden 5 ml verworfen, während die verbleibenden 5 ml in neue Kulturflaschen gesetzt und mit frischem Medium aufgefüllt wurden.

GEFRIERKONSERVIERUNG DER ZELLEN

Stammkulturen aller Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C mit einer Konzentration von 1x10⁶ Zellen/ml gelagert. Um Zellschäden durch Eiskristallbildung zu minimieren, wurden die Zellen in definierter Zellzahl in Konservierungsmedium mit 10 % kryoprotektivem Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Die Kryoröhrchen wurden zunächst über 24 h langsam auf -80°C heruntergekühlt und danach bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Aussaat der Zellen wurden die Kryoröhrchen in sterilem H₂O_{UF} bei 37°C aufgetaut und die Zellsuspension in 10 ml Medium aufgenommen. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte ein Wechsel des Mediums.

3.2.10 Transfektionsmethoden

ELEKTROPORATION VON HEPG2-ZELLEN

HepG2-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Antibiotika-Lösung in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde 24 h vor Versuchsbeginn erneuert. Am Versuchstag wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst und bei 1000xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellzahl auf eine Dichte von $0,6-1 \times 10^7$ Zellen/ml mit DMEM ohne Zusätze eingestellt. In sterilen Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,4 cm, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) wurden je 100 µg Plasmid-DNA vorgelegt, pro Küvette jeweils 400 µl Zellsuspension zugegeben und gründlich gemischt. Dieser Ansatz wurde 10 min auf Eis vorinkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Volt und 975 µF mit Zeitkonstanten zwischen 50 und 80 ms (Gene Pulser, Fa. BioRAD). Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 25 ml DMEM mit 10% FKS resuspendiert und je 1 ml in die Vertiefungen einer 24-Lochplatte pipettiert.

ELEKTROPORATION VON JURKAT-ZELLEN

Jurkat-Zellen wurden in RPMI mit 10 % FKS und 1 % Antibiotika-Lösung in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und 24 h vor Versuchsbeginn wurde das Medium erneuert. Am versuchstag wurden die Zellen bei 1000xg und 4°C abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml kaltem Hebs-Puffer (0,5x) resuspendiert und die Zellzahl auf $0,5 - 1 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt. 200 µl dieser Zellsuspension wurden in sterilen Elektroporationsküvetten mit 50 µg Plasmid-DNA vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde bei 200 Volt und 140 ms (Gene Pulser, Fa. BioRAD) durchgeführt, wobei die Zeitkonstanten zwischen 100 und 140 ms lagen. Nach weiteren 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 25 ml RPMI mit 10% FKS aufgenommen und je 1 ml in die Vertiefungen einer 24-Lochplatte pipettiert.

TRANSFEKTION VON A549- UND BEAS-2B-ZELLEN MITTELS LIPOFECTAMIN

Die Kultivierung der beiden Zelllinien erfolgte in DMEM Medium mit 10 % FKS und 1 % Antibiotika-Lösung in 175 cm² Zellkulturflaschen. 48 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen abgelöst und bei 1000xg und 4°C abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde die Zellzahl auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt und in 24-Lochplatten ausgesät. 24 h vor Versuchsbeginn wurde das Medium steril abgesaugt und durch Medium mit 0,5% FKS und ohne Antibiotikum ersetzt. Am Versuchstag wurde das Medium nochmals steril abgesaugt und durch 500 µl frisches Medium (0,5% FKS, kein Antibiotikum) pro Vertiefung ersetzt. Pro Transfektionsprobe wurden 0,8 µg Plasmid-DNA und 50 µl OptiMEM-Medium (ohne Zusätze) sowie 1 µl „Lipofectamine 2000“ und 50 µl OptiMEM-Medium (ohne Zusätze) vermischt. Nach einer fünfminütigen Vorinkubation bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze vereinigt und nochmals 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl dieser Lipid-DNA-Komplexe pro Vertiefung in das Medium pipettiert.

3.2.11 Reporteragenassays

Transgene Reporteragensysteme werden häufig zur Untersuchung der Genexpression und -regulation in Eukaryonten herangezogen. Die transiente Genexpression induzierbarer Reporteragenkonstrukte kann dabei auch Erkenntnisse über den Einfluss von Verbindungen auf verschiedene Signaltransduktionswege liefern. Als Reporteragen dienen hier die Gene, die für die sekretierbare plazentale, alkalische Phosphatase (SEAP) bzw. Luciferase codieren, wobei der Nachweis über die enzymatische Aktivität der Reporteragen erfolgte. Stimulierte und nicht stimulierte Ansätze dienen dabei als Kontrollen. Nach 24 h wurden die Zellen mikroskopisch auf eventuelle zytotoxische Effekte hin untersucht. Die Chemolumineszenz wurde in einem Microplate-Reader mit Injektor (FLUOstar Omega, BMG Labtech) gemessen.

DUAL-LUCIFERASE-ASSAY

Bei diesem Reporteragen-Assay werden die Zellen mit zwei Reporteragen cotransfiziert, dem experimentellen Reporteragenvektor sowie dem Kontrollvektor. Die Expression des experimentellen Reporteragens wird dabei durch den zu untersuchenden Promoter reguliert, während das Reporteragen des Kontrollvektors konstitutiv exprimiert wird. Um beide Reporteragenzymaktivitäten voneinander unterscheiden zu können, nutzt man eine Kombination aus zwei verschiedenen Luciferase-Genen (Abb. 7). Zum einen das Luciferase-Gen aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*), auch Firefly-Luciferase genannt, das die Oxidation von beetle-Luciferin katalysiert, wobei Licht mit einer Wellenlänge von 560 nm emittiert wird. Das Luciferase-Gen aus dem Seestiefmütterchen (*Renilla reniformis*) hingegen oxidiert Coelenteraten-Luciferin (Coelenterazin), wobei Licht mit einer Wellenlänge von 482 nm emittiert wird. Die unterschiedliche Substratspezifität der Enzyme ermöglicht so eine selektive Zuordnung der biolumineszierenden Reaktion.

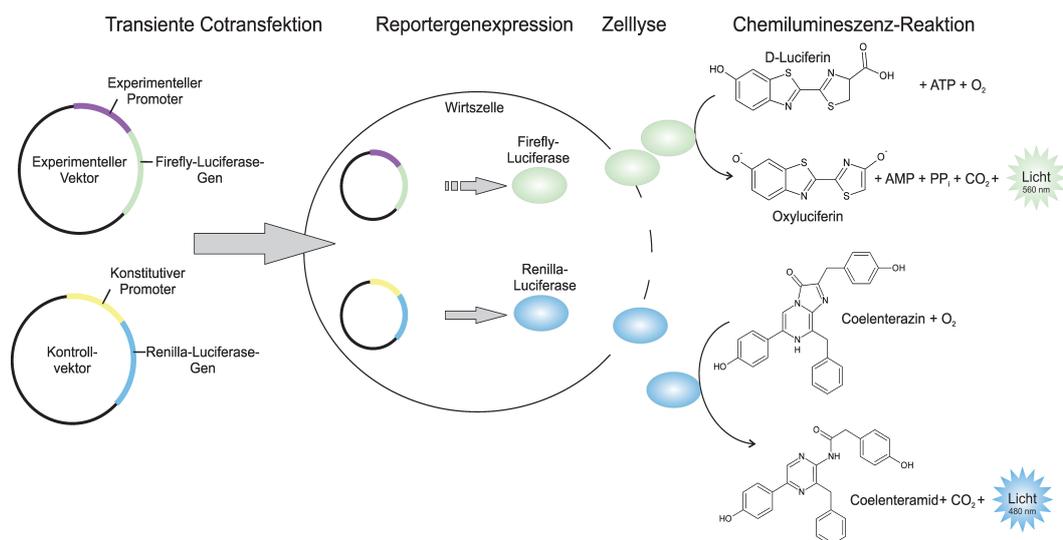


Abbildung 7: Prinzip des Dual-Luciferase-Assays.

Die Normalisierung der Firefly-Luciferase-Aktivität gegen die Aktivität des Kontrollvektors dient dabei dem Ausgleich von Schwankungen in der Zellviabilität, Transfektionseffizienz sowie Probenaufbereitung. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des Dual-Luciferase Assay Systems (Fa. Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben.

SEAP-ASSAY

Die SEAP wird direkt ins Kulturmedium der transfizierten Zellen abgegeben. Zur Messung der SEAP-Aktivität müssen somit keine Zellextrakte angefertigt werden, da hierfür ein Aliquot des Kulturmediums verwendet werden kann. Zur Chemilumineszenz-Detektion wird CSPD, ein 1,2-Dioxethan-Chemilumineszenzsubstrat, als Substrat verwendet, welches durch SEAP dephosphoryliert wird. Hierbei entsteht ein instabiles Dioxethan-Anion, welches unter Lichtemission zerfällt. Durch Zugabe eines Enhancerreagenzes wird das Signal um das 500- bis 1000-fache verstärkt. Ein hoher Background durch eventuell exprimierte endogene alkalische Phosphatasen wird durch die Erhitzung der Probe auf 65°C vermieden, da andere Isoenzyme im Vergleich zu SEAP extrem hitzelabil sind. Die Bestimmung der SEAP-Aktivität erfolgte mit Hilfe des Phospha-Light Systems (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers in einer 96-Lochplatte.

3.2.12 Epithelial-mesenchymale Transition

Um die epithelial-mesenchymale Transition in der Zelllinie BEAS-2B zu untersuchen, wurden die Zellen mit einer Konzentration von 5×10^3 Zellen/ml in Medium M7b in 6-Lochplatten ausgesät. Nach 16 Stunden wurde das Medium erneuert und die Zellen mit 5 ng/ml TGF- β für 48 bzw. 72 h Stunden inkubiert. Wurden die Wirkungen von Testsubstanzen im Zusammenhang mit EMT untersucht, wurden die Zellen eine Stunde vor TGF- β Stimulation mit den jeweiligen Substanzen in frischem Medium inkubiert. Die Bilder zur Zellmorphologie wurden mit einem Olympus CKX41 Mikroskop mit angeschlossener Moticam 2500 aufgenommen. Nach der Behandlung wurde entweder die RNA isoliert für qRT-PCR Analysen oder Proteinextrakte hergestellt für Western Immunoblotting.

3.2.13 Isolation von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Für RNA-Arbeiten wurde ein gesonderter Satz an Chemikalien, Plastikspitzen (gestopft) und Glasgeräten verwendet. Alle verwendeten Lösungen wurden mit Wasser hergestellt, das mit dem RNase-Inhibitor DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt worden war. Zu dessen Herstellung wurde Wasser mit 0,1% (v/v) DEPC über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert.

ISOLATION VON GESAMT-RNA ÜBER RNEASY KIT

Hochreine RNA aus Säugerzellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Fa. QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Sofern die RNA zur cDNA-Synthese

mit nachfolgender qPCR eingesetzt werden sollte, wurde zusätzlich ein DNase-Verdau durchgeführt. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

ISOLATION VON GESAMT-RNA ÜBER TRIZOL

Zur Isolierung von Gesamt-RNA mittels TRIzol wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit TRIzol von der Kulturschale lysiert. Hierzu wurde 1 mL TRIzol pro Vertiefung einer 6-Lochplatte verwendet. Die Suspension wurde in Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufreinigung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden zunächst die Zelltrümmer für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 200 µL Chloroform unter Vortexen extrahiert. Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und die wässrige (obere) Phase in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 500 µL Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µL kaltem 80%-igen Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA wurde in 30 µl RNase/DNase-freiem Wasser gelöst und bis zur reversen Transkription bei -80°C gelagert.

cDNA-SYNTHESE

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte mittels des „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis“-Kits (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) unter Verwendung von Oligo(dT)₁₈ Primern. Die Synthese wurde dabei gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt, wobei 600 ng-1 µg RNA als Ausgangsmaterial eingesetzt wurden.

3.2.14 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren. Hierbei wird die Fluoreszenzemission eines interkalierenden Farbstoffes (SYBR Green) bzw. eines Fluoreszenz-markierten Oligonukleotids (z.B. TaqMan) in Echtzeit gemessen, wobei die Signalstärke der Fluoreszenzfarbstoffe quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt korreliert.

PRIMERDESIGN UND PRÄ-ANALYTISCHE SCHRITTE

Zunächst wurden bereits veröffentlichte Primersequenzen anhand von Datenbankeinträgen des NCBI (National Center for Biotechnology, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) verifiziert. Bei dem Design eigener Primer bzw. der Verifizierung bereits veröffentlichter Primer wurde zunächst die mRNA des Zielgens anhand von Datenbankeinträgen des NCBI mit dem Programm Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) auf die Bildung von Sekundärstrukturen überprüft. Die Primer wurden daraufhin mit der Software Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) so entworfen, dass sie die mRNA innerhalb eines frei zugänglichen

Bereiches binden. Um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primer derart gewählt, dass mindestens einer der beiden Primer eine Exon-Intron-Grenze überspannt. Mit Hilfe des BLAST-Servers des NCBI wurden die Primersequenzen auf mögliche Homologien hin untersucht und anschließend mit dem Programm NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) auf inter- sowie intramolekulare Komplementarität geprüft. Die Spezifität der erstellten Primerpaare wurde im Anschluss auch experimentell per Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese verifiziert.

WAHL DES REFERENZ-GENS

Zu den Anforderungen, die an ein Referenz-Gen gestellt werden, gehören eine konstante Expression sowie ein dem Zielgen ähnliches Expressionsniveau. Zudem sollte es nicht aktiv reguliert werden, da die Stabilität der Expression des Referenz-Gens unter experimentellen Bedingungen eine elementare Voraussetzung für die interne Standardisierung der Genexpression des Zielgens darstellt. Da bisher kein Referenz-Gen gefunden werden konnte, das all diese Anforderungen auch in unterschiedlichen Zelltypen gleichermaßen erfüllt, wurde zunächst die Expression einer Auswahl an Referenz-Genen (GAPDH, β -Actin und 18S rRNA) auf ihre Stabilität unter experimentellen Bedingungen untersucht. Hierzu wurde die Excel-basierende Software BestKeeper verwendet, die aus den Kandidatengen das unter Behandlung am stabilsten exprimierte Haushaltsgen ermittelt ¹²⁹.

DURCHFÜHRUNG DER qRT-PCR

Als Template für die qRT-pCR wurden 10–20 ng revers transkribierte und mit DNase behandelte Total-RNA eingesetzt, wobei jeweils Triplikate der Proben analysiert wurden. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit Wasser anstatt von cDNA (no template control, NTC) angesetzt. Die Amplifikation wurde mit dem Hot Start Taq EvaGreen qPCR-Mix der Fa. Axon Labortechnik (Kaiserslautern) in einem StepOnePlus RT-PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) und folgender Programmierung durchgeführt:

Tabelle 2: qRT-PCR Programmierung

Zyklusanzahl	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95	15 min
30	Denaturierung	94	15 s
	Annealing	56	30 s
	Elongation	72	30 s

ÜBERPRÜFUNG DER SPEZIFITÄT DER AMPLIFIKATION

Obwohl bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen wie SYBR-Green die kostenintensive Synthese und Markierung von Sequenz-spezifischen Sonden entfällt, liegt der Nachteil des Fluoreszenzfarbstoffes in seiner Unspezifität; er lagert sich in alle doppelsträngige DNA-Moleküle ein, d.h. auch an Primer-Dimere oder unspezifische PCR-

Produkte. Allerdings besitzen alle doppelsträngigen DNA-Moleküle einen charakteristischen Schmelzpunkt, der durch ihre Länge sowie GC-Gehalt beeinflusst wird. Daher kann anhand einer Schmelzkurvenanalyse am Ende einer qRT-PCR zwischen verschiedenen PCR-Produkten differenziert werden. Hierzu wird die Temperatur mit einer Heizrate von 0,1°C pro Sekunde von 56°C bis auf 95°C erhöht und kontinuierlich die Fluoreszenzemission gemessen. Sobald Doppelstränge denaturieren (Schmelzpunkt), sinkt das Fluoreszenzsignal. Trägt man graphisch die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur auf, ergeben sich Maxima, die für verschiedene Amplicons spezifisch sind. Beim Auftreten von Primerdimeren oder unspezifischen Amplifikaten wurden die PCR-Bedingungen weiter optimiert, bis nur noch spezifische Amplifikate in der Schmelzkurvenanalyse nachweisbar waren.

LINEARITÄT UND EFFIZIENZ DER AMPLIFIKATION

Um die Linearität zu überprüfen sowie die Effizienz der Amplifikation zu berechnen, wurde eine Verdünnungsreihe gepoolter cDNA der gesamten Untersuchungsreihe erstellt und der lineare Korrelationskoeffizient anhand einer Regressionsgeraden berechnet. Hierfür wurde die eingesetzte Menge an cDNA in einer Verdünnungsreihe in logarithmischer Funktion gegen die C_T -Zykluszahl aufgetragen und die Effizienz aus der Steigung der Standardkurve nach der Formel berechnet ¹³⁰.

QUANTITATIVE AUSWERTUNG UND STATISTISCHE ANALYSE DER QRT-PCR DATEN

Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten Proben wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgte dabei über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Pfaffl ¹³¹. Bei diesem Modell wird der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, der zusätzlich gegen ein Referenzgen normalisiert wird, aus der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnet. Dabei wird zunächst zur Normierung für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des Referenzgens von dem C_T -Wert des Zielgens subtrahiert ($\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ Referenzgen}}$) und danach vom ΔC_T der experimentell behandelten Probe der ΔC_T der unbehandelten Kontrolle abgezogen. Die Voraussetzung für diese Formel ist allerdings eine optimale PCR-Effizienz ($E = 2,0$) in allen Proben, bei der sich die DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus verdoppelt. Realistische Effizienzen liegen jedoch, selbst bei optimierten Bedingungen, im Bereich von 1,7 bis 1,9. Da bereits geringste Effizienzunterschiede bei der Berechnung der relativen Expression zu enormen Schwankungen in den Expressionsunterschieden führen, weswegen das Effizienz-korrigierte Quantifizierungsmodell verwendet wurde, das die unterschiedlichen Effizienzen nach der folgenden Formel berücksichtigt:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CT \text{ Zielgen (Kontrolle-Behandlung)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CT \text{ Referenzgen (Kontrolle-Behandlung)}}$$

Ratio = relatives Expressionsverhältnis

E_{Zielgen}	= Effizienz der Amplifikation des Zielgens
$E_{\text{Referenzgen}}$	= Effizienz der Amplifikation des Referenzgens
$\Delta CT_{\text{Zielgen}}$	= Differenz der C_T -Werte des Zielgens von Kontrolle und Behandlung
$\Delta CT_{\text{Referenzgen}}$	= Differenz der C_T -Werte des Referenzgens von Kontrolle und Behandlung

3.2.15 Isolierung von Proteinen, SDS-PAGE und Western Blot

PROTEINISOLATION (GESAMTZELLYSAT)

Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und für 24 h inkubiert. Nachdem die Zellen für weitere 24 Stunden in Serum-reduzierten Medium (0,5%) und 1% Antibiotika-Lösung ausgehungert wurden, erfolgte die Applikation der Testsubstanzen in frischem Medium und einstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach Induktion mit Zytokinen für die jeweils angegebene Dauer, wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und danach mit RIPA- oder Totex-Puffer 30 min im Kühlraum (4°C) auf einem Plattenschüttler lysiert. Nach Abschaben mit einem Zellschaber (Fa. Greiner Bio-One) und mehrmaligem Hoch- und Runterpipettieren, um den Zellaufschluss zu verbessern, wurde das Gemisch in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Pelletierung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (1000xg, 4°C, 10 min) wurden der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Nutzung bei -80°C aufbewahrt.

HERSTELLUNG VON ZYTOPLASMATISCHEN UND NUKLEÄREN PROTEINEXTRAKTEN

Die Herstellung von Kernextrakten erfolgte nach der High-salt-Methode von Andrews und Faller¹³². Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in PBS abgeschabt und in frische Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 1,5 Volumen Puffer A pro Volumen Zellpellet aufgenommen. Nach Resuspendieren und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde Triton X zu einer endgültigen Konzentration von 0,5% hinzugefügt und durch kurzes Hoch- und Runterpipettieren vermischt. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 4°C und 6000 rpm wurde der Überstand (zytoplasmatischer Extrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration bestimmt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das nukleäre Pellet wurde in einem 1:1 Volumenverhältnis in Lösung B vorsichtig resuspendiert und danach bei 12.000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in einem 1:1 Volumenverhältnis in Lösung C aufgenommen und im Kühlraum (4°C) 20 min lang alternierend gevortext (1 min) und auf Eis ruhen gelassen (1 min), um die Nuclei aufzubrechen. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C für 10 min wurde der Überstand (Kernextrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Aceton-Fällung der Proteine über Nacht bei -20°C und Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C für 10 min wurde der Überstand entfernt und das Proteinpellet nochmals mit kaltem Aceton gewaschen, um Salzrückstände zu entfernen. Das Pellet wurde in Proteinlyse-Puffer resuspendiert, die Proteinkonzentration bestimmt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

IMMUNOPRÄZIPITATION BZW. CO-IMMUNOPRÄZIPITATION VON PROTEINEN

Hierzu wurde zunächst ein Gesamtzelllysat in NP40-Lysepuffer bei konstanter Agitation (30–60 min, 4°C) hergestellt, zentrifugiert und der Proteingehalt des Überstandes bestimmt. Von jeder Probe wurde dieselbe Menge an Protein (100–500 µg) eingesetzt und die Proben mit PBS auf 1 µg/µl verdünnt. Zunächst wurden die Proben für 30 min mit 20 µl resuspendiertem Protein A/G PLUS bei 4°C end-over-end inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 14.000 rpm) wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und der spezifische Antikörper bzw. IgG als non-spezifische Kontrolle den Herstellerangaben entsprechend hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C end-over-end wurden noch 20 µl resuspendiertem Protein A/G PLUS über Nacht hinzugefügt. Nach Abzentrifugieren und viermaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurde das Pellet in Lämmli-Puffer aufgekocht (10 min, 95°C), um Protein und Agarose zu trennen. Nach erneuter Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand per SDS-PAGE aufgetrennt und per Immuno-Blotting analysiert.

QUANTIFIZIERUNG VON PROTEINEN

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bicinchoninsäure (BCA)-Assay nach Smith *et al.* durchgeführt, der auf der Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen durch Proteinseitenketten unter alkalischen Bedingungen beruht¹³³. Zur Quantifizierung wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Karlsruhe) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Mit Hilfe einer Standardkurve für bovines Serumalbumin (BSA) wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt.

ELEKTROPHORESE UND WESTERN-IMMUNOBLOTTING DER PROTEINE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), wobei Trenngele mit einer Acrylamid-Konzentration von 6–12% verwendet wurden. Hierzu wurden die Proteinproben zunächst in einem SDS-haltigen Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Als Standardmarker zur Zuordnung der Proteingröße wurde der Proteinmarker PageRuler Prestained Protein Ladder (10–80 kDa) verwendet. Unmittelbar nach der Protein-Elektrophorese wurde der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran, Fa. Schleicher & Schüll) in einer Semi-Dry-Blot Apparatur (Trans-Blot SD, Fa. BioRad) vorgenommen. Hiernach wurde die Membran mit 5% Blocking Puffer für 2 h bei RT abgesättigt und danach über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach 3-maligem Waschen mit TBST-Puffer mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für weitere 1 ½ Stunden bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem. Bei Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von Proteinen wurde zunächst die Phosphorylierung untersucht und danach die Membran gestrippt. Hierzu wurde diese eine Stunde bei 55°C in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend in TBST-Puffer bei RT dreimal 10 min lang gewaschen. Nach erneuter Inkubation in Blocking-

Puffer über eine Stunde bei RT, wurde eine erneute Antikörperdetektion durchgeführt, um die erfolgreiche Entfernung der Antikörper zu kontrollieren. Anschließend wurde die Membran erneut gemäß oben mit Primärantikörper für das unphosphorylierte Protein inkubiert und nach Behandlung mit dem entsprechenden Sekundärantikörper detektiert, was als Kontrolle der Proteinmenge diente.

3.2.16 ProteomProfiler

Mittels eines „Proteome Profilers“ lässt sich die Proteinexpression einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen parallel untersuchen. Dabei binden zunächst die Chemo- sowie Zytokine in der Probe an spezifische Antikörper (s. Abb. 8, Schritt 1), die auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert sind. Im zweiten Schritt binden biotinylierte Antikörper an die Protein-Antikörper-Komplexe. Der Nachweis erfolgt über die Zugabe von Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase und Chemilumineszenz-Detektionsreagenz (Schritt 3), wobei die Intensität des entstehenden Lichtsignals proportional zu der gebundenen Proteinmenge ist.

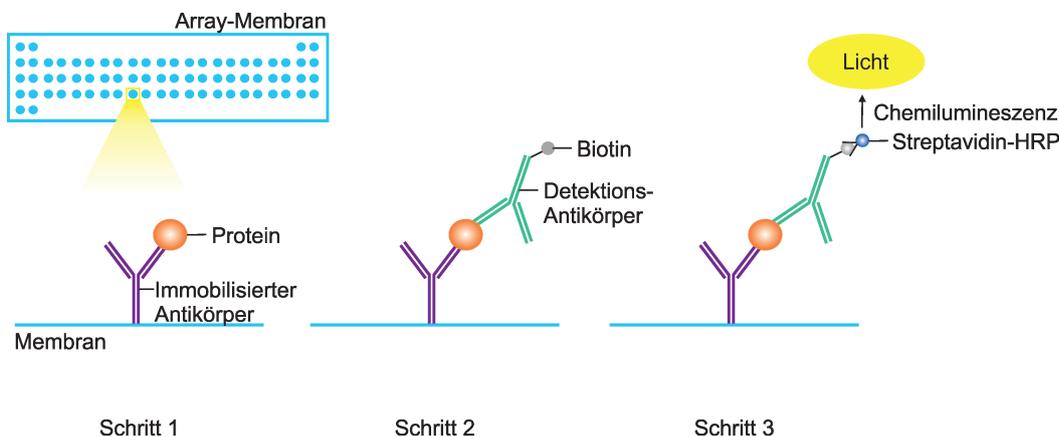


Abbildung 8: Funktionsprinzip des Proteom Profilers.

Für diesen Versuchsteil wurden A549-Zellen 24 h vor Versuchsbeginn in serumreduzierten Medium (0,5% FKS) mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml in 6-Lochplatten ausgesät. Die Applikation der Testsubstanz erfolgte eine Stunde vor der Induktion der Zellen mit IL-4 und IL-13 (jeweils 5 ng/ml). Nach 16 Stunden wurde der Überstand abgenommen und mögliche Zelltrümmer bei 1000xg und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß der Herstellerangaben.

3.2.17 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Um die Bindung bestimmter Proteine *in vivo* an spezifische DNA-Sequenzen nachzuweisen, wurden Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIPs) durchgeführt. Dazu wurden zunächst die an die DNA gebundenen Proteine durch Cross-Linking mit Formaldehyd an der DNA fixiert und die DNA im Anschluss durch Ultraschallbehandlung in Fragmente geschnitten.

Nach Immunpräzipitation der DNA-Protein-Komplexe und nachfolgender Aufreinigung der DNA konnte mittels qRT-PCR mit sequenzspezifischen Primern die Assoziation eines Proteins mit einem bestimmten DNA-Bereich nachgewiesen werden. Hierbei wurde der Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit endogenen Promotoren untersucht.

Pro Immunpräzipitation wurden Zellen in sterilen Petrischalen (Durchmesser 10 cm) in 20 ml Medium ausgesät und entsprechend vorbehandelt. Um Proteine und DNA crosszulinken, wurde dem Medium Formaldehyd (Endkonzentration: 1%) hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei RT unter leichter Agitation inkubiert. Durch die Zugabe von Glycin (Endkonzentration: 125 mM) wurde die Reaktion gequencht. Nach Entfernen des Mediums wurde der Zellrasen zweimal mit eiskaltem PBS gespült und danach in PBS (mit Protease-Inhibitoren) mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (1.500 rpm, 4°C, 10 min) und das Pellet in 10 ml eiskaltem ChIP-Lysepuffer inkubiert (10 min). Die Zellkerne wurden bei 1.000 rpm und 4°C für 10 min gesammelt und in 1 ml Kern-Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis sonifiziert, wobei 6 Zyklen von 15-Sekunden Pulse (50% output) gefolgt von einer 2-minütigen Pause durchgeführt wurden. Im Anschluss wurde per Agarose-Gelelektrophorese die Größe der DNA-Fragmente überprüft. Hierzu wurde an dieser Stelle das Cross-Linking eines Aliquots durch Zugabe von 200 mM NaCl und Inkubation über Nacht bei 65°C aufgehoben. Lag die Fragmentgröße durchschnittlich über 100-1000 bp, wurden weitere Sonifikationszyklen durchgeführt. Nach Konzentrationsbestimmung der DNA wurden jeweils 100 µg in neue Reaktionsgefäße aliquotiert und mit Dilution-Puffer auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt. Zunächst wurde das Chromatin mit 50 µl Protein A/G PLUS, das zuvor mit sonifizierter Lachssperma-DNA inkubiert wurde, für ein bis zwei Stunden bei 4°C end-to-end vorinkubiert (Preclearing). Nach Zentrifugation bei 3.000 rpm und 4°C für 5 min, wurde der Überstand in frische Gefäße überführt und 1% des Überstandes als Input-Probe abgenommen und für später aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde über Nacht mit den spezifischen Antikörpern gemäß der Herstellerangaben bzw. ein Ansatz mit IgG als unspezifische Kontrolle inkubiert. Nach Hinzufügen von 50 µl Protein A/G PLUS, das zuvor mit sonifizierter Lachssperma-DNA inkubiert wurde, und weiterer zweistündiger Inkubation bei 4°C und end-to-end Rotation, wurden die Proben bei 3.000 rpm und 4°C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 1 ml high-salt ChIP-Waschpuffer resuspendiert und für 10 min bei RT end-to-end rotiert. Nach Zentrifugation (3.000 rpm, 2 min, RT) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und der Waschvorgang mit high-salt ChIP-Waschpuffer noch weitere dreimal durchgeführt. Als nächstes wurde das Pellet zweimal mit TE-Puffer gewaschen und das Pellet danach in 300 µl ChIP-Elutionspuffer, der zuvor mit 1 µl Proteinase K (20 µg/µl) supplementiert wurde, für 2 Stunden bei 45°C inkubiert, um die Proteine proteolytisch abzubauen. Die anschließende Inkubation über Nacht bei 65°C diente der Aufhebung des Cross-Linking. Nach Abzentrifugieren (14.000 rpm, 5 min, RT) wurden die DNA-enthaltenden Überstände über spin columns der Fa. QIAGEN, HILDEN gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Zur

Analyse der Chromatin-Immunopräzipitation wurde das präzipitierte Material als Template in einer quantitativen Real-Time PCR eingesetzt.

3.2.18 Nachweis von Apoptose/Nekrose per Durchflusszytometrie

Bei apoptotischen Zellen transloziert Phosphatidylserin, das sich bei lebenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet, auf die Außenseite der Membran und wird dort von Annexin V gebunden. Da die bei nekrotischen Zellen permeabilisierte Zellmembran ebenfalls die Bindung von Annexin erlaubt, allerdings an der Innenseite der Zellmembran, erfolgt eine zusätzliche Färbung mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumjodid, der die Differenzierung zwischen Zellen im frühen Apoptosestadium (Annexin V positiv, Propidiumjodid negativ) und Zellen im späten Apoptosestadium bzw. nekrotischen Zellen (Annexin V positiv, Propidiumjodid positiv) erlaubt, da Propidiumjodid nur die perforierten Zellmembranen nekrotischer Zellen bzw. von Zellen im später Apoptosestadium passieren kann.

Jurkat-Zellen wurden in 6-Lochplatten mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät und mit den Testsubstanzen für 6 bzw. 16 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle für Apoptose dienten dabei mit Camptothecin behandelte Zellen, während mit Methanol behandelte Zellen als Positivkontrolle für Nekrose verwendet wurden. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert (500xg, 4°C, 10 min) und das Pellet in eiskaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (500xg, 4°C, 10 min) wurde das Zellpellet mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in PBS aufgenommen. Die Zellen wurden mit 5 µl der Annexin V-FITC Lösung sowie 2,5 µl der nach Herstellerangaben verdünnten Propidiumjodid-Lösung auf Eis für 10 min inkubiert und danach 400 µl binding buffer hinzugefügt. Nach Pipettieren der Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb, um Zellaggregationen aufzulösen, wurden die Proben in einem Durchflusszytometer (Bio-Rad S3 Cell Sorter mit 2 Lasern (488 nm und 561 nm, jeweils 100 mW) vermessen. Tabelle 3 zeigt dabei die Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Kaluza Flow Cytometry Analysis Software Version 1.3 der Fa. Beckman Coulter, wobei die Daten als zweidimensionale Punkt-Diagramme (dot-plots) sowie in Form eines gestapelten Säulendiagramms dargestellt wurden.

Tabelle 3: Absorptions- und Emissionwellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzkanal	Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FL1	Fluoreszein- isothiocyanat (FITC)	494 nm	518 nm
FL2	Propidiumjodid	535 nm	617 nm

ERGEBNISSE

3.

3.1 Isolierung von Cyclonerodiol aus *Fusarium sp.*

Das Sesquiterpen Cyclonerodiol (s. Abb. 9) wurde bereits in eigenen Vorarbeiten aus dem Ascomyceten *Fusarium sp.* (E01031) isoliert und als Inhibitor der IL-4 induzierten Signaltransduktion in der hepatozellulären Adenokarzinom-Zelllinie HepG2 isoliert. Die Strukturaufklärung der Substanz, die ein Molekulargewicht von 240,38 g/mol besitzt, erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Opatz (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) ^{134,135}.

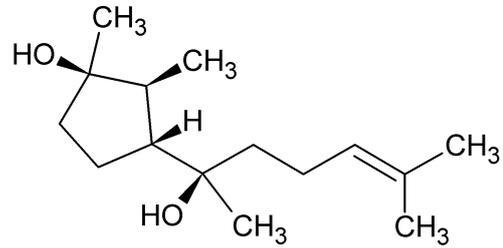


Abbildung 9: Strukturformel von Cyclonerodiol (C₁₅H₂₈O₂)

3.1.1 Fermentation von *Fusarium sp.* und Optimierung der Ausbeute von Cyclonerodiol

Die Fermentation des Ascomyceten erfolgte zunächst als Submerskultivierung im 20 l-Fermenter bei RT in Doppelmalzmedium und führte zur Reindarstellung von 3,6 mg Cyclonerodiol. Um eine Erhöhung der Ausbeute zu erzielen, wurden im weiteren Verlauf verschiedene Medien (BAF, Malz, HA, HMG) sowie unterschiedliche Fermentationsbedingungen bezüglich Temperatur und pH-Wert getestet. Die Ausbeute an Cyclonerodiol ließ sich dabei durch die Verwendung von Malzmedium um das 1,6-fache steigern. Zudem bewirkte eine Verlängerung der Fermentationsdauer um mehrere Tage eine zusätzliche Erhöhung der Cyclonerodiol-Ausbeute, was in Abbildung 10A dargestellt ist.

Die Fermentationsdauer lag bei acht Tagen, wobei der Pilz ab dem vierten Tag von der exponentiellen in eine lineare Wachstumsphase überging, was mit dem Verlust freier Glukose im Medium einherging. Zeitnah hierzu begann der Pilz, die ebenfalls im Medium vorhandene Maltose abzubauen. Der ursprüngliche pH-Wert von 5,6 fiel zunächst auf 4,5

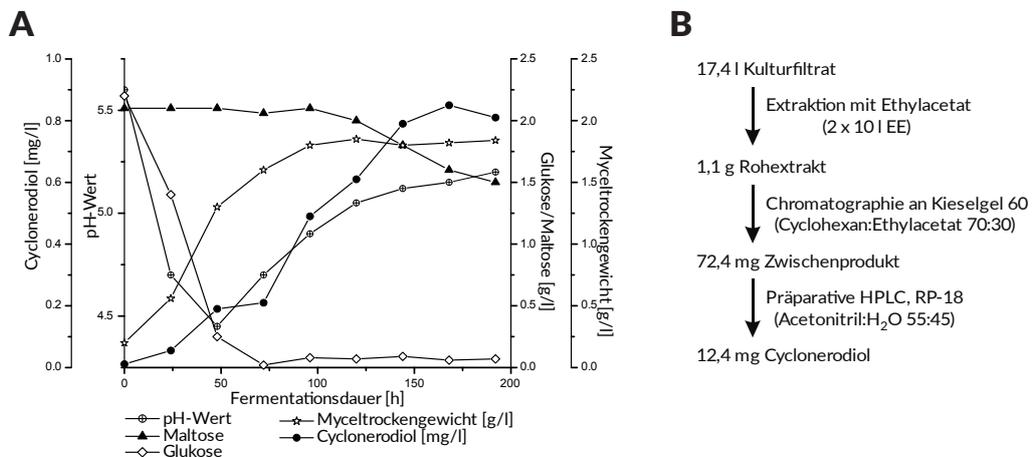


Abbildung 10: Optimierte Fermentation von *Fusarium sp.* im 20 l-Maßstab (A) und Aufreinigungsschema von Cyclonerodiol (B).

ab, stieg aber im weiteren Verlauf wieder auf einen Wert von 5,2. Mittels analytischer HPLC wurde die Produktion von Cyclonerodiol verfolgt und anhand eines internen Standards quantifiziert. Am fünften Tag stieg die Cyclonerodiol-Konzentration nochmals sprunghaft an. Die Fermentation wurde am achten Tag abgebrochen, nachdem die Cyclonerodiol-Konzentration zu sinken begann.

Nachdem Mycel und Kulturfiltrat über eine Nutsche per Vakuumfiltration voneinander getrennt wurden, wurden die 17,4 l Kulturfiltrat mit Ethylacetat extrahiert (s. Abb. 10B). Nach Destillation im Rotationsverdampfer wurden 1,1 g Rohextrakt gewonnen, die über Säulenchromatographie an Kieselgel 60 weiter aufgetrennt wurden. Aus dem aktiven Zwischenprodukt der Fraktion 70:30 wurde per präparativer HPLC 12,4 mg Cyclonerodiol gewonnen.

3.2 Biologische Charakterisierung von Cyclonerodiol

3.2.1 Wirkung von Cyclonerodiol in verschiedenen Reporterassays in A549-Zellen

STAT6 VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION

In eigenen Vorarbeiten wurde Cyclonerodiol bereits in der humanen, hepatozellulären Leberkarzinomzelllinie HepG2 als spezifischer Inhibitor der IL-4 induzierten Signaltransduktion (IC_{50} 9,7 μ M) beschrieben, die durch den Transkriptionsfaktor STAT6 vermittelt wird¹³⁴. Um die Substanz jedoch in einem Asthma-relevanten Kontext zu untersuchen, wurden weitere Versuche in der humanen Bronchialzelllinie A549 durchgeführt, die Charakteristika von alveolären Epithelzellen (Typ II) aufweist. Zur Verifizierung der Wirkung in der bronchialen Epithelzelllinie wurden die Zellen mit dem Luciferase-Reportervektor pGL3-TK-7xN₄ und dem Renilla-Reportervektor pRL-EF1 α mittels Elektroporation cotransfiziert. Das Renilla-Reportergen steht dabei unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Promoters des Elongationsfaktors 1 α und diente als interner Standard zum Ausgleich von experimentellen Schwankungen in der Zellviabilität, Transfektionseffizienz sowie Probenaufbereitung¹³⁶.

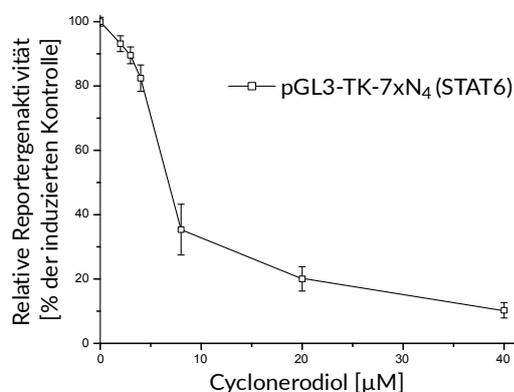


Abbildung 11: Wirkung von Cyclonerodiol auf die durch IL-4 induzierte und STAT6-vermittelte Reporterexpression.

A549-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pGL3-TK-7xN₄ und dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1 α per Elektroporation transfiziert. Nach Applikation der Testsubstanz und 24-stündiger Inkubation mit IL-4 (5 ng/ml) wurde die Reporterexpression gemessen und gegen den Kontrollvektor normiert.

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 2 technischen Replikaten.

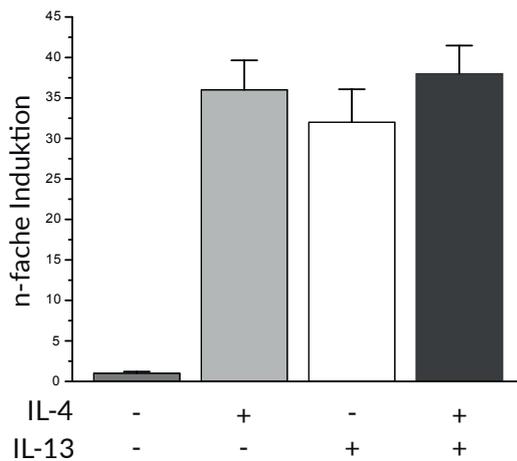


Abbildung 12: Induzierbarkeit des STAT6 abhängigen Reporter-genkonstruktes pGL3-TK-7xN₄ in A549-Zellen durch IL-4, IL-13 bzw. einem kombinierten Stimulus aus beiden Zytokinen.

A549-Zellen wurden mit dem Reporter-gen-konstrukt pGL3-TK-7xN₄ und dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1α per Elektroporation transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation mit IL-4 (5 ng/ml) oder IL-13 (5 ng/ml) allein oder einer

Kombination aus beiden (jeweils 5 ng/ml) wurde die Reporter-gen-expression gemessen und gegen den Kontrollvektor normiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 3 technischen Replikaten.

24 Stunden nach Elektroporation wurden verschiedene Konzentrationen von Cyclonerodiol appliziert und die Zellen für weitere 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-4 stimuliert, wonach die Luciferase-Aktivität gemessen wurde. Für die Zelllinie A549 konnte so eine IC₅₀ von 6,7 µM ermittelt werden (s. Abb. 11).

Der STAT6-vermittelte Signalweg wird nicht nur durch Interleukin 4, sondern auch durch Interleukin-13 induziert, welches im Zusammenhang mit Asthma ebenso wie Interleukin-4 proinflammatorische Prozesse fördert¹³⁷. Daher sollte die Wirkung von Cyclonerodiol auch auf die durch IL-13 induzierte Signaltransduktion untersucht werden. Dazu wurde zunächst getestet, ob die STAT6-abhängige Reporter-gen-expression in A549-Zellen durch IL-13 induziert werden kann. Die Zellen wurden hierzu wie oben beschrieben transfiziert und mit IL-4,

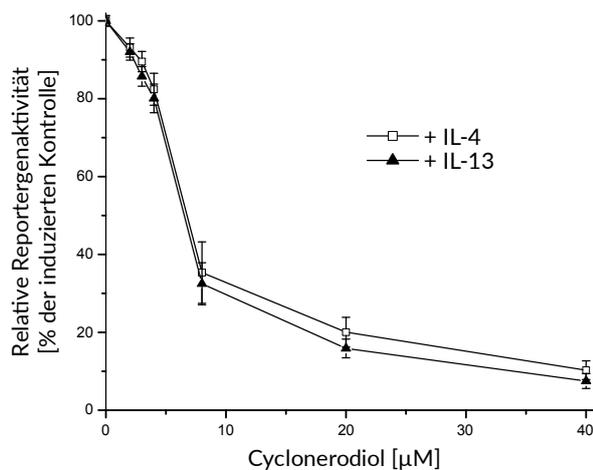


Abbildung 13: Wirkung von Cyclonerodiol auf die durch IL-13 bzw. IL-4 induzierte und STAT6-vermittelte Reporter-gen-expression.

A549-Zellen wurden mit dem Reporter-genkonstrukt pGL3-TK-7xN₄ und dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1α per Elektroporation transfiziert. Nach Applikation der Testsubstanz und 24-stündiger Inkubation mit IL-4 (5 ng/ml) bzw. IL-13 (5 ng/ml) wurde die Reporter-gen-expression gemessen und gegen den Kontrollvektor normiert.

Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 3 technischen Replikaten.

IL-13 oder einer Kombination aus beiden stimuliert. In A549-Zellen ließ sich die STAT6-abhängige Signaltransduktion durch IL-13 ebenso induzieren wie durch IL-4. Die kombinierte Applikation von beiden Zytokinen führte dabei allerdings zu keiner signifikanten Steigerung der Reporterexpression (s. Abb. 12). Auch die durch IL-13 induzierte Reporterexpression wurde durch Cyclonerodiol mit einer IC_{50} von 6,6 μM inhibiert (s. Abb. 13).

WIRKUNG AUF ANDERE SIGNALWEGE SOWIE DIE PROMOTERAKTIVITÄT ENTZÜNDUNGSRELEVANTER GENE

Um festzustellen, ob es sich bei Cyclonerodiol um einen spezifischen Inhibitor des STAT6 vermittelten Signalweges handelt oder ob mehrere JAK/STAT Signalwege beeinflusst werden, wurden die STAT1/2-vermittelte sowie die STAT3-vermittelte Signaltransduktion in A549-Zellen untersucht. Desweiteren wurde weitere entzündungsrelevante Signalwege analysiert, an deren Signaltransduktion andere Transkriptionsfaktoren (NF κ B und Smad2/3) beteiligt sind. Die Transkriptionsfaktoren NF κ B und Smad2/3 aktivieren dabei die Expression inflammatorischer und fibrotischer Gene, die im Zusammenhang mit Asthma eine Rolle spielen. Zudem wurde die Wirkung von Cyclonerodiol auf die Promoteraktivität entzündungsrelevanter Gene (TNF- α , IL-8) untersucht. Hierzu wurden A549-Zellen mit Reportergenkonstrukten transfiziert, deren Luciferase-Expression unter der Kontrolle des IL-8-Promoters bzw. des TNF α -Promoters steht.

Die Expression aller Reportergene wurde dabei bis zu einer getesteten Cyclonerodiolkonzentration von 40 μM nicht inhibiert (s. Abb. 14 und 15).

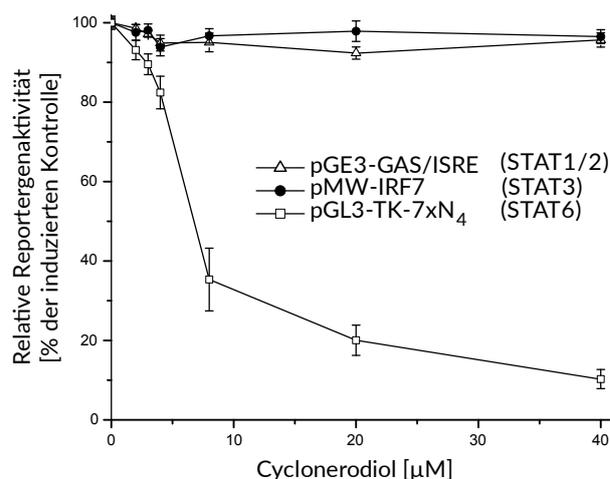


Abbildung 14: Wirkung von Cyclonerodiol auf die durch IL-13 bzw. IL-4 induzierte und STAT6-vermittelte Reporterexpression.

A549-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt pGL3-TK-7xN₄ und dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1 α per Elektroporation transfiziert. Nach Applikation der Testsubstanz und 24-stündiger Inkubation mit IL-4 (5 ng/ml) bzw. IL-13 (5 ng/ml) wurde

die Reporterexpression gemessen und gegen den Kontrollvektor normiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 2 technischen Replikaten.

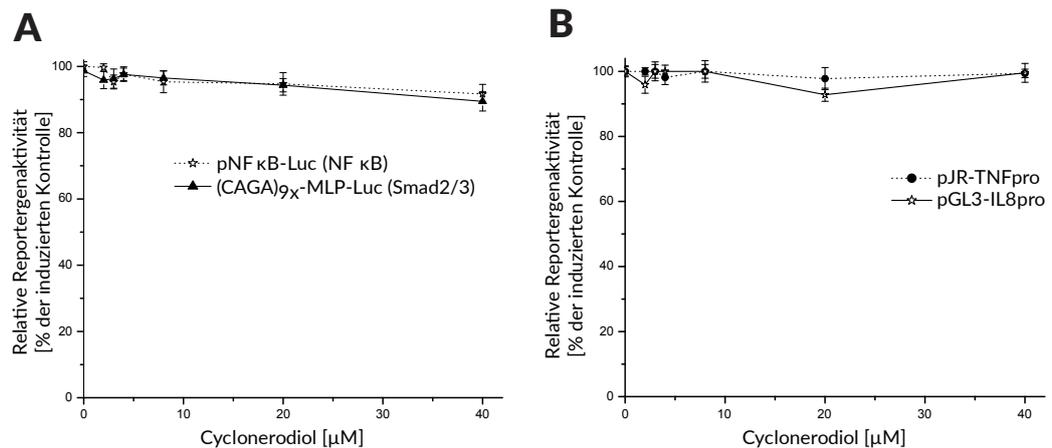


Abbildung 15: Wirkung von Cyclonerodiol auf die NFκB- und Smad2/3-vermittelte Signaltransduktion (A) sowie die Promoteraktivität der entzündungsrelevanten Gene TNF-α und IL-8 (B).

A549-Zellen wurden mit den angegebenen Reportergenkonstrukten sowie dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1α transient cotransfiziert und anschließend für 24 h mit verschiedenen Cyclonerodiolkonzentrationen sowie Induktoren der entsprechenden Signalwege (NFκB: 10 ng/ml TNF-α; Smad2/3: 5 ng/ml TGF-β; TNFpro/IL8pro: 100 ng/ml LPS) stimuliert. Die Expression des experimentellen Reportergens wurde gegen die Expression des Kontrollvektors normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 technischen Triplikaten

3.2.2 Effekt von Cyclonerodiol auf die mRNA-Expression Asthma-relevanter Gene in A549-Zellen

ZEITREIHENANALYSE

Mittels einer Zeitreihe wurde zunächst ermittelt, zu welchem Zeitpunkt (2h, 4h, 6h, 8h) nach Stimulation von A549 Zellen mit IL-4 und IL-13 die Änderung der mRNA-Menge Asthma-relevanter Gene wie Chemokin (C-X-C motif) Ligand 1 (*cxcl-1*), Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (*ccl-2*) und Eotaxin-1 (*ccl-11*) am stärksten war (s. Abb. 16). Zur Normierung wurde das housekeeping Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (*gapdh*) als Referenzgen verwendet. Da die Änderung der mRNA-Menge von Eotaxin-1 erst nach 8 Stunden ihr Maximum erreichte, die beiden anderen Gene jedoch bereits eine rückläufige Tendenz zu diesem Zeitpunkt aufwiesen, wurde für die folgenden Expressionsstudien eine 6-stündige Induktionszeit gewählt, da bei dieser Induktionsdauer für alle getesteten Gene ein deutlicher Anstieg in der mRNA-Menge gegenüber der uninduzierten Kontrolle nachgewiesen werden konnte.

IL-4 UND IL-13 INDUZIERTER MRNA-EXPRESSION ASTHMA-RELEVANTER GENE

Abbildung 17 zeigt die Wirkung von Cyclonerodiol auf die mRNA-Menge von Genen, die in A549-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit IL-4 und IL-13 induziert wurden. Bei den

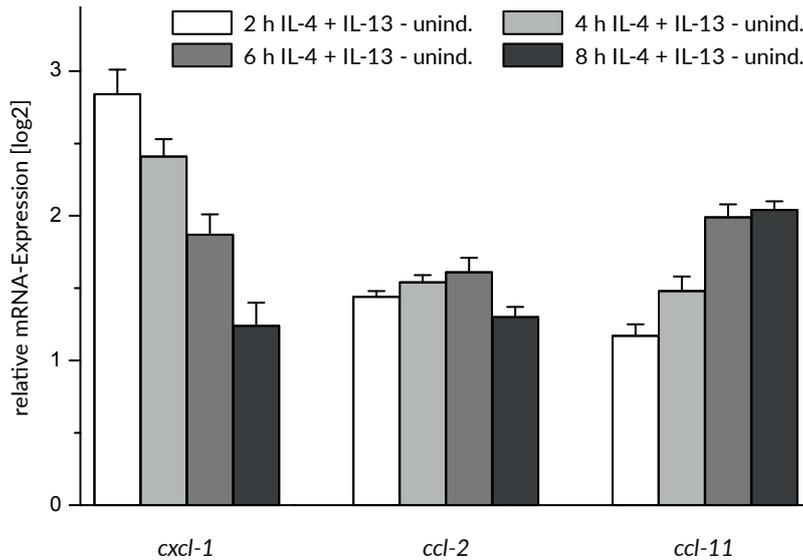


Abbildung 16: Änderung der mRNA-Menge [log2] der Asthma-relevanten Gene Chemokin (C-X-C motif) Ligand 1 (*cxcl-1*), Monozyten-Chemoattraktor-Protein-2 (*ccl-2*) und Eotaxin-1 (*ccl-11*) in A549-Zellen nach 2-, 4-, 6- bzw- 8-stündiger Stimulation mit IL-4 und IL-13.

A549-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit jeweils 5 ng/ml IL-4 und IL-13 stimuliert und die relative mRNA-Expression per qRT-PCR bestimmt. Angabe der Werte als Quotient [log2] der relativen mRNA-Menge von IL-4/-13 induzierten gegen uninduzierte Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 technischen Triplikaten.

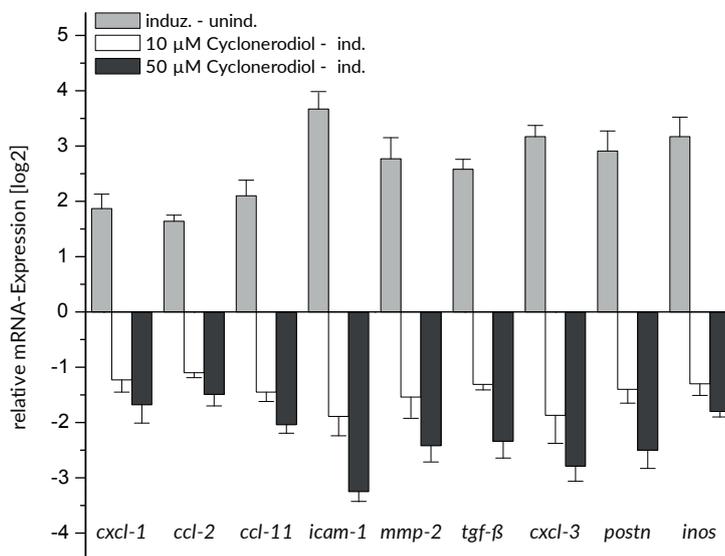


Abbildung 17: Effekt von Cyclonerodiol auf die mRNA-Expression Asthma-relevanter Gene in A549-Zellen.

Nach einstündiger Vorbehandlung mit 50 μ M Cyclonerodiol wurden die Zellen für 6 h mit IL-4 (5 ng/ml) und IL-13 (5 ng/ml) stimuliert. Angabe der Werte als Quotient [log2] der relativen mRNA-Menge von IL-4/-13 induzierten gegen uninduzierte Zellen bzw. von Cyclonerodiol behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen. Zur Normierung wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) als Referenzgen verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 technischen Triplikaten.

Genen handelt es sich, zusätzlich zu den drei bereits genannten, um das Chemokin (C-X-C motif) Ligand 3 (*cxcl-3*), intercellular adhesion molecule 1 (*icam-1*), transforming growth factor β (*tgf-\beta*), Matrix-Metalloprotease 2 (*mmp-2*), Periostin (*postn*) und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (*inos*). Cyclonerodiol hemmte bereits ab einer Konzentration von 10 μM die mRNA-Expression dieser Asthma-relevanten Gene um mind. 50%, was durch eine Konzentrationserhöhung auf 50 μM noch auf mind. 80% verstärkt werden konnte. Nur die Transkriptmenge der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (*inos*) wurde durch das Sesquiterpen schwächer beeinflusst: hier reduzierte Cyclonerodiol selbst bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 μM die Transkriptmenge nur um 50%.

3.2.3 Effekt von Cyclonerodiol auf die Expression Asthma-relevanter Proteine in A549-Zellen

Die Wirkung von Cyclonerodiol auf die Expression inflammatorischer Proteine wurde mit Hilfe eines auf biotinylierten Antikörpern basierenden Proteinarrays der Firma R&D Systems untersucht, der es ermöglicht, simultan multiple Zyto- und Chemokine mehrerer biologischer Proben zu detektieren. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse des Proteom Profiler

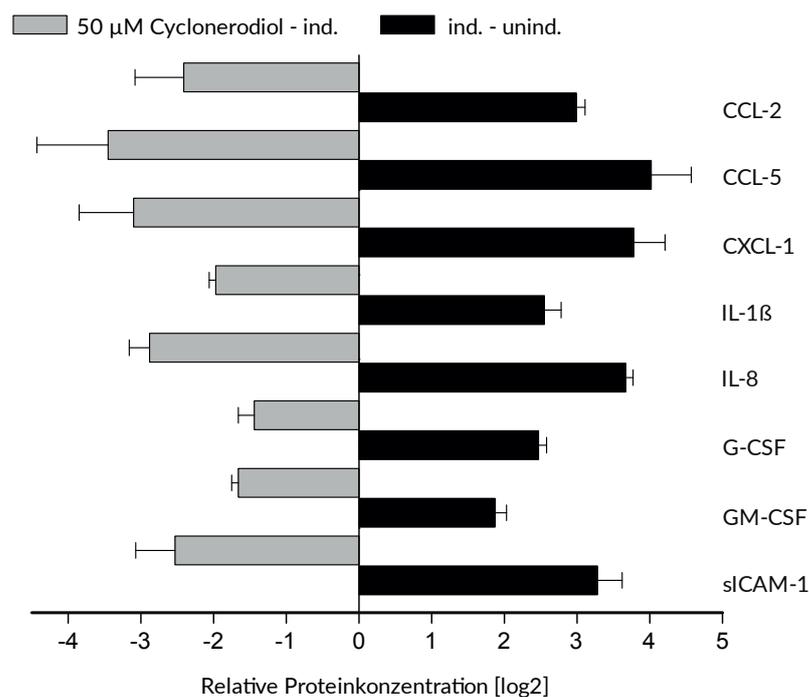


Abbildung 18: Wirkung von Cyclonerodiol auf die durch IL-4 und IL-13 induzierte Proteinexpression Asthma-relevanter Chemokine und Zytokine.

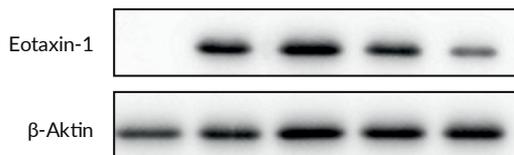
A549-Zellen wurden für 1 h mit 50 μM Cyclonerodiol vorinkubiert und danach für 24 h mit IL-4 (5 ng/ml) und IL-13 (5 ng/ml) stimuliert. Asthma-relevante Proteine im Zelllysate wurden mit Hilfe des Proteom Profilers Human Cytokine Array (Panel A) per Chemilumineszenz-Reaktion detektiert und densitometrisch analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert [log2] der relativen Proteinkonzentration (IL-4/-13 induzierte gegen uninduzierte Zellen bzw. mit Cyclonerodiol behandelte, induzierte Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen) sowie Standardabweichung zweier biologischer Replikate.

Arrays zusammenfassend dargestellt. Durch Zytokinbehandlung (IL-4 und IL-13) wurde die Expression einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen deutlich angeregt, wobei vor allem CCL-2, CCL-5, CXCL-1, IL-8 und soluble ICAM-1 (sICAM-1) induziert wurden, die bei Asthma für die Rekrutierung von Immunzellen verantwortlich sind. Aber auch IL-1 β , G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) wurden durch IL-4 und IL-13 positiv reguliert. Durch die Vorbehandlung der Zellen mit 50 μ M Cyclonerodiol konnte dabei die Expression dieser Proteine um mind. 60% herabreguliert werden.

Weitere Proteine, die im Zusammenhang mit Asthma eine wichtige Rolle übernehmen, sind u.a. Eotaxine. Diese Chemokin-Familie wird mit Allergen-induziertem, eosinophilem Asthma in Verbindung gebracht und ist neben Interleukin-5 für die selektive Rekrutierung eosinophiler Granulozyten verantwortlich¹³⁸. Da Interleukin 4 und 13 potente Induktoren dieser Chemokin-Familie darstellen, wurde zusätzlich der Effekt von Cyclonerodiol auf die Eotaxin-Expression in A549-Zellen untersucht. Dazu wurden A549-Zellen eine Stunde mit Cyclonerodiol vorbehandelt und für weitere 24 Stunden mit 5 ng/ml IL-4 stimuliert. Der Nachweis von Eotaxin-1 in Zellextrakten erfolgte mittels Western Immunoblotting. Bei Applikation von 10 μ M Cyclonerodiol konnte bereits eine Abnahme in der Expression von Eotaxin-1 um etwas mehr als 20% beobachtet werden, die durch Erhöhung der verwendeten Cyclonerodiolkonzentration auf 50 μ M noch deutlich zunahm (s. Abb. 19). Relativ zur induzierten Kontrolle konnte die Eotaxin-Expression durch 50 μ M Cyclonerodiol um über 70% gesenkt werden.

A

IL-4 [5 ng/ml]	-	+	+	+	+
DMSO	-	-	+	-	-
Cyclonerodiol [μ M]	-	-	-	10	50



B

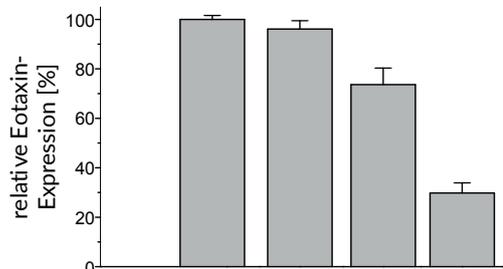


Abbildung 19: Effekt von Cyclonerodiol auf die Expression von Eotaxin-1 in A549-Zellen.

Nach einstündiger Vorinkubation mit Cyclonerodiol wurden A549-Zellen für 24 h mit IL-4 (5 ng/ml) stimuliert. Gesamt-Zelllysate wurden per Western Blotting auf die Expression von Eotaxin-1 hin untersucht, als Ladekontrolle diente β -Aktin (A). B zeigt die relative Eotaxin-Expression (Mittelwert und Standardabweichung), die durch die densitometrische Analyse von 3 biologischen Replikaten erhalten wurde.

3.2.4 Wirkung von Cyclonerodiol in verschiedenen Reporterassays in Jurkat-Zellen

IL-4 SIGNALWEG IN JURKAT-ZELLEN

Da Interleukin-4 u.a. in der frühen Entstehungsphase von Asthma bei der Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H2-Zellen eine wichtige Rolle spielt¹³⁹, sollte die Wirkung von Cyclonerodiol auf den IL-4 induzierten Signalweg in der humanen T-Zelllinie Jurkat untersucht werden. Diese immortalisierte Zelllinie humaner T-Lymphozyten weist viele Eigenschaften regulärer T-Zellen auf und wird häufig zur Untersuchung von T-Zell-Signalwegen sowie der transkriptionellen Regulation in T-Lymphozyten genutzt. Da sich in der Literatur jedoch widersprüchliche Angaben zur Expression des Transkriptionsfaktors STAT6 in Jurkat-Zellen finden^{139,140}, wurde zunächst die STAT6-Expression in dieser Zelllinie sowie die Induzierbarkeit eines Reportergenkonstruktes untersucht, dessen Expression unter der Kontrolle von sieben Kopien der C/EBP-N4-Konsensussequenz steht, die die Bindungsstelle von aktiviertem STAT6 darstellt.

Für die Reporterassays wurden Jurkat-Zellen mit dem Reporter pGL3-TK-7xN₄ und dem konstitutiv aktiven STAT6-Expressionsvektor TOPO/STAT6 bzw. dem leeren Kontrollvektor TOPO/- transient cotransfiziert und für 24 h mit Interleukin 4 (5 ng/ml) behandelt bzw. ohne Stimulus inkubiert. Zur Normalisierung wurde mit dem konstitutiv aktiven Renilla-Reporter pRL-EF1 α cotransfiziert und gegen dessen Reporterexpression

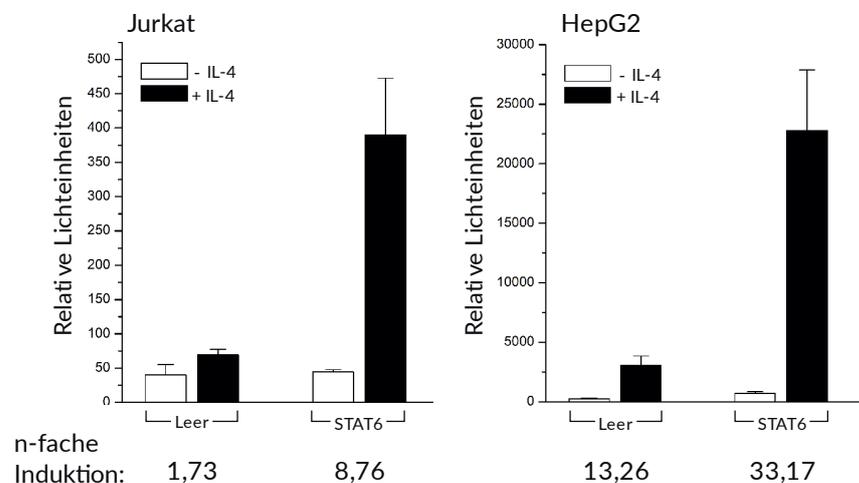


Abbildung 20: Induktion des STAT6-abhängigen Reportergenvektors durch IL-4 in Jurkat-Zellen.

Jurkat-Zellen wurden mit dem Reportervektor (pGL3-TK-7xN₄) transient transfiziert in Kombination mit dem STAT6-Expressionvektor TOPO/STAT6 oder dem leeren Kontrollvektor (Leer) und für 24 h mit (schwarz) oder ohne (weiß) IL-4 (5 ng/ml) kultiviert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde der konstitutive Vektor pRL-EF1 α cotransfiziert und die Luciferaseaktivität anhand dessen Expression normalisiert. Vergleichend ist die Induktion des STAT6-abhängigen Reportergens in HepG2-Zellen dargestellt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 2 biologischen Replikaten mit jeweils 3 technischen Replikaten.

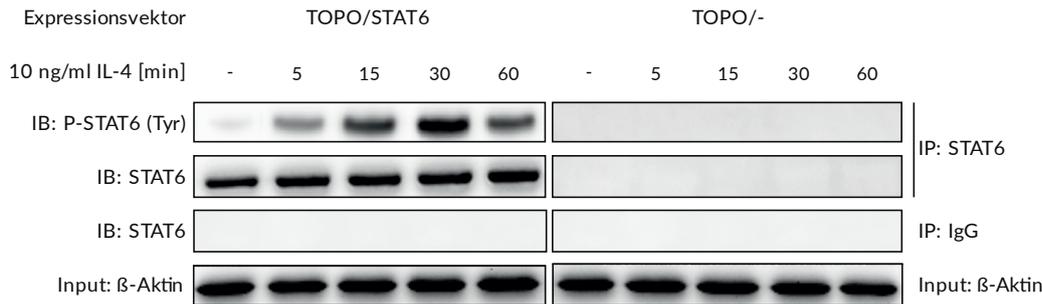


Abbildung 21: Expressionsnachweis von exogenem (links) und endogenem (rechts) STAT6 in Jurkat-Zellen und dessen Phosphorylierung nach IL-4 Stimulation.

Zellen wurden mit dem Expressionsvektor TOPO/STAT6 (links) bzw. dem leeren TOPO/- Kontrollvektor (rechts) transfiziert und STAT6 mit einem spezifischen Antikörper aus dem Zellysate immunpräzipitiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Immunopräzipitation diente mit IgG-präzipitiertes Zellysate, als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

normalisiert. In Jurkat-Zellen, die mit dem STAT6-abhängigen Reportergen (pGL3-TK-7xN₄) und dem leeren Kontrollvektor (TOPO/-) transfiziert wurden, bewirkte die Stimulation mit IL-4 keine Induktion der Reportergenexpression. Die Induzierbarkeit dieses Reportergenkonstruktes durch IL-4 wurde vergleichend zu der Zelllinie HepG2 dargestellt, deren endogene STAT6-Expression schon mehrfach belegt wurde^{141,142}. Dennoch ließ sich in dieser Zelllinie durch eine exogene STAT6-Expression die Induktion des Reportergens noch verstärken (s. Abb. 20). Durch den STAT6-Expressionsvektor konnte jedoch auch in der T-Zelllinie Jurkat die STAT6-abhängige Reportergenexpression durch IL-4 induziert werden. Die Stimulation bewirkte dabei eine 8,76-fache Steigerung der Reportergenexpression im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle.

Um die Aktivierung des STAT6-abhängigen Signalweges nach IL-4 Stimulation und somit dessen Funktionalität zu belegen, wurden Jurkatzellen mit dem STAT6 Expressionsvektor

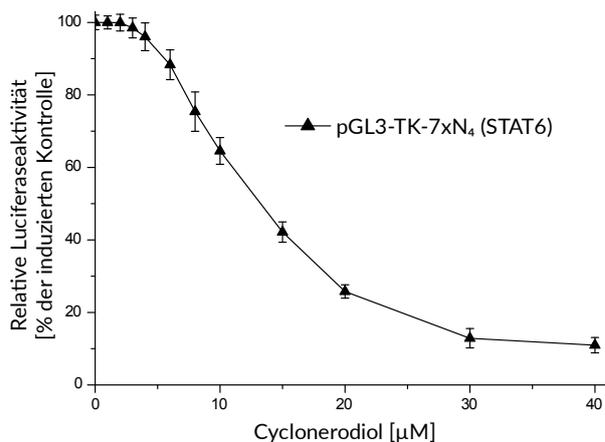


Abbildung 22: Wirkung von Cyclonerodiol auf die STAT6-vermittelte Signaltransduktion.

Jurkat-Zellen wurden mit dem STAT6-abhängigen Reportergenkonstrukt (pGL3-TK-7xN₄), dem konstitutiv aktiven Expressionsvektor TOPO/STAT6 sowie dem Kontrollvektor pRL-EF1 α transient cotransfiziert und anschließend für 24 Stunden mit verschiedenen Cyclonerodiolkonzentrationen

sowie IL-4 (5 ng/ml) kultiviert. Die Expression des experimentellen Reportergens wurde gegen die Expression des Kontrollvektors normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 technischen Triplikaten.

TOPO-STAT6 bzw. mit dem leeren TOPO-Kontrollvektor transient transfiziert und nach 24 Stunden für unterschiedliche Zeitintervalle (5-15-30-60 min) mit bzw. ohne IL-4 (5 ng/ml) inkubiert. Die Expression sowie Aktivierung von STAT6 durch Phosphorylierung wurde mittels Western Immunoblotting untersucht. Für die T-Zelllinie konnte dabei keine endogene Expression oder Phosphorylierung von STAT6 nach IL-4 Stimulation nachgewiesen werden, während bei Verwendung des Expressionsvektors STAT6 bereits nach 24 Stunden nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 21). Desweiteren ließ sich hierdurch in Jurkat-Zellen der IL-4 abhängige Signalweg induzieren, wobei phosphoryliertes STAT6 bereits 5 Minuten nach Stimulation mit IL-4 auftrat. Die Phosphorylierung erreichte ihren Höhepunkt nach 30 Minuten und nahm nach 60 Minuten bereits wieder ab.

Die so in Jurkat-Zellen durch IL-4 induzierte Reporterexpression wurde durch Cyclonerodiol mit einer IC_{50} von 13,2 μ M inhibiert, die IC_{90} lag bei etwa 40 μ M (s. Abb. 22).

NFAT- UND AP-1-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION

In Jurkat-Zellen wurde zudem der Einfluss des Wirkstoffes auf die NFAT- und AP-1-abhängige Signaltransduktion ermittelt, durch die die Expression einer Reihe von proinflammatorischen Genen in T-Zellen reguliert wird. Im Reporterassay zeigt die Verbindung bis zu einer getesteten Konzentration von 40 μ M keinen inhibitorischen Effekt auf die beiden Signaltransduktionswege, was nochmals die Spezifität des Naturstoffes für den STAT6-anhängigen Signalweg unterstreicht.

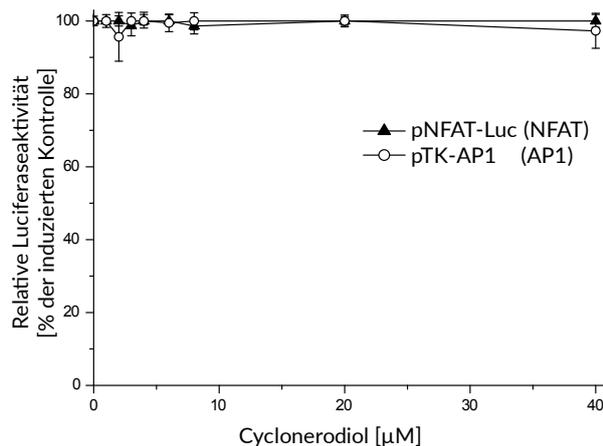


Abbildung 23: Wirkung von Cyclonerodiol auf die NFAT- und AP1- vermittelte Signaltransduktion.

Jurkat-Zellen wurden mit den angegebenen Reportergenkonstrukten sowie dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1a transient cotransfiziert und anschließend für 24 h mit verschiedenen Cyclonerodiolkonzentrationen

sowie Induktoren der entsprechenden Signalwege (NFAT: 10 ng/ml PMA und 2,5 μ M Ionomycin; AP1: 50 ng/ml PMA) kultiviert. Die Expression des experimentellen Reportergens (Firefly-Luciferase) wurde gegen die Expression des Kontrollvektors (Renilla-Luciferase) normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 technischen Triplikaten.

3.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Cyclonerodiol

3.3.1 Tyrosin-Phosphorylierung von STAT6

Zu den ersten Schritten der Signaltransduktion nach Bindung der Zytokine IL-4 bzw. IL-13 an die α -Rezeptoruntereinheit des IL-4 Rezeptors (IL-4R α) zählt die Heterodimerisierung des Rezeptors sowie die darauffolgende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT6 durch zytoplasmatische Tyrosinkinasen (Janus-Kinasen) ¹⁴³. Um festzustellen, ob es sich bei Cyclonerodiol um einen Januskinase-Inhibitor handelt, wurde der Einfluss des Wirkstoffes auf die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT6 per Western Immunoblotting untersucht.

Anhand von Abbildung 24 ist ersichtlich, dass die Applikation von Cyclonerodiol bis zu einer Konzentration von 50 μ M die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT6 nicht inhibierte. Als Positivkontrolle wurde der Kinase-Inhibitor AG490 verwendet, der die Janus-Kinase 2 inhibiert, welche nach IL-4 Stimulation an den IL-4 Rezeptor rekrutiert wird und dort STAT6 phosphoryliert ¹⁴⁴.

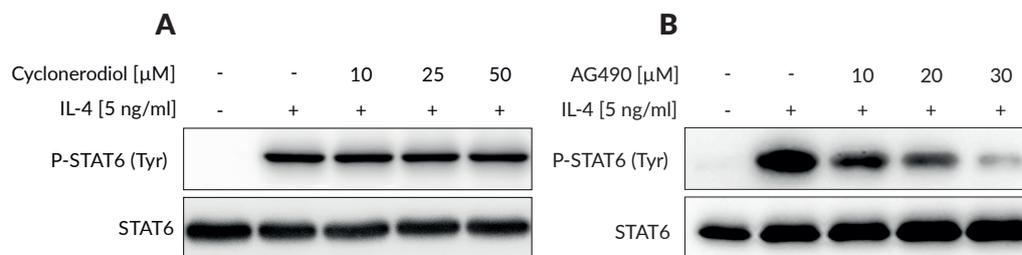


Abbildung 24: Phosphorylierungsstatus (Tyr) von STAT6 in Abhängigkeit von Cyclonerodiol (A) bzw. dem Januskinase-Inhibitor AG490 (B).

A549-Zellen wurden 1 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cyclonerodiol (A) bzw. AG490 (B) vorinkubiert und danach für 30 min mit IL-4 (5 ng/ml) stimuliert. Gesamt-Zelllysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und STAT6 bzw. Phospho-STAT6 durch Western Immunoblotting mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 2 unabhängigen Experimenten.

3.3.2 Translokation von aktiviertem STAT6 in den Nukleus

Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie translozieren nach ihrer Aktivierung durch Phosphorylierung und Dimerisierung in den Nukleus ¹⁴³, weswegen im nächsten Schritt der Effekt von Cyclonerodiol auf die STAT6 Lokalisation untersucht wurde. Da mehrere Zyklen aus Aktivierung, Import und Export des Transkriptionsfaktors für die maximale Induktion der Genexpression benötigt werden ¹⁴⁵, wurde zusätzlich die Lokalisation des Transkriptionsfaktors über eine Stunde hinweg anhand von zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakten verfolgt. Abbildung 25 zeigt den Nachweis von STAT6 in zytoplasmatischen sowie nukleären Extrakten nach verschiedenen Zeitintervallen. Nach Stimulation mit IL-4 stieg die Konzentration von STAT6 im Nukleus stetig an, bis sie nach 30 Minuten ihr Maximum

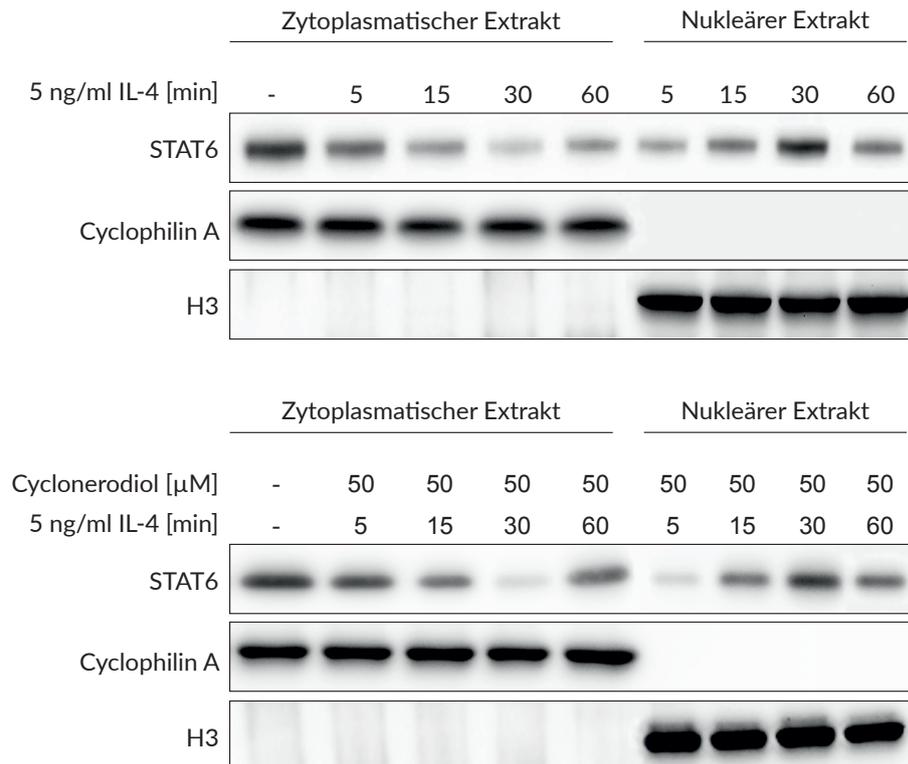


Abbildung 25: Effekt von Cyclosporin A auf die Translokation von STAT6 nach IL-4 Stimulation.

A549-Zellen wurden nach einstündiger Vorinkubation mit Cyclosporin A für die angegebene Dauer mit IL-4 stimuliert. Zytoplasmatische und nukleäre Extrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und STAT6 per Western Immunoblotting nachgewiesen. Als Ladekontrolle für den zytoplasmatischen Extrakt diente das für das Zytosol spezifische Cyclophilin A, für den nukleären Extrakt Histon H3. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 2 unabhängigen Experimenten.

erreichte. Gegenläufig hierzu verhielt sich die Konzentration von STAT6 im Zytoplasma, die nach Stimulation mit IL-4 stetig absank und nach 30 min ihr Minimum erreichte. Nach einer Stunde nahm die STAT6-Konzentration im Kern bereits wieder ab, im Zytoplasma wieder zu. Die Applikation von Cyclosporin A bewirkte dabei weder eine Akkumulation von STAT6 im Zytoplasma noch im Nukleus.

3.3.3 Aktivierung des IRS-1/2 Signalweges

Die transkriptionelle Aktivität von STAT-Proteinen wird zusätzlich zur Tyrosin-Phosphorylierung durch weitere posttranslationale Modifikationen reguliert wie z.B. Serin-Phosphorylierungen in der transkriptionellen Aktivierungsdomäne (TAD) der STAT-Proteine. Die Serin-Phosphorylierung wird dabei u.a. durch IL-4 induziert, indem das Zytokin STAT6-unabhängig Kinasen des mitogen activated protein kinase (MAPK)-Signalwegs sowie des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalwegs aktiviert, was u.a. zur Serin-Phosphorylierung von STAT6 durch MAP-Kinasen wie JNK (c-Jun terminale Kinase),

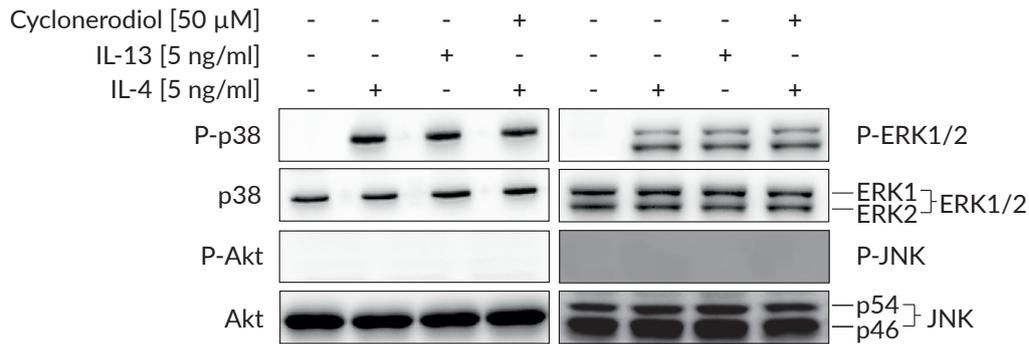


Abbildung 26: Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK (MAP-Kinase Signalweg) sowie der Serin/Threonin Kinase Akt (PI3K-Akt Signalweg) bei Stimulation mit IL-4 bzw. IL-13.

A549-Zellen wurden für 30 min entweder mit IL-4 oder IL-13 stimuliert, Gesamt-Zelllysate per SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphorylierungsstatus mittels spezifischer Antikörper durch Western Immunoblotting untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

p38 oder ERK1/2 (extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2) führt (MAPK-Signalweg), aber auch durch andere Kinasen wie die Proteinkinase B (Akt) des PI3K-Akt-Signalweges erfolgen kann¹⁴⁶. Da je nach Zelltyp unterschiedliche Kinasen für die Serin-Phosphorylierung der STAT-Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind, wurde zunächst die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 sowie der Proteinkinase Akt in der Zelllinie A549 nach IL-4 bzw. IL-13 Stimulation untersucht (s. Abb. 26). Sowohl IL-4 als auch IL-13 aktivierten in der bronchialen Epithelzelllinie die MAP-Kinasen p38 und ERK1/2, während

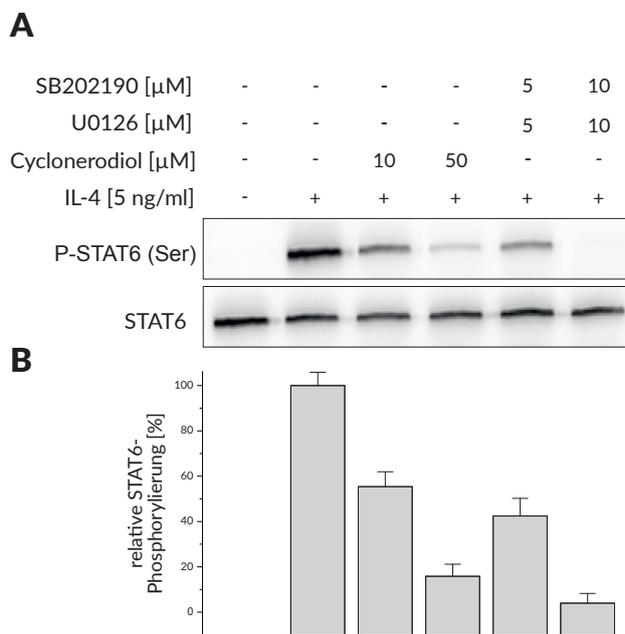


Abbildung 27: Effekt von Cyclonerodiol auf die Serin-Phosphorylierung von STAT6 (A) sowie densitometrische Auswertung (B).

A549-Zellen wurden für 1 h mit Cyclonerodiol bzw. dem p38 MAPK-Inhibitor SB202190 und dem MEK1/2 Inhibitor U0126 vorinkubiert und anschließend mit IL-4 stimuliert. STAT6 wurde immunpräzipitiert und per Western Immunoblotting auf den Serin-Phosphorylierungsstatus hin untersucht (A). Der p38 MAPK-Inhibitor SB202190 und der MEK1/2 Inhibitor U0126 diente hierbei als Positivkontrolle für eine inhibierte Serin-Phosphorylierung.

B: Relative Serin-Phosphorylierung von STAT6 (Mittelwert und Standardabweichung), die durch die densitometrische Analyse von 3 biologischen Replikaten erhalten wurde. Dabei wurde phosphoryliertes STAT6 gegen Gesamt-STAT6 normalisiert.

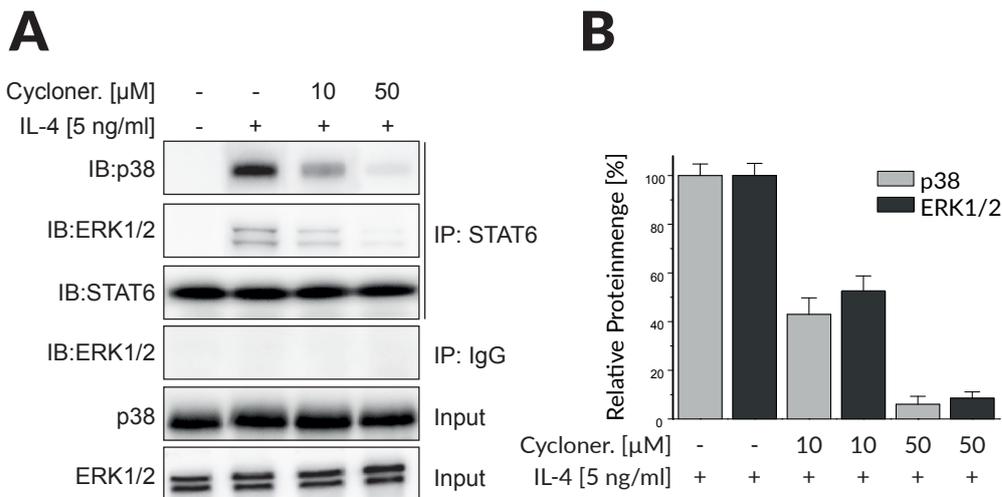


Abbildung 30: Effekt von Cyclonerodiol auf die Interaktion von STAT6 mit den MAP-Kinasen p38 und ERK1/2.

A549-Zellen wurden 1 h mit Cyclonerodiol vorinkubiert und anschließend 30 min mit IL-4 stimuliert. STAT6 wurde aus dem Zelllysat immunpräzipitiert und co-präzipitierte Proteine per Western Immunoblotting (p38, ERK1/2) nachgewiesen (A). Als Kontrolle für die Spezifität wurde mit IgG-präzipitiertes Zelllysat verwendet. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten. B: Densitometrische Analyse der 3 Western Blots (Mittelwert und Standardabweichung), wobei der densitometrische Wert der co-immunopräzipitierten Proteine gegen den entsprechenden Wert des Inputs normalisiert wurde.

STAT6 wie auch die Applikation von Cyclonerodiol. Aus diesem Grund wurde der Effekt des Naturstoffes auf die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 näher untersucht. Wie aus Abb. 28 ersichtlich, inhibierte Cyclonerodiol jedoch nicht die Phosphorylierung und somit Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2.

Da auch die Aktivität anderer STAT-Proteine durch Serin-Phosphorylierungen beeinflusst wird, wurde zusätzlich die Wirkung von Cyclonerodiol auf die durch IL-6 induzierte Serin-Phosphorylierung von STAT3 untersucht (s. Abb. 29). Hierbei konnte zwar die Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach IL-6 Stimulation sowie die p38 MAPK-abhängige Serin-Phosphorylierung von STAT3 in A549-Zellen nachgewiesen werden, allerdings wurde diese nicht durch Cyclonerodiol inhibiert.

Da keine generelle Inhibierung der Serin-Phosphorylierung durch Cyclonerodiol festgestellt werden konnte, wurde im nächsten Schritt der Einfluss der Substanz auf die Interaktion zwischen STAT6 und den MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 per Co-Immunopräzipitation untersucht. Die Stimulation von A549-Zellen mit IL-4 führte dabei bereits nach 30 min zu einer Interaktion der MAP-Kinasen p38 bzw. ERK1/2 mit STAT6, die durch Cyclonerodiol konzentrationsabhängig inhibiert wurde (s. Abb. 30). Bereits bei einer Konzentration von 10 μ M verursachte Cyclonerodiol eine Hemmung der Interaktion mit den beiden um etwa 50%, was durch eine Konzentrationserhöhung (50 μ M) auf etwa 90% erhöht werden konnte.

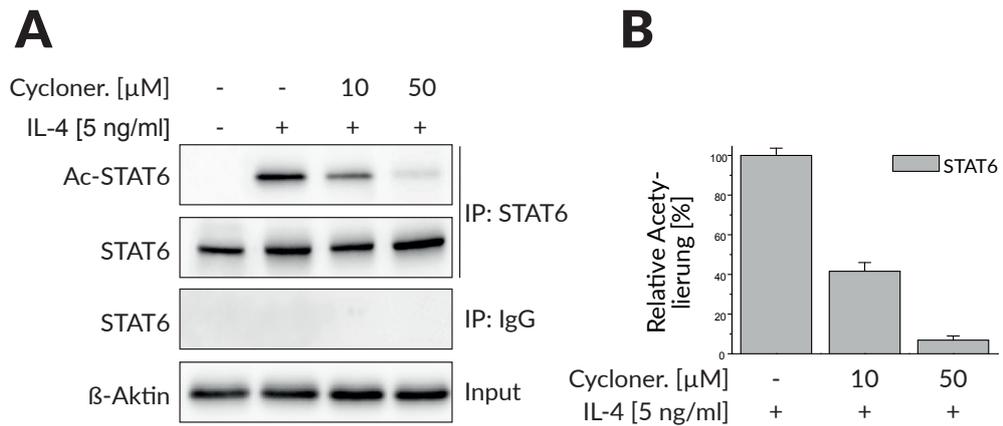


Abbildung 31: Effekt von Cyclonerodiol auf die Acetylierung von STAT6 (links) und densitometrische Auswertung (rechts).

A549-Zellen wurden mit Cyclonerodiol 1 h vorinkubiert und danach 30 min mit IL-4 stimuliert. STAT6 wurde immunpräzipitiert und der Acetylierungsstatus von STAT6 per Western Immunoblotting untersucht. Als Kontrolle für die Spezifität wurde mit IgG-präzipitiertes Zelllysate verwendet. Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten (A). B: Densitometrische Analyse (Mittelwert und Standardabweichung) der 3 Experimente, wobei der densitometrische Wert von acetyliertem STAT6 gegen Gesamt-STAT6 normalisiert wurde.

3.3.4 Interaktion von STAT6 mit dem Coaktivator p300

Der transkriptionelle Coaktivator p300 reguliert über verschiedene Mechanismen die Transkription, indem er als Brücke zwischen den Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie fungiert, als Gerüst mehrere Transkriptionsfaktoren am Chromatin positioniert bzw. durch seine intrinsische Acetyltransferase-Aktivität Histone und Transkriptionsfaktoren acetyliert und somit die Chromatin-Struktur bzw. die Aktivität von

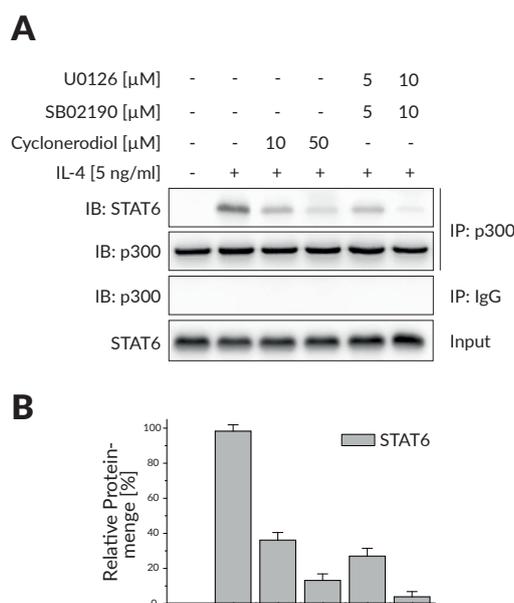


Abbildung 32: Effekt von Cyclonerodiol auf die Interaktion zwischen STAT6 und dem Coaktivator p300.

A549-Zellen wurden für 1 h mit Cyclonerodiol vorinkubiert und danach mit IL-4 stimuliert. p300 wurde aus dem Zelllysate immunpräzipitiert und co-immunpräzipitiertes STAT6 per Western Immunoblotting nachgewiesen (A). Als Kontrolle für die Spezifität diente mit IgG-präzipitiertes Zelllysate. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten. B zeigt die densitometrische Analyse der 3 Experimente (Mittelwert und Standardabweichung), wobei co-immunpräzipitiertes STAT6 gegen Input-STAT6 normalisiert wurde.

Transkriptionsfaktoren beeinflusst¹⁴⁷. Zunächst wurde untersucht, ob der Transkriptionsfaktor STAT6 nach IL-4 Stimulation acetyliert wird und ob Cyclonerodiol diese Acetylierung inhibiert. Abb. 32 zeigt, dass die Stimulation mit IL-4 die Acetylierung des Transkriptionsfaktors induzierte, die durch Cyclonerodiol wiederum konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Dabei wurde die Acetylierung von STAT6 durch 10 μM Cyclonerodiol um etwa 60% inhibiert, durch 50 μM Cyclonerodiol sogar um 90%.

Da die Serin-Phosphorylierung der STAT-Transkriptionsfaktoren deren Bindungsaffinität für Coaktivatoren erhöht¹⁴⁸, wurde als nächstes per Co-Immunopräzipitation untersucht, ob die verringerte Acetylierung als Folge der durch Cyclonerodiol inhibierten Serin-Phosphorylierung auftrat. Die Interaktion zwischen dem Coaktivator p300 und STAT6, die durch IL-4 induziert werden konnte, wurde dabei durch Cyclonerodiol konzentrationsabhängig inhibiert. Dass die Inhibierung dabei als Folge der verringerten Serin-Phosphorylierung auftrat, konnte durch die kombinierte Applikation des p38 MAPK Inhibitors SB202190 und des MEK1/2 Inhibitors U0126 gezeigt werden, deren verursachte Verringerung der Serin-Phosphorylierung ebenfalls die Interaktion zwischen STAT6 und p300 inhibierte.

3.3.5 Bindung von STAT6 an den Eotaxin-1 Promoter

Da Cyclonerodiol die Interaktion mit den MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 inhibierte und zusätzlich die Interaktion mit dem transkriptionellen Coaktivator p300 verringerte, wurde zusätzlich der Effekt der Substanz auf die Interaktion des STAT6-Transkriptionsfaktors mit dem Eotaxin-Promoter per Chromatin-Immunopräzipitation untersucht, die bereits von Matsukura *et al.* beschrieben wurde.

Die Stimulation mit IL-4 induzierte eine Anreicherung des Transkriptionsfaktors STAT6 (23-fach) am Promoter von Eotaxin-1 (*ccl-11*). Diese Interaktion wurde durch Cyclonerodiol, selbst bei einer Konzentration von 50 μM , nicht signifikant beeinflusst (s. Abb. 33). Die acetylierte und somit aktive Chromatinstruktur am *gapdh*-Promoter wurde dabei weder durch die Stimulation mit IL-4 noch durch Cyclonerodiol-Behandlung beeinflusst.

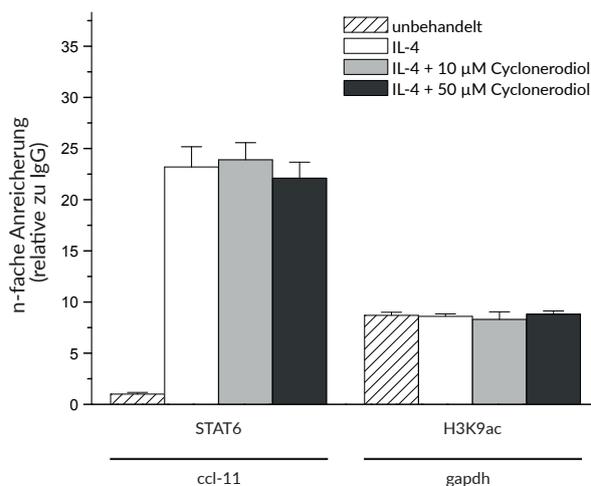


Abbildung 33: Effekt von Cyclonerodiol auf die Bindung des Transkriptionsfaktors STAT6 an den Eotaxin-1 Promoter.

ChIP-Assay von A549-Zelllysate mit anti-STAT6 bzw. anti-H3K9ac-Antikörper und qRT-pCR der immunopräzipitierten DNA mit Primern spezifisch für den Eotaxin-Promoter (*ccl-11*) bzw. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Promoter (*gapdh*). Dargestellt ist die Anreicherung der Promoter-Sequenzen der entsprechenden Gene relativ zur

Immunopräzipitation mit nicht-spezifischem IgG (Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 2 technischen Replikaten).

3.4 Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf EMT

3.4.1 Zellmorphologie & Expression von Markergenen

Um die Auswirkungen proinflammatorischer Zytokine auf die Progression von EMT zu analysieren, wurden zunächst EMT-charakteristische, zellmorphologische Veränderungen sowie die mRNA- und Protein-Expression von epithelialen sowie mesenchymalen Markergenen in

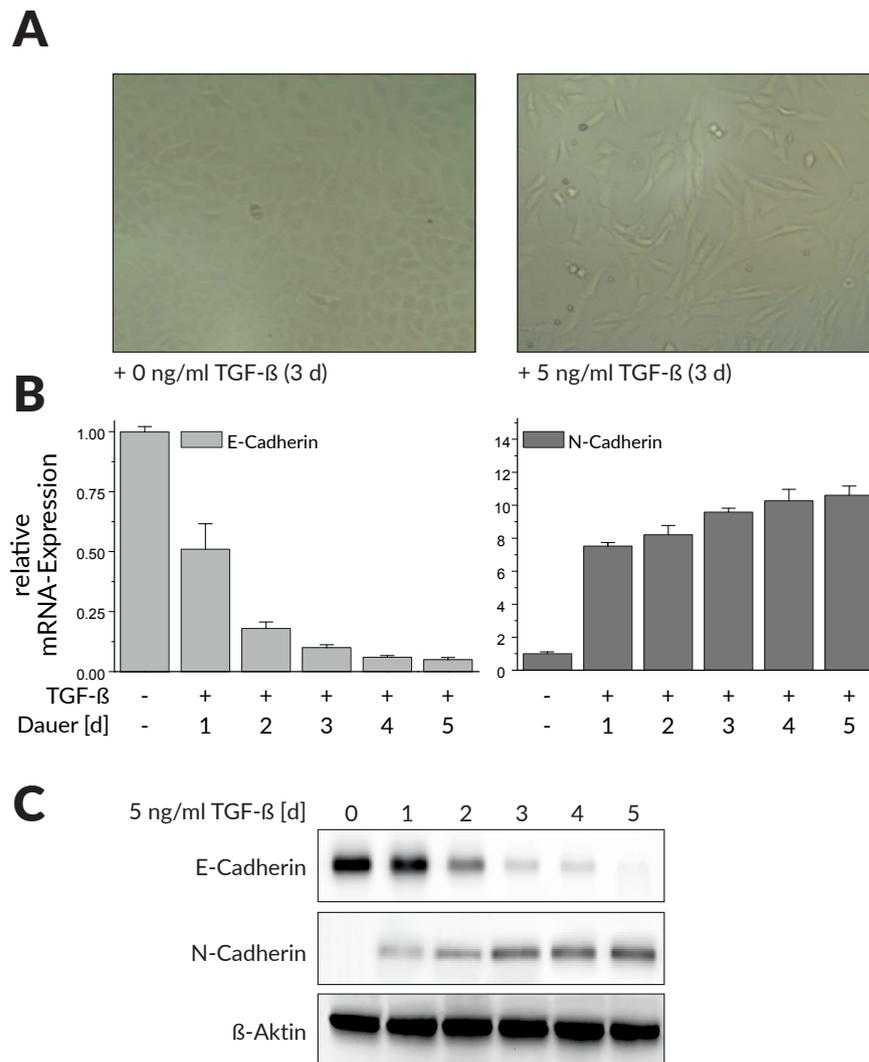


Abbildung 34: Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition bei BEAS-2B-Zellen durch TGF- β .

A: Zellmorphologische Veränderungen von BEAS-2B-Zellen nach 3 Tagen TGF- β Stimulation bzw. unbehandelt. B: mRNA-Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und des mesenchymalen Markers N-Cadherin in zeitlicher Abhängigkeit der TGF- β Stimulation (5 ng/ml) relativ zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 technischen Triplikaten. C: Proteinexpression von E-Cadherin und N-Cadherin in Abhängigkeit der Stimulationsdauer. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

der epithelialen Zelllinie BEAS-2B unter dem Einfluss des EMT-Induktors TGF- β untersucht. Bereits nach 3-tägiger TGF- β Stimulation konnten Änderungen in der Zellmorphologie der BEAS-2B-Zellen beobachtet werden: Während unbehandelte Zellen nach 3 Tagen einen lückenlosen (konfluenten) Zellrasen aus polygonalen Zellen mit engem Zell-Zell-Kontakt ausbildeten, nahmen stimulierte Zellen eine spindelförmige Zellform an (s. Abb. 34A). Zudem war der Zellverbund bei TGF- β Stimulation mit Lücken durchsetzt und der Zellrasen zeigte nur noch eine 70%-ige Konfluenz. Auf transkriptioneller Ebene verringerte sich die Expression des epithelialen Markergens E-Cadherin drastisch bis zum 3. Tag, wobei die mRNA-Menge bereits nach 24 Stunden um die Hälfte abnahm und nach 72 Stunden nur noch 10% der ursprünglichen Menge betrug. Die Expression des mesenchymalen Markergens N-Cadherin nahm hingegen stark zu: Nach 24-Stunden war sie bereits um über das 7-fache angestiegen und nahm auch danach weiterhin leicht zu. Ab dem 4. Tag veränderte sich die mRNA-Expression beider Markergene nur noch marginal (s. Abb. 34B). Auch auf Proteinebene konnte eine starke Abnahme von E-Cadherin sowie Zunahme von N-Cadherin innerhalb der ersten 72-Stunden verzeichnet werden, während sich die Proteinmenge ab dem 4. Tag nur noch geringfügig änderte (s. Abb. 34C).

Um die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine IL-4, -17 und -22 auf EMT zu untersuchen, wurden zunächst die Auswirkungen einer alleinigen Stimulation mit jeweils einem der Zytokine auf die Zellmorphologie von BEAS-2B-Zellen sowie die Expression von EMT-Markergenen untersucht (s. Abb. 35). Die alleinige Stimulation mit jeweils IL-4, -17 oder -22 verursachte hingegen selbst nach 5 Tagen Inkubation zu keinen zellmorphologischen

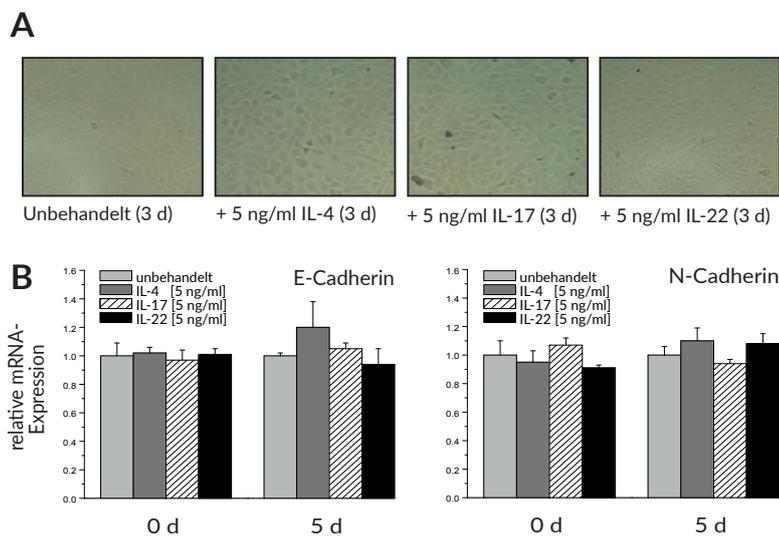


Abbildung 35: Wirkung der proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-17 und IL-22 auf die Zellmorphologie von BEAS-2B-Zellen (A) sowie die Expression der EMT-Markergene E-Cadherin und N-Cadherin (B).

BEAS-2B Zellen wurden mit IL-4, IL-17 oder IL-22 für insgesamt 5 Tage inkubiert und die mRNA-Expression von E- sowie N-Cadherin per qRT-PCR bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 technischen Triplikaten.

Veränderungen, das charakteristische epitheliale Wachstum blieb bestehen. Auch auf mRNA-Ebene konnte nach 5 Tagen Stimulation keine Beeinflussung der EMT-Marker E-Cadherin oder N-Cadherin durch die proinflammatorischen Zytokine festgestellt werden.

Als nächstes wurde der Effekt der Zytokine auf die durch TGF- β induzierte epithelial-mesenchymale Transition untersucht. Die kombinierte Applikation von TGF- β mit jeweils einem der proinflammatorischen Zytokine förderte die Progression von EMT, was auf mRNA-Ebene für E- sowie N-Cadherin nachgewiesen werden konnte. Dabei verursachte die kombinierte Applikation aller 3 Zytokine mit TGF- β zusammen einen additiven Effekt, welcher sowohl im Fall von N-Cadherin sowie E-Cadherin eine signifikante Erhöhung der relativen Transkriptmenge im Vergleich zur TGF- β induzierten Kontrolle zur Folge hatte (s. Abb. 36A). Auf Proteinebene konnte dieses Verhalten zusätzlich zu den beiden Cadherinen für das epitheliale Markergen Zonula occludens-1 (ZO-1) und das mesenchymale Markergen Vimentin gezeigt werden (s. Abb. 36B).

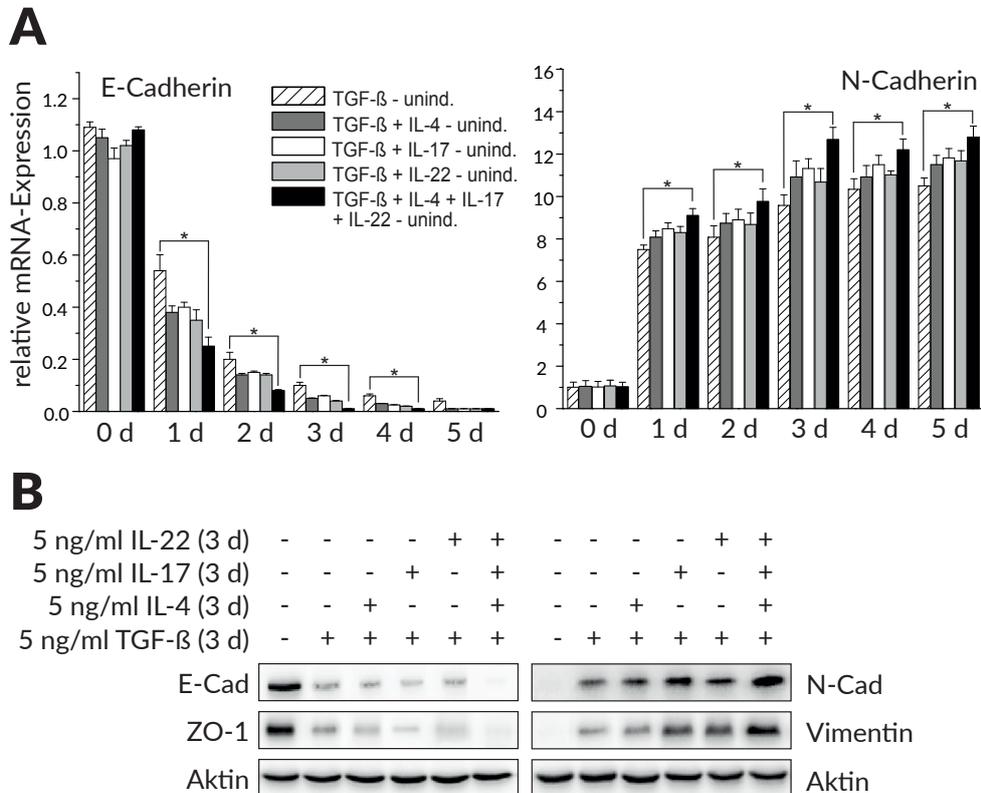


Abbildung 36: Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-17 und IL-22 auf die TGF- β induzierte mRNA- (A) und Protein-Expression (B) epithelialer sowie mesenchymaler Markergene in BEAS-2B-Zellen.

BEAS-2B Zellen wurden mit einem kombinierten Stimulus aus TGF- β und proinflammatorischem Zytokin (IL-4/IL-17/IL-22) bzw. mit allen 4 für insgesamt 5 Tage inkubiert und die relative mRNA-Expression von E- sowie N-Cadherin per qRT-PCR bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 technischen Triplikaten (A). B: Expression der epithelialen Markergene E-Cadherin und Zonula-occludens 1 (ZO-1) sowie der mesenchymalen Markergene N-Cadherin und Vimentin nach 3-tägiger TGF- β Stimulation. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

3.4.2 EMT-assoziierte Signalwege

Intrazellulär aktiviert TGF- β eine Reihe von Signalwegen, die zu einer veränderten Genexpression führen und so die epithelial-mesenchymale Transition induzieren. Der Wachstumsfaktor aktiviert dabei den Smad-abhängigen Signalweg sowie mehrere MAP-Kinase Signalwege. Aus diesem Grund wurde zunächst analysiert, ob die proinflammatorischen Zytokine zu einer verstärkten Aktivierung dieser durch TGF- β induzierten Signalwege führen. Dabei wurden die MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK sowie die Transkriptionsfaktoren NF κ B und Smad näher untersucht, für die eine Aktivierung durch TGF- β bereits nachgewiesen werden konnte⁹⁵. Der Transkriptionsfaktor NF κ B liegt in unstimulierten Zellen als inaktiver Komplex mit I κ B α vor, wobei I κ B α bei Stimulation phosphoryliert und somit für den proteasomalen Abbau markiert wird, wodurch NF κ B frei wird und in den Nucleus translozieren kann. Deshalb wurde die Phosphorylierung von I κ B α stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B untersucht.

BEAS-2B-Zellen wurden zunächst 30 min mit TGF- β und dem jeweiligen proinflammatorischen Zytokin stimuliert, Gesamt-Zelllysate per SDS-PAGE aufgetrennt und die Aktivierung der relevanten Proteine per Western Immunoblotting untersucht. Die durch den Wachstumsfaktor TGF- β induzierte Aktivierung der MAP-Kinase p38 wurde durch alle 3 getesteten Zytokine verstärkt, während die Phosphorylierung der MAP-Kinase JNK durch die Zytokine unbeeinflusst blieb. IL-4 förderte zudem die Phosphorylierung von ERK1/2, während IL-17 hingegen die stärkere Phosphorylierung von I κ B α auslöste und somit auch die Aktivierung des NF κ B-Signalweges. Die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren

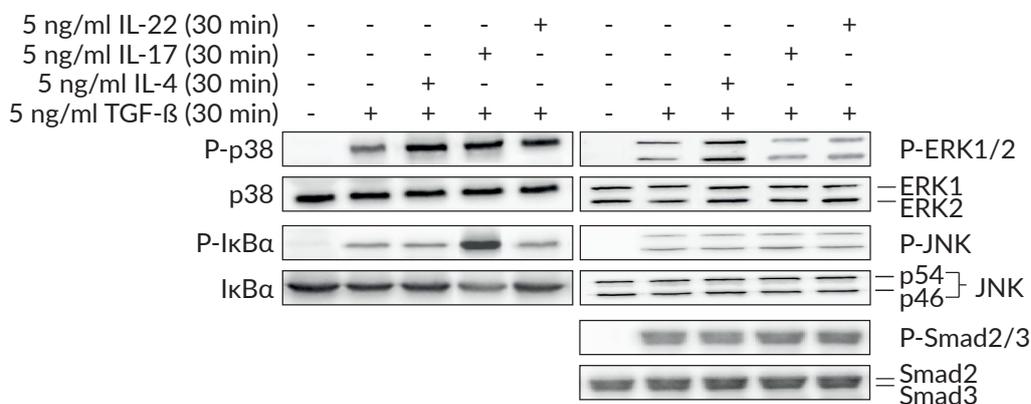


Abbildung 37: Wirkung der proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-17 und IL-22 auf die Aktivierung TGF- β induzierter Signalwege.

BEAS-2B Zellen wurden für 30 min mit TGF- β allein oder einer Kombination aus TGF- β und proinflammatorischem Zytokin (IL-4, IL-17, IL-22) inkubiert. Nach Isolierung von Gesamt-Zellextrakten wurden diese per SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Immunoblotting der Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK, des Transkriptionsfaktors Smad2/3 sowie des I κ B α -Komplexes untersucht. Als Kontrolle dienten die jeweiligen unphosphorylierten Proteine. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

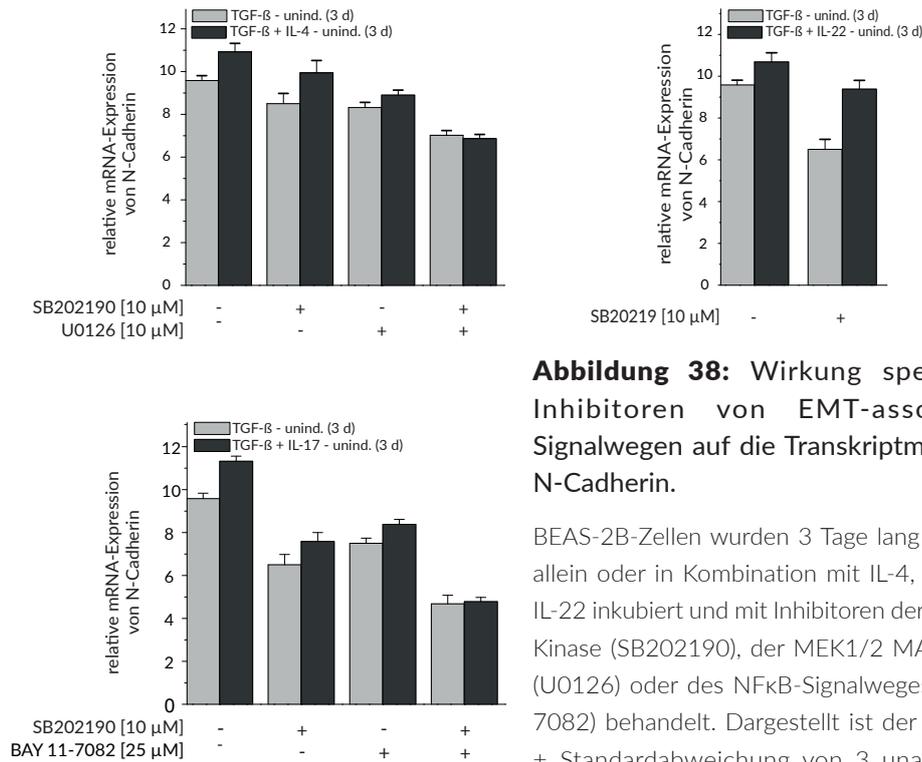


Abbildung 38: Wirkung spezifischer Inhibitoren von EMT-assoziierten Signalwegen auf die Transkriptmenge von N-Cadherin.

BEAS-2B-Zellen wurden 3 Tage lang mit TGF-β allein oder in Kombination mit IL-4, IL-17 oder IL-22 inkubiert und mit Inhibitoren der p38 MAP-Kinase (SB202190), der MEK1/2 MAP2-Kinase (U0126) oder des NFκB-Signalweges (BAY 11-7082) behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 technischen Triplikaten.

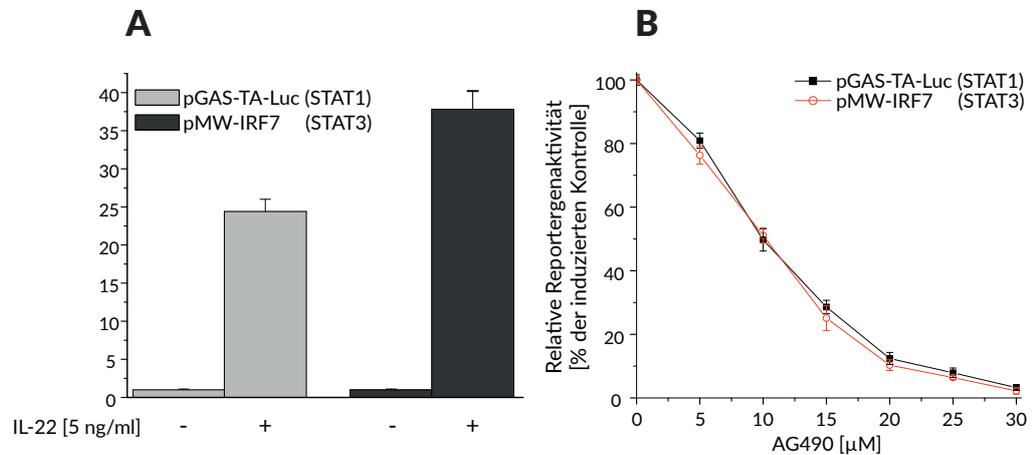


Abbildung 39: Induzierbarkeit des STAT1- und STAT3-abhängigen Signalweges durch IL-22 (A) und Hemmung dieser beiden Signalwege durch den JAK2-Inhibitor AG490 (B).

A: BEAS-2B-Zellen wurden mit den angegebenen Reportergenkonstrukten sowie dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1α per Elektroporation transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation mit IL-22 (5 ng/ml) wurde die Reporterexpression gemessen und gegen den Kontrollvektor normiert. B: BEAS-2B-Zellen wurden mit den angegebenen Reportergenkonstrukten sowie dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1α per Elektroporation transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation mit IL-22 (5 ng/ml) sowie unterschiedlichen Konzentrationen des JAK2-Inhibitors AG490 wurde die Reporterexpression gemessen und gegen den Kontrollvektor normiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 2 technischen Replikaten.

Smad2 und 3 wurde dabei durch keines der Zytokine modifiziert.

Um herauszufinden, ob der EMT-fördernde Effekt der Zytokine wirklich nur auf die verstärkte Aktivierung dieser beiden MAP-Kinasen und NF κ B zurückzuführen ist oder hierzu noch andere induzierte Signalwege beitragen, wurde per qRT-PCR die Expression von N-Cadherin unter dem Einfluss spezifischer Inhibitoren dieser TGF- β Signalwege untersucht. Dafür wurde der p38 MAPK-Inhibitor SB202190 und der MEK1/2 U0126 Inhibitor verwendet, wobei MEK1/2 als MAP2-Kinase für die Aktivierung der ERK1/2 zuständig ist. Zur Hemmung des NF κ B-Signalweges wurde die Substanz BAY 11-7085 verwendet, die die Phosphorylierung von I κ Ba inhibiert und somit die Freilassung des Transkriptionsfaktors NF κ B verhindert. Der verstärkende Effekt von IL-4 auf die N-Cadherin Expression konnte dabei durch die parallele Hemmung der MAP-Kinasen p38 sowie ERK1/2 aufgehoben werden, was nur durch die alleinige Inhibierung einer der beiden MAP-Kinasen nicht gelang. Auch bei IL-17 konnte durch die gleichzeitige Hemmung des NF κ B-Signalweges sowie der p38 MAP-Kinase der fördernde Effekt des Zytokins auf die Transkriptmenge von N-Cadherin verhindert werden. Bei IL-22 jedoch reichte der p38-MAPK-Inhibitor nicht aus, um den Effekt des Zytokins vollständig zu unterbinden.

Da auch viele andere Signalwege die epithelial-mesenchymale Transition Kontext-abhängig beeinflussen können, wurde der Einfluss von IL-22 auf die Aktivierung weiterer Signalwege untersucht. Da für das Zytokin bereits bekannt ist, dass es den STAT1- und STAT3-abhängigen Signalweg in einigen Zelllinien aktiviert, wurde dies per Reporterassays in der Zelllinie BEAS-2B-Zellen untersucht. Die Reporterexpression von sowohl einem STAT1- als auch einem STAT3-abhängigen Reportergenkonstrukt ließ sich dabei in der bronchialen Zelllinie BEAS-2B durch IL-22 induzieren (s. Abb. 39A). Intrazellulär löst die Stimulation mit IL-22 u.a. die Aktivierung der Januskinase 2 (JAK2) aus, die wiederum die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 phosphoryliert. Abbildung 39B zeigt dabei, dass durch den JAK2-Inhibitor AG490 sowohl die STAT1- als auch STAT3-abhängige Expression beider Reportergene konzentrationsabhängig gesenkt wurde.

Da durch IL-22 zusätzlich zu der p38 MAP-Kinase auch der STAT1- sowie STAT3-abhängige Signalweg in BEAS-2B-Zellen aktiviert wurde, sollte im Folgenden das Experiment

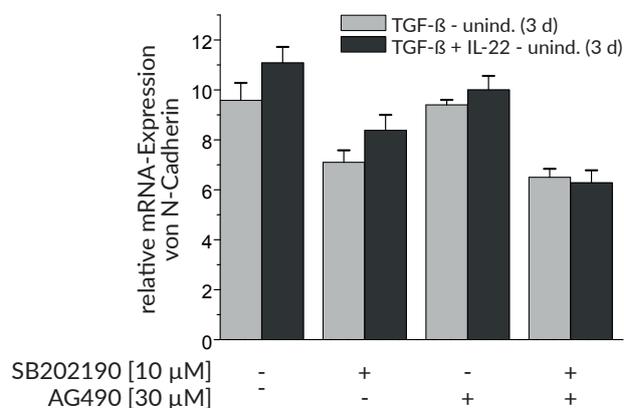


Abbildung 40: Wirkung des p38-Inhibitors SB202190 sowie des JAK2-Inhibitors AG490 auf die durch TGF- β allein bzw. durch TGF- β und IL-22 induzierte mRNA-Expression von N-Cadherin.

BEAS-2B-Zellen wurden 3 Tage lang mit TGF- β allein oder in Kombination mit IL-22 inkubiert und mit dem p38 MAP-Kinase Inhibitor SB202190 und/oder dem JAK2-Inhibitor AG490 behandelt.

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 technischen Triplikaten.

zur mRNA-Expression von N-Cadherin wiederholt werden, wobei zusätzlich zu dem p38 MAP-Kinase Inhibitor SB202190 der JAK2-Inhibitor AG490 verwendet werden sollte (s. Abb. 40). Durch die gleichzeitige Hemmung der p38 MAP-Kinase sowie der Januskinase 2 wurde der verstärkende Effekt von IL-22 auf die TGF- β induzierte N-Cadherin-Expression aufgehoben.

3.4.3 EMT-assoziierte Transkriptionsfaktoren

Für die Repression der epithelialen Genexpression sowie Induktion der mesenchymalen Genexpression sind EMT-assoziierte Transkriptionsfaktoren notwendig, deren Expression über unterschiedliche Signalwege reguliert wird. Die Aktivierung der Expression dieser Transkriptionsfaktoren zählt dabei zu den ersten Schritten in der Einleitung von EMT. Zu den wichtigsten EMT-regulierenden Transkriptionsfaktoren gehören Snail1 und Snail2 (Slug), Twist1 und 2 sowie die ZEB (Zinc finger E-box-binding homeobox) Transkriptionsfaktoren ZEB1 und ZEB2, deren Expression zunächst bei alleiniger Stimulation mit TGF- β , IL-4, IL-17 oder IL-22 untersucht wurde (s. Abb. 41). Der Wachstumsfaktor TGF- β löste dabei die Expression aller EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren aus. Bei alleiniger Stimulation mit jeweils einem der proinflammatorischen Zytokine hingegen wurden kurzzeitig unterschiedliche EMT-Transkriptionsfaktoren exprimiert: Während IL-4 die Expression von Snail und Twist1

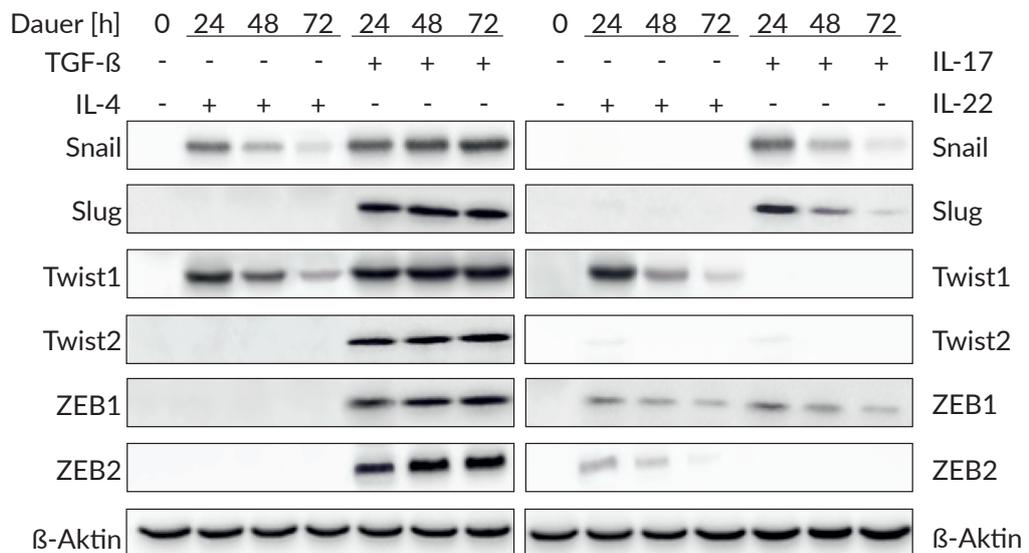


Abbildung 41: Expression EMT-assoziiierter Transkriptionsfaktoren induziert durch den Wachstumsfaktor TGF- β bzw. die proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-17 oder IL-22.

BEAS-2B-Zellen wurden für die angegebenen Zeitintervalle mit TGF- β , IL-4, IL-17 oder IL-22 inkubiert. Nach Isolierung von Gesamt-Zellextrakten wurden diese per SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Immunoblotting die jeweiligen Transkriptionsfaktoren mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

induzierte, förderte IL-17 die Expression der Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und ZEB1. Durch IL-22 wurde die Expression von Twist1, ZEB1 und ZEB2 ausgelöst. Allerdings verringerte sich die Proteinmenge dieser Transkriptionsfaktoren wieder nach 48 Stunden, was sich nach 72 Stunden noch verstärkte. Die Proteinmenge der durch TGF- β induzierten Transkriptionsfaktoren blieb hingegen gleich. Auffällig war zudem, dass die Zytokine die Expression der Transkriptionsfaktoren ZEB1 und ZEB2 wesentlich schwächer induzierten verglichen mit der durch TGF- β induzierten Expression.

Um festzustellen, ob diese Effekte ebenfalls auf transkriptioneller Ebene auftreten und dort womöglich reguliert werden, wurde die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Twist1, Snail und ZEB1 per qRT-PCR untersucht (s. Abb. 42). Obwohl die Transkriptmenge der untersuchten EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren kurzzeitig (6 h) durch die jeweiligen Zytokine erhöht wurde, trat bei allen Zytokinbehandlungen bereits nach 12 Stunden eine Abnahme in der mRNA-Menge der Transkriptionsfaktoren um etwa 50% auf. Nach 24 Stunden erreichte die Transkriptmenge bei allen wieder das Level der unbehandelten Kontrolle. Die durch TGF- β allein ausgelöste Genexpression hingegen nahm über den Zeitraum von 72 h nur sehr langsam ab und war selbst nach 3 Tagen lediglich um etwa 25% gesunken. Dieser Effekt trat ebenfalls bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- β und Zytokin auf.

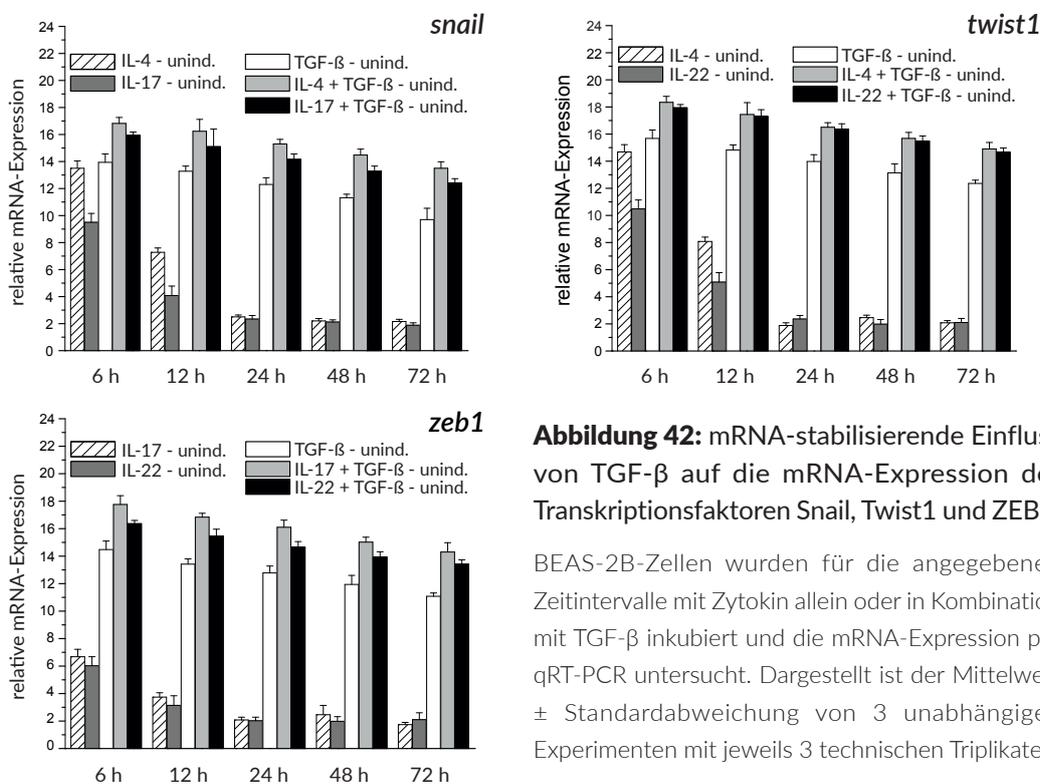


Abbildung 42: mRNA-stabilisierende Einfluss von TGF- β auf die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Snail, Twist1 und ZEB1.

BEAS-2B-Zellen wurden für die angegebenen Zeitintervalle mit Zytokin allein oder in Kombination mit TGF- β inkubiert und die mRNA-Expression per qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 technischen Triplikaten.

Für die Transkriptionsfaktoren Snail, Twist1 und ZEB1 wurde als nächstes untersucht, ob sich der Effekt von TGF- β auf transkriptioneller Ebene auch auf Proteinmenge nachweisen lässt. Hierzu wurden BEAS-2B-Zellen mit dem Wachstumsfaktor und Zytokin allein bzw. in Kombination für unterschiedliche Zeitintervalle stimuliert, Gesamt-Zellextrakte hergestellt und die Expression der Transkriptionsfaktoren per Western Immunoblotting analysiert. Die kombinierte Stimulation von BEAS-2B-Zellen mit TGF- β und proinflammatorischem Zytokin resultierte dabei in der stärksten Expression aller untersuchten Transkriptionsfaktoren, verglichen mit der alleinigen Stimulation mit Zytokin oder nur TGF- β . Diese Erhöhung in der Proteinabundanz konnte dabei bereits nach 24-stündiger Stimulation verzeichnet werden und die Proteinmenge nahm, im Gegensatz zur Stimulation mit Zytokin allein, auch nach 48 und 72 Stunden nicht ab. Auch bei alleiniger Stimulation mit TGF- β reduzierte sich die Proteinmenge der EMT-essentiellen Transkriptionsfaktoren nicht.

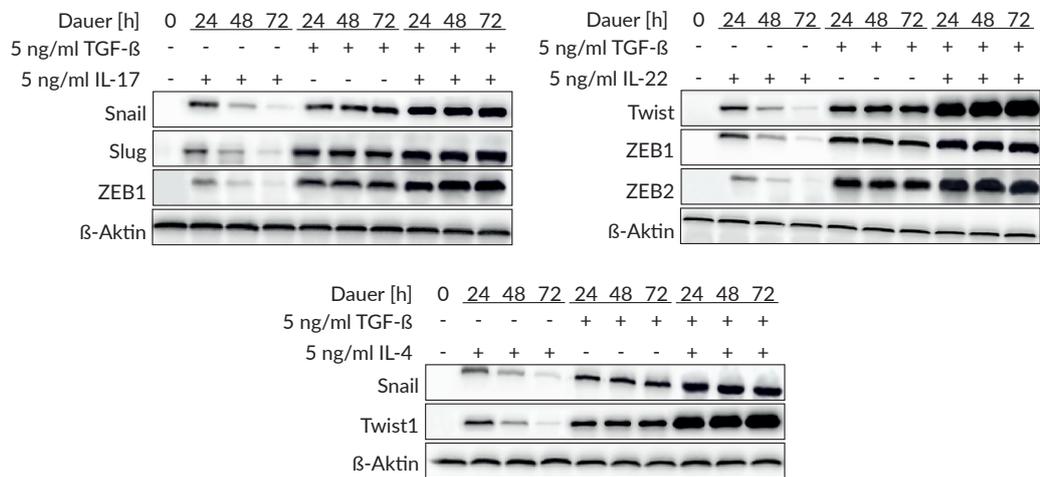


Abbildung 36: Effekt der kombinierten Stimulation von BEAS-2B-Zellen mit TGF- β und Zytokin auf die Proteinmenge der Transkriptionsfaktoren Snail, Twist1 und ZEB1.

BEAS-2B-Zellen wurden für die angegebenen Zeitintervalle entweder nur mit TGF- β oder Zytokin bzw. einer Kombination aus beiden stimuliert und danach die Expression der Transkriptionsfaktoren per Western Immunoblotting untersucht. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

3.5 Oxacyclododecindion aus *Exserohilum rostratum*

Oxacyclododecindion (s. Abb. 44) wurde bereits als potenter Inhibitor von JAK-STAT-Signalkaskaden sowie der TGF- β induzierten Signaltransduktion charakterisiert¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Der Naturstoff gehört dabei, chemisch gesehen, zu den Makrolaktonen und weist ein Molekulargewicht von 368,81 g/mol auf. Oxacyclododecindion wurde durch Fermentation des Deuteromyceten *Exserohilum rostratum* gewonnen, was bereits detailliert beschrieben wurde¹⁴⁹. Im Rahmen

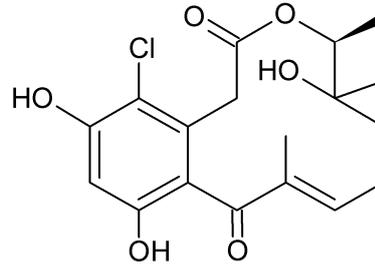


Abbildung 44: Strukturformel von Oxacyclododecindion ($C_{18}H_{21}ClO_6$)

dieser Arbeit sollte das therapeutische Potential des Naturstoffes zur Behandlung von schwerem, Glukokortikoid-resistentem Asthma sowie zur Inhibierung von EMT untersucht werden.

3.5.1 Wirkung auf Asthma-relevante Signalwege

Da das Zytokin IL-17 eng mit der Entstehung von schwerem, Glukokortikoid-resistentem Asthma assoziiert ist, sollte das Potential von Oxacyclododecindion untersucht werden, die Produktion von IL-17 in T-Zellen sowie die IL-17 induzierte Genexpression in bronchialen Epithelzellen zu inhibieren. Hierzu mussten zunächst die Stimulationsparameter für das Reporter-gen, das unter der Kontrolle des IL-17 Promoters steht, in der T-Zelllinie Jurkat optimiert werden. In naiven T-Zellen wird zur Aktivierung des IL-17 Promoters eine Stimulation des T-Zellrezeptors sowie zusätzlich das Zytokin IL-6 und der Wachstumsfaktor TGF- β benötigt. Intrazellulär verursachen diese Signale zunächst die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t, der für die Aktivierung des IL-17-Promoters essentiell ist. *In vitro* kann die Aktivierung des T-Zellrezeptors durch das Phorbol-ester PMA und das Ionophor Ionomycin simuliert werden, da diese Substanzen intrazellulär dieselben Signalwege aktivieren¹⁵².

Das Reporter-gen unter der Kontrolle des IL-17 Promoters konnte jedoch zunächst in Jurkat-Zellen selbst durch Kombination der oben genannten Stimuli nicht induziert werden (s. Abb. 45A). Obwohl eine Kombination dieser Stimuli (IL-6, TGF- β und T-Zellrezeptor-Aktivierung) bei naiven T-Zellen ausreicht, um die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t auszulösen, konnte in Jurkat-Zellen selbst nach 48 Stunden keine Expression von ROR γ t nachgewiesen werden (s. Abb. 45B). Daher wurden die T-Zellen zusätzlich zu dem Reporter-gen mit einem Expressionsvektor für ROR γ t (MIGR-ROR γ t) cotransfiziert. Da die TGF- β -Stimulation nur für die Expression von ROR γ t benötigt wird, nicht aber zur Aktivierung des IL-17 Promoters an sich, wurde dieser Stimulus im Folgenden ausgelassen. Bei Verwendung des Expressionsvektors konnte ROR γ t bereits nach 24 Stunden nachgewiesen werden und auch die Reporter-genaktivität ließ sich durch einen kombinierten Stimulus aus PMA, Ionomycin sowie IL-6 um das 7,2-fache steigern (s. Abb. 45C+D).

Das Reporter-gen-Testsystem wurde im Folgenden dazu genutzt, die Wirkung von

Oxacyclododecindion auf die IL-17 Promoteraktivität zu testen. Als Vergleichssubstanz diente das synthetische Glukokortikoid Dexamethason, wobei therapeutische bis superpharmakologische Konzentrationen des Glukokortikoids verwendet wurden. Dabei gelten Konzentrationen von 1 nM bis 100 nM als therapeutische Dosis (normal bis klinisch hoch), während Konzentrationen ab 1 μ M als superpharmakologisch eingestuft werden und in der Praxis nicht zum Einsatz kommen^{153,154}. Obwohl Dexamethason im Reporterassay bereits bei geringeren Konzentrationen als Oxacyclododecindion (1-10 nM) eine Verringerung der IL-17 Promoteraktivität auslöste, wurde diese durch das Glukokortikoid, selbst bei einer superpharmakologischen Dosis von 1 μ M, nur um 45% gesenkt (s. Abb. 46). Oxacyclododecindion hingegen inhibierte die IL-17 Promoteraktivität ab einer Konzentration

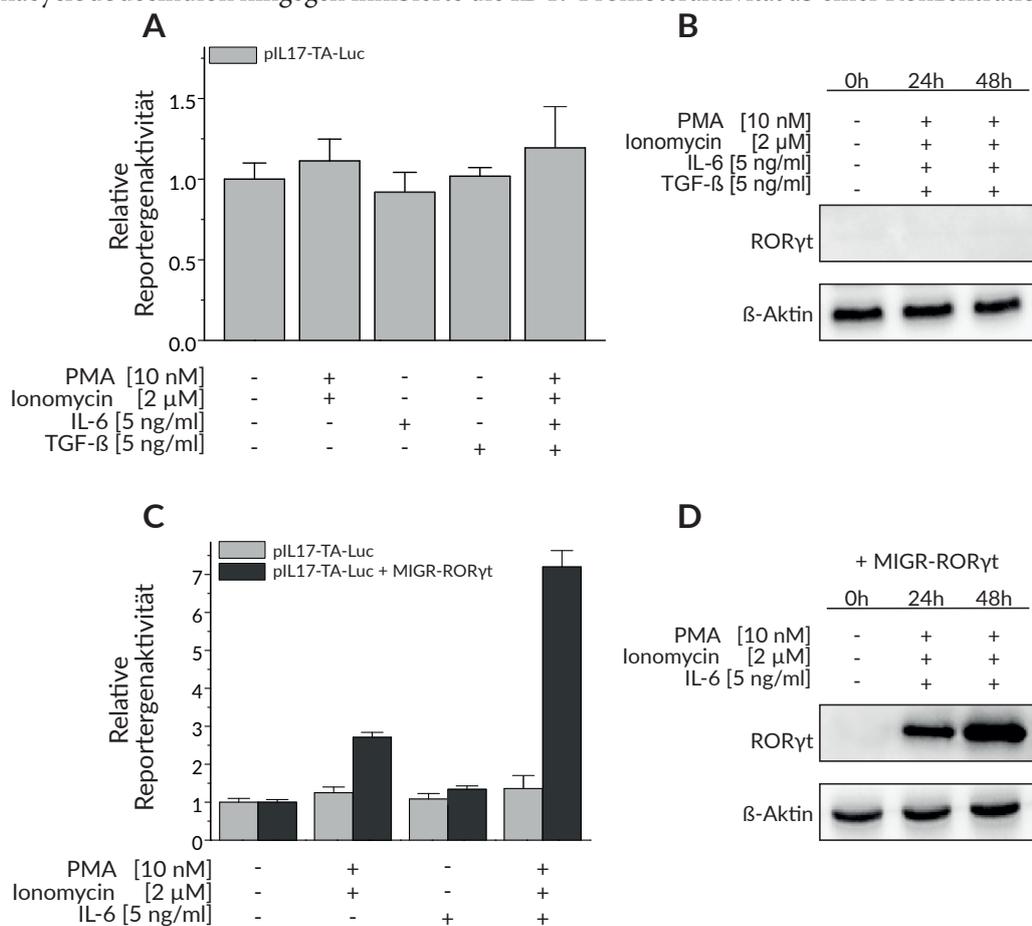


Abbildung 45: Expression des Reportergens pIL17-TA-Luc (A+C), das unter der Kontrolle des IL-17 Promoters steht, und Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t in der T-Zelllinie Jurkat ohne (B) bzw. mit dem konstitutiv aktiven ROR γ t-Expressionsvektor (D).

A/C: Jurkat-Zellen wurden mit den angegebenen Reporterkonstrukten sowie dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1 α per Elektroporation transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation mit den dargestellten Induktoren wurde die Reporterexpression gemessen und gegen den Kontrollvektor normiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 2 technischen Replikaten. B und D zeigen die ROR γ t-Expression in Jurkat-Zellen mit bzw. ohne den ROR γ t-Expressionsvektor (MIGR-ROR γ t). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

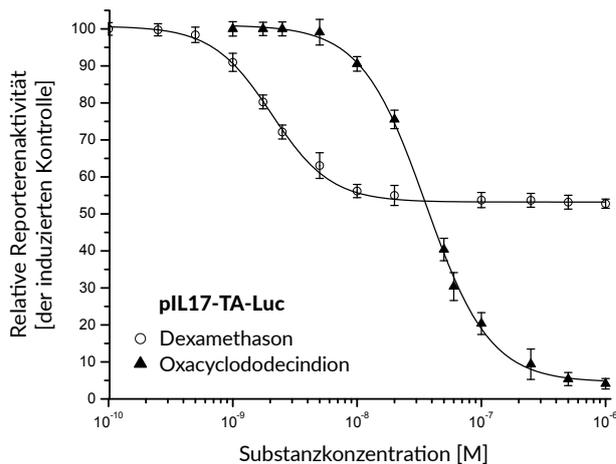


Abbildung 46: Wirkung von Dexamethason und Oxacyclododecindion auf die Promoteraktivität des IL-17 Gens.

Jurkat-Zellen wurden mit dem Reporter gen pIL17-TA-Luc, dem konstitutiv aktiven Expressionsvektor MIGR-ROR γ t sowie dem Kontrollvektor pRL-EF1 α per Elektroporation transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation mit PMA, Ionomycin und IL-6 sowie den zu testenden Substanzen wurde die

Reporter genexpression gemessen und gegen den Kontrollvektor normiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 3 technischen Replikaten.

von etwa 10 nM, wobei eine IC₅₀ von 30 nM und eine IC₉₀ von 200 nM für den Naturstoff bestimmt wurde.

Nachfolgend wurde das Potential von Oxacyclododecindion getestet, die durch IL-17 induzierte mRNA-Expression in bronchialen Epithelzellen zu inhibieren. Dazu wurde mittels qRT-PCR die Transkriptmenge von Genen untersucht, deren Expression in A549-Zellen durch IL-17 induziert wird (s. Abb. 47). Durch eine 8-stündige Stimulation mit IL-17 wurde in A549-Zellen die mRNA-Expression von IL-6, IL-8, MMP-9 sowie GM-CSF induziert, die alle mit der Pathogenese von Asthma assoziiert sind. Obwohl durch beide Testsubstanzen die mRNA-Expression aller untersuchten Gene verringert wurde, verursachte Oxacyclododecindion eine Reduktion der Transkriptmenge um durchschnittlich 85%, während sich die mRNA-Expression durch die Behandlung mit dem Glukokortikoid nur um durchschnittlich 70% verringerte.

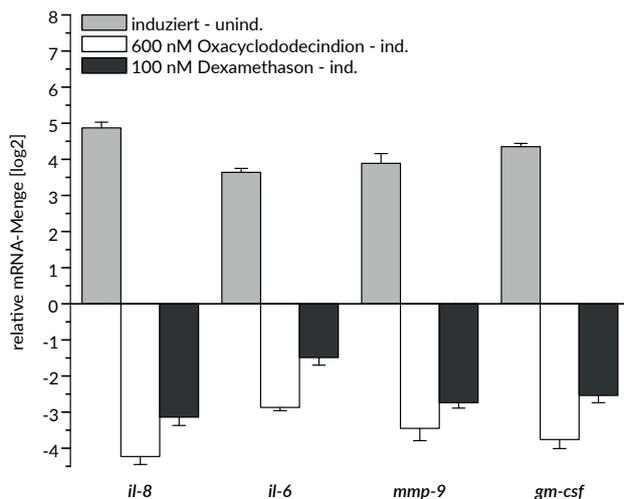


Abbildung 47: Wirkung von Oxacyclododecindion sowie Dexamethason auf die durch IL-17 induzierte mRNA-Expression in der bronchialen Epithelzelllinie A549.

Nach einstündiger Vorbehandlung mit den Testsubstanzen wurden die Zellen für 8 h mit IL-17 (10 ng/ml) stimuliert und die relative mRNA-Menge per qRT-PCR bestimmt. Angabe der Werte als Quotient [log₂] der relativen mRNA-Menge von IL-17 induzierten gegen uninduzierte Zellen sowie behandelten,

induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen. Zur Normierung wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) als Referenzgen verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 technischen Triplikaten.

3.5.2 Wirkung auf die epithelial-mesenchymale Transition

Um die Wirkung von Oxacyclododecindion auf die epithelial-mesenchymale Transition in BEAS-2B-Zellen zu untersuchen, wurde ein kombinierter Stimulus aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-17 und IL-22 sowie dem profibrotischen Zytokin TGF- β gewählt, um die pathologischen Bedingungen in den Atemwegen von Asthmatikern realistischer zu simulieren. Als Vergleichssubstanz wurde wieder das synthetische Glukokortikoid Dexamethason verwendet. Oxacyclododecindion inhibierte den EMT-Prozess, was bereits anhand von zellmorphologischen Aspekten ersichtlich war (s. Abb. 48A): Während BEAS-2B Zellen durch den kombinierten EMT-Stimulus eine spindelförmige Zellform annahmen und keinen konfluenten Zellrasen mehr ausbildeten (Konfluenz etwa 50%), wuchsen die Zellen bei zusätzlicher Behandlung mit Oxacyclododecindion als durchgehender Zellrasen

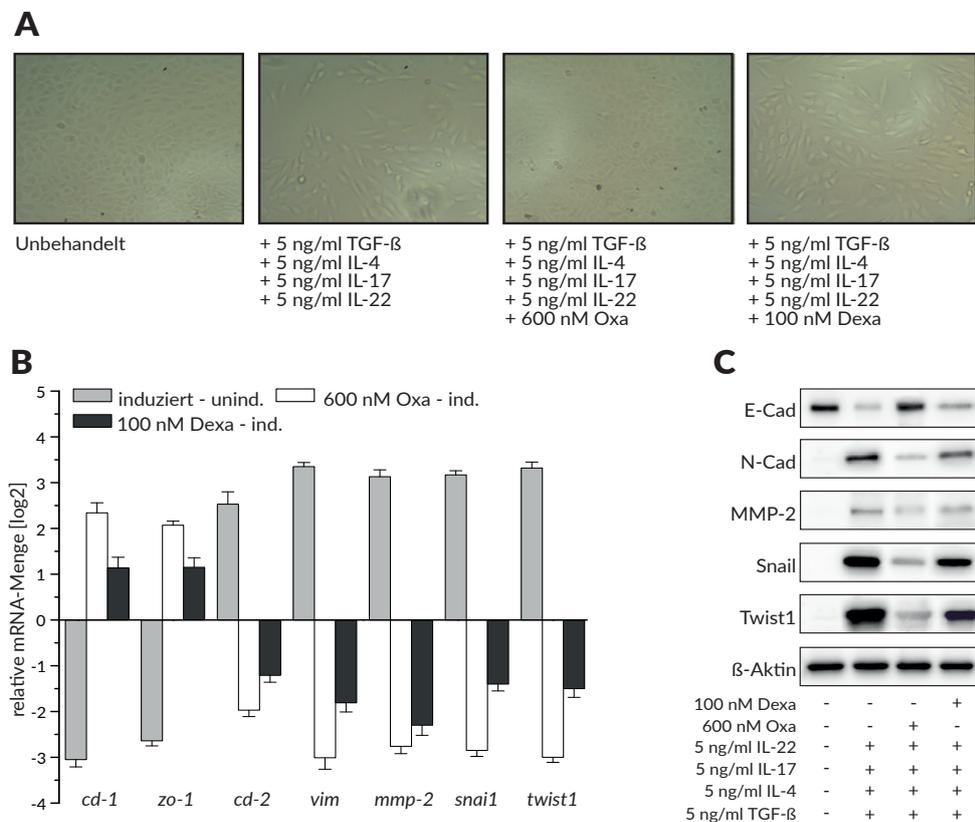


Abbildung 48: Wirkung von Oxacyclododecindion sowie Dexamethason auf EMT.

BEAS-2B Zellen wurden mit einem kombinierten Stimulus aus TGF- β und proinflammatorischen Zytokinen (IL-4, IL-17 und IL-22) und Substanzen für insgesamt 3 Tage inkubiert. Die Abbildungen zeigen zellmorphologische Veränderungen, die nach 3 Tagen durch die entsprechenden Behandlungen auftraten (A). B: Per qRT-PCR wurden die mRNA-Expression von EMT-assoziierten Genen in den unterschiedlichen Versuchsansätze bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 technischen Triplikaten. C: Proteinexpression mehrerer EMT-Markergene nach 3-tägiger TGF- β Stimulation mit bzw. ohne Testsubstanzen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

aus polygonalen Zellen mit abschließendem Zell-Zell-Kontakt und zeigten somit dieselbe Zellmorphologie, die auch bei der Negativkontrolle beobachtet werden konnte. Bei der Behandlung mit Dexamethason hingegen wuchsen die Zellen immer noch spindelförmig, allerdings war die Konfluenz des Zellrasens höher im Vergleich zur Positivkontrolle (etwa 85%). Auf transkriptioneller Ebene verringerte Oxacyclododecindion die mRNA-Menge von mesenchymalen Markergenen wie N-Cadherin, Vimentin und der Matrix-Metalloprotease 2 um durchschnittlich mehr als 80%, während es epitheliale Markergene wie E-Cadherin und Zonula occludens 1 um mind. 60% hochregulierte (s. Abb. 48B). Auch die Expression der EMT-essentiellen Transkriptionsfaktoren Snail1 und Twist1 wurde auf transkriptioneller Ebene durch das Makrolakton um über 80% gesenkt. Das Glukokortikoid Dexamethason verringerte zwar ebenfalls die mRNA-Menge dieser Gene, allerdings wesentlich schwächer als Oxacyclododecindion: Obwohl es die mRNA-Expression der Matrix-Metalloprotease 2 ähnlich stark wie Oxacyclododecindion inhibierte, verursachte es bei allen anderen untersuchten EMT-Markergenen nur eine Verringerung der Transkriptmenge um durchschnittlich 50%. Dieser Unterschied zwischen den beiden Testsubstanzen konnte dabei auch auf Proteinebene für die untersuchten EMT-Markergene beobachtet werden (s. Abb. 48C).

Da Dexamethason die epithelial-mesenchymale Transition nur schwach inhibierte, wurde zusätzlich der Effekt der beiden Substanzen auf ein TGF- β -abhängiges Reporter-genkonstrukt getestet (s. Abb. 49). Ähnlich dem Effekt der beiden Substanzen auf die IL-17 Promoteraktivität zuvor, löste Dexamethason bereits in geringeren Konzentrationen als Oxacyclododecindion eine Abnahme der TGF- β -induzierten Reporter-genexpression aus. Allerdings wurde die Reporteraktivität durch therapeutische Konzentrationen des Glukokortikoids (1-100 nM) nur um maximal 40% gesenkt. Oxacyclododecindion hingegen inhibierte bei einer Konzentration von 100 nM die TGF- β -induzierte Reporter-genexpression bereits um etwa 50% (IC_{50}), während die IC_{90} bei einer Konzentration von etwa 350 nM erreicht wurde.

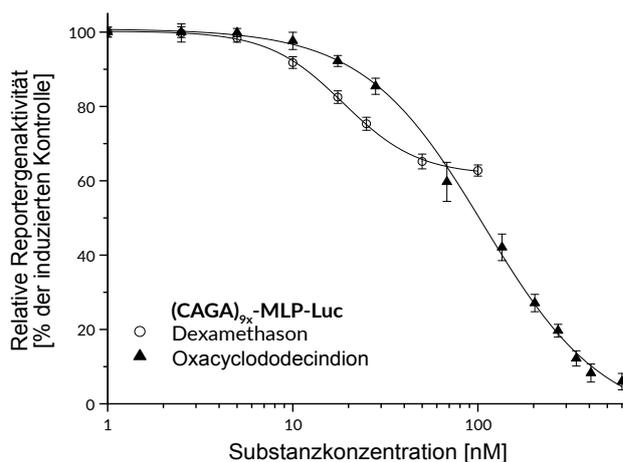


Abbildung 49: Wirkung von Dexamethason und Oxacyclododecindion auf die durch TGF- β induzierte und durch Smad2/3 vermittelte Signaltransduktion in BEAS-2B-Zellen.

BEAS-2B-Zellen wurden mit dem Reporter-gen $(CAGA)_{9x}$ -MLP-Luc sowie dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1 α per Elektroporation transfiziert. 24 Stunden nach Elektroporation wurden die Zellen

für weitere 24-Stunden mit TGF- β sowie den zu testenden Substanzen inkubiert und danach die Reporter-genexpression gemessen, die gegen den Kontrollvektor normiert wurde. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit jeweils 3 technischen Replikaten.

3.5.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

INDUKTION VON APOPTOSE/NEKROSE

Für Oxacyclododecindion konnte bisher in Zellviabilitätsassays (XTT Assay) bis zu einer Konzentration von 1,35 μM keine Beeinflussung der Zellviabilität nachgewiesen werden¹⁵⁵. Da Oxacyclododecindion jedoch eine Vielzahl an Signalwegen inhibiert, sollte zunächst eine unspezifische Wirkung des Naturstoffes durch Induktion von Apoptose bzw. Nekrose ausgeschlossen werden und die bereits erhaltenen Daten bezüglich der Zellviabilität per Durchflusszytometrie bestätigt werden. Hierzu wurde eine Doppelfärbung der Zellen mit Propidiumjodid und Annexin V durchgeführt, was eine Unterscheidung zwischen apoptotischen

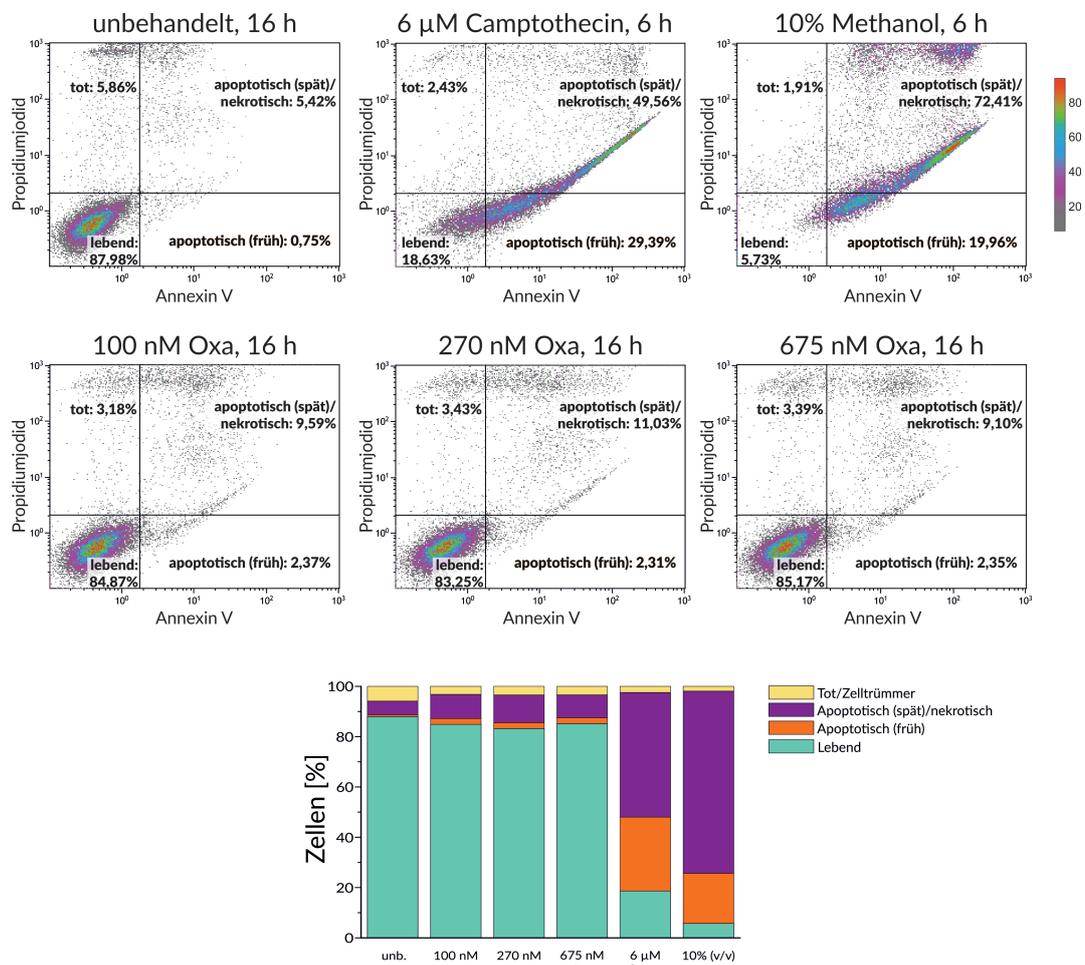


Abbildung 50: Effekt von Oxacyclododecindion auf die Viabilität von Jurkat-Zellen.

Zellen wurden für 16 h mit Oxacyclododecindion bzw. für 6 h mit Kontrollsubstanzen vorinkubiert, danach mit Annexin V und Propidiumjodid für 30 min auf Eis angefärbt und die Fluoreszenz per Durchflusszytometer gemessen. Die Behandlung mit Camptothecin diente dabei als Positivkontrolle für Apoptose, Methanol als Positivkontrolle für Nekrose. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Messung mit jeweils 20.000 gemessenen Ereignissen (oben) bzw. der Mittelwert von 2 biologischen Replikaten als Prozentanteil aller gemessenen Zellen.

bzw. nekrotischen und lebenden Zellen ermöglicht. Das Prinzip basiert darauf, dass bei Zellen in der frühen Apoptose-Phase Phosphatidylserin, das sich bei lebenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet, auf die Außenseite der Membran transloziert und dort von Annexin V gebunden wird. Da die bei nekrotischen Zellen permeabilisierte Zellmembran ebenfalls die Bindung von Annexin erlaubt, wenn auch an der Innenseite der Zellmembran, erfolgt zur Differenzierung die zusätzliche Anwendung des DNA-interkalierenden Farbstoffes Propidiumjodid, der nur die perforierten Zellmembranen nekrotischer Zellen bzw. Zellen im fortgeschrittenen Apoptosestadium passieren kann. Lebende Zellen werden dabei durch keinen der beiden Farbstoffe gefärbt ¹⁵⁵.

Oxacyclododecindion erhöhte selbst nach 16 Stunden Inkubationsdauer die Anzahl an nekrotischen Zellen nur um 3,7% und die Zahl der apoptotischen Zellen nur um 1,6% verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Das zytostatisch wirkende Alkaloid Camptothecin hingegen, das als Positivkontrolle für Apoptose verwendet wurde, erhöhte bereits nach 6 Stunden die Zahl der apoptotischen Zellen um 28,4%, während die Anzahl an nekrotischen Zellen bzw. Zellen im späten Apoptosestadium um etwa 44% anstieg. Durch 10% Methanol im Zellkulturmedium wurde hingegen nach 6 Stunden verstärkt Nekrose induziert, wobei sich die Anzahl an nekrotischen bzw. spät-apoptotischen Zellen durch Methanolbehandlung auf 70% erhöhte.

BINDUNG VON SMAD2/3 AN DEN PAI-1 PROMOTER

Da für Oxacyclododecindion bereits in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass die Substanz die Phosphorylierung und somit Aktivierung des Smad2/3-Komplexes im TGF- β induzierten Signalweg nicht beeinflusst, aber dennoch die Smad2/3-abhängige Genexpression reduziert, wurde der Einfluss des Makrolaktins auf die Interaktion des

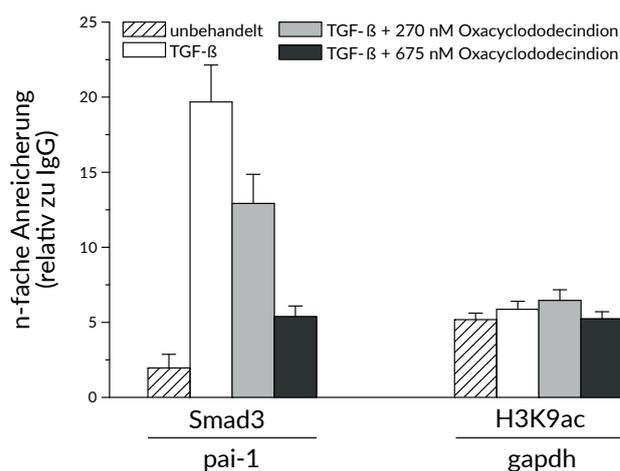


Abbildung 51: Effekt von Oxacyclododecindion auf die TGF- β induzierte Interaktion des Transkriptionsfaktors Smad3 mit dem PAI-1 Promoter in HepG2-Zellen.

Nach einstündiger Vorinkubation mit Oxacyclododecindion wurden HepG2-Zellen mit 10 ng/ml TGF- β für 30 min induziert. Crossgelinkte und gescherte DNA wurde mit Antikörpern gegen Smad3, acetyliertes Histon 3 (H3K9ac) oder Kaninchen-

IgG co-immunpräzipitiert. Das präzipitierte Material wurde als Template eingesetzt für qRT-PCR mit Primern spezifisch für den pai-1 bzw. gapdh-Promoter und die n-fache Anreicherung auf dem Promoter gegenüber der unspezifischen IgG-Probe berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten mit 3 technischen Replikaten.

Transkriptionsfaktors Smad3 mit dem PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor) Promoter per Chromatin-Immunopräzipitation analysiert (s. Abb. 51)¹⁴⁹. Das Protein PAI-1 ist dabei eng mit Fibrose assoziiert und die Hemmung der PAI-1 Genexpression durch Oxacyclododecindion konnte bereits auf mRNA- sowie Proteinebene nachgewiesen werden¹⁴⁹.

Durch Behandlung mit Oxacyclododecindion wurde die durch TGF- β induzierte Bindung des Transkriptionsfaktors Smad3 an den PAI-1 Promoter konzentrationsabhängig verringert, während die Menge an acetyliertem Histon 3 am GAPDH Promoter, welches einen Marker für zugängliches, transkriptionell aktives Chromatin darstellt, durch die Substanz sowie die Stimulation mit TGF- β nicht beeinflusst wurde.

AKTIVITÄT VON p300

Eine Gemeinsamkeit aller durch Oxacyclododecindion inhibierten Signalwege stellt die Rekrutierung des transkriptionellen Coaktivators p300 im Nukleus dar, der als Apapterprotein zwischen Transkriptionsfaktoren und basaler Transkriptionsmaschinerie fungiert sowie als Acetyltransferase die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Zugänglichkeit des Chromatins

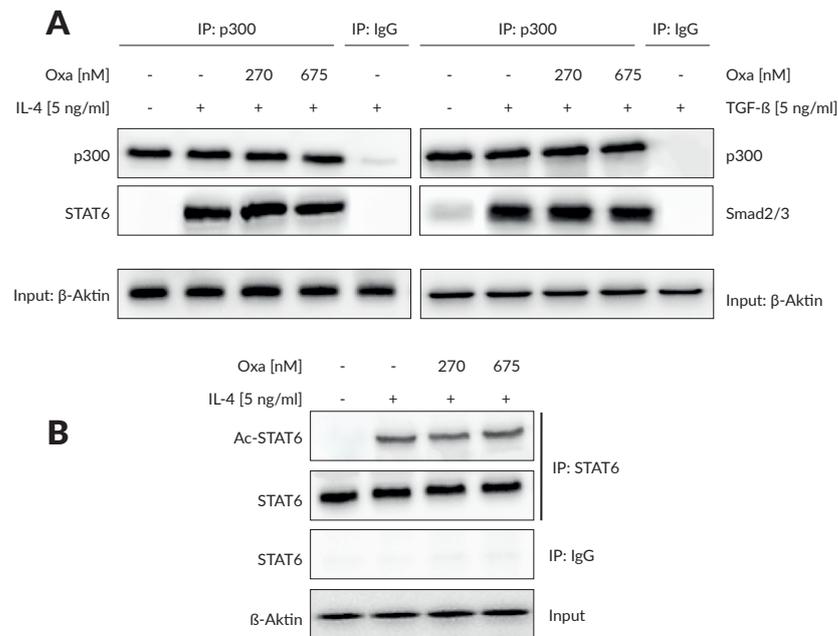


Abbildung 52: Wirkung von Oxacyclododecindion auf die Interaktion des transkriptionellen Coaktivators p300 mit den Transkriptionsfaktoren Smad2/3 und STAT6 (A) sowie auf die Acetylierung von STAT6 (B).

A: Nach einstündiger Vorinkubation mit Oxacyclododecindion wurden HepG2-Zellen für 30 min mit 5 ng/ml TGF- β (Smad2/3) bzw. 5 ng/ml IL-4 (STAT6) induziert. Zellysate wurden mit anti-p300-Antikörpern immunpräzipitiert und co-immunpräzipitiertes STAT6 bzw. Smad2/3 per Western Immunoblot nachgewiesen. B: Nach einstündiger Vorinkubation mit Oxacyclododecindion wurden HepG2-Zellen für 30 min mit 5 ng/ml IL-4 induziert und Zellysate hergestellt. STAT6 wurde immunpräzipitiert und der Acetylierungsstatus von STAT6 per Western Immunoblotting untersucht. Als Kontrolle für die Spezifität diente bei beiden Versuchsansätzen mit IgG-Antikörpern präzipitiertes Zellysate. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

moduliert. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Oxacyclododecindion auf die Interaktion von p300 mit den Transkriptionsfaktoren STAT6 und Smad2/3 sowie auf die Acetyltransferase-Aktivität des Coaktivators untersucht. Oxacyclododecindion inhibierte dabei nicht die Interaktion von p300 mit den Transkriptionsfaktoren STAT6 sowie Smad2/3, die durch Behandlung mit IL-4 bzw. TGF- β induziert wurde (s. Abb. 52A). Desweiteren reduzierte das Makrolakton nicht die IL-4 induzierte Acetylierung von STAT6, die durch p300 verursacht wurde, und hemmte somit auch nicht die Acetyltransferase-Aktivität des transkriptionellen Coaktivators (s. Abb. 52B).

TGF- β INDUZIERTE AKTIVIERUNG DER MAP-KINASE-KASKADE

Da Oxacyclododecindion die epithelial-mesenchymale Transition inhibierte, wurde in diesem Zusammenhang die Aktivierung von Kinasen untersucht, die durch TGF- β Stimulation aktiviert werden. Hierzu zählen die MAP-Kinasen p38, JNK und ERK sowie die Proteinkinase

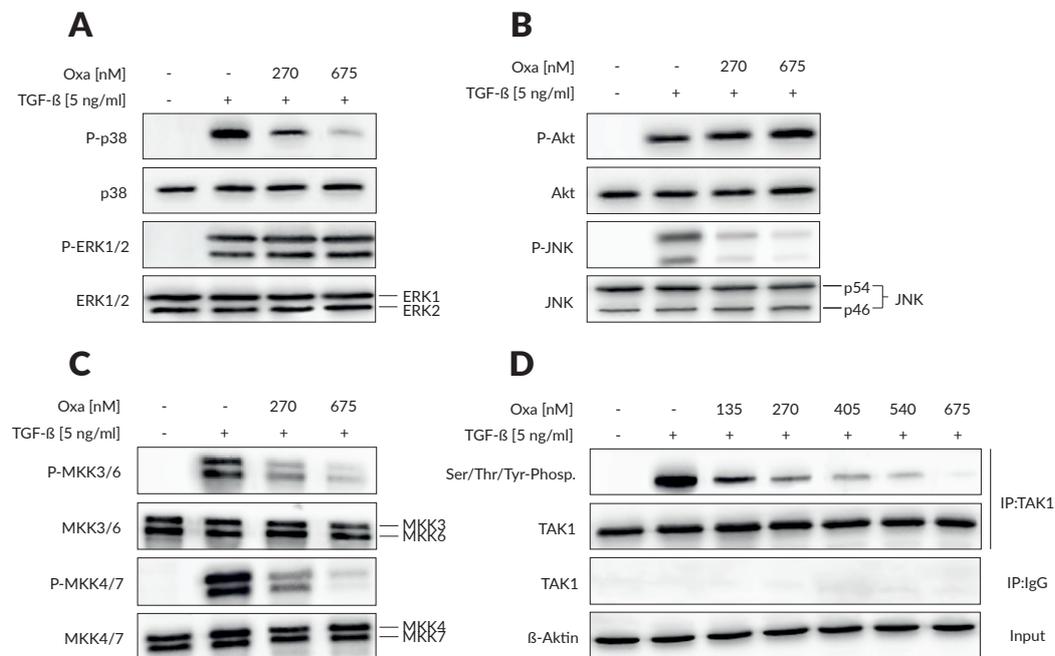


Abbildung 53: Effekt von Oxacyclododecindion auf die TGF- β induzierte Phosphorylierung von Kinasen.

A: Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2. B: Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinase JNK sowie der Proteinkinase B (Akt). C: Phosphorylierungsstatus der MAP2-Kinasen MKK3/6 und MKK4/7, die sich in der MAP-Phosphorylierungskaskade upstream der MAP-Kinasen p38 und JNK befinden. D: Phosphorylierungsstatus der MAP3-Kinase TAK1, die sich in der MAP-Kinase-Kaskade upstream der MAP2-Kinasen MKK3/6 und MKK4/7 befindet.

Nach einstündiger Vorinkubation mit Oxacyclododecindion wurden BEAS-2B-Zellen für 30 min mit 5 ng/ml TGF- β induziert. Gesamt-Zelllysate wurde per SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphorylierungsstatus mittels spezifischer Antikörper durch Western Immunoblotting untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

B (Akt). Abb. 53 (A und B) zeigt, dass Oxacyclododecindion konzentrationsabhängig die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 sowie JNK inhibierte, während die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) sowie der MAP-Kinase ERK bis zu der höchsten getesteten Konzentration von 675 nM unbeeinflusst blieb. Betrachtet man die gesamte Phosphorylierungskaskade des MAP-Kinase Signalweges, so wird die MAP-Kinase p38 durch die MAP2-Kinasen MKK3 und 6 phosphoryliert, während die Phosphorylierung der MAP-Kinase JNK durch die MAP2-Kinasen MKK4 und 7 erfolgt. Um festzustellen, ob Oxacyclododecindion die Kinase-Aktivität dieser MAP2-Kinasen inhibiert oder upstream der MAP2-Kinasen wirkt, wurde der Phosphorylierungsstatus der beiden MAP2-Kinasen untersucht. Auch für die MAP2-Kinasen MKK3/6 und MKK4/7 konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Phosphorylierung durch Oxacyclododecindion nachgewiesen werden (s. Abb. 53C), was bedeutet, dass der Naturstoff upstream der MAP2-Kinasen wirken muss. Die Aktivierung der MAP2-Kinasen erfolgt bei TGF- β Stimulation durch die MAP3-Kinase TAK1 (TGF- β activated kinase 1), die sich selbst nach einer Konformationsänderung an Serin-192 sowie Threoninresten (Thr184 und Thr187) autophosphoryliert. Auch für TAK1 konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Serin-Tyrosin-Threonin-Phosphorylierung durch Oxacyclododecindion nachgewiesen werden (s. Abb. 53D).

Nach Aktivierung des TGF- β Rezeptors wird intrazellulär zunächst die Ubiquitin-Protein-Ligase TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) an den TGF- β Rezeptor rekrutiert, welche daraufhin sich selbst mit K63-verknüpften Polyubiquitinketten modifiziert. Die polyubiquitinierte TRAF6-Ligase ermöglicht die Anlagerung des heterotrimeren TAK1-Komplexes, der außer TAK1 die TAK1-bindenden Proteine (TAB) 1 und 2 beinhaltet. Die Interaktion bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb der Kinase TAK1 und ermöglicht so deren Autophosphorylierung. Dabei wurde die K63-Ubiquitinierung von TRAF6, die essentiell ist für die Aktivierung der MAPK-Kaskade und die durch TGF- β Stimulation in BEAS-2B-Zellen induziert werden konnte, selbst bei der höchsten Oxacyclododecindion-Konzentration von 675 nM nicht beeinflusst. Dies bedeutet, dass die inhibierte Phosphorylierung von

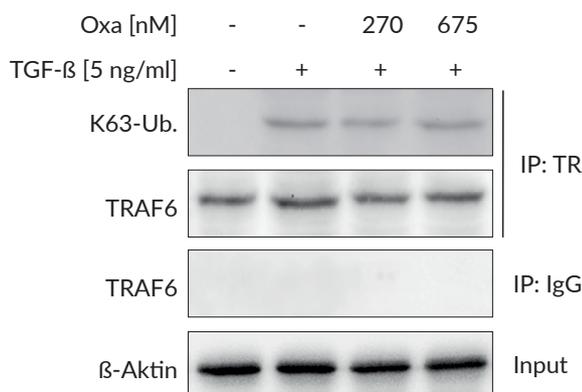


Abbildung 54: Wirkung von Oxacyclododecindion auf die K63-Ubiquitinierung von TRAF6.

Nach einstündiger Vorinkubation mit Oxacyclododecindion wurden BEAS-2B-Zellen für 30 min mit 5 ng/ml TGF- β induziert. Zelllysate wurden mit anti-TRAF6-Antikörpern immunpräzipitiert und der K63-Ubiquitinierungsstatus per Western Immunoblot nachgewiesen. Als Kontrolle für die Spezifität diente mit IgG-Antikörpern präzipitiertes Zelllysate, während β -Aktin im Input als

Ladekontrolle diente. Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

TAK1 den ersten Schritt in der TGF- β induzierten MAPK-Kaskade darstellt, der durch Oxacyclododecindion inhibiert wird.

DISKUSSION

4.

3.1 Suche nach neuen Wirkstoffen

Mit dem momentanen Angebot an Medikamenten auf dem Arzneimittelmarkt können lediglich etwa ein Drittel aller Krankheiten zufriedenstellend behandelt werden. Für viele Krankheiten jedoch, von denen ein Großteil der Bevölkerung betroffen ist und die immense Kosten im Gesundheitssystem verursachen, stehen immer noch keine befriedigenden medikamentösen Therapien zur Verfügung. Zu diesen Krankheiten zählen neben Krebs- und Infektionserkrankungen auch viele chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Asthma¹⁵⁵. Die Suche nach neuen und effektiven Medikamenten für Asthma gestaltet sich jedoch aufgrund der Heterogenität der Krankheit und den daraus resultierenden Variationen in der Therapieantwort als außergewöhnlich schwierig.

Bis zum späten 20. Jahrhundert beruhte die Therapie chronisch entzündlicher Krankheiten auf Medikamenten, die lediglich anhand empirischer Studien und ohne detailliertes Wissen der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen entwickelt wurden. Der immense Fortschritt in der Molekular-, Zell- und Strukturbiologie hat es mittlerweile jedoch ermöglicht, biologische Systeme in ihre einzelnen Bestandteile zu zerlegen, wodurch auf dem molekularen Level ein neues Verständnis für biologische Prozesse generiert wurde¹⁵⁶. So konnten für viele Krankheiten Schlüsselkomponenten der Pathogenese identifiziert werden, die heute als targets für neue Therapieansätze dienen. Die Wirkstoffentwicklung

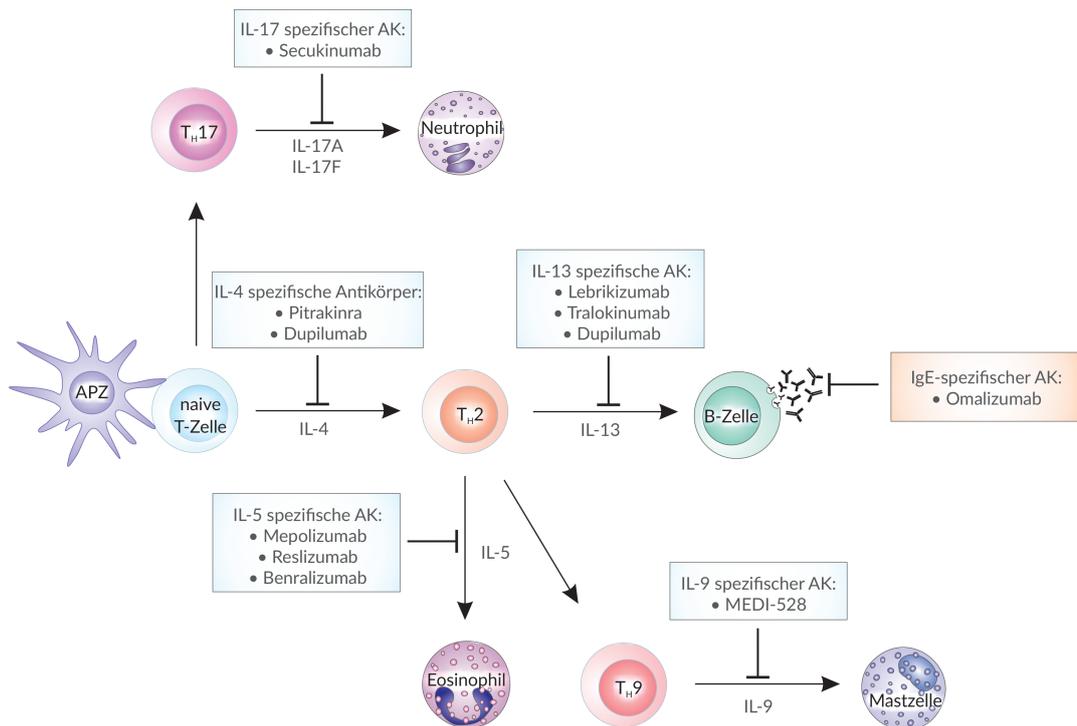


Abbildung 55: Wirkmechanismen momentan entwickelter biologischer Therapien für Asthma.

Dargestellt sind die Zielstrukturen von Protein-basierten Biologika, die sich entweder momentan in klinischen Studien befinden (blau) oder bereits zur Therapie zugelassen sind (orange). APZ: Antigen-präsentierende Zelle; AK: Antikörper; IgE: Immunglobulin E; IL: Interleukin; T_H: T-Helferzelle.

konzentrierte sich dabei während der letzten 15 Jahre verstärkt auf Biologika, die durch ein gezieltes Eingreifen in pathologische Mechanismen den Krankheitsverlauf positiv verändern sollen¹⁵⁷. Im Falle von Asthma wurden vor allem Protein-basierte Biologika entwickelt, die entweder in Form von Antikörpern gegen proinflammatorische Zytokine gerichtet sind, oder als Rezeptor-Antagonisten mit proinflammatorischen Zytokinen kompetitiv um die Besetzung von Rezeptoren konkurrieren, selbst allerdings nach Rezeptorbindung keine Signaltransduktion in der Zelle auslösen. Die so konzipierten Biologika sollen durch ihre hohe Selektivität für ein einzelnes Zielprotein nur geringe Nebenwirkungen verursachen¹⁵⁸. Abbildung 55 zeigt eine Übersicht der bisher für Asthma entwickelten Biologika mit deren targets, wobei hauptsächlich Antikörper gegen die Interleukine 4, 5 und 13 im Fokus der Entwicklung standen¹⁵⁹.

Obwohl Biologika die Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen revolutioniert haben, sind sie aufgrund ihrer Größe von über 100.000 Da nicht in der Lage, über die Zellmembran zu diffundieren, weswegen sie nur auf Proteine an der Zelloberfläche bzw. auf sekretierte Proteine wirken können. Small-molecule drugs, die ein Molekulargewicht von weniger als 500 Da aufweisen, können hingegen Membranen passieren und damit Zielstrukturen unabhängig von deren zellulären Lokalisation inhibieren¹⁶⁰. Der Einsatz von Biologika ist zudem mit extrem hohen Kosten verbunden, da sie mit Hilfe von Zellkultur-Expressionssystemen produziert werden und eine Vielzahl von analytischen Methoden zur Evaluierung ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur notwendig sind¹⁶¹. Während sich die jährlichen Kosten einer biologischen Therapie auf durchschnittlich 16.425 \$ pro Patient belaufen, werden die Kosten für traditionelle Pharmazeutika auf durchschnittlich 730 \$ pro Patient geschätzt. Aufgrund der hohen Herstellungskosten wird der Einsatz von Biologika streng limitiert und die meisten biologischen Therapien sind für die Behandlung stark fortgeschrittener bzw. aggressiver Erkrankungen vorbehalten¹⁶². Aufgrund ihrer kostengünstigen Produktion sowie ihrer oralen Bioverfügbarkeit und metabolischen Stabilität stellen small-molecule drugs daher immer noch die beste Möglichkeit dar, große Patientenpopulationen kostengünstig zu behandeln¹⁵⁸.

3.2 Cyclonerodiol aus *Fusarium* sp.

Durch die Fermentation des Ascomyceten *Fusarium* sp. konnte das Sesquiterpen Cyclonerodiol gewonnen werden, das bereits in eigenen Vorarbeiten als Inhibitor der IL-4 abhängigen Signaltransduktion in der hepatozellulären Zelllinie HepG2 charakterisiert wurde¹³⁴. Das Grundgerüst von Cyclonerodiol bildet ein Cyclopentanring und der Metabolit gehört, biosynthetisch gesehen, zu den einfachsten Sesquiterpenen. Die Erstbeschreibung von Cyclonerodiol erfolgte im Jahr 1970 durch Nozoe *et al.*, die den Naturstoff aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Trichothecium roseum* isolierten¹⁶³, wobei die Darstellung der vollständigen Stereostruktur erst im Jahr 1990 gelang¹⁶⁴. Über die Jahre hinweg konnte die Verbindung auch in weiteren Pilzgattungen nachgewiesen werden, wie z.B. *Fusarium* und *Trichoderma*^{164,165}. Bis zu diesem Zeitpunkt war für den Metaboliten nur eine schwache antifungische Wirkung gegen den Kastanienrindenkrebs *Cryphonectria parasitica* beschrieben

(100 µg im Agardiffusionstest) ¹⁶⁶, wobei andere getestete Pilzarten wie *Aspergillus flavus*, *Chaetomium cochlioides* und *Curvularia lunata* im Agardiffusionstest bis 500 µg keine Wachstumsbeeinträchtigung zeigten ¹⁶⁵. Cutler *et al.* konnten zudem eine schwache Inhibierung von Koleptilenwachstum durch den Naturstoff nachweisen ¹⁶⁵.

Die Biosynthese des Sesquiterpendiols (s. Abb. 56) erfolgt aus Acetyl-CoA, das über den Acetat-Mevalonatweg zu Mevalonsäure umgesetzt wird, aus der wiederum Dimethylallylpyrophosphat und Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet werden. Durch Isomerisierung und Verknüpfung mehrerer Isopentylpyrophosphate entsteht zunächst Geranylpyrophosphat, an das durch Anlagerung eines weiteren IPP-Bausteins Farnesylpyrophosphat gebildet wird, das zu Nerolidylpyrophosphat isomerisiert wird. Die Addition von Wasser führt schließlich durch Cyclisation zu Cyclonerodiol ¹⁶⁷.

Um die die Wirkung von Cyclonerodiol in einem Asthma-spezifischen Kontext zu untersuchen sowie den Wirkmechanismus des Naturstoffes aufzuklären, wurden zunächst die Fermentationsbedingungen optimiert, um die Produktausbeute zu erhöhen und eine ausreichende Menge für die folgenden Versuchsreihen zu erhalten. Hierzu wurden Medien mit verschiedenen C- und N-Quellen sowie unterschiedliche pH- und Temperatur-Bedingungen getestet. Während durch veränderte Fermentationsbedingungen nur eine geringfügige Produktionssteigerung erreicht werden konnte (1,6-fach), bewirkte die Verlängerung der

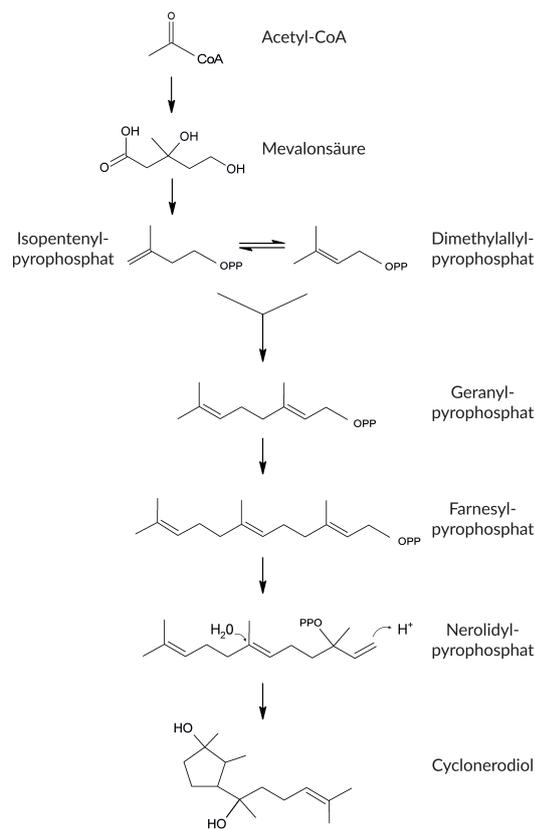


Abbildung 56: Biosynthese des Sesquiterpens Cyclonerodiol über den Mevalonatweg.

Fermentationsdauer um 4-5 Tage eine zusätzliche Erhöhung der Ausbeute (3-fach), die, unabhängig vom gewählten Medium, immer auftrat. Der sprunghafte Anstieg in der Cyclonerodiolsynthese erfolgte dabei, nachdem die freie Glukose im Medium verbraucht war. Das stagnierende Mycelwachstum zu diesem Zeitpunkt deutete darauf hin, dass die Kapazitätsgrenzen bezüglich der Nährstoffe bzw. des zur Verfügung stehenden Raumes erreicht waren. Dass die Biosynthese von Sekundärmetaboliten erst nach Beendigung der aktiven Wachstumsphase einsetzt, ist dabei ein typisches Merkmal bei Pilzen ¹⁶⁸. Von Evans *et al.* wurde zudem beschrieben, dass Cyclonerodiol von Pilz-Kulturen in einem degenerierenden Stadium auf Kosten anderer Sesquiterpene gebildet wird ¹⁶⁹. Welche Funktion der

Metabolit dabei im Pilz übernimmt und ob der Pilz durch die Biosynthese von Cyclonerodiol einen Vorteil erlangt, ist bisher nicht bekannt. Die Abnahme der Cyclonerodiol-Konzentration, die hier am 8. Tag der Fermentation auftrat, ist laut Rahman *et al.* auf die Aktivität einer Oxidase zurückzuführen, die das Sesquiterpen zu einem instabilen Epoxid umwandelt¹⁷⁰, weswegen eine weitere Verlängerung der Fermentationsdauer zu keiner zusätzlichen Produktsteigerung geführt hätte.

Eine chemische Synthese für Cyclonerodiol wurde 1979 von Matsuki *et al.* publiziert, bei der in einem biomimetischen Verfahren die Cyclohydratisierung von Nerolidol durch Hg^{2+} induziert wurde¹⁷¹. Bei der biologischen Testung und humanen Therapie erweisen sich jedoch bereits geringste Spuren von Quecksilber aufgrund ihrer toxischen Wirkung als problematisch, weswegen 2014 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Opatz (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) eine neuartige Synthese ausgehend von Linalool entwickelt wurde. Bei dieser chemischen Synthese entstand allerdings zusätzlich zu Cyclonerodiol (Produktausbeute 72%) als Nebenprodukt noch ein Diastereomer, dessen Abtrennung zu hohen Verlusten an Cyclonerodiol führte, weswegen die endgültige Ausbeute von Cyclonerodiol bei lediglich etwa 5% lag, verglichen mit der theoretisch maximal möglichen Produktmenge¹⁷². Die Produktion im Organismus hat hingegen den Vorteil, dass Cyclonerodiol enantiomerenrein und ohne Diastereomer-Nebenprodukt gebildet wird. Zudem könnte die Produktion eventuell noch durch Überexpression Schritt-limitierender Enzyme der Biosynthese, wie z.B. der HMG-CoA-Reduktase, die die Umsetzung von β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym A zu Mevalonsäure katalysiert¹⁷³, oder durch die Zugabe chemischer Vorstufen in das Medium gesteigert werden¹⁷⁴, weswegen die Fermentation von *Fusarium* sp. ein attraktives Verfahren zur Gewinnung von Cyclonerodiol bleibt.

3.2.1 Biologische Charakterisierung von Cyclonerodiol

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cyclonerodiol nicht nur die IL-4 abhängige Signaltransduktion, sondern auch die IL-13 abhängige Signaltransduktion in bronchialen Epithelzellen und die IL-4-abhängige Signaltransduktion in T-Lymphozyten inhibiert. IL-4 und IL-13 zählen zu den Schlüsselkomponenten in der Pathogenese von Asthma und werden als zentrale Koordinatoren der asthmatischen Inflammation hauptsächlich von T_H2 -Zellen, aber auch von Mastzellen und Eosinophilen exprimiert. Die Zytokine sind mit der T_H2 -Differenzierung naiver T-Zellen, der Produktion von IgE durch B-Lymphozyten und der Akkumulation von eosinophilen Granulozyten in der Lunge assoziiert¹⁷⁵. IL-13 erhöht zudem die kontraktile Wirkung von Acetylcholin auf die glatte Muskulatur in den Atemwegen, wodurch die bronchiale Hyperreagibilität verstärkt wird, und erhöht die Mucusproduktion in Epithelzellen. Desweiteren tragen die beiden Interleukine zu den irreversiblen Veränderungen des airway remodelings bei, indem sie Epithelzellen zur Bildung von TGF- β anregen, das seinerseits Fibroblasten aktiviert und so die vermehrte Produktion extrazellulärer Matrixproteine induziert¹⁷⁶ (s. Abb. 57).

In vitro-Untersuchungen in Mäusen bestätigten die essentielle Rolle von STAT6. So differenzierten naive T-Lymphozyten in STAT6^{-/-}-defizienten Mäuse nicht zu T_H2 -Zellen

und exprimierten nach IL-4 Stimulus keine IL-4 abhängigen Gene wie MHC II (major histocompatibility complex) Moleküle, die zur allergischen Immunantwort benötigt werden. Auch die Produktion von IgE durch B-Lymphozyten konnte nicht mehr detektiert werden und die STAT6-defizienten Mutanten entwickelten nach Allergenprovokation keine bronchiale Hyperreaktivität¹⁷⁷. Durch die pulmonäre Überexpression von IL-13 in Mäusen konnten zudem viele Symptome von Asthma ausgelöst werden, zu denen bronchiale Eosinophilie (Ansammlung von Eosinophilen), erhöhte Mucussekretion, bronchiale Hyperreaktivität und airway remodeling zählen¹⁷⁸. Für die Gene, die für IL-4, IL-13 und assoziierte Signalmoleküle (STAT6, IL-13R α 1) codieren, konnten zudem Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (single-nucleotid-polymorphisms, SNPs) identifiziert werden, die zu einer Überaktivierung des IL-4/-13 Signalweges führen und mit bronchialem Asthma sowie Atopie assoziiert sind¹⁷⁹. Durch Verwendung von Antikörpern gegen IL-4 (Pitrakinra) und IL-13 (Anrukinzumab) konnte zudem in Primaten die Antigen-induzierte pulmonäre Inflammation sowie die Akkumulation von Immunzellen in der Lunge reduziert werden¹³⁶. Wegen ihrer Beteiligung an sowohl der Entstehung als auch der Aufrechterhaltung der Atemwegsinfammation bei Asthma sowie ihre pleiotropen Effekte sind IL-4 und IL-13 ein attraktives therapeutisches Ziel für die Wirkstoffentwicklung¹⁸⁰.

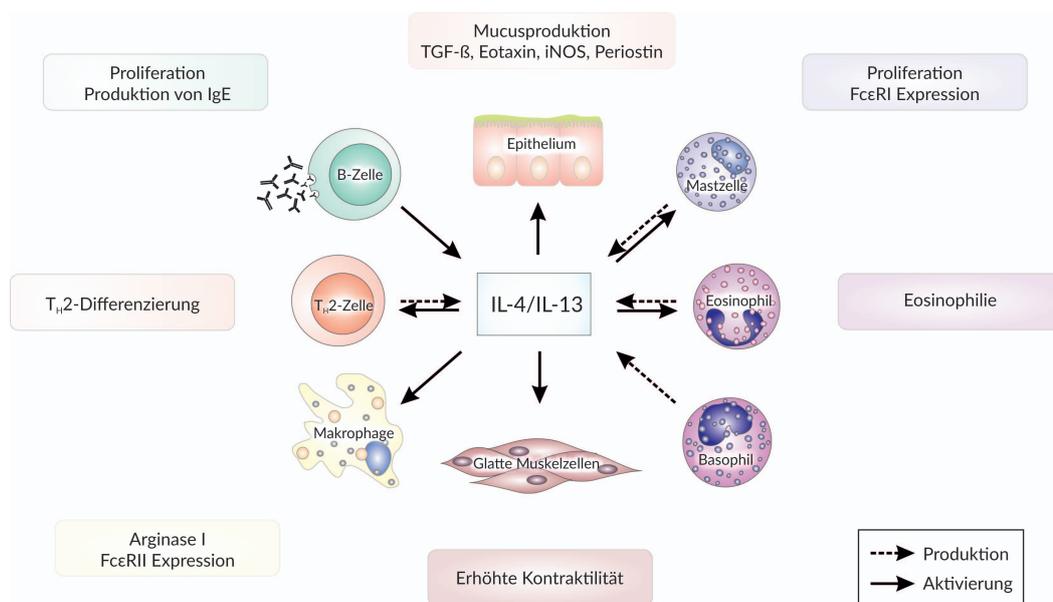


Abbildung 57: Produktion und Wirkung von IL-4 und IL-13.

Die beiden Zytokine werden in den Atemwegen von T_H2-Zellen, Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen gebildet. Zu ihren pleiotropen Effekten gehören die Induktion der T_H2-Differenzierung, des Immunglobulin E (IgE)-Klassenwechsels bei B-Lymphozyten, erhöhte Expression des IgE-Rezeptors (FcεRI/II) in verschiedenen inflammatorischen Zellen, erhöhte Kontraktilität von glatten Muskelzellen, verstärkte Mucusproduktion sowie erhöhte Expression von TGF-β (transforming growth factor β), Eotaxin, iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) und Periostin in Epithelzellen. IL-4 und -13 fördern so die Atemwegsinfammation, bronchiale Hyperreagibilität, airway remodeling und die Schädigung des Epitheliums.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cyclonerodiol spezifisch die durch IL-4 (IC_{50} 6,7 μ M) und IL-13 (IC_{50} 6,6 μ M) induzierte Reporterexpression in der bronchialen Epithelzelllinie A549 inhibiert, ohne dabei andere untersuchte Signalwege bzw. die Promoteraktivität entzündungsrelevanter Gene zu beeinflussen. Auf transkriptioneller Ebene hemmte Cyclonerodiol konzentrationsabhängig die mRNA-Expression IL-4 abhängiger Gene. So wurde die mRNA-Expression der Chemokine C-C motif ligand 2 (*ccl-2*), das Immunzellen wie Monozyten, T-Lymphozyten und dendritische Zellen rekrutiert, Eotaxin-1 (*ccl-11*), das den Zustrom von Eosinophilen erhöht, und C-X-C motif ligand 3 (*cxcl-3*), das spezifisch Monozyten anlockt, gesenkt^{181,182}. Desweiteren wurde die Expression des intrazellulären Adhäsionsmoleküls 1 (*icam-1*) auf transkriptioneller Ebene inhibiert, das die Adhäsion von inflammatorischen Zellen an residente Zellen vermittelt und so das interzelluläre Einwandern von Immunzellen in das Gewebe ermöglicht¹⁸³. Auch die transkriptionelle Expression der Matrixmetalloprotease 2 (*mmp-2*) und des Transforming growth factors β (*tgf-\beta*), die im Rahmen des airway remodelings für die strukturelle Degradierung der extrazellulären Matrix (*mmp-2*) bzw. für die Induktion fibrotischer Gene (*tgf-\beta*) verantwortlich sind, wurden durch den Naturstoff gesenkt³. Desweiteren reduzierte Cyclonerodiol die mRNA-Expression von Periostin, bei dem es sich um ein sekretiertes Zelladhäsionsprotein handelt, das Zelltypabhängig u.a. die Kollagenproduktion und Angiogenese induziert. Periostin erhöht zudem die TGF- β Expression und verstärkt somit die epithelial-mesenchymale Transition (EMT)¹⁸⁴. Cyclonerodiol inhibierte zudem die mRNA-Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Diese oxidiert L-Arginin zu L-Citrullin, wobei Stickstoffmonoxid (NO) frei wird, welches als Signalmolekül dient. Wegen der ungeraden Anzahl an Elektronen ist Stickstoffmonoxid eine radikalische Verbindung und weist eine hohe Reaktivität auf. Reagiert NO mit einem Superoxid-Anion (O_2^-), bildet sich ein Peroxynitrit-Anion ($ONOO^-$), das die Oxidation von Proteinen und Nucleinsäuren sowie Lipidperoxidation verursachen kann, wobei letzteres durch die Schädigung der Zellmembran zur Zerstörung der epithelialen Barriere beiträgt¹⁸⁵. Auch auf Proteinebene konnte der inhibitorische Effekt von Cyclonerodiol auf Eotaxin-1, CCL-2, CXCL1 und ICAM-1 nachgewiesen werden, aber auch für weitere Zyto- und Chemokine. Dazu zählen das auf T-Zellen, Eosinophile und Basophile chemotaktisch wirkende CCL-5¹⁸², aber auch die Chemokine Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), die die Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen sowie deren Rekrutierung bewirken¹⁸⁶. Zusätzlich reduzierte Cyclonerodiol die Sekretion von IL-1 β sowie IL-8, die chemotaktisch auf Neutrophile wirken¹⁸¹.

Da vor allem Interleukin-4 in der frühen Entstehungsphase von Asthma bei der Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H2-Zellen eine wichtige Rolle spielt, wurde die Wirkung von Cyclonerodiol zudem in der humanen T-Zelllinie Jurkat untersucht. Hierzu wurde zunächst verifiziert, ob der IL-4 Rezeptor Signalweg in Jurkatzellen funktional ist, da sich hierzu in der Literatur widersprüchliche Angaben finden^{138,139}. Zunächst wurde die Expression des Transkriptionsfaktors STAT6 sowie dessen Aktivierung nach IL-4 Behandlung analysiert. Dabei konnte weder ein Reportergenkonstrukt unter der Kontrolle der STAT6-

Konsensussequenz durch IL-4 induziert werden noch konnte STAT6 in der Zelllinie per Western Immunoblotting nachgewiesen werden. Bei Expression von STAT6 durch einen Expressionsvektor ließ sich jedoch die Expression des Reportergens durch IL-4 stimulieren, was bewies, dass, bis auf STAT6, alle zur Vermittlung des IL-4 Signals notwendigen Signalmoleküle wie z.B. Rezeptoruntereinheiten in der T-Zelllinie exprimiert werden, was sich mit den Ergebnissen Georas *et al.* deckt¹³⁸. Kim *et al.* hingegen konnten in Jurkatzellen die Expression eines STAT6-abhängigen Reportergens durch IL-4 Stimulation um das 80-fache steigern¹³⁹. Eine Erklärung hierfür liegt womöglich darin, dass Jurkat-Zelllinien verschiedener Labore nachweislich stark in der Expression zellulärer Markergene variieren können, was auch unterschiedliches zelluläres Verhalten hervorrufen kann¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

Auch in der humanen T-Zelllinie Jurkat hemmte Cyclonerodiol den IL-4 abhängigen Signalweg (IC_{50} 10,1 μ M), wobei IL-13 in der T-Zelllinie keine Aktivierung des STAT6-abhängigen Signalweges auslöste. Dies stimmt mit den Untersuchungen von Konstantinidis *et al.* überein, die in der Zelllinie keine IL-13 Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ nachweisen konnten, die zur Bildung des IL-13 Rezeptors benötigt wird¹⁹⁰. Die Spezifität von Cyclonerodiol für den STAT6-vermittelten Signalweg konnte auch in der T-Zelllinie nochmals bestätigt werden, da die NFAT- und AP-1-abhängigen Signaltransduktionen, die in T-Lymphozyten die Expression proinflammatorischer Gene regulieren¹⁹¹, nicht inhibiert wurden. Zusammenfassend konnte für Cyclonerodiol gezeigt werden, dass der Naturstoff nicht nur Proteine reguliert, die für die Rekrutierung von Immunzellen in die Lunge verantwortlich sind, sondern auch die durch IL-13 induzierte Expression von TGF- β , MMP-2 und Periostin inhibiert, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung der subepithelialen Fibrose und der Zerstörung des Epitheliums spielen und so auch zum airway remodeling beitragen. Cyclonerodiol könnte so nicht nur die Atemwegsinflammation verringern, sondern auch die strukturellen Veränderungen in den Atemwegen und somit einen positiven Langzeiteffekt auf die Atemwege ausüben.

Während die alleinige Inhibierung von IL-4 durch den humanisierten anti-IL-4-Antikörper Pascolizumab in klinischen Studien trotz guter Verträglichkeit zu keiner Verbesserung der asthmatischen Symptome führte, scheint die kombinierte Inhibierung des IL-4 sowie IL-13 abhängigen Signalweges wesentlich effektiver zu sein, was bereits mit Dupilumab, einem gegen die α -Untereinheit des IL-4 Rezeptors gerichteten Antikörper, in klinischen Studien bewiesen werden konnte¹⁹². Da die IL-4R α Untereinheit der Signalweiterleitung von sowohl IL-4 als auch IL-13 dient, inhibiert der Antikörper, ebenso wie Cyclonerodiol, die Signale beider Zytokine. In einer klinischen Studie (Phase II) wurde der Antikörper an Patienten mit mittelgradig bis schwergradig persistierenden Asthma getestet, das durch erhöhte Eosinophil-Konzentrationen gekennzeichnet war, und reduzierte das Risiko für Asthma-Exazerbationen um 87% nach Absetzen von inhalierten Kortikosteroiden und Langzeit-Beta-Agonisten¹⁹³. Aufgrund der hohen Produktionskosten von Biologika wird deren Einsatz jedoch streng limitiert, während Cyclonerodiol als niedermolekulare Verbindung kostengünstiger produziert werden könnte.

3.2.2 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Cyclonerodiol

Um den Wirkort sowie Wirkmechanismus von Cyclonerodiol einzugrenzen, wurden einzelne Signaltransduktionsschritte des STAT6 vermittelten Signalweges genauer untersucht. Der Transkriptionsfaktor STAT6 wird durch die extrazellulären Zytokine IL-4 und IL-13 aktiviert, die an unterschiedliche Rezeptoruntereinheiten in der Zellmembran binden (s. Abb. 58). IL-4 kann dabei mit zwei unterschiedlichen Rezeptorkomplexen interagieren, nämlich dem Typ I und II IL-4 Rezeptor (IL-4R), während die Bindung von IL-13 auf den Typ II IL-4 Rezeptor beschränkt ist. IL-4 bindet mit hoher Affinität an die IL-4 Rezeptor α Kette (IL4R α), die daraufhin in hämatopoetischen Zellen mit der γ -Kette (γ c) dimerisiert und so den Typ I Rezeptorkomplex bildet. In nicht-hämatopoetischen Zellen interagiert die IL4R α Untereinheit mit der IL-13 Rezeptor α (IL13R α) Kette und formt darauf den Typ II Rezeptorkomplex¹³⁶. Das Zytokin IL-13 bindet hingegen an die IL13R α Kette des Typ II Rezeptorkomplexes. Durch die Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten werden Januskinasen (JAKs), die mit dem zyttoplasmatischen Teil des Rezeptors assoziiert sind, in räumliche Nähe gerückt, woraufhin sich die Januskinasen gegenseitig an konservierten Tyrosinresten phosphorylieren. Die so aktivierten JAKs phosphorylieren zudem intrazelluläre Tyrosinreste des Rezeptors (Y575, Y603, Y631), mit denen daraufhin STAT6-Moleküle über ihre Src Homologie 2 (SH2-) Domäne assoziieren. Die an den Rezeptor gebundenen STAT-Proteine werden durch die JAKs ebenfalls phosphoryliert (Y641) und dissoziieren daraufhin vom Rezeptor. Nach Dimerisierung der phosphorylierten STAT6-Moleküle translozieren diese in den Nukleus und regulieren dort zelltypabhängig sehr unterschiedliche Genexpressionsprofile. Durch die Expression von Tyrosinphosphatasen sowie negativen Regulatoren der PIAS-(protein inhibitor of activated STATs) und SOCS-(suppressors of the cytokine signaling) Familie werden JAK-STAT-Signalwege reguliert. PIAS-Proteine binden dabei an die SH2-Domäne der STATs und verhindern somit deren Anlagerung an aktivierte Zytokinrezeptoren sowie die Dimerisierung bereits phosphorylierter STAT-Proteine. Die SOCS-Proteine hingegen binden über ihre SH2-Domäne direkt an die Zytokinrezeptoren und kompetieren so mit den STATs um die Rezeptorbindung. Zudem hemmen sie aktivierte Januskinasen und markieren diese für den proteasomalen Abbau durch das 26S-Proteasom¹⁹⁴.

JAK-STAT-Signalwege können an essentiellen Signaltransduktionsschritten inhibiert werden wie z.B. der initialen Phosphorylierung durch Januskinasen, der Dimerisierung der STAT-Moleküle sowie der Transkription der Zielgene, was in jedem der Fälle zum Abbruch der Signaltransduktion führt. Inhibitoren können dabei entweder direkt mit den STAT-Transkriptionsfaktoren interagieren oder die an der Signaltransduktion beteiligten Proteine, wie z.B. Kinasen inhibieren¹⁹⁵. Abbildung 58 zeigt die einzelnen Signaltransduktionsschritte des STAT6 vermittelten Signalweges und bisher beschriebene Inhibitoren mit ihrem Wirkort.

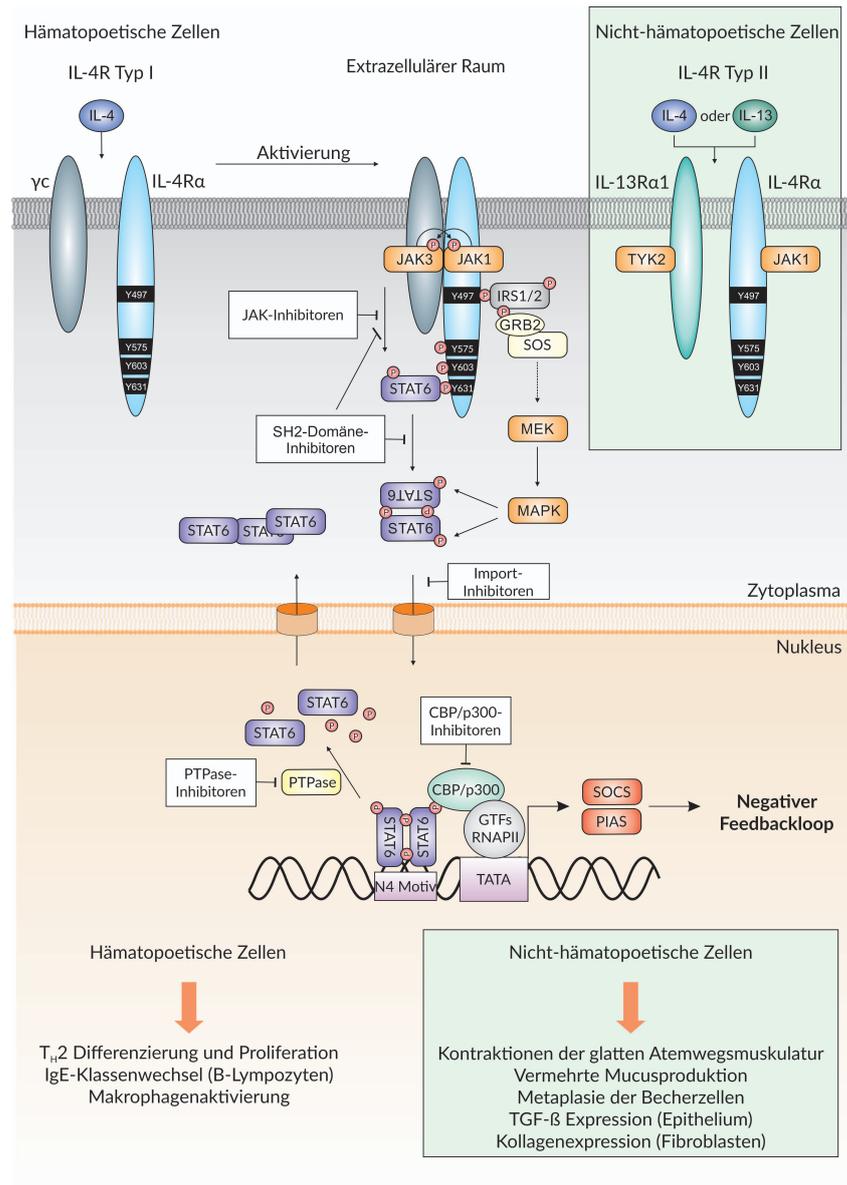


Abbildung 58: Der durch IL-4 und IL-13 induzierte Signalweg.

Nach Bindung von IL-4 bzw. IL-13 an die entsprechenden Rezeptoruntereinheiten heterodimerisiert der Rezeptor, was intrazellulär Rezeptor-assoziierte Janus-Kinasen (JAKs) aktiviert. Diese phosphorylieren zunächst Tyrosinreste des Rezeptors, die als Bindestelle für Signalmoleküle (STAT6, IRS1/2) dienen, die daraufhin ebenfalls phosphoryliert werden. Nach Dimerisierung der phosphorylierten STAT6-Proteine translozieren diese in den Nucleus und induzieren dort die Expression IL-4 bzw. IL-13 abhängiger Gene. Die Phosphorylierung von IRS1/2 aktiviert die MAP-Kaskade, wobei die MAP-Kinasen STAT6 zusätzlich phosphorylieren können, was die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors erhöht. GRB: Growth factor receptor bound; GTFs: General transcription factors; IgE: Immunglobulin E; IL: Interleukin; IRS: Insulin-Rezeptor-Substrat; JAK: Janus assoziierte Kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MEK: Mitogen/Extracellular signal-regulated kinase; PIAS: Protein inhibitor of activated STAT; PTPase: Protein-Tyrosin-Phosphatase; RNAPII: RNA-Polymerase II; SOCS: Suppressor of cytokine signalling; SOS: Son of sevenless homolog; STAT: Signal transducer and activator of transcription; TGF- β Expression (Epithelium); Kollagenexpression (Fibroblasten); T_H2: T-Helferzelle Typ II; TYK: Tyrosinkinase.

AKTIVIERUNG VON STAT6 UND NUKLEO-ZYTOPLASMATISCHER PROTEINTRANSPORT

Zu den prominentesten STAT-Inhibitoren zählen Tyrosinkinase-Inhibitoren, die die Aktivität einer oder mehrerer Enzyme der Januskinase-Familie inhibieren und so in JAK-STAT Signalwege eingreifen¹⁹⁵. Beispiele hierfür sind das tetrazyklische Pyridon 6, das ATP-kompetitiv die Januskinasen JAK1, JAK2 und JAK3 reversibel inhibiert¹⁹⁶, sowie das Pyrrolopyrimidin Tofacitinib, das hauptsächlich JAK1 und JAK3 inhibiert und in den USA sowie Russland zur Behandlung rheumatischer Arthritis zugelassen ist¹⁹⁷. Per Western Blot Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass Cyclonerodiol bis zu einer Konzentration von 50 µM die IL-4 induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von STAT6 nicht beeinflusst, weswegen eine Hemmung der Januskinasen durch den Naturstoff ausgeschlossen wurde.

Nach der Phosphorylierung durch die Tyrosinkinasen dimerisieren die STAT-Proteine über ihre SH2-Domänen¹⁹⁸. Für den Kernimport ist dies essentiell, da mit der Dimerisierung eine Konformationsänderung assoziiert ist, die das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) für den Kernimport der STAT-Transkriptionsfaktoren freilegt¹⁹⁹. Der Transport in sowie aus dem Nukleus erfolgt dabei über Karyopherine, die an Signalsequenzen im zu transportierenden Protein binden, die für den Import (nukleäres Lokalisationssignal, NLS) oder den Export (nukleäres Exportsignal, NES) spezifisch sind. Nach Dephosphorylierung im Nukleus durch Tyrosin-spezifische Proteinphosphatasen (PTPasen) werden die dephosphorylierten STAT-Proteine wieder aus dem Kern transportiert. Die Halbwertszeit von phosphoryliertem STAT6 beträgt dabei lediglich etwa 5 Minuten, allerdings wird die maximale Aktivierung IL-4 responsibler Gene erst durch eine dauerhafte STAT6-Aktivierung über mehrere Stunden hinweg erreicht. Andrews *et al.* fanden in diesem Zusammenhang durch den Einsatz eines nukleären Export-Inhibitors heraus, dass mehrere Zyklen aus STAT6-Aktivierung, Import und Export für die maximale Induktion der STAT6-abhängigen Genexpression benötigt werden¹⁴⁴, weswegen die Lokalisation des Transkriptionsfaktors STAT6 anhand von zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakten verfolgt wurde. Da Cyclonerodiol allerdings keine Akkumulation von STAT6 im Zytoplasma bewirkte, wie es bei einem Import-Inhibitor zu erwarten wäre, noch eine dauerhafte Akkumulation von STAT6 im Nukleus, wie es bei einer Hemmung von nukleären PTPasen bzw. durch einen Export-Inhibitor ausgelöst werden würde, konnte eine Inhibierung des nukleo-zytoplasmatischen Proteintransportes ebenfalls ausgeschlossen werden.

DNA-BINDUNG UND POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN

Die transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine benötigt die physische Interaktion ihrer DNA-Bindedomäne mit der entsprechenden Konsensussequenz in der Promoterregion responsibler Gene. Als Inhibitor dieser STAT-DNA-Interaktion wurde bereits das Tetrahydroisobenzofuranon-Derivat Galiellalacton beschrieben, wobei die Substanz selektiv die durch IL-6 induzierte Bindung von STAT3 an die DNA hemmte, ohne die STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung zu beeinflussen²⁰⁰. Für Verbindungen aus der Familie der Platin (IV)-Komponenten konnte zudem die direkte Interaktion der Substanzen mit der DNA-Bindedomäne von STAT3 sowie die daraus resultierende verringerte DNA-Bindeaktivität

nachgewiesen werden²⁰¹. Die STAT-vermittelte Transkription wird zusätzlich zur Tyrosin-Phosphorylierung durch weitere posttranslationale chemische Modifikationen der STATs beeinflusst. So kann die transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine durch Arginin-Methylierung der N-terminalen Domäne noch verstärkt werden, da so die Assoziation der STATs mit PIAS-Proteinen blockiert wird. PIAS-Proteine sind dabei Negativregulatoren STAT-vermittelter Signalwege und reduzieren durch ihre Bindung an aktivierte STAT-Dimere deren DNA-Bindefähigkeit¹⁴⁷. Durch Serin-Phosphorylierungen der Transaktivierungsdomäne (TAD) der STAT-Proteine wird deren transkriptionelle Aktivität zudem noch zusätzlich erhöht. Zu den dafür verantwortlichen Serin-Kinasen zählen zelltypabhängig MAP-Kinasen (ERKs, JNK und p38), aber auch MAP-unabhängige Kinasen wie die Proteinkinase C (PKC) und mTOR, wodurch STAT-abhängige Signalwege auch durch andere Signalwege beeinflusst werden können²⁰². Die erhöhte transkriptionelle Aktivität der Serin-phosphorylierten STATs beruht dabei auf der erhöhten Bindungsaffinität von Coaktivatoren für die Serin-phosphorylierten TADs¹⁴⁷. Eine weitere bedeutende posttranslationale Modifikation stellt die Acetylierung dar. STAT6 kann dabei an mehreren Lysinresten (K129, K619, K621) durch Histonacetyltransferasen (HATs) acetyliert werden, wodurch die DNA-Bindeaktivität sowie transkriptionelle Aktivität von STAT6 erhöht wird²⁰³. STAT6 interagiert dabei vor allem mit der Histonacetyltransferase CBP/p300, die auch als Verbindung zwischen STAT6 und der RNA-Polymerase II dient²⁰⁴.

Anhand von Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die Serin-Phosphorylierung von STAT6 durch Cyclonerodiol konzentrationsabhängig gehemmt wird. Da sich die für die Serin-Phosphorylierung von STAT6 verantwortlichen Kinasen zelltypabhängig voneinander unterscheiden und bisher nur in Keratinozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten genauer untersucht wurden, sind zunächst die für die Serin-Phosphorylierung notwendigen Kinasen in der epithelialen Zelllinie A549 ermittelt worden. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren konnten die MAP-Kinasen p38 sowie ERK1/2 als verantwortliche Kinasen identifiziert werden, wobei durch Cyclonerodiol keine Inhibition der MAP-Kinasen-Aktivität festgestellt werden konnte. Bei der Untersuchung der Interaktion von STAT6 mit den beiden MAP-Kinasen per Co-IP zeigte sich jedoch, dass der Naturstoff die Bindung der Kinasen an STAT6 inhibiert. Desweiteren verringerte der Naturstoff die Interaktion von STAT6 mit dem transkriptionellen Coaktivator CBP/p300 und als Folge dessen auch die Acetylierung von STAT6, während die DNA-Bindung von STAT6 unbeeinflusst blieb. Dies lässt den Schluss zu, dass der Wirkmechanismus von Cyclonerodiol auf einer Hemmung der Serin-Phosphorylierung von STAT6 und der Interaktion mit dem Coaktivator CBP/p300 beruht, wodurch vor allem dessen transkriptionelle Aktivität inhibiert wird. Einen ähnlichen inhibitorischen Effekt auf die STAT6-abhängige Genexpression konnten Pesu *et al.* unter Verwendung des Serin/Threonin-Kinase Inhibitors H7 beobachten, der die Serin-Phosphorylierung der TAD von STAT6 inhibierte, ohne dabei die Tyrosin-Phosphorylierung oder die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors zu beeinflussen, wodurch die IL-4 abhängige Genexpression dennoch komplett gehemmt wurde²⁰⁵. Die hier erbrachten Ergebnisse zeigen allerdings, dass die gehemmte Serin-Phosphorylierung in diesem Fall kein Produkt einer

Kinase-Inhibierung ist, sondern vielmehr auf einer Inhibierung der Interaktion von STAT6 mit den verantwortlichen Kinasen beruht. Da die TAD der Bereich im STAT-Protein ist, der innerhalb der STAT-Familie am meisten variiert ²⁰⁶, würde eine Anlagerung von Cyclonerodiol in dieser Domäne die Spezifität des Naturstoffes für STAT6 erklären (s. Abb. 59). So konnte für das Zelltod-regulierende Protein GRIM-19 gezeigt werden, dass es spezifisch mit der TAD-Region von STAT3 interagiert und so die STAT3-abhängige Transkription inhibiert, ohne die durch andere STAT-Proteine vermittelte Transkription zu beeinflussen ²⁰⁷. Ob Cyclonerodiol tatsächlich mit der TAD-Region interagiert, muss jedoch erst in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, wobei mit Hilfe von Deletionsmutanten und Punktmutationen des STAT6-Proteins der für die Interaktion mit Cyclonerodiol notwendige Bereich genauer analysiert werden könnte.

Dass die Serin-Phosphorylierung der TAD immense Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität der STAT-Proteine haben kann, konnte bereits auch für STAT1

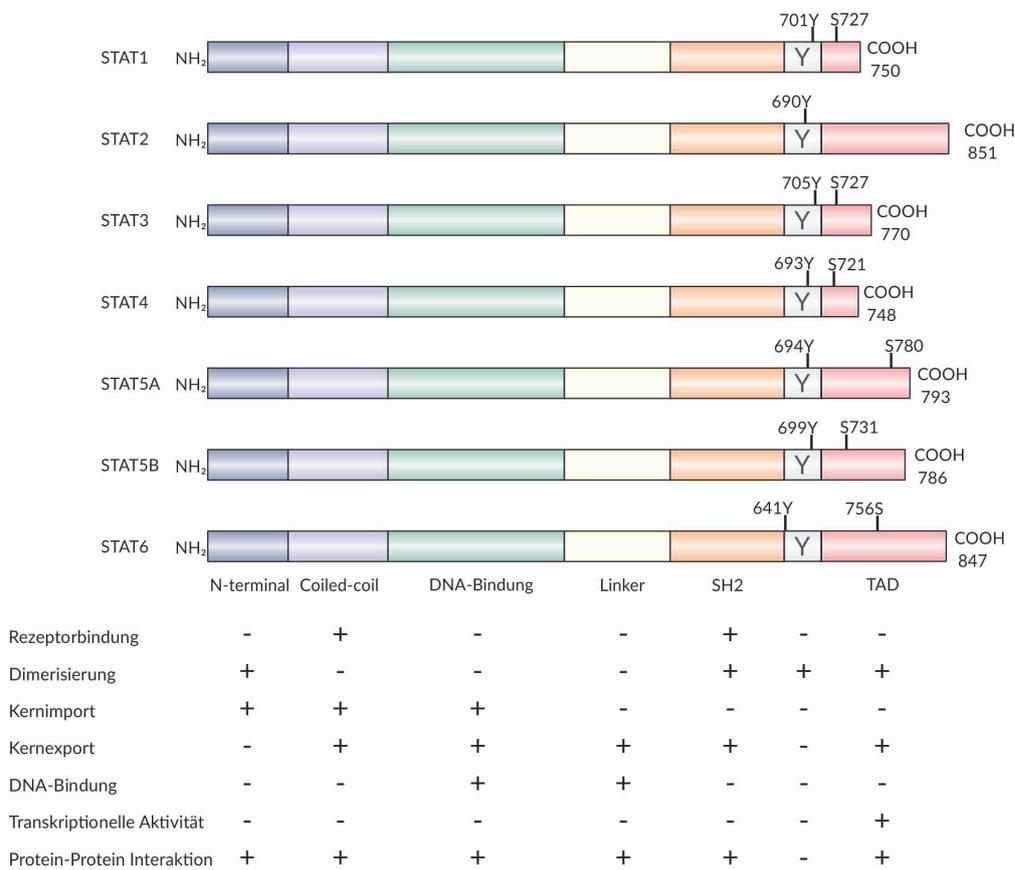


Abbildung 59: Lineare Darstellung der Strukturdomänen sowie der mit ihnen assoziierten Funktionen für die sieben Mitglieder der STAT-Proteinfamilie.

Die Aktivierung der STATs erfolgt über Tyrosin-Phosphorylierung im Phosphotyrosylsegment (Y) durch Rezeptor-assoziierte Januskinasen, wonach zwei phosphorylierte Monomere über ihre SH2-Domänen dimerisieren. Durch Serin-Phosphorylierung der Transaktivierungsdomäne (TAD) wird die transkriptionelle Aktivität noch verstärkt, wobei der Grad der stimulatorischen Aktivität zwischen den einzelnen STAT-Proteinen stark variiert.

und STAT3 nachgewiesen werden. Wen *et al.* erzeugten hierfür eine Serinmutation in der TAD von STAT1 und STAT3, wodurch die durch IFN- γ induzierte transkriptionelle Aktivität von STAT1 um 80% und die durch IFN- α induzierte transkriptionelle Aktivität von STAT3 um 50% gesenkt wurde²⁰⁸. Da die TAD von STAT6 im Vergleich zu anderen STAT-Proteinen jedoch eine mind. 10-fach höhere stimulatorische Aktivität aufweist¹⁴⁷, ist diese Domäne im Fall von STAT6 ein vielversprechendes Ziel für die Wirkstoffforschung. Dabei sind grundsätzlich sind alle Domänen, die bei Transkriptionsfaktoren für die DNA-Bindung oder zur Interaktion mit anderen Proteinen im Nukleus (Transkriptionsfaktoren, Coaktivatoren, Transkriptionsmaschinerie) notwendig sind, von großem Interesse, da über diese Domänen sehr spezifisch die transkriptionelle Aktivität eines einzelnen Transkriptionsfaktors beeinflusst werden kann. Ein Beispiel hierfür ist der Naturstoff Chetomin, bei dem es sich um ein Epipolythiodiketopiperazin handelt und für den gezeigt werden konnte, dass er spezifisch die Interaktion der C-terminalen TAD des Hypoxie-induzierten Faktors 1 α (HIF-1 α) mit CBP/p300 und hierdurch die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α inhibiert. Die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren hingegen, die ebenfalls mit CBP/p300 interagieren, blieb durch den Naturstoff unbeeinflusst²⁰⁹. Im Gegensatz dazu werden durch z.B. Januskinase-Inhibitoren direkt mehrere Signalwege inhibiert, was häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen führt²¹⁰. Desweiteren können sie nur die transkriptionelle Aktivität inhibieren, die direkt mit der Tyrosin-Phosphorylierung in Verbindung steht. Daniel *et al.* konnten jedoch durch die Substitution zweier Aminosäurereste (V547 und Y548) in der SH2 Domäne von STAT6 eine konstitutiv aktive Mutante erzeugen, die die IL-4 abhängige Genexpression unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert²¹¹. Dies spricht dafür, dass bereits kleine Veränderungen wie Punktmutationen im STAT6 Gen die Hyperaktivierung des Proteins und dadurch die konstitutive Expression STAT6-abhängiger Gene ohne Beteiligung der entsprechenden Januskinasen verursachen können. Aus diesem Grund stellt die direkte Inhibierung von Mechanismen, die eng mit der Transkription assoziiert sind und gleichzeitig hoch spezifisch sind für ein einzelnes Protein, einen vielversprechenden Ansatz dar, um krankheitsspezifische Signalwege gezielt und nebenwirkungsarm zu beeinflussen.

3.3 Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf EMT

3.3.1 Induktion von EMT

Bei Asthmatikern treten im Laufe der Krankheit strukturelle Veränderungen in den Atemwegen (airway remodeling) auf, die zu einer irreversiblen Verringerung der Atemwegsfunktion führen. Eine besondere Rolle übernimmt dabei die epithelial-mesenchymale Transition, bei der durch eine zelluläre Reprogrammierung die Redifferenzierung epithelialer Zellen zu mesenchymalen Zellen (Fibroblasten) induziert wird¹¹¹. Während durch die Auflösung des epithelialen Zellverbundes in den Bronchien die Barriere gegenüber Schadstoffen drastisch gemindert wird, fördern die entstandenen Fibroblasten fibrotische Veränderungen durch

den stetigen Auf- und Abbau extrazellulärer Matrix. Somit trägt EMT auf zweierlei Weise zu den strukturellen Veränderungen sowie der stetigen Abnahme der Lungenfunktion bei ²¹². Obwohl man bisher davon ausging, dass airway remodeling lediglich als Folge der chronischen Wundheilung auftrat, sprechen neueste Erkenntnisse für eine direkte Potenzierung der strukturellen Veränderungen durch proinflammatorische Zytokine ²¹³. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, die im Zusammenhang mit Asthma in der Lunge auftreten und mit mittelgradig bis schwerem Asthma assoziiert sind, auf die epithelial-mesenchymale Transition untersucht. Hierzu zählen neben IL-4, das bei allergischem Asthma das dominante Zytokin darstellt, die Interleukine -17 und -22. Während erhöhte Konzentrationen von IL-17 vor allem mit Steroid-insensitivem, schwerem Asthma assoziiert sind ²¹⁴, konnte auch eine erhöhte Rezeptor-Expression des T_H17-spezifischen Zytokins IL-22 in Gewebeproben von Patienten mit schwerem Asthma nachgewiesen werden ²¹⁵.

Als Zellkulturmodell diente die epitheliale Bronchialzelllinie BEAS-2B, für die die Induktion von EMT durch TGF- β schon mehrmals beschrieben wurde ^{100,216,217}. Die alleinige Applikation der getesteten Interleukine bewirkte dabei keine EMT-typischen morphologischen Veränderungen der BEAS-2B Zellen, sondern erst bei kombinierter Applikation mit TGF- β traten sowohl morphologisch als auch auf mRNA- und Proteinebene EMT-typische Veränderungen auf: So verringerte sich die mRNA- und Protein-Menge von epithelialen Markern wie E-Cadherin und Zonula occludens-1 (ZO-1), während die Transkription der mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin verstärkt wurde. E-Cadherin ist dabei als transmembranes Glykoprotein Teil von Adherens junctions sowie Desmosomen und ist an der Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte beteiligt. ZO-1 interagiert als Teil der Tight junctions mit den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts und trägt so zur Zellstabilität bei. Die mesenchymalen Markerprotein N-Cadherin und Vimentin hingegen fördern beide die Zellmotilität, wobei N-Cadherin bei Zellkontakt die Migration der Zelle induziert, während das Intermediärfilament Vimentin ebenfalls die Zellmotilität erhöht ⁹³.

Die kombinierte Applikation von allen 3 Zytokinen zusammen mit TGF- β zeigte dabei sogar einen additiven Effekt, der die stärkste Induktion der mesenchymalen Marker sowie stärkste Verringerung der epithelialen Markerproteine verursachte. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei den 3 getesteten proinflammatorischen Zytokinen (IL-4, -17, -22) um keine Induktoren von EMT handelt, da sie, im Vergleich zu TGF- β , keine Veränderungen der epithelialen und mesenchymalen Genexpression verursachten. Allerdings waren die Zytokine in der Lage, die durch TGF- β induzierten Veränderungen der Genexpression noch zu verstärken und so die Progression von EMT zu beschleunigen.

3.3.2 Aktivierung EMT-assoziiierter Signalwege

Um festzustellen, über welche zellulären Mechanismen die getesteten Zytokine die epithelial-mesenchymale Transition beeinflussen, wurden zunächst die intrazellulären Signalwege untersucht, die an der Entstehung von EMT beteiligt sind (s. Abb. 60). TGF- β sowie andere Mitglieder der TGF- β Familie vermitteln ihre Wirkung einerseits durch Aktivierung der Smad-Transkriptionsfaktoren und andererseits über MAP-Kinase Signalwege. Bei letzteren

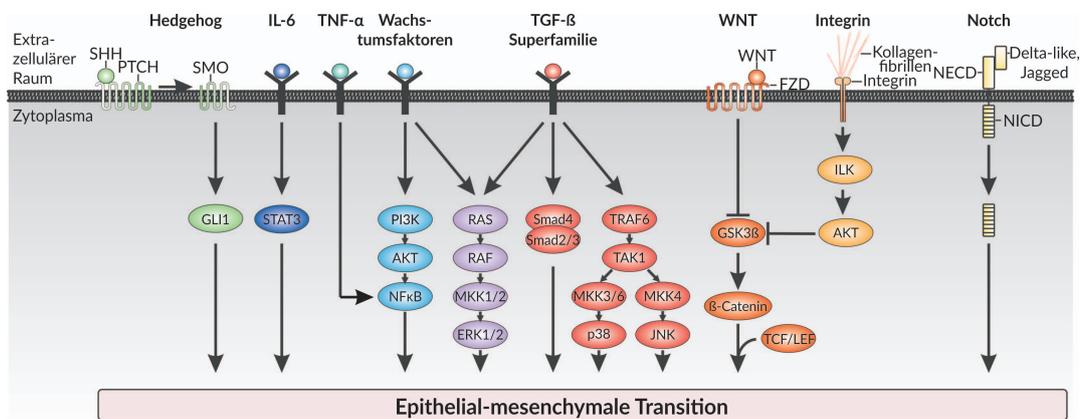


Abbildung 60: Intrazelluläre Signalwege, deren Aktivierung die epithelial-mesenchymale Transition induziert oder verstärkt.

Proteine der transforming growth factor- β (TGF- β) Superfamilie induzieren EMT sowohl über Smad-abhängige als auch Smad-unabhängige Signalwege. Bei letzteren werden sowohl durch Aktivierung des TNF Rezeptor-assoziierten Faktors 6 (TRAF6) über mehrere Zwischenschritte die MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 aktiviert als auch durch Aktivierung verschiedener Kinasen der Transkriptionsfaktor NF κ B. Die RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2 Kaskade kann dabei auch durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden, genauso wie die Aktivierung von NF κ B, die zusätzlich zu Mitgliedern der TGF- β Superfamilie und Wachstumsfaktoren auch durch das proinflammatorische Zytokin TNF- α induziert werden kann. Auch das proinflammatorische Zytokin IL-6 reguliert über den Transkriptionsfaktor STAT3 die Expression EMT-assoziiierter Gene. Im Hedgehog-Signalweg induziert die Bindung des sonic hedgehog (SHH) an den Patched Rezeptor (PTCH) die Aktivierung des Transmembranproteins Smoothened (SMO), das den Transkriptionsfaktor GLI reguliert. Durch Bindung von Proteinen der Wnt-Familie an den Frizzled (FZD)-Rezeptor wird die Aktivität der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) inhibiert, woraufhin β -Catenin nicht mehr proteosomal abgebaut wird und im Kern zusammen mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren die Gentransduktion induziert. Auch bei der Integrin-vermittelten Signaltransduktion wird die GSK3 β inhibiert, in diesem Fall durch die Proteinkinase B (AKT). Beim Notch-Signalweg binden Liganden wie Jagged und Delta-like an die extrazellulären Domänen des Notch-Proteins (Notch extracellular domain, NECD), was die Abspaltung des intrazellulären Proteinanteils (Notch intracellular domain, NICD) bewirkt, das in den Nukleus transloziert und dort die Genexpression modifiziert.

ERK: extracellular-signal regulated kinase; ILK: integrin-linked kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinase; LEF: lymphoid enhancer-binding factor; MKK: mitogen-activated protein kinase kinase; NF κ B: nuclear factor κ B; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; TAK: TGF- β activated kinase; TCF: T-cell factor; TNF- α : tumor necrosis factor α .

interagiert der TGF- β Rezeptor-Komplex (TGF β RI) mit dem TNF Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6), welcher die TGF- β aktivierte Kinase 1 (TAK1) aktiviert, welche wiederum über MAPK-Kaskaden die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK auslöst. Desweiteren werden durch den TGF- β Rezeptor-Komplex G-Proteine und Kinasen rekrutiert, die den Transkriptionsfaktor NF κ B und die MAP-Kinase ERK1/2 aktivieren. Obwohl TGF- β als der wichtigste Induktor von EMT angesehen wird, können viele weitere Signalwege die epithelial-mesenchymale Transition beeinflussen und so deren Progression Kontext-abhängig modifizieren. Dazu zählen verschiedene Wachstumsfaktoren wie der epidermal growth factor (EGF), die über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen MAP-Kinase Signalwege zusätzlich aktivieren können. Andere Signaltransduktionswege wie WNT, Notch und Hedgehog (HH) partizipieren ebenfalls in EMT. So fördert der WNT Signalweg durch die Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) die Stabilisierung von β -Catenin, das daraufhin in den Kern transloziert und dort zusammen mit den Transkriptionsfaktoren LEF (lymphoid enhancer-binding factor 1) und TCF (T-cell factor) die epithelial-mesenchymale Progression vorantreibt. Bei Aktivierung des Hedgehog Signalweges induziert der Transkriptionsfaktor Glioma 1 (GLI1) die Expression von Snail1, während der Notch Signalweg die Expression von Snail2 induziert. Bei den Mitgliedern der Snail-Familie handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die eng mit EMT assoziiert sind und für die Repression epithelialer Gene sowie Aktivierung mesenchymaler Gene verantwortlich sind²¹⁸. Auch die zelluläre Mikroumgebung kann EMT regulieren. So induziert das bei Inflammation sezernierte Zytokin TNF- α die Expression von Snail1 und führt somit zu einer Verstärkung der epithelial-mesenchymalen Transition. Die verschiedenen Signalwege sind dabei untereinander vernetzt und können sich dadurch gegenseitig beeinflussen. So inhibiert die durch Wachstumsfaktoren aktivierte Serin/Threonin-Kinase Akt die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β des WNT Signalweges, wodurch β -Catenin stabilisiert und die epithelial-mesenchymale Antwort verstärkt wird.

In dieser Arbeit konnte für alle drei getesteten Zytokine gezeigt werden, dass sie die Aktivierung EMT-assoziiierter Signalwege, die durch TGF- β aktiviert werden, verstärken und somit die epithelial-mesenchymale Progression forcieren. So löste die kombinierte Stimulation mit IL-4 und TGF- β die verstärkte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 aus. Da der verstärkende Effekt von IL-4 auf die epithelial-mesenchymale Progression durch den hoch selektiven MEK1/2 Inhibitor U0126 und den p38 Inhibitor SB202190 vollständig aufgehoben wurde, kann man davon ausgehen, dass außer der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 kein weiterer Mechanismus an der durch IL-4 ausgelösten Verstärkung von EMT beteiligt ist. In Abhängigkeit von IL-17 wurden der Transkriptionsfaktor NF κ B sowie die MAP-Kinase p38 aktiviert. Allerdings konnte die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 durch IL-17 Stimulation, wie es von Ji *et al.* in der humanen bronchialen Zelllinie 16HBE-14o gezeigt wurde, in der hier verwendeten Zelllinie nicht nachgewiesen werden²¹⁹. Für IL-22 konnte eine erhöhte Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase beobachtet werden, deren Inhibierung durch den spezifischen p38 MAPK-Inhibitor SB202190 jedoch nicht den EMT-verstärkenden Effekt von IL-22 vollständig aufzuheben vermochte, was auf die Beteiligung weiterer Signalwege hindeutete. Die zusätzliche Aktivierung des STAT1- sowie

STAT3-abhängigen Signalweges durch IL-22 konnte hier in BEAS-2B Zellen nachgewiesen werden und erst die kombinierte Inhibierung von allen 3 Signalwegen hob die verstärkende Wirkung von IL-22 komplett auf. Im Zusammenhang mit Tumorprogression und EMT konnte bereits für das inflammatorische Zytokin IL-6 gezeigt werden, dass es durch die Aktivierung des STAT3-abhängigen Signalweges sowie die autokrine Aktivierung des Insulin growth factor 1 (IGF-1)-Rezeptors EMT in einer epithelialen Prostata-Zelllinie auslöst²²⁰. Die Phosphorylierung und somit Aktivierung der MAP-Kinasen AKT, ERK und p38 MAPK, die bei einer Aktivierung des IGF-1 Rezeptors durch autokrine Stimulation auftritt¹¹⁰, konnte in der hier verwendeten bronchialen Epithelzelllinie jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch in der epithelialen Brustkrebszelllinie MCF-7 induzierte eine Stimulation mit IL-6 die STAT3-abhängige Repression der E-Cadherin Produktion sowie Expression mesenchymaler Markerproteine wie Vimentin und N-Cadherin¹⁰⁹. Dies spricht dafür, dass Induktoren des STAT3-abhängigen Signalweges die epithelial-mesenchymale Transition zwar maßgeblich modulieren können, aber der Grad der Beeinflussung stark von der Zelltyp-abhängigen Aktivierung weiterer Signalwege durch STAT3 beruht.

3.3.3 Expression EMT-assoziierter Transkriptionsfaktoren

Die Aktivierung vieler Signalwege, die EMT regulieren, induziert die Expression von Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität die epitheliale-mesenchymale Transition erst ermöglicht. Die Expression sowie Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird dabei über unterschiedliche Mechanismen und Signalwege reguliert und ermöglicht so eine Kontext-abhängige Antwort. Da bereits für das proinflammatorische Zytokin TNF- α gezeigt werden konnte, dass es eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Snail auslöst, der für die Ausbildung von EMT unerlässlich ist, wurde der Einfluss der Zytokine auf die Expression EMT-assoziierter Transkriptionsfaktoren untersucht. Neben Snail zählen basic helix-loop-helix (bHLH) und Zink-Finger E-Box bindende (ZEB) Transkriptionsfaktoren zu den transkriptionellen Hauptregulatoren von EMT, die die Repression des epithelialen Phänotypes und die Induktion des mesenchymalen Phänotypes vermitteln (s. Abb. 61)²²¹. Die Aktivierung der Expression dieser Transkriptionsfaktoren zählt dabei zu den ersten Schritten in der Einleitung von EMT. Von den 3 Snail-Proteinen, die in Vertebraten auftreten, regulieren Snail1 und Snail2, auch als Slug bekannt, das EMT-Programm bei Fibrose. Dabei unterdrücken sie die Expression epithelialer Proteine, indem sie über ihre Carboxy-terminalen Zink-Finger-Domänen an E-Box DNA-Sequenzen in proximalen Promoterregionen binden und Proteine rekrutieren, die Histonmodifikationen vermitteln. Hierzu gehören u.a. die Histondeacetylasen 1, 2 und 3 sowie die Lysin-spezifische Demethylase 1, die Methylierungen und Acetylierungen an verschiedenen Lysinresten des Histons 3 vermitteln (H3K4, H3K9 und H3K27). Während die Methylierung von H3K9 und H3K27 bei reprimierten Genen gefunden wird, markieren die Methylierung von H3K4 und die Acetylierung von H3K9 offene und aktive Chromatinstrukturen. Diese sogenannten „bivalenten Domänen“ in Promotoren ermöglichen dabei eine temporäre Stilllegung der Transkription und treten bei Genen auf, die bei der Entwicklung und Differenzierung eine Rolle spielen⁹⁵.

Die Expression von Snail1 wird nicht nur durch TGF- β induziert, sondern auch durch weitere Wachstumsfaktoren, Mitglieder der WNT-Familie sowie das die Zellmembran durchspannende Notch-Protein. Die Snail-Transkriptionsfaktoren interagieren zudem mit weiteren Transkriptionsfaktoren und transkriptionellen Regulatoren, was eine zusätzliche Regulation der Antwort ermöglicht. So bewirkt die Interaktion von Snail1 mit dem Smad2/3-Smad4-Komplex die Repression von E-Cadherin und Occludin ²²². Desweiteren kann die transkriptionelle Aktivität der Snail-Transkriptionsfaktoren durch posttranslationale Modifikationen moduliert werden, da hierdurch die Stabilität sowie zelluläre Lokalisation des Proteins beeinflusst wird ²²³. So bewirkt die einmalige Phosphorylierung von Snail im Nukleus durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) den nukleären Export des Proteins, während die zweite Phosphorylierung im Zytoplasma das Protein für den Ubiquitin-vermittelten Abbau markiert ²²⁴.

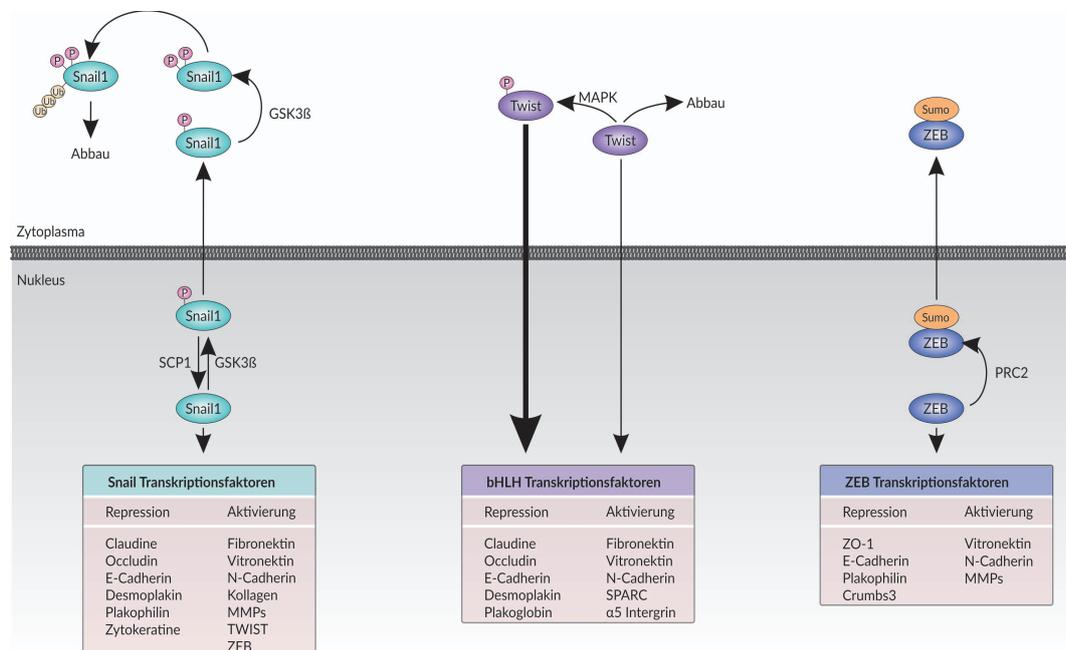


Abbildung 61: Genaktivierung und -repression durch Mitglieder der 3 wichtigen EMT-assozierten Transkriptionsfaktor-Familien und ihre Regulation durch posttranskriptionale Modifikationen.

Transkriptionsfaktoren der Snail-Familie werden durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) an zwei Motiven phosphoryliert, wobei die erste Phosphorylierung den Export aus dem Nukleus vermittelt, während die zweite Phosphorylierung zur Ubiquitinierung und somit zum Abbau des Proteins durch das Proteasom führt. Die Dephosphorylierung von Snail durch SCP1 (small C-terminal domain phosphatase 1) hingegen verlängert die Verweildauer der Snails im Kern. Im Gegensatz zu Snail werden Transkriptionsfaktoren der bHLH-Familie wie Twist durch Phosphorylierung vor Abbau geschützt und ihr nukleärer Import sowie ihre transkriptionelle Aktivität verstärkt. Die Phosphorylierung wird dabei durch die MAP-Kinasen p38, JNK und ERK vermittelt. ZEB Transkriptionsfaktoren werden durch den PRC2 (Polycomb repressive complex 2) sumoyliert und translozieren daraufhin aus dem Kern. bHLH: basic helix-loop-helix; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MMP: Matrix-Metalloprotease; SPARC: secreted protein acidic and rich in Cys; ZO-1: Zonula occludens 1.

Homodimere und heterodimere basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren fungieren ebenfalls als Regulatoren von Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen, wobei vor allem Twist1 und Twist2 eine wichtige Rolle bei der Progression von EMT übernehmen⁹⁵. Dabei wird die Expression der Zielgene, ähnlich wie bei Snail, durch die Interaktion mit anderen transkriptionellen Regulatoren, posttranslationale Modifikationen und unterschiedliche Dimerisierungspartner reguliert²²³. So wird die Stabilität von Twist durch die MAP-Kinasen vermittelte Phosphorylierung des Proteins beeinflusst, die den Transkriptionsfaktor vor dem Ubiquitin-vermittelten Abbau schützt und zudem die Aktivität von Twist erhöht. Auch die beiden ZEB (Zinc finger E-box-binding homeobox) Transkriptionsfaktoren ZEB1 und ZEB2 können die Transkription von Genen reprimieren oder aktivieren. Durch Rekrutierung des C-terminalen Bindeproteins CTBP wirken die ZEB-Transkriptionsfaktoren als Repressoren, während die Interaktion mit dem transkriptionellen Coaktivator PCAF (p300/CBP-assoziierten Faktor) bzw. p300 die transkriptionelle Aktivierung von Genen zur Folge hat. Die Aktivität von ZEB wird dabei durch posttranskriptionale Sumoylierung, durch den Polycomb repressive complex 2 (PRC2) vermittelt wird, reguliert, die die Translokation des Transkriptionsfaktors in das Zytoplasma fördert.

Die Protein-Expression der Transkriptionsfaktoren Snail und Slug, Twist1 und -2 sowie ZEB1 und -2 wurde nach alleiniger Stimulation mit IL-4, -17 und -22 bzw. in Kombination mit TGF- β untersucht. Dabei induzierten die einzelnen Zytokine auch ohne TGF- β die Expression EMT-assoziiierter Transkriptionsfaktoren nach 24 Stunden. So bewirkte die Stimulation mit IL-4 die Expression der Transkriptionsfaktoren Snail und Twist1, während durch IL-17 die Expression von Snail, Slug und ZEB1 angeregt wurde. IL-22 induzierte hingegen die Genexpression von Twist1, ZEB1 und ZEB2. Allerdings konnte bereits nach 48 Stunden ein deutlicher Rückgang bezüglich der Proteinmenge der Transkriptionsfaktoren beobachtet werden und nach 72 Stunden war die Proteinmenge um durchschnittlich 90% gesunken. Bei TGF- β Stimulation hingegen wurde die Expression aller untersuchten Transkriptionsfaktoren induziert und deren Proteinmenge verringerte sich selbst nach 72 Stunden Stimulation nicht. Bei der Expression der ZEB-Proteine durch TGF- β war auffällig, dass erst nach 48-stündiger Stimulation die stärkste Expression erreicht wurde, was mit der Induktion der ZEB-Expression zusammenhängen könnte, da für diese die Bindung von Transkriptionsfaktoren der Snail- bzw. Twist-Familie an die Promotoren der ZEB-Transkriptionsfaktoren notwendig ist, weswegen die Expression der ZEB-Proteine auch zeitlich verzögert stattfindet⁹⁵.

Auch auf transkriptioneller Ebene konnte für die EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Snail, Twist1 und ZEB1 ein ähnlicher Effekt zwischen Zytokin- und TGF- β Stimulation beobachtet werden. So trat nach alleiniger Zytokinstimulation eine deutliche transkriptionelle Induktion der 3 untersuchten Transkriptionsfaktoren (Snail, Twist1 und ZEB1) auf, wobei die Transkriptmenge bereits innerhalb von 12 Stunden um mind. die Hälfte absank und nach 24 Stunden sogar wieder auf der Höhe der uninduzierten Kontrolle lag. Im Gegensatz dazu verringerte sich die mRNA-Menge bei alleiniger TGF- β Stimulation selbst über einen Zeitraum von 72 Stunden durchschnittlich nur um etwa ein Drittel, wobei dieser Effekt auch bei kombinierter Stimulation, bestehend aus Zytokin und TGF- β , beobachtet werden konnte. Auch

auf Proteinebene wurden diese Beobachtungen bestätigt: Während die alleinige Stimulation mit Zytokinen nur eine kurzfristige Expression der Transkriptionsfaktoren induzierten, die nach bereits 48 Stunden wieder deutlich abnahm, verringerte sich die Proteinmenge der Transkriptionsfaktoren nach alleiniger TGF- β Stimulation bzw. in Kombination mit den Zytokinen selbst nach 72 Stunden nicht.

Dieser beobachtete Rückgang in der Transkript- sowie Proteinmenge, der bei alleiniger Zytokinstimulation beobachtet wurde, könnte dabei eine Erklärung liefern, warum die Zytokine eigenständig nicht in der Lage sind, EMT auszulösen, da die Zytokine allein keine langfristige Expression der EMT-essentiellen Transkriptionsfaktoren auslösen. Die langsamere Abnahme der Transkriptmenge, die hingegen bei TGF- β Stimulation auftritt, könnte dabei ein Produkt der mRNA-stabilisierenden Wirkung des Wachstumsfaktors sein. Dieser positive Effekt auf die mRNA-Stabilität wurde dabei bereits für über 40 TGF- β regulierte Gene beschrieben, zu denen auch EMT-relevante Gene wie die extrazellulären Matrixproteine Elastin, Kollagen, Fibronectin und Thrombospondin-1 zählen, aber auch Metalloproteasen wie MMP-2, -9 und Stromelysin-3^{225,226}. Die extrazellulären Matrixproteine sowie Metalloproteasen werden im Zusammenhang mit EMT verstärkt von den redifferenzierten Fibroblasten produziert und tragen zu dem ständigen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix und somit zu den fibrotischen Veränderungen in der Lunge bei. Desweiteren konnte ein fördernder Effekt von TGF- β auf die mRNA von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 und IFN- γ , aber auch auf die mRNA des Wachstumsfaktors selbst nachgewiesen werden, was im Zusammenhang mit Asthma eine Verstärkung der Inflammation in den Atemwegen sowie eine positive Rückkopplung bezüglich der Progression von EMT bedeuten würde²²⁵.

Obwohl die genauen Mechanismen dieses mRNA-stabilisierenden Effektes noch nicht geklärt sind, konnte gezeigt werden, dass der Translationshemmer Cycloheximid die stabilisierende Wirkung von TGF- β auf die mRNA von Elastin sowie IL-8 inhibiert^{227,228}. Dies spricht dafür, dass durch TGF- β die Expression von mind. einem early response-Protein angeregt wird, das essentiell ist für die mRNA-stabilisierende Wirkung von TGF- β . Bei den early-response Proteinen, deren Expression durch TGF- β induziert wird, handelt es sich bisherigen Ergebnissen nach um *trans*-wirkende Faktoren, die an *cis*-Elemente in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA binden und so die Stabilität der mRNA beeinflussen²²⁵. Der stabilisierende Effekt von TGF- β wird zudem durch die Überexpression des Negativ-Regulators Smad7, der Komplexe mit dem aktivierten TGF- β Rezeptor Typ I bildet und so in einer negativen Rückkopplung die weitere Phosphorylierung von Smad2 und 3 unterdrückt, um über 70% gesenkt, wie von Kucich *et al* gezeigt. Obwohl die Autoren keine Ergebnisse dazu lieferten, ob durch die vorliegende Überexpression von Smad7 die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges komplett inhibiert wurde²²⁸, kann man dennoch festhalten, dass die aktivierten Smad-Transkriptionsfaktoren notwendig sind für die Genexpression der stabilisierenden early response-Proteine. Die verbleibenden 30% Restaktivität könnten somit das Produkt einer zu schwachen Überexpression von Smad7 oder eines mRNA-stabilisierenden Effektes Smad-unabhängiger Signalwege sein, wie es für die p38-MAP Kinase bereits beschrieben wurde²²⁹. Parallel hierzu wurde auch schon durch

mehrere Arbeitsgruppen im Kontext von EMT gezeigt, dass die Inhibierung von Smad-unabhängigen Signalwegen nicht ausreicht, um die epithelial-mesenchymale Transition zu unterdrücken. Erst durch die zusätzliche Hemmung des Smad-abhängigen Signalweges konnte die epithelial-mesenchymale Transition verhindert werden, was auf den Smad-vermittelten mRNA-stabilisierenden Effekt von TGF- β zurückzuführen sein könnte und die fundamentale Rolle des Smad-abhängigen Signalweges in der Entstehung von EMT unterstreicht ²³⁰⁻²³³.

Obwohl für die drei hier untersuchten Zytokine, so wie auch bereits für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β , keine EMT-induzierende Wirkung nachgewiesen werden konnte, waren sie dennoch in der Lage, durch Aktivierung EMT-assoziiierter Signalwege die TGF- β induzierte epithelial-mesenchymale Progression zu forcieren. Dabei konnte selbst für IL-22, für das eine gewebsschützende Wirkung postuliert wurde, eine fördernde Wirkung auf EMT nachgewiesen werden. Für das Zytokin konnte bisher gezeigt werden, dass es sowohl die epitheliale Barriere-Funktion verstärkt als auch die Expression des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ reduziert ²³⁵, weswegen von Mühl *et al.* sogar eine therapeutische Administration von IL-22 bei Krankheiten mit epithelialen Schädigungen vorgeschlagen wurde ²³⁶. Allerdings zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass das Zytokin in Kombination mit dem Wachstumsfaktor TGF- β , der eng mit Wundheilung assoziiert ist, die Auflösung des epithelialen Zellverbundes durch EMT fördert. Dies verstärkt nochmals den ambivalenten Charakter von IL-22, für das Kontext-abhängig auch bereits proinflammatorische sowie antiinflammatorische Eigenschaften beschrieben werden konnten ³⁷. Ein EMT-verstärkender Effekt von IL-22 wurde auch 2013 von Johnson *et al.* beschrieben, die die Potenzierung der Expression TGF- β induzierter mesenchymaler Markergene sowie eine verstärkte Reduktion epithelialer Markergene durch IL-22 festgestellt hatten ²¹⁵. In der hier vorliegenden Arbeit konnte allerdings zusätzlich gezeigt werden, dass IL-22 die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 sowie die p38 MAP-Kinase aktiviert und die Expression der EMT-fördernden Transkriptionsfaktoren Twist1, ZEB1 und ZEB2 induziert. Die Förderung von EMT durch IL-22 in Kombination mit TGF- β könnte dabei vor allem bei Patienten mit schwerem Asthma von Bedeutung sein, da Zhao *et al.* eine verstärkte Expression von IL-22 vorwiegend in der subepithelialen Region von Patienten mit schwerem Asthma nachweisen konnten ²³⁸. Auch für IL-4 und IL-17 wurde bereits 2013 eine synergistische, potenzierende Wirkung auf die TGF- β induzierte EMT in der bronchialen Epithelzelllinie 16-HBE berichtet. Ji *et al.* führten dies auf die durch IL-4 und IL-17 verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors ERK1/2 zurück und waren auch in der Lage, durch die alleinige Inhibition dieses Signalweges die epithelial-mesenchymale Transition komplett zu unterdrücken ²¹⁹. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die unabhängig voneinander nur durch die kombinierte Hemmung der Smad-abhängigen Signaltransduktion sowie weiterer MAPK-Signalwege (p38/JNK/ERK) die epithelial-mesenchymale Transition verhindern konnten ²³⁰⁻²³³. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass zwar durch IL-4 auch die ERK1/2 MAP-Kinase verstärkt aktiviert wird, allerdings auch die p38 MAP-Kinase. IL-17 induzierte in der bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B ebenfalls die Aktivierung der p38-MAP-Kinase und zusätzlich den NF κ B-Signalweg. Desweiteren konnte

hier die verstärkte Expression der Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist 1 sowie ZEB1 durch die Zytokine nachgewiesen werden, wenn sie in Kombination mit TGF- β appliziert wurden. Obwohl bei einer Stimulation mit den 3 untersuchten Zytokine zumindest kurzfristig über einen Zeitraum von 48 Stunden EMT-assoziierte Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden konnten, waren die Zytokine dennoch nicht in der Lage, EMT zu induzieren. Dies deutet darauf hin, dass womöglich eine ganz bestimmte Kombination aus EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren für die Induktion des EMT-Prozesses notwendig ist. Desweiteren unterstreicht die rasante Abnahme der Proteinmenge der EMT-Transkriptionsfaktoren die These, dass es sich bei dem epithelialen bzw. mesenchymalen Differenzierungszustand um ein dynamisches Gleichgewicht mit aktiver Regulierung handelt, und betont nochmals den reversiblen Charakter der Transition. Von Zhang *et al.* wurde in diesem Zusammenhang ein Modell postuliert, bei dem die Transition als Kaskade mit zwei bistabilen Schaltern abläuft, deren Durchlaufen von der Stärke sowie Dauer der TGF- β Stimulation abhängt. Dabei wird der zweite Schalter durch einen autokrinen TGF- β /ZEB Feedback-Loop irreversibel, wodurch der mesenchymale Phänotyp dauerhaft aufrecht erhalten wird²³⁴, was nochmals TGF- β als treibende Kraft bei der epithelial-mesenchymalen Transition hervorhebt.

Allerdings konnte bereits für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, die ebenfalls in den Atemwegen von Asthmatikern auftreten, sowie für die hier untersuchten Zytokine eine verstärkende Wirkung auf die Progression von EMT nachgewiesen werden. Dabei trat bei einer Kombination der inflammatorischen Zytokine sogar ein additiver Effekt auf. Da in den Atemwegen von Asthmatikern eine ganze Reihe weiterer proinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP) exprimiert werden²³⁹, die eventuell auch einen verstärkenden Effekt auf die Progression von EMT zeigen, darf die potenzierende Wirkung der Zytokine bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für EMT nicht außer Acht gelassen werden. Da durch klinische Therapien die Aktivität der Signalwege niemals komplett unterdrückt wird, sondern eine Restaktivität von mindestens 20% verbleibt²⁴⁰, sollte im Fall von EMT eine gegen TGF- β gerichtete Therapie mit einer antiinflammatorischen Behandlung kombiniert werden, um auch der potenzierenden Wirkung der proinflammatorischen Zytokine entgegenzuwirken und so airway remodeling effektiv therapieren zu können.

3.4 Oxacyclododecindion zur Behandlung von Asthma

Der Naturstoff Oxacyclododecindion wurde bereits als hoch potenter Inhibitor von JAK-STAT-Signalkaskaden sowie des TGF- β induzierten Signalweges beschrieben¹⁴⁸, was das makrozyklische Lacton zu einer vielversprechenden Verbindung für die gleichzeitige Behandlung inflammatorischer sowie fibrotischer Pathomechanismen bei Asthma macht. Der pilzliche Sekundärmetabolit gehört zu einer ganzen Reihe pilzlicher Makrolaktone, für die bereits eine antiinflammatorische Wirkung beschrieben werden konnte. Hierzu zählen neben Oxacyclododecindion auch (S)-Curvularin, (S)-10,11-Dehydrocurvularin, 4-Dechloro-14-deoxyoxacyclododecindion und 14-Deoxyoxacyclododecindion (s. Abb. 62), wobei Oxacyclododecindion die höchste Wirksamkeit von allen aufgezählten

Verbindungen aufweist²⁴¹. Bei den Makrolaktonen 4-Dechloro-14-deoxyoxacyclododecindion und 14-Deoxyoxacyclododecindion handelt es sich um Inhibitoren der TGF- β induzierten CTGF (connective tissue growth factor) Expression, das als zentraler Mediator von Gewebsveränderungen u.a. an der Pathogenese fibrotischer Krankheiten beteiligt ist²⁴². Für die Makrolactone (S)-Curvularin, (S)-10,11-Dehydrocurvularin sowie Oxacyclododecindion wurde zusätzlich zu ihrer antifibrotischen Wirkung auch ein antiinflammatorischer Effekt beschrieben, der u.a. durch die Hemmung der IL4-induzierten Signaltransduktion hervorgerufen wird^{148,241}.

In Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential von Oxacyclododecindion zur Inhibierung Asthma-relevanter inflammatorischer sowie EMT-assoziiierter Prozesse untersucht und der Wirkmechanismus der Substanz genauer eruiert.

3.4.1 Inhibierung inflammatorischer Pathomechanismen bei Asthma

Die erfolgreiche Inhibierung einiger Asthma-relevanter, inflammatorischer Mechanismen durch Oxacyclododecindion konnte bereits in eigenen Vorarbeiten in der bronchialen Zelllinie A549 nachgewiesen werden, in der der Naturstoff sowohl die durch IL-4, TNF- α sowie TGF- β induzierte Signaltransduktion mit IC₅₀-Werten zwischen 68 und 190 nM inhibierte¹³⁴. Auch auf transkriptioneller Ebene hemmte der Naturstoff die Expression Asthma-relevanter Chemokine wie Eotaxin-1 und -2, RANTES und MCP-1, die in der Lunge zur Rekrutierung diverser Immunzellen sezerniert werden. Desweiteren reduzierte das Makrolakton die mRNA-Expression der Interleukine IL-1 β , -6 und -8, die bei Asthma an der Entstehung sowie Aufrechterhaltung der Entzündung beteiligt sind. Auch die durch TNF- α sowie IL-4 induzierte Transkription der Gene TGF- β und der Matrix-Metalloproteasen (MMP)-2 und -9 wurde

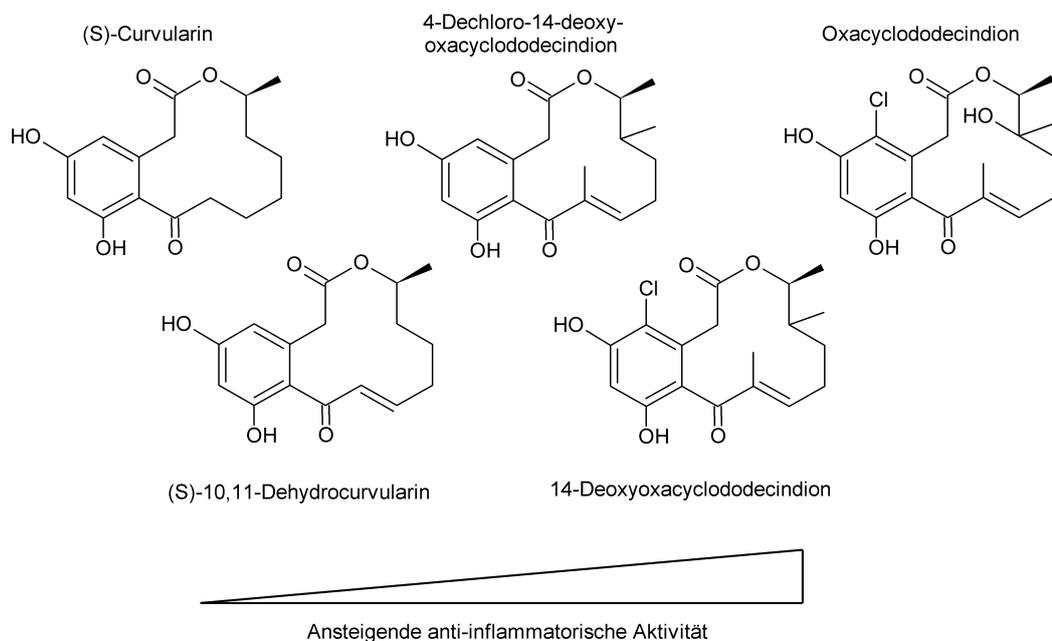


Abbildung 62: Struktur von Oxacyclododecindion und verwandter Makrolaktone mit antiinflammatorischer Aktivität⁹⁹.

durch Oxacyclododecindion inhibiert. Diese Ergebnisse konnten auch bereits in Microarray-Analysen bestätigt werden, wobei Oxacyclododecindion u.a. auch die Transkription des antiinflammatorischen Proteins IL-10 erhöhte, das die Aktivität von Immunzellen sowie die Produktion inflammatorischer Zytokine senkt und in einem negativen Feedback-Mechanismus Entzündungsprozesse eindämmt ²⁴³.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential von Oxacyclododecindion untersucht, die Produktion von IL-17 in T-Zellen sowie die IL-17 induzierte Genexpression zu inhibieren. Bei Asthmatikern korreliert die Produktion von Interleukin-17 mit der Anzahl an Neutrophilen in der Lunge und ist somit eng assoziiert mit neutrophiler Inflammation ²⁴⁴. Zudem wird dem Zytokin eine Schlüsselrolle in der Entstehung von schwerem Asthma zugeschrieben, weswegen die Inhibierung der IL-17-Produktion, aber auch IL-17 abhängiger Signalwege als Behandlungsmöglichkeiten von neutrophilem Asthma diskutiert werden ²¹⁴. IL-17 wird hauptsächlich von T_H17-Zellen produziert, wobei auch andere Immunzellen wie z.B. natürliche Killerzellen, Makrophagen und Neutrophile als Quellen von IL-17 identifiziert werden konnten ²⁴⁴. Die Differenzierung naiver T-Zellen in T_H17-Zellen erfordert dabei zusätzlich zur Antigenpräsentation einen Stimulus aus IL-6, was die Expression des Transkriptionsfaktors retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)- γ t induziert, der als Hauptregulator der T_H17-Differenzierung gilt und für die Produktion von IL-17 erforderlich ist (s. Abb. 63) ²⁴⁵. Mit Hilfe eines Reportergens wurde in T-Zellen die Aktivität des IL-17 Promoters untersucht, wobei die Aktivierung des IL-17 Promoters durch einen kombinierten Stimulus aus IL-6, PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) und Ionomycin erfolgte. PMA und Ionomycin aktivieren T-Zellen *in vitro* und dienen als Alternative zur Antigen-spezifischen Stimulation. Das Ionophor Ionomycin induziert dabei einen Ca²⁺-Einstrom, der wiederum Calcineurin-abhängig den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert. Das Phorbol-ester PMA hingegen ist aufgrund seiner Strukturanalogie zu Diacylglycerin in der Lage, die Proteinkinase C (PKC) zu aktivieren ²⁴⁶. Somit werden durch die beiden Verbindungen dieselben intrazellulären Signalwege aktiviert wie auch in Folge einer Antigenpräsentation.

Die Expression des Reportergens konnte erst bei Transfektion der Zellen mit einem Expressionsvektor für den Transkriptionsfaktor ROR γ t durch entsprechende Stimulation um das 7,2-fache induziert werden, da die Expression des Transkriptionsfaktors in der T-Zelllinie nicht induziert werden konnte. Durch Oxacyclododecindion wurde die Expression des IL-17-Reportergens um 90% inhibiert, während die Behandlung mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason, das auch zur Behandlung von Asthma eingesetzt wird ²⁴⁷, die Promoteraktivität selbst bei der höchsten Dexamethason-Konzentration nur um etwa 50% reduzierte. Ähnliches konnten Kaur *et al.* bezüglich der Expression von IL-17 in Asthmatikern beobachten, die regelmäßig Dexamethason inhalierten: So ließ sich die Expression von IL-17 durch Dexamethason-Gabe nur um 42% senken, während gleichzeitig die Konzentrationen von IL-13 durch das Glukokortikoid um bis zu 90% gesenkt wurden ²⁴⁸.

Desweiteren wurde die Wirkung des Naturstoffes auf die durch IL-17 induzierte Genexpression in der bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B untersucht. So stieg nach Behandlung mit IL-17 die mRNA-Menge von MMP-9, IL-6 und -8 in der Zelllinie, was durch

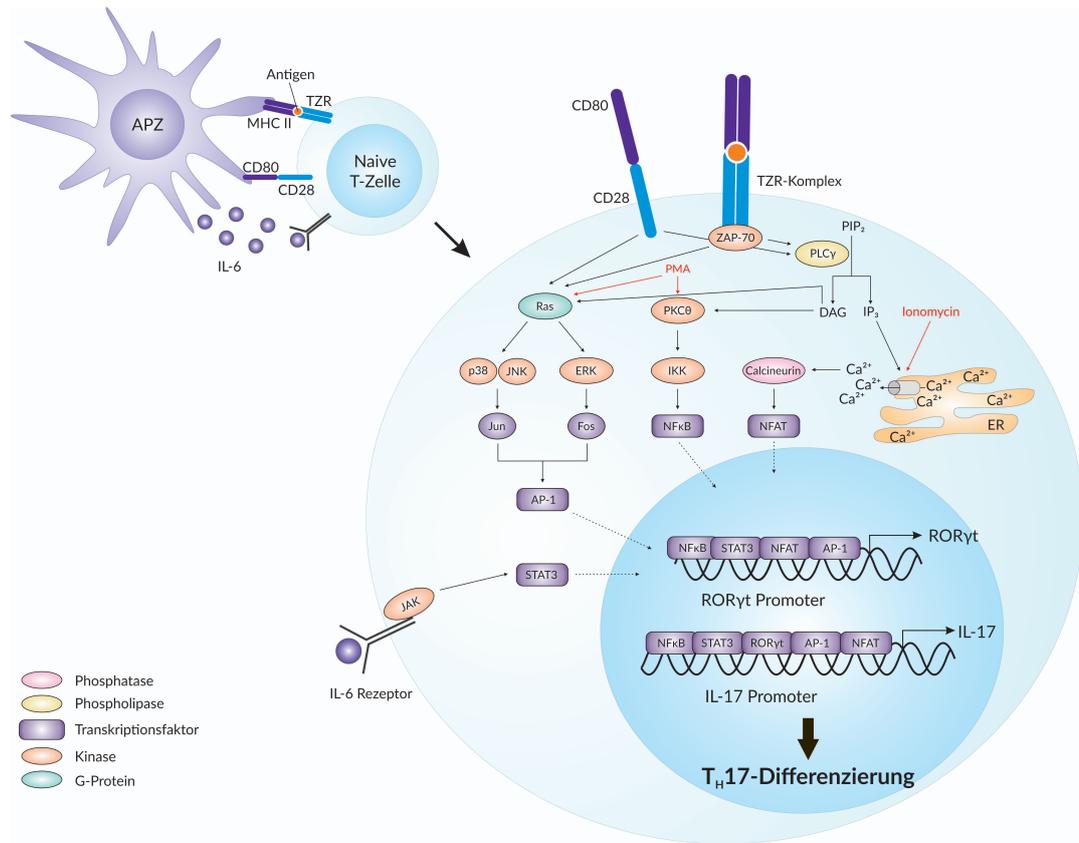


Abbildung 63: T_H17 -Differenzierung naiver T-Zellen nach durch Antigenstimulation und aktivierte Signalwege.

Stimulierung des T-Zell-Rezeptors (TZR) durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) in Anwesenheit von IL-6 induziert die T_H17 -Differenzierung naiver T-Zellen. Die mit dem TZR-assoziierte Protein-Tyrosin-Kinase ZAP-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) aktiviert die beiden Signalnetzwerke RAS-MAPK-Kaskade und den Inositol-Phospholipid Stoffwechsel, wobei die Co-Stimulation über den CD28 Rezeptor das Signal noch amplifiziert. Ras aktiviert über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalkaskade die Kinasen ERK, JNK und p38, die die Expression und Aktivierung der c-Fos und c-Jun Proteine zur Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 kontrollieren. Beim Inositol-Phospholipid Stoffwechsel generiert die Phospholipase C γ (PLC γ) die Sekundärbotenstoffe Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). DAG induziert über die Proteinkinase C (PKC) die Aktivierung von NF- κ B. IP $_3$ bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration und die Aktivierung von Calcineurin, das NFAT dephosphoryliert und somit aktiviert. NFAT, NF- κ B und AP-1 translokieren in den Zellkern und induzieren die ROR γ t-Expression. ROR γ t ist dabei essentiell für die Produktion von IL-17. Die kombinierte Stimulation mit dem Phorbol-ester PMA und dem Ionophor Ionomycin ermöglicht es *in vitro*, den TZR-Signalweg ohne Antigen-Stimulation zu induzieren.

AP-1: activator protein 1; CD: cluster of differentiation; ER: Endoplasmatisches Retikulum; ERK: extracellular-signal related kinase; IKK: I κ B α -Kinase-Komplex; IL: Interleukin; JNK: c-Jun N-terminale Kinase; MHC: major histocompatibility complex; NFAT: nuclear factor of activated t-cells; NF κ B: nuclear factor κ B; PIP $_2$: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PLC: Phospholipase C; ROR γ t: retinoic acid-related orphan receptor γ t; STAT: signal transducer and activator of transcription.

Oxacyclododecindion zu etwa 85% inhibiert wurde. Zwar wurde durch Dexamethason die Expression der drei Gene auf mRNA-Ebene ebenfalls gesenkt, allerdings durchschnittlich nur um 70%. Obwohl sowohl Dexamethason als auch Oxacyclododecindion die Expression proinflammatorischer Gene inhibieren²⁴⁹, könnte die Hemmung der MAP-Kinase p38 durch Oxacyclododecindion, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, die stärkere Wirkung von Oxacyclododecindion auf mRNA-Ebene erklären. p38 aktiviert dabei nicht nur den Transkriptionsfaktor AP-1, sondern übt auch eine wichtige mRNA-stabilisierende Funktion aus. Die p38 MAP-Kinase reguliert dabei mRNAs mit Adenylat/Uridylat-reichen Elementen (AREs), indem sie ARE-bindende Faktoren, welche an ARE-haltige mRNA binden und diese stabilisieren bzw. destabilisieren, phosphoryliert und so deren Funktionen modifiziert²⁵⁰. Dies gibt dem Organismus die Möglichkeit, die mRNA-Abbauraten zu beschleunigen bzw. zu verlangsamen und konnte bereits bei Vorgängen wie Differenzierung, Zellwachstum und Immunantwort nachgewiesen werden. Die p38 MAP-Kinase beeinflusst so nicht nur die mRNA-Stabilität von IL-6 und -8, sondern auch von weiteren inflammatorischen Genen wie der Cyclooxygenase 2 (COX-2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und dem Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF)^{229,250,251}

3.4.2 Inhibierung von EMT

Bisherige Ergebnisse zur Wirkung von Kortikosteroiden auf die epithelial-mesenchymale Transition zeigen, dass die erhöhten Konzentrationen von TGF- β , die in den Lungen von Asthmatikern auftreten, selbst bei Verabreichung oraler Kortikosteroide persistieren¹⁰⁰. Obwohl Kortikosteroide sich als extrem nützlich in der Behandlung der asthmatischen Inflammation erwiesen haben, ist ihre Wirksamkeit, was die Inhibierung von EMT betrifft, limitiert. Aus diesem Grund müssen für Asthma neue Therapiestrategien entwickelt werden, die auch die Inhibierung des airway remodelings zum Ziel haben.

Deshalb wurde zusätzlich zur antiinflammatorischen Wirkung von Oxacyclododecindion auch dessen antifibrotischer Effekt im Zusammenhang mit EMT untersucht. Hierbei wurde ein breiter Stimulationsansatz gewählt, der nicht nur aus TGF- β bestand, sondern zusätzlich aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-17 und IL-22, deren verstärkende Wirkung auf die epithelial-mesenchymale Transition bereits im vorherigen Abschnitt zusammengefasst und diskutiert wurde. Oxacyclododecindion inhibierte dabei EMT-assoziierte Veränderungen, was hier auf morphologischer, mRNA- und Protein-Ebene gezeigt werden konnte. So nahmen die Epithelzellen keine spindelförmige Form mehr an, sondern verblieben als polygonale Zellen, die eine geschlossene Zellfläche ausbilden. Der für EMT-typische Cadherin-Switch blieb nach Behandlung mit dem Naturstoff aus, aber auch die Expression weiterer mesenchymaler Markergene wie Vimentin. Die Expression epithelialer Markerproteine wie E-Cadherin und Zonula-occludens 1 (ZO-1), die für die strukturelle Integrität sowie Zellpolarisation notwendig sind, wurde durch den Naturstoff hingegen gefördert. Im Vergleich zu Oxacyclododecindion beeinflusste Dexamethason die epithelial-mesenchymale Transition hingegen nur schwach, was bereits anhand der morphologischen Merkmale festgestellt werden konnte. So veränderte sich trotz Vorbehandlung mit dem Glukokortikoid die Zellform immer noch zu einer

spindelförmigen Form, auch wenn ein enger Zellkontakt bestehen blieb. Auf transkriptioneller sowie Proteinebene reduzierte Dexamethason nur geringfügig die Expression mesenchymaler Markerproteine wie N-Cadherin und Vimentin. Die Expression von epithelialen Markern wie ZO-1 und E-Cadherin verringerte das Glukokortikoid um lediglich 40%.

Mit dem mesenchymalen Phänotyp und erhöhter Zellmotilität ist zudem die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) eng assoziiert, die durch Matrixdegeneration nicht nur die Invasivität der Zellen begünstigen¹⁰⁰, sondern auch die Freisetzung von latentem TGF- β fördern, das in der extrazellulären Matrix in Form eines inaktiven Komplexes gespeichert wird²⁵². Die Stimulation mit TGF- β und proinflammatorischen Zytokinen induzierte die mRNA-Expression von MMP-2, was durch Oxacyclododecindion um mehr als 90% inhibiert wurde. Dexamethason hingegen hemmte die Expression von MMP-2 auf transkriptioneller Ebene lediglich um etwa 40%. Die Expression der EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Snail und Twist1 wurde durch Oxacyclododecindion um 75% reduziert, während Dexamethason nur zu einer 30%-igen Reduktion der Expression führte. Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen nochmals die schwach bis moderate Wirkung von Glukokortikoiden auf die epithelial-mesenchymale Transition. Im Reporteragenassay reduzierte Dexamethason zudem die TGF- β induzierte Reporterexpression lediglich um etwa 40%, was auch den geringen Effekt der Substanz auf die durch TGF- β vermittelte epithelial-mesenchymale Transition erklärt.

Obwohl Dexamethason aufgrund seiner antiinflammatorischen Wirkung dem potenzierenden Effekt der proinflammatorischen Zytokine entgegenwirken kann, reicht die zusätzliche schwache Inhibierung des TGF- β induzierten Signalweges nicht aus, um die EMT-charakteristischen Zellveränderungen zu verhindern. In der Praxis verzögern inhalierte Kortikosteroide so nur die progressive Abnahme der Lungenfunktion durch airway remodeling, sind jedoch nicht in der Lage, diese zu vollkommen zu unterdrücken²⁵³. In diesem Zusammenhang konnten Salem *et al.* sowohl in der Zelllinie A549 als auch BEAS-2B zeigen, dass TGF- β sogar die antiinflammatorische Aktivität von Glukokortikoiden reduziert, indem es die Translokation des aktivierten Glukokortikoid-Rezeptors in den Nukleus verringert. Die Wirkung von Dexamethason auf die Produktion von IL-6 sowie CXCL-8, die zunächst 80% betrug, wurde so durch den Wachstumsfaktor auf 30% gesenkt. Desweiteren erniedrigte TGF- β auch die mRNA-Expression des Glukokortikoid-Rezeptors, über den Glukokortikoide ihre Wirkung ausüben, was den Effekt von Dexamethason zusätzlich minderte²⁵⁴.

Da Glukokortikoide nur eine schwache Wirkung auf den durch TGF- β induzierten Signalweg zeigen und ihre antiinflammatorische Aktivität zudem in der Anwesenheit von TGF- β verringert wird, sollten Glukokortikoide mit einem TGF- β inhibierenden Wirkstoff kombiniert werden, um EMT effektiv zu therapieren. Alternativ bieten sich Wirkstoffe wie Oxacyclododecindion an, die antiinflammatorische und antifibrotische Eigenschaften vereinen. Das vielversprechende Potential des Makrolaktons zur Behandlung von Krankheiten mit inflammatorischen sowie fibrotischen Pathomechanismen konnte dabei bereits in ersten Studien im Mausmodell für systemischen Lupus erythematoses, einer Autoimmunerkrankung mit sowohl inflammatorischen sowie fibrotischen Aspekten, bestätigt werden²⁵⁵.

3.4.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Oxacyclododecindion

Oxacyclododecindion inhibiert eine Vielzahl von Signalwegen, zu denen u.a. Smad- sowie STAT-vermittelte Signaltransduktionen zählen. Von Serwe konnte bereits gezeigt werden, dass der Naturstoff dabei allerdings weder die Tyrosin- noch Serin-Phosphorylierung der STAT-Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Auch für den Transkriptionsfaktorkomplex Smad2/3 wurde keine Inhibierung der Phosphorylierung durch die Verbindung festgestellt¹⁴⁹. Deshalb wurde hier zunächst per Chromatin-Immunopräzipitation beispielhaft die Bindung des Transkriptionsfaktors Smad3 an den PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor) Promoter unter Einfluss von Oxacyclododecindion untersucht. PAI-1 ist dabei ein wichtiger Regulator proteolytischer Degradation der extrazellulären Matrix und somit der Gewebshomöostase, wobei erhöhte Konzentrationen von PAI-1 mit der verstärkten Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine und Fibrose assoziiert sind²⁵⁶. Die Hemmung der PAI-1 Genexpression durch Oxacyclododecindion konnte dabei bereits auf mRNA-Ebene sowie Proteinebene nachgewiesen werden¹⁴⁸. Die Bindung des Transkriptionsfaktors an den PAI-1 Promoter wurde durch Behandlung mit dem Naturstoff konzentrationsabhängig reduziert, was die Inhibierung des Smad-abhängigen Signalweges trotz unbeeinflusster Tyrosin-Phosphorylierung erklärt.

Eine Gemeinsamkeit, die sich bei allen inhibierten Signalwegen findet, ist die Rekrutierung des transkriptionellen Coaktivators p300, der als Adapterprotein Transkriptionsfaktoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie verbindet (s. Abb. 64). Der Coaktivator besitzt jedoch auch eine intrinsische Acetyltransferase-Aktivität, durch die p300 Transkriptionsfaktoren sowie Histone acetylieren kann. So moduliert der Coaktivator die Aktivität von Transkriptionsfaktoren,

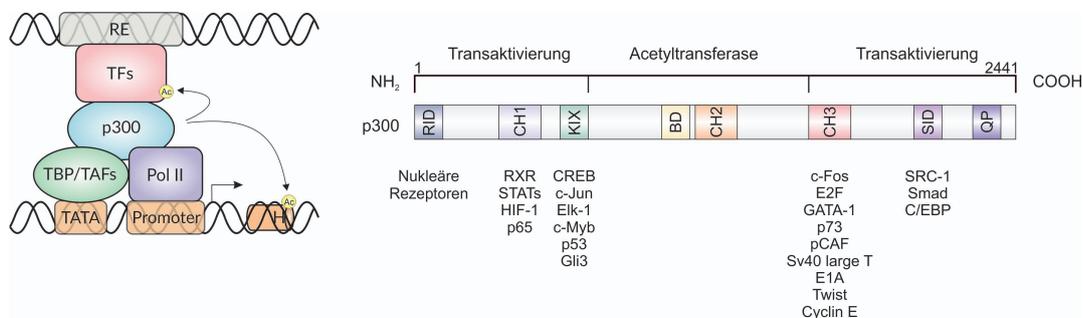


Abbildung 64: Schematische Darstellung der Funktionen des transkriptionellen Coaktivators p300 (links) und dessen funktionellen Domänen mit einigen interagierenden Transkriptionsfaktoren (rechts).

p300 kann durch die Acetylierung von sowohl Transkriptionsfaktoren (TFs) als auch Histonen (H) die Transkription modifizieren und fungiert zudem als Brücke zwischen Transkriptionsfaktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie. Der Coaktivator kann dabei mit mehr als 400 Proteinen interagieren, zu denen u.a. die Transkriptionsfaktoren der STAT- und Smad-Familie zählen.

BD: Bromodomäne; CH: cysteine and histidine-rich regions; KIX: CREB-binding site; Pol II: RNA-Polymerase II; QP: glutamine- and proline-rich domains; RE: responsive element; RID: receptor interacting domain; SID: steroid receptor coactivator-1 interaction domain; TAFs: TBP-associated factors; TBP: TATA binding protein.

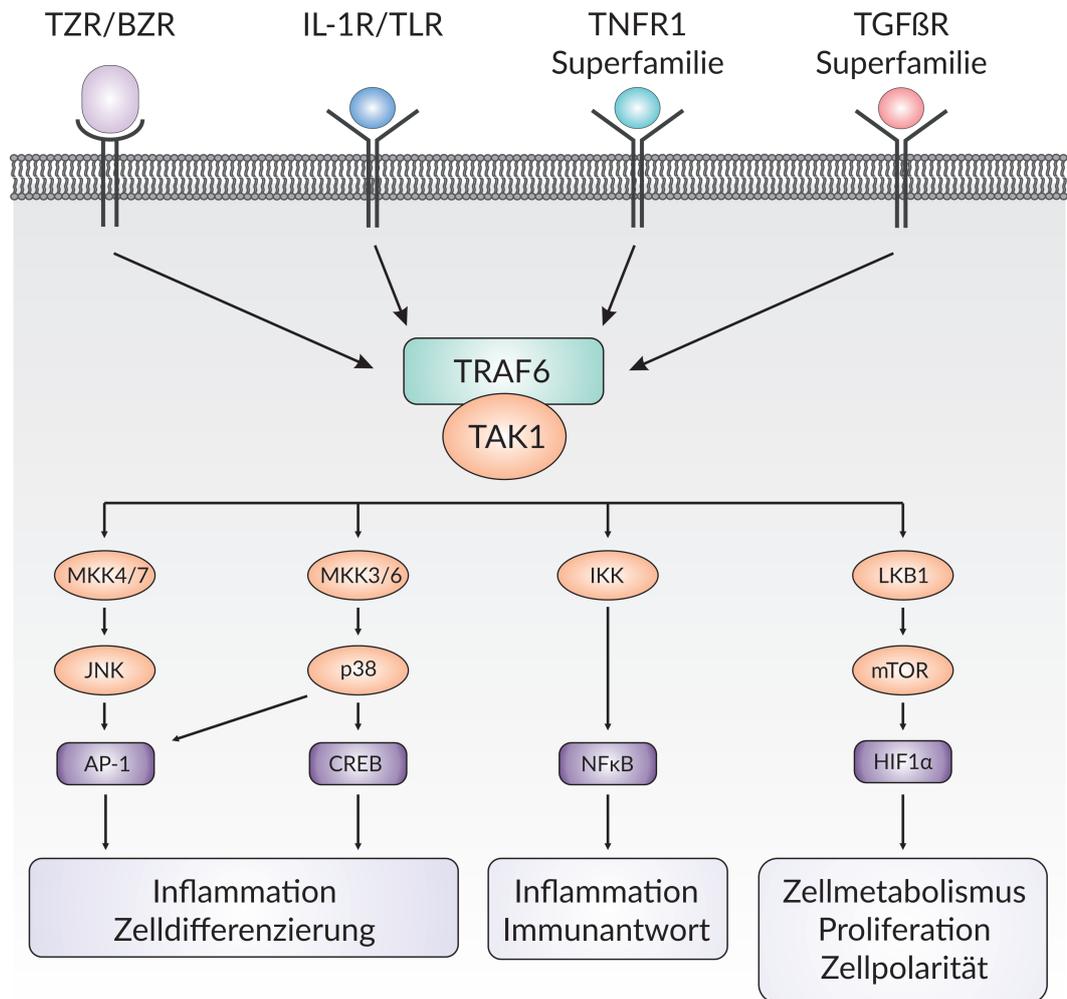


Abbildung 65: TRAF6/TAK1 als Knotenpunkt mehrerer Signalwege, die mit Inflammation und Zellveränderungen assoziiert sind.

Stimulationen des T- bzw. B-Zell-Rezeptors (TZR/BZR), des Interleukin-1-Rezeptors (IL-1R), der toll-like Rezeptoren (TLR) und Rezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNFR1)- sowie der transforming-growth factor β -Superfamilie führen zur Rekrutierung des TRAF6/TAK1-Komplexes. Dieser aktiviert u.a. Signalnetzwerke der MAPK-Kaskade, bei denen durch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und CREB inflammatorische Prozesse sowie Zelldifferenzierung geregelt werden. Auch der NF κ B-Signalweg wird durch TAK1 aktiviert, der die Immunantwort sowie inflammatorische Prozesse reguliert. Desweiteren wird der Transkriptionsfaktor HIF1 α durch TAK1 über die Kinasen LKB1 und mTOR aktiviert, wodurch TAK1 auch an der Regulation von Proliferation, des Zellmetabolismus und der Zellpolarität beteiligt ist. AP-1: activator protein 1; CREB: cAMP response element-binding protein; ELK: ETS domain-containing protein; ERK: extracellular-signal related kinase; HIF1 α : hypoxia-inducible factor 1 α ; IKK: I κ B α -Kinase-Komplex; JNK: c-Jun N-terminale Kinase; LKB1: liver kinase B1; MKK: mitogen-activated protein kinase kinase; mTOR: mechanistic target of rapamycin; NF κ B: nuclear factor κ B; TAK1: tgf- β activated kinase 1; TRAF6: tnf-receptor associated factor 6.

während die Acetylierung der Histone zu einer Relaxierung der Chromatinstruktur führt und somit das Binden von Transkriptionsfaktoren sowie der Transkriptionsmaschinerie an die DNA begünstigt²⁵⁷. Per Co-Immunopräzipitation konnte allerdings gezeigt werden, dass Oxacyclododecindion die Interaktion von p300 mit den Transkriptionsfaktoren Smad2/3 sowie STAT6 nicht inhibiert. Auch die Acetyltransferase-Aktivität des Coaktivators, die u.a. für die Acetylierung von STAT6 zuständig ist²⁰³, wurde durch die Verbindung nicht beeinflusst, weswegen p300 als target des Naturstoffes ausgeschlossen wurde.

Als weiterer Schnittpunkt mehrerer untersuchter Signalwege stellte sich der TRAF6-TAK1-Signalweg heraus (s. Abb. 65). Dieser leitet nicht nur die Smad-unabhängige Signalweiterleitung über MAP-Kinasen bei EMT ein, sondern vermittelt auch die Aktivierung des NF κ B Signalweges nach Stimulation mit TNF- α bzw. nach Aktivierung des T-Zellrezeptors sowie der toll-like receptors (TLRs)²⁵⁸. Bei Stimulation mit TGF- β interagiert der TGF- β -Rezeptor mit der E3-Ubiquitin Ligase TRAF6 (TNF Rezeptor assoziierten Faktor 6), welche daraufhin sich selbst an Lysin-63 ubiquitiniert. Diese K63-verknüpften Polyubiquitinketten führen dabei nicht zum Abbau von TRAF6 durch das Proteasom wie K48-verknüpfte Polyubiquitinketten, sondern sind entscheidend für die durch TGF- β stimulierte Aktivierung weiterer Proteine²⁵⁹. An diese K63-Ubiquitinketten wird ein Komplex aus TAB-Proteinen (TAK1 binding protein) sowie TAK1 rekrutiert (transforming growth factor beta-activated kinase 1). Dies bewirkt eine Konformationsänderung von TAK1 und legt so das aktive Zentrum der Kinase frei, wodurch die Kinase zunächst sich selbst autophosphoryliert. TAK1 ist dabei eine MAP3-Kinase, die MAP2-Kinasen wie MKK3/6 phosphoryliert, die wiederum die MAP-Kinasen p38 und JNK aktivieren²³¹. Oxacyclododecindion inhibierte konzentrationsabhängig die Phosphorylierung und somit Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK. Upstream-Analysen ergaben, dass die Aktivierung der MAP2-Kinasen MKK3/6 sowie MKK4/7 ebenfalls durch das Makrolakton gehemmt wird, während die K63-Ubiquitinierung von TRAF6, die zu den ersten Schritten des TGF- β induzierten MAP-Kinase Signalweges gehört, nicht beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Hemmung von TAK1 hin und per Western Blot Analyse konnte bestätigt werden, dass Oxacyclododecindion konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von TAK1 inhibiert. Diese Autophosphorylierung von TAK1, die an Serin- und Threoninresten in der Aktivierungsschleife von TAK1 erfolgt, korreliert dabei mit der katalytischen Aktivität der Kinase²⁶⁰.

Strippoli *et al.* konnten bereits die durch TGF- β induzierte epithelial-mesenchymale Transition durch Verwendung des Makrolaktone 5Z-7-Oxozeaenol hemmen, das in *in vitro*-Studien als irreversibler Inhibitor der ATP-Bindung durch TAK1 charakterisiert wurde^{261,262}. Wie auch Oxacyclododecindion gehört 5Z-7-Oxozeaenol zu der Klasse der Benzolaktone. Diese pilzlichen Metabolite werden über den Polyketidweg synthetisiert und besitzen ein breites Spektrum an biologischen Eigenschaften, zu denen antifungische, phytotoxische, östrogene und antiinflammatorische Aktivitäten zählen, wobei letztere für die Makrolaktone Oxacyclododecindion, 5Z-7-Oxozeaenol und Hypothemycin auch bereits in Tierstudien nachgewiesen werden konnten^{255,263-266}. Dadurch repräsentieren diese Naturstoffe eine äußerst interessante Stoffklasse, da sie, verglichen mit anderen Naturstoffen, trotz ihres relativ einfachen

Aufbaus vielfältige biologische Aktivitäten aufweisen (s. Abb. 66).

5Z-7-Oxozeaenol entfaltet seine Wirkung durch kovalente Bindung an einen reaktiven Cysteinrest (Cys174) in der ATP-Bindestelle von TAK1, wodurch die ATPase-Aktivität der Kinase inhibiert wird²⁶². Dabei findet eine Michael-Addition statt, bei der die *cis*-Enon Einheit des Makrolaktons (Michael-Akzeptor) mit der nukleophilen Thiolgruppe im Cysteinrest der Kinase (Michael-Donator) reagiert (s. Abb. 67). Auch weitere Makrolaktone mit einer *cis*-Enon Gruppe, zu denen Radicolol A, Hypothemycin und LL-783277 zählen, wurden als potente Kinase-Inhibitoren identifiziert. Struktur-bioinformatische Analysen des Kinoms ergaben, dass 46 von 518 putativen Kinasen einen Cysteinrest in einer passenden Position besitzen, um mit der *cis*-Enon Gruppe von Hypothemycin zu reagieren. Tatsächlich werden aber nur 16 dieser 46 Kinasen durch Hypothemycin inhibiert, wobei zudem signifikante Unterschiede in der Inhibierungskinetik auftreten²⁶⁷. Auch Chloro-Radicicol A hemmte nur Enzyme dieser 46 Kinasen umfassenden Untergruppe, wobei auch hier wieder nicht alle Kinasen inhibiert wurden²⁶⁸.

Obwohl anhand der hier vorliegenden Ergebnisse eine Hemmung der Interaktion des

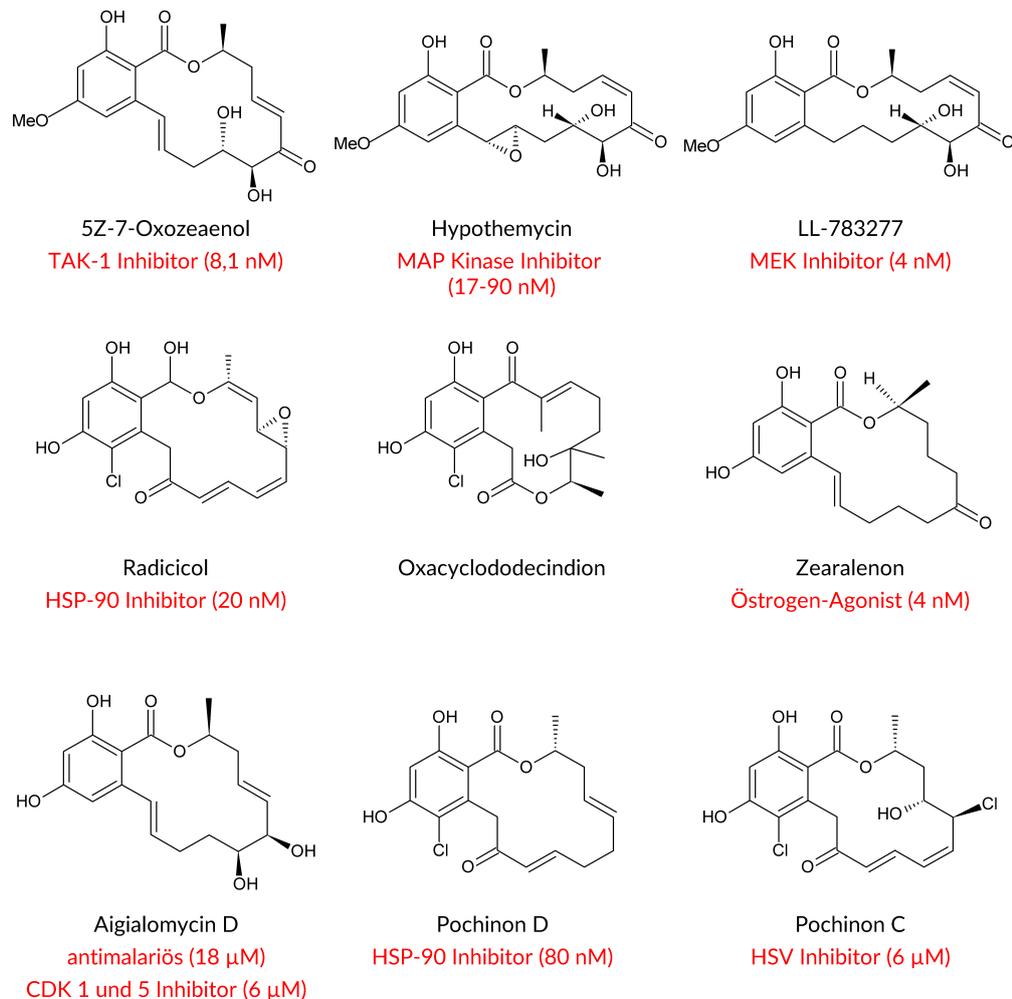


Abbildung 66: Oxacyclododecindion und weitere Makrolaktone pilzlicher Herkunft mit deren erstbeschriebenen biologischen Aktivität (rot).

TAB/TAK1-Komplexes mit den K63-Ubiquitin-Ketten von TRAF6 nicht ausgeschlossen werden kann, legt die ebenfalls bei Oxacyclododecindion vorliegende *cis*-Enon Einheit nahe, dass hier ein ähnlicher Mechanismus vorliegt wie bei den anderen Makrolaktonen mit *cis*-Enon Einheit. Zwar beruht der Wirkmechanismus bei diesen Makrolaktonen immer auf der Michael-Addition der *cis*-Enon Einheit, aber dennoch weisen die einzelnen Makrolaktone starke Unterschiede bezüglich ihrer Spezifität auf. Für 5Z-7-Oxozeaenol konnte mittlerweile zusätzlich zur Inhibierung von TAK1 (IC_{50} 8 nM) die Hemmung der MAP2-Kinase MEK1 (IC_{50} 411 nM) sowie der MAP3-Kinasen ASK-1, MEKK1 und MEKK4 ($IC_{50} \geq 268$ nM) nachgewiesen werden. Für Hypothemycin hingegen konnte im nanomolaren Bereich die Hemmung der Kinasen MEK1/2, PDGFR β (platelet-derived growth factor receptor), FLT-3 (FMS-like tyrosine kinase-3) sowie VEGFR1 und 2 (vascular endothelial growth factor receptor) gezeigt werden, während die MAP-Kinase ERK erst im mikromolaren Bereich durch das Makrolakton inhibiert wurde²⁶⁹. Dies verdeutlicht, dass die Struktur der Makrolaktone deren Spezifität stark beeinflusst.

Für 5Z-7-Oxozeaenol wurden zudem bereits in zwei Zelllinien apoptotische Eigenschaften nachgewiesen^{270,271}. In dieser Arbeit wurde die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose durch Oxacyclododecindion in der T-Zelllinie Jurkat per Durchflusszytometrie untersucht. Dabei erhöhte die Substanz selbst bei einer Konzentration von 670 nM und 16-stündiger Inkubation die Anzahl an nekrotischen Zellen nur um 3,7% bzw. an apoptotischen Zellen nur um 1,6% verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Für 5Z-7-Oxozeaenol hingegen konnten bereits bei einer Konzentration von 625 nM apoptotische Effekte nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass auch diese beiden Naturstoffe ein unterschiedliches Spektrum an Kinasen inhibieren. Obwohl die Inhibierung der Aktivierung von TAK1 eine Erklärung für die Wirkung von Oxacyclododecindion auf den NF κ B- sowie MAPK-Signalweg liefert, kann so nicht der Effekt des Naturstoffes auf Signalwege erklärt werden, die durch STAT- und Smad-Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. Obwohl für die Transkriptionsfaktoren

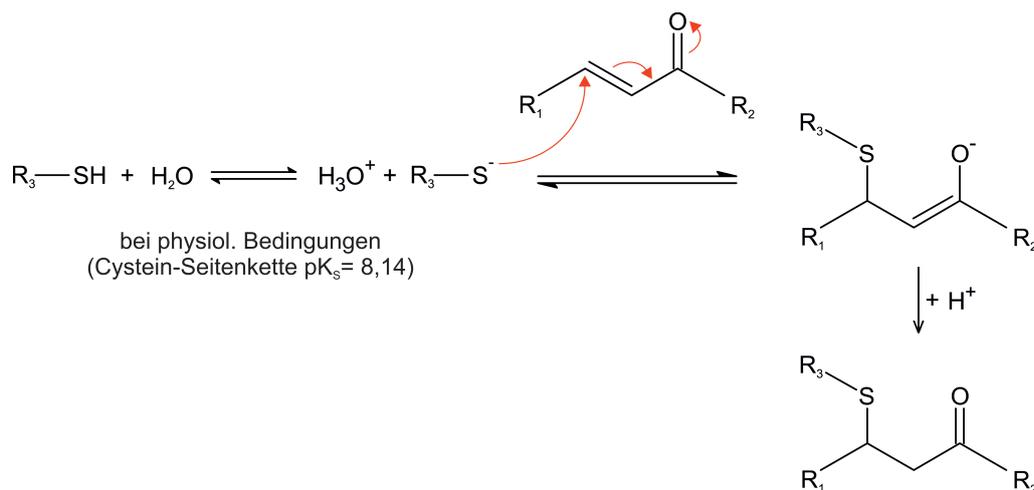


Abbildung 67: Michael-Addition eines nucleophilen Thiolat-Anions an eine Enon-Einheit.

Smad2 sowie Smad3 bereits gezeigt werden konnte, dass deren Phosphorylierung und somit Aktivität indirekt durch Inhibierung von p38 verringert werden kann^{272,273}, wurde von Serwe keine Beeinflussung der Smad2/3-Phosphorylierung durch Oxacyclododecindion nachgewiesen. Auch die Serin-Phosphorylierung der STAT-Transkriptionsfaktoren, an der u.a. p38 beteiligt ist, wurde durch den Naturstoff nicht inhibiert¹⁴⁹. Dies deutet darauf hin, dass Oxacyclododecindion zusätzlich zu TAK1 weitere Kinasen in ihrer Funktion inhibiert, weswegen in weiterführenden Experimenten zunächst die Wirkung von Oxacyclododecindion auf diese 46 Kinasen umfassende Untergruppe getestet werden sollte. Diese Ergebnisse können dabei wichtige Informationen liefern zur Struktur-Aktivitätsbeziehung der Makrolaktone mit *cis*-Enon-Gruppe, die durch ihr therapeutisches Potential zu Leitstrukturen für die Entwicklung von Kinase-Inhibitoren geworden sind²⁶⁸.

3.5 Perspektiven für Single- und Multi-Target-Drugs

Die meisten der bisher für Asthma entwickelten Therapien, die gegen einzelne Zytokine gerichtet sind, lieferten zwar in Tiermodellen vielversprechende Ergebnisse, überzeugten allerdings meistens nicht in den entsprechenden klinischen Studien²⁷⁴. In diesem Zusammenhang wurde schon vielfach diskutiert, ob der Nutzen dieser Therapien womöglich nicht in der allgemeinen Behandlung von Asthma liegt, sondern sie vor allem bei Patientenpopulationen mit spezifischen Phänotypen von Vorteil sein könnten. So verbesserte Lebrikizumab, ein monoklonaler anti-IL-13 Antikörper, die Lungenfunktion von Patienten mit inadäquat kontrolliertem Asthma, wobei Patienten mit hohem Periostinspiegel im Serum, was als Marker für erhöhte IL-13 Konzentrationen dient, stärker von der Therapie profitierten als Patienten mit niedrigem Periostinspiegel²⁷⁵. Auch der gegen IL-5 gerichtete Antikörper Mepolizumab führte lediglich in einer spezifisch selektierten Patientengruppe mit Kortikosteroid-insensitiver, persistierender Eosinophilie, die als Folge von erhöhten IL-5 Konzentrationen auftritt, zu signifikanten Verbesserungen der asthmatischen Symptome²². Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass bei heterogenen Krankheiten wie Asthma der Schlüssel zu einer effizienten Anti-Zytokin-Therapie in personalisierten Behandlungen liegt, die auf den speziellen Phänotyp des Patienten angepasst sind. Allerdings fehlen zum momentanen Zeitpunkt geeignete Biomarker, um klinisch relevante Phänotypen genau identifizieren zu können und asthmatische Parameter dauerhaft überwachen zu können²⁷⁶. Dabei könnten Biomarker in Zukunft kombiniert mit genetic profiling auch dazu genutzt werden, um eine Prädisposition für Asthma festzustellen und so frühzeitig präventive Maßnahmen zu ermöglichen. Vor allem lokal angewandte Inhibitoren des IL-4 abhängigen Signalweges, wie z.B. Cyclonodiol, könnten dann bei einer Prädisposition für allergisches Asthma eingesetzt werden, um die Differenzierung von T_H2-Zellen, die vor allem in der frühen Entstehungsphase von Asthma stattfindet, zu reduzieren.

Obwohl der Fokus der Wirkstoffforschung während des letzten Jahrzehnts hauptsächlich auf Einzeltarget-Strategien beruhte, verdeutlichen retrospektive Analysen bereits zugelassener Wirkstoffe sowie Erkenntnisse aus der Systembiologie, dass viele erfolgreiche Wirkstoffe wie z.B. Aspirin ihre Effektivität nur aufgrund von Multi-target Eigenschaften erzielen²⁷⁷. Dies zeichnet sich auch auf dem Arzneimittelmarkt ab, denn obwohl die Kombination aus *in vitro*

high-throughput screening (HTS) mit validierten Zielstrukturen und Reinsubstanzbanken es ermöglicht hat, in einer kurzen Zeitspanne eine Vielzahl an Substanzen auf ihre biologische Aktivität hin zu untersuchen, nahm die Zahl der Neuzulassungen auf dem Arzneimittelmarkt nicht merklich zu¹⁵⁶. Dies beruht vor allem auf der Tatsache, dass die meisten Substanzen, die durch diese Methode als biologisch aktiv identifiziert wurden, *in vivo* keine Wirksamkeit mehr aufweisen, da Einzeltarget-basierte Screenings nicht die Komplexität biologischer Netzwerke sowie deren intrinsische Robustheit gegenüber Störungen berücksichtigen. Dies wird auch durch Netzwerk-Modelle gestützt, laut denen eine partielle Inhibition mehrerer targets bei multifaktoriellen Krankheiten effektiver ist als die vollständige Inhibition einer einzelnen Zielstruktur^{278,279}. So konnte der Multi-Target Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor Sorafenib, der u.a. die Asthma-relevanten Kinasen Raf-1, VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) und die p38 MAP-Kinase inhibiert, bei Mäusen sowohl die T_H2-typische Eosinophilie sowie die T_H17-charakteristische Neutrophilie in den Atemwegen der Versuchstiere um etwa 70% senken²⁸⁰, was nochmals das Potential von Multi-target drugs zur Behandlung heterogener Krankheiten unterstreicht.

LITERATUR

- 1 Mullane K (2011). Asthma translational medicine: report card. *Biochem Pharmacol* **82**, 567-585.
- 2 Striebel HW (2012). *Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin Vol. 7 Schattauer*.
- 3 Bergeron C, Al-Ramli W & Hamid Q (2009). Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* **6**, 301-305.
- 4 van de Kant KD, Klaassen EM, Jobsis Q *et al.* (2009). Early diagnosis of asthma in young children by using non-invasive biomarkers of airway inflammation and early lung function measurements: study protocol of a case-control study. *BMC Public Health* **9**, 210.
- 5 Network GA (2014). *The Global Asthma Report 2014*. (Auckland, New Zealand).
- 6 Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2011). *Global Initiative for Asthma (GINA)*. (<http://www.ginasthma.org/>).
- 7 Corren J (2013). Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discov Med* **15**, 243-249.
- 8 Agache I, Akdis C, Jutel M *et al.* (2012). Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy* **67**, 835-846.
- 9 Wenzel SE (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* **18**, 716-725.
- 10 Wenzel SE (2013). Complex phenotypes in asthma: current definitions. *Pulm Pharmacol Ther* **26**, 710-715.
- 11 Vennera Mdel C & Picado C (2014). Novel diagnostic approaches and biological therapeutics for intrinsic asthma. *Int J Gen Med* **7**, 365-371.
- 12 Dahlberg PE & Busse WW (2009). Is intrinsic asthma synonymous with infection? *Clin Exp Allergy* **39**, 1324-1329.
- 13 Gibeon D & Menzies-Gow A (2013). Recent changes in the drug treatment of allergic asthma. *Clin Med* **13**, 477-481.
- 14 Wenzel S (2012). Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clin Exp Allergy* **42**, 650-658.
- 15 Wenzel SE (2006). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* **368**, 804-813.
- 16 King CS & Moores LK (2008). Clinical asthma syndromes and important asthma mimics. *Respir Care* **53**, 568-580;.
- 17 Agbetile J & Green R (2011). New therapies and management strategies in the treatment of asthma: patient-focused developments. *J Asthma Allergy* **4**, 1-12.

-
- 18 Vock C, Hauber HP & Wegmann M (2010). The other T helper cells in asthma pathogenesis. *J Allergy (Cairo)* **2010**, 14.
 - 19 Lloyd CM & Hessel EM (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol* **10**, 838-848.
 - 20 Olin JT & Wechsler ME (2014). Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. *Bmj-British Medical Journal* **349**.
 - 21 Mamessier E & Magnan A (2006). Cytokines in atopic diseases: revisiting the Th2 dogma. *Eur J Dermatol* **16**, 103-113.
 - 22 Garcia G, Taille C, Laveneziana P *et al.* (2013). Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma. *Eur Respir Rev* **22**, 251-257.
 - 23 Wills-Karp M & Chiaramonte M (2003). Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med* **9**, 21-27.
 - 24 Wills-Karp M (2004). Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* **202**, 175-190.
 - 25 Finkelman FD, Perkins C, Smulian G *et al.* (2009). Selective stimulation of IL-4 receptor on smooth muscle induces airway hyperresponsiveness in mice. *The Journal of Immunology* **182**, 4.
 - 26 Desai SN, Van G, Robson J *et al.* (1993). Human eosinophil major basic protein augments bronchoconstriction induced by intravenous agonists in guinea pigs. *Agents Actions* **39 Spec No**, C132-135.
 - 27 Gleich GJ & Adolphson C (1993). Bronchial hyperreactivity and eosinophil granule proteins. *Agents Actions Suppl* **43**, 223-230.
 - 28 Acharya KR & Ackerman SJ (2014). Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem* **289**, 17406-17415.
 - 29 Trivedi SG & Lloyd CM (2007). Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1269-1289.
 - 30 Abu-Ghazaleh RI, Gleich GJ & Prendergast FG (1992). Interaction of eosinophil granule major basic protein with synthetic lipid bilayers: a mechanism for toxicity. *J Membr Biol* **128**, 153-164.
 - 31 Rankin JA, Harris P & Ackerman SJ (1992). The effects of eosinophil-granule major basic protein on lung-macrophage superoxide anion generation. *J Allergy Clin Immunol* **89**, 746-752.
 - 32 Shenoy NG, Gleich GJ & Thomas LL (2003). Eosinophil major basic protein stimulates neutrophil superoxide production by a class IA phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C-zeta-dependent pathway. *J Immunol* **171**, 3734-3741.

- 33 Adcock IM, Brown CR, Kwon O *et al.* (1994). Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in the human epithelial cell line A549. *Biochem Soc Trans* **22**, 186S.
- 34 Haddad JJ, Olver RE & Land SC (2000). Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1alpha and NF-kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* **275**, 21130-21139.
- 35 Henricks PA & Nijkamp FP (2001). Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* **14**, 409-420.
- 36 Pegorier S, Wagner LA, Gleich GJ *et al.* (2006). Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. *J Immunol* **177**, 4861-4869.
- 37 Kearley J, Barker JE, Robinson DS *et al.* (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* **202**, 1539-1547.
- 38 Heinrich PC, Müller M & Graeve L (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer Berlin Heidelberg.
- 39 Kraneveld AD, van der Kleij HP, Kool M *et al.* (2002). Key role for mast cells in nonatopic asthma. *J Immunol* **169**, 2044-2053.
- 40 Cox G (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* **154**, 4719-4725.
- 41 Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP *et al.* (1989). An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* **250**, 598-605.
- 42 Alcorn JF, Crowe CR & Kolls JK (2010). TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol* **72**, 495-516.
- 43 Barczyk A, Pierzchala W & Sozanska E (2003). Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* **97**, 726-733.
- 44 Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F *et al.* (2009). T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 1185-1187.
- 45 Bullens DM, Truyen E, Coteur L *et al.* (2006). IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* **7**, 135.
- 46 McKinley L, Alcorn JF, Peterson A *et al.* (2008). TH17 cells mediate steroid-

-
- resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* **181**, 4089-4097.
- 47 Curtis MM & Way SS (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* **126**, 177-185.
- 48 Wiehler S & Proud D (2007). Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L505-515.
- 49 Marks BR & Craft J (2009). Barrier immunity and IL-17. *Semin Immunol* **21**, 164-171.
- 50 Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP *et al.* (2008). gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* **20**, 353-357.
- 51 Wu J, Groh V & Spies T (2002). T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J Immunol* **169**, 1236-1240.
- 52 Bauer S, Groh V, Wu J *et al.* (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727-729.
- 53 Pennington DJ, Vermijlen D, Wise EL *et al.* (2005). The integration of conventional and unconventional T cells that characterizes cell-mediated responses. *Adv Immunol* **87**, 27-59.
- 54 Tang D, Kang R, Coyne CB *et al.* (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* **249**, 158-175.
- 55 Jin W & Dong C (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes & Infections* **2**, e60.
- 56 Kumar RK, Yang M, Herbert C *et al.* (2012). Interferon-gamma, pulmonary macrophages and airway responsiveness in asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets* **11**, 292-297.
- 57 Kim YS, Choi EJ, Lee WH *et al.* (2013). Extracellular vesicles, especially derived from Gram-negative bacteria, in indoor dust induce neutrophilic pulmonary inflammation associated with both Th1 and Th17 cell responses. *Clin Exp Allergy* **43**, 443-454.
- 58 Holgate ST (2011). The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* **242**, 205-219.
- 59 Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D *et al.* (2011). The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Ther Adv Respir Dis* **5**, 255-273.
- 60 Yang SJ, Delbert RD & Samuel JW (2012). IL-13, Asthma and Glycosylation in Airway Epithelial Repair.

- 61 Hermans C & Bernard A (1999). Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 646-678.
- 62 Gehr P, Im Hof V, Geiser M *et al.* (2000). The mucociliary system of the lung-role of surfactants. *Schweiz Med Wochenschr* **130**, 691-698.
- 63 Sibille Y & Reynolds HY (1990). Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* **141**, 471-501.
- 64 Hackett TL, Singhera GK, Shaheen F *et al.* (2011). Intrinsic phenotypic differences of asthmatic epithelium and its inflammatory responses to respiratory syncytial virus and air pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**, 1090-1100.
- 65 Coleman JM, Naik C, Holguin F *et al.* (2012). Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. *Thorax* **67**, 1061-1066.
- 66 Freishtat RJ, Watson AM, Benton AS *et al.* (2011). Asthmatic airway epithelium is intrinsically inflammatory and mitotically dyssynchronous. *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**, 863-869.
- 67 Bals R & Hiemstra PS (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* **23**, 327-333.
- 68 West EE, Kashyap M & Leonard WJ (2012). TSLP: A Key Regulator of Asthma Pathogenesis. *Drug Discov Today Dis Mech* **9**.
- 69 Flynn AN, Vagner J, Schulz S *et al.* (2010). Protease activated receptor-2 (PAR-2) in the airway epithelium: a sentinel receptor triggered by the asthma associated allergen *Alternaria alternata*. *The FASEB Journal* **24**, 612.612.
- 70 Grotenboer NS, Ketelaar ME, Koppelman GH *et al.* (2013). Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 856-865.
- 71 Wjst M, Sargurupremraj M & Arnold M (2013). Genome-wide association studies in asthma: what they really told us about pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **13**, 112-118.
- 72 Mayuzumi N, Matsushima H & Takashima A (2009). IL-33 promotes DC development in BM culture by triggering GM-CSF production. *Eur J Immunol* **39**, 3331-3342.
- 73 Iikura M, Suto H, Kajiwara N *et al.* (2007). IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest* **87**, 971-978.
- 74 Kroeger KM, Sullivan BM & Locksley RM (2009). IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38alpha-dependent pathway. *J*

-
- Leukoc Biol **86**, 769-778.
- 75 Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P *et al.* (2010). IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol* **185**, 3472-3480.
- 76 Hackett TL (2012). Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **12**, 53-59.
- 77 Bai TR & Knight DA (2005). Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci (Lond)* **108**, 463-477.
- 78 Holgate ST, Roberts G, Arshad HS *et al.* (2009). The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc* **6**, 655-659.
- 79 Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ *et al.* (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13180-13185.
- 80 Lee K & Nelson CM (2012). New insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol* **294**, 171-221.
- 81 Thiery JP & Sleeman JP (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 131-142.
- 82 Chaffer CL, Thompson EW & Williams ED (2007). Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* **185**, 7-19.
- 83 Kalluri R & Neilson EG (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112**, 1776-1784.
- 84 Flier SN, Tanjore H, Kokkotou EG *et al.* (2010). Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis. *J Biol Chem* **285**, 20202-20212.
- 85 Kriz W, Kaissling B & Le Hir M (2011). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest* **121**, 468-474.
- 86 Saika S, Kono-Saika S, Ohnishi Y *et al.* (2004). Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am J Pathol* **164**, 651-663.
- 87 Zeisberg M, Yang C, Martino M *et al.* (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* **282**, 23337-23347.
- 88 Poeggel G (2013). *Kurzlehrbuch Biologie*. Thieme.
- 89 Meng W & Takeichi M (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**.

- 90 Schiebler TH & Korf HW (2007). Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. Steinkopff Verlag.
- 91 Burridge K, Fath K, Kelly T *et al.* (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 487-525.
- 92 Mitchison TJ & Cramer LP (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* **84**, 371-379.
- 93 Kalluri R & Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-1428.
- 94 Zavadil J & Bottinger EP (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764-5774.
- 95 Lamouille S, Xu J & Derynck R (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-196.
- 96 Pawankar R, Holgate ST & Rosenwasser LJ (2009). Allergy Frontiers: Classification and Pathomechanisms. Springer.
- 97 Voulgari A & Pintzas A (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* **1796**, 75-90.
- 98 Kubiczikova L, Sedlarikova L, Hajek R *et al.* (2012). TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* **10**, 183.
- 99 Akhurst RJ & Hata A (2012). Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 790-811.
- 100 Doerner AM & Zuraw BL (2009). TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res* **10**, 100.
- 101 Massague J (2012). TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 616-630.
- 102 Shi Y & Massague J (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.
- 103 Yan X, Liu Z & Chen Y (2009). Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **41**, 263-272.
- 104 Davis-Dusenbery BN & Hata A (2011). Smad-mediated miRNA processing: a critical role for a conserved RNA sequence. *RNA Biol* **8**, 71-76.
- 105 Willis BC & Borok Z (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L525-534.

-
- 106 Bai D, Ueno L & Vogt PK (2009). Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer* **125**, 2863-2870.
- 107 Narumiya S, Tanji M & Ishizaki T (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 65-76.
- 108 Li CW, Xia W, Huo L *et al.* (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res* **72**, 1290-1300.
- 109 Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE *et al.* (2009). Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* **28**, 2940-2947.
- 110 Tao Y, Pinzi V, Bourhis J *et al.* (2007). Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **4**, 591-602.
- 111 Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P *et al.* (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* **2014**.
- 112 Bjermer L (2008). Evaluating combination therapies for asthma: pros, cons, and comparative benefits. *Ther Adv Respir Dis* **2**, 149-161.
- 113 Cazzola M, Calzetta L & Matera MG (2011). beta(2) -adrenoceptor agonists: current and future direction. *Br J Pharmacol* **163**, 4-17.
- 114 Ramanujan K (2006). Common beta-agonist inhalers more than double death rate in COPD patients.
- 115 Rossi GA, Cerasoli F & Cazzola M (2007). Safety of inhaled corticosteroids: room for improvement. *Pulm Pharmacol Ther* **20**, 23-35.
- 116 Derendorf H, Nave R, Drollmann A *et al.* (2006). Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma. *Eur Respir J* **28**, 1042-1050.
- 117 Barnes PJ (2011). Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol* **163**, 29-43.
- 118 Zdanowicz MM (2007). Pharmacotherapy of asthma. *Am J Pharm Educ* **71**, 98.
- 119 Holgate ST (2014). New strategies with anti-IgE in allergic diseases. *World Allergy Organ J* **7**, 17.
- 120 (2011). Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL) in Anlage IV: Therapiehinweis zu Omalizumab. *Dtsch Arztebl International* **108**, 600-604.
- 121 Girodet PO, Ozier A, Bara I *et al.* (2011). Airway remodeling in asthma: new

- mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther* **130**, 325-337.
- 122 Newman DJ & Cragg GM (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **75**, 311-335.
- 123 Gunatilaka AL & Wijeratne EK NATURAL PRODUCTS FROM BACTERIA AND FUNGI.
- 124 Manzoni M & Rollini M (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 555-564.
- 125 Dennler S, Itoh S, Vivien D *et al.* (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* **17**, 3091-3100.
- 126 Weidler M, Rether J, Anke T *et al.* (2000). Inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation by a new class of bioactive cyclopentenone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 447-453.
- 127 Rether J, Erkel G, Sterner O *et al.* (2005). Inhibition of TNF-alpha promoter activity and synthesis by A11-99-1, a new cyclopentenone from the ascomycete *Mollisia melaleuca*. *Z Naturforsch C* **60**, 478-484.
- 128 Sambrook J & Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 129 Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C *et al.* (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* **26**, 509-515.
- 130 Pfaffl MW (2004). in *Quantification strategies in real-time PCR Vol. 1* (ed Bustin SA) Ch. 3, 89-113.
- 131 Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45-e45.
- 132 Andrews NC & Faller DV (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**, 2499.
- 133 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- 134 Rudolph K (2010). *Isolierung und Charakterisierung neuer Inhibitoren Asthma-relevanter Signalwege aus Pilzen*, TU Kaiserslautern.
- 135 Langhanki J, Rudolph K, Erkel G *et al.* (2014). Total synthesis and biological

-
- evaluation of the natural product (-)-cyclonerodiol, a new inhibitor of IL-4 signaling. *Org Biomol Chem*.
- 136 McNabb DS, Reed R & Marciniak RA (2005). Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**, 1539-1549.
- 137 Oh CK, Geba GP & Molfino N (2010). Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *Eur Respir Rev* **19**, 46-54.
- 138 Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF *et al.* (2005). The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol* **175**, 5341-5350.
- 139 Georas SN, Cumberland JE, Burke TF *et al.* (1998). Stat6 inhibits human interleukin-4 promoter activity in T cells. *Blood* **92**, 4529-4538.
- 140 Kim Y, Kwon EK, Jeon JH *et al.* (2012). Activation of the STAT6 transcription factor in Jurkat T-cells by the herpesvirus saimiri Tip protein. *J Gen Virol* **93**, 330-340.
- 141 Mikita T, Campbell D, Wu P *et al.* (1996). Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol Cell Biol* **16**, 5811-5820.
- 142 Goenka S & Boothby M (2006). Selective potentiation of Stat-dependent gene expression by collaborator of Stat6 (CoaSt6), a transcriptional cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4210-4215.
- 143 Wurster AL, Tanaka T & Grusby MJ (2000). The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* **19**, 2577-2584.
- 144 Choi H, Choi H, Han J *et al.* (2013). IL-4 inhibits the melanogenesis of normal human melanocytes through the JAK2-STAT6 signaling pathway. *J Invest Dermatol* **133**, 528-536.
- 145 Andrews RP, Ericksen MB, Cunningham CM *et al.* (2002). Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. *J Biol Chem* **277**, 36563-36569.
- 146 Walker SR, Xiang M & Frank DA (2014). STAT3 Activity and Function in Cancer: Modulation by STAT5 and miR-146b. *Cancers (Basel)* **6**, 958-968.
- 147 Chen J & Li Q (2011). Life and death of transcriptional co-activator p300. *Epi-genetics* **6**, 957-961.
- 148 Levy DE & Darnell JE, Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 651-662.

- 149 Rudolph K, Serwe A & Erkel G (2013). Inhibition of TGF-beta signaling by the fungal lactones (S)-curvularin, dehydrocurvularin, oxacyclododecindione and galiellalactone. *Cytokine* **61**, 285-296.
- 150 Serwe A (2008). Hemmung der Angiogenese und Tumorprogression durch Blockierung der TGF- β -Signaltransduktion [TGF-Beta-Signaltransduktion] durch neue Wirkstoffe isoliert aus Pilzen. WiKu.
- 151 Erkel G, Belahmer H, Serwe A *et al.* (2008). Oxacyclododecindione, a Novel Inhibitor of IL-4 Signaling from *Exserohilum rostratum*. *J Antibiot (Tokyo)* **61**, 6.
- 152 Takahama Y & Nakauchi H (1996). Phorbol ester and calcium ionophore can replace TCR signals that induce positive selection of CD4 T cells. *J Immunol* **157**, 1508-1513.
- 153 Liu R (2008). *Water-Insoluble Drug Formulation, Second Edition*. Taylor & Francis.
- 154 Creed TJ, Lee RW, Newcomb PV *et al.* (2009). The effects of cytokines on suppression of lymphocyte proliferation by dexamethasone. *J Immunol* **183**, 164-171.
- 155 Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD *et al.* (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*.
- 156 Walsh GM (2013). An update on biologic-based therapy in asthma. *Immunotherapy* **5**, 1255-1264.
- 157 Medina-Franco JL, Giulianotti MA, Welmaker GS *et al.* (2013). Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discov Today* **18**, 495-501.
- 158 Mocsai A, Kovacs L & Gergely P (2014). What is the future of targeted therapy in rheumatology: biologics or small molecules? *BMC Med* **12**, 43.
- 159 Craik DJ, Fairlie DP, Liras S *et al.* (2013). The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des* **81**, 136-147.
- 160 Pelaia G, Vatrella A & Maselli R (2012). The potential of biologics for the treatment of asthma. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 958-972.
- 161 Imai K & Takaoka A (2006). Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 714-727.
- 162 Welsing PM, Bijl M, van Bodegraven AA *et al.* (2011). Cost effectiveness of biologics: high costs are the other face of success. *Ned Tijdschr Geneeskd* **155**, A3026.
- 163 Shapiro RJ, Singh K & Mukim M (2008). The potential American market for

generic biological treatments and the associated cost savings.

- 164 Nozoe S, Goi M & Morisaki N (1970). Structure of cyclonerodiol. *Tetrahedron Lett.* **15**, 1293-1296.
- 165 Laurent D, Goasdoué N, Kohler F *et al.* (1990). Characterisation of cyclonerodiol isolated from corn infested by *Fusarium moniliforme* shield.: One- and two-dimensional ¹H and ¹³C NMR study. *Organic Magnetic Resonance* **28**, 662-664.
- 166 Cutler HG, Jacyno JM, Phillips RS *et al.* (1991). Cyclonerodiol from a Novel Source, *Trichoderma koningii*: Plant Growth Regulatory Activity. *55* **1**.
- 167 Yue Q, Miller CJ, White Jr. JF *et al.* (2000). Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *J Agric Food Chem* **48**, 4687-4692.
- 168 Cane DE, Iyengar R & Shiao MS (1981). Cyclonerodiol Biosynthesis and the Enzymatic Conversion of Farnesyl to Nerolidyl Pyrophosphate. *Journal of American Chemistry Society* **103**, 914-931.
- 169 Keller NP, Turner G & Bennett JW (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**, 937-947.
- 170 Evans RE, Hanson JR & Nyfeler R (1976). Studies in terpenoid biosynthesis. Part XVII. Biosynthesis of the Sesquiterpenoids Cyclonerodiol and Cyclonerotriol. *J Chem Soc Perkin 1*, 1214-1217.
- 171 Rahman A-u (2000). *Studies in natural products chemistry (Part B)*. Vol. 21 3-812 Elsevier.
- 172 Matsuki Y, Kodama M & Itô S (1979). Regio- and Stereoselective Cyclization of Linalool and Nerolidol with Mercuric Salts. Synthesis of Iridanols and Cyclonerodiol. Pergamon Press Ltd., 2901-2904.
- 173 Schmidt-Dannert C (2014). in *Biosynthesis of Terpenoid Natural Products in Fungi Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* Ch. 283, 1-43 Springer Berlin Heidelberg.
- 174 Bunch AW & Harris RE (1986). The manipulation of micro-organisms for the production of secondary metabolites. *Biotechnol Genet Eng Rev* **4**, 117-144.
- 175 Steinke JW & Borish L (2001). Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* **2**, 66-70.
- 176 Walsh GM (2012). An update on emerging drugs for asthma. *Expert Opin Emerg Drugs* **17**, 37-42.
- 177 Kuperman D, Schofield B, Wills-Karp M *et al.* (1998). Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from

- antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med* **187**, 939-948.
- 178 Zhu Z, Homer RJ, Wang Z *et al.* (1999). Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* **103**, 779-788.
- 179 Renkonen J, Joenvaara S, Parviainen V *et al.* (2010). Network analysis of single nucleotide polymorphisms in asthma. *J Asthma Allergy* **3**, 177-186.
- 180 Barnes PJ (2001). Cytokine modulators as novel therapies for airway disease. *Eur Respir J Suppl* **34**, 67s-77s.
- 181 Barnes PJ, Drazen JM, Rennard SI *et al.* (2002). *Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management*. Elsevier Science.
- 182 Barnes PJ, Drazen JM, Rennard SI *et al.* (2009). *Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management*. Elsevier Science.
- 183 Ceyhan BB, Sungur M, Celikel T *et al.* (1995). Role of the adhesion molecule ICAM-1 in asthma. *J Asthma* **32**, 419-427.
- 184 Sidhu SS, Yuan S, Innes AL *et al.* (2010). Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14170-14175.
- 185 Yates DH (2001). Role of exhaled nitric oxide in asthma. *Immunol Cell Biol* **79**, 178-190.
- 186 Cox G, Gauldie J & Jordana M (1992). Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**, 507-513.
- 187 Lee B, Sharron M, Montaner LJ *et al.* (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5215-5220.
- 188 Mantel PY, Kuipers H, Boyman O *et al.* (2007). GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* **5**, e329.
- 189 Smeets RL, Fleuren WW, He X *et al.* (2012). Molecular pathway profiling of T lymphocyte signal transduction pathways; Th1 and Th2 genomic fingerprints are defined by TCR and CD28-mediated signaling. *BMC Immunol* **13**, 12.
- 190 Konstantinidis AK, Puddicombe SM, Mochizuki A *et al.* (2008). Cellular localization of interleukin 13 receptor alpha2 in human primary bronchial epithelial cells and fibroblasts. *J Investig Allergol Clin Immunol* **18**, 174-180.

-
- 191 Macian F, Lopez-Rodriguez C & Rao A (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-2489.
- 192 Gallelli L, Busceti MT, Vatrella A *et al.* (2013). Update on anticytokine treatment for asthma. *Biomed Res Int* **2013**, 104315.
- 193 Wenzel S, Ford L, Pearlman D *et al.* (2013). Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* **368**, 2455-2466.
- 194 Greenhalgh CJ & Hilton DJ (2001). Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol* **70**, 348-356.
- 195 Miklossy G, Hilliard TS & Turkson J (2013). Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 611-629.
- 196 Thompson JE, Cubbon RM, Cummings RT *et al.* (2002). Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycline: a Jak protein kinase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 1219-1223.
- 197 Riese RJ, Krishnaswami S & Kremer J (2010). Inhibition of JAK kinases in patients with rheumatoid arthritis: scientific rationale and clinical outcomes. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **24**, 513-526.
- 198 Shin DS, Kim HN, Shin KD *et al.* (2009). Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells. *Cancer Res* **69**, 193-202.
- 199 Reich NC (2013). STATs get their move on. *JAKSTAT* **2**, e27080.
- 200 Weidler M, Rether J, Anke T *et al.* (2000). Inhibition of interleukin-6 signaling by galactinolactone. *FEBS Lett* **484**, 1-6.
- 201 Yue P & Turkson J (2009). Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? *Expert Opin Investig Drugs* **18**, 45-56.
- 202 Konjević G, Radenković S, Vuletić A *et al.* (2013). STAT Transcription Factors in Tumor Development and Targeted Therapy of Malignancies.
- 203 Shankaranarayanan P, Chaitidis P, Kuhn H *et al.* (2001). Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J Biol Chem* **276**, 42753-42760.
- 204 Gingras S, Simard J, Groner B *et al.* (1999). p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6. *Nucleic Acids Res* **27**, 2722-2729.
- 205 Pesu M, Takaluoma K, Aittomäki S *et al.* (2000). Interleukin-4-induced transcriptional activation by Stat6 involves multiple serine/threonine kinase pathways and serine phosphorylation of Stat6. *Blood* **95**, 494-502.

- 206 Valineva T, Yang J, Palovuori R *et al.* (2005). The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6. *J Biol Chem* **280**, 14989-14996.
- 207 Zhang J, Yang J, Roy SK *et al.* (2003). The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9342-9347.
- 208 Wen Z, Zhong Z & Darnell JE, Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241-250.
- 209 Kushal S, Wang H, Laszlo CF *et al.* (2011). Inhibition of hypoxia-inducible transcription factor complex with designed epipolythiodiketopiperazine. *Biopolymers* **95**, 8-16.
- 210 Loriot Y, Perlemuter G, Malka D *et al.* (2008). Drug insight: gastrointestinal and hepatic adverse effects of molecular-targeted agents in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* **5**, 268-278.
- 211 Daniel C, Salvekar A & Schindler U (2000). A gain-of-function mutation in STAT6. *J Biol Chem* **275**, 14255-14259.
- 212 Holgate ST, Davies DE, Lackie PM *et al.* (2000). Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**, 193-204.
- 213 Liu X (2008). Inflammatory cytokines augments TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I. *Cell Motil Cytoskeleton* **65**, 935-944.
- 214 Wang YH & Wills-Karp M (2011). The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* **11**, 388-394.
- 215 Johnson JR, Nishioka M, Chakir J *et al.* (2013). IL-22 contributes to TGF-beta1-mediated epithelial-mesenchymal transition in asthmatic bronchial epithelial cells. *Respir Res* **14**, 118.
- 216 Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S *et al.* (2011). Simultaneous stimulation with TGF-beta1 and TNF-alpha induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* **155**, 119-128.
- 217 Camara J & Jarai G (2010). Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha. *Fibrogenesis Tissue Repair* **3**, 2.
- 218 Naber HP, Drabsch Y, Snaar-Jagalska BE *et al.* (2013). Snail and Slug, key regulators of TGF-beta-induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell

-
- invasion. *Biochem Biophys Res Commun* **435**, 58-63.
- 219 Ji X, Li J, Xu L *et al.* (2013). IL4 and IL-17A provide a Th2/Th17-polarized inflammatory milieu in favor of TGF-beta1 to induce bronchial epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Int J Clin Exp Pathol* **6**, 1481-1492.
- 220 Rojas A, Liu G, Coleman I *et al.* (2011). IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. *Oncogene* **30**, 2345-2355.
- 221 Peinado H, Olmeda D & Cano A (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **7**, 415-428.
- 222 Vincent T, Neve EP, Johnson JR *et al.* (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* **11**, 943-950.
- 223 Garg M (2013). Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells* **5**, 188-195.
- 224 Wang Y, Shi J, Chai K *et al.* (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* **13**, 963-972.
- 225 Dibrov A, Kashour T & Amara FM (2006). The role of transforming growth factor beta signaling in messenger RNA stability. *Growth Factors* **24**, 1-11.
- 226 Davidson JM (2002). Smad about elastin regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 164-166.
- 227 Arici A, MacDonald PC & Casey ML (1996). Modulation of the levels of interleukin-8 messenger ribonucleic acid and interleukin-8 protein synthesis in human endometrial stromal cells by transforming growth factor-beta 1. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 3004-3009.
- 228 Kucich U, Rosenbloom JC, Abrams WR *et al.* (2002). Transforming growth factor-beta stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C-delta, and p38. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 183-188.
- 229 Patil C, Zhu X, Rossa C, Jr. *et al.* (2004). p38 MAPK regulates IL-1beta induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. *Immunol Invest* **33**, 213-233.
- 230 Yu L, Hebert MC & Zhang YE (2002). TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* **21**, 3749-3759.
- 231 Gui T, Sun Y, Shimokado A *et al.* (2012). The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF-beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J*

Signal Transduct **2012**, 289243.

- 232 Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK *et al.* (2002). p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* **115**, 3193-3206.
- 233 Liu Q, Zhang Y, Mao H *et al.* (2012). A crosstalk between the Smad and JNK signaling in the TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in rat peritoneal mesothelial cells. *PLoS One* **7**, e32009.
- 234 Hanash AM, Dudakov JA, Hua G *et al.* (2012). Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* **37**, 339-350.
- 235 Pennino D, Bhavsar PK, Effner R *et al.* (2013). IL-22 suppresses IFN-gamma-mediated lung inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 562-570.
- 236 Muhl H, Scheiermann P, Bachmann M *et al.* (2013). IL-22 in tissue-protective therapy. *Br J Pharmacol* **169**, 761-771.
- 237 Nakagome K, Imamura M, Kawahata K *et al.* (2011). High expression of IL-22 suppresses antigen-induced immune responses and eosinophilic airway inflammation via an IL-10-associated mechanism. *J Immunol* **187**, 5077-5089.
- 238 Zhao Y, Yang J, Gao YD *et al.* (2010). Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* **151**, 297-307.
- 239 Barnes PJ (2008). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* **118**, 3546-3556.
- 240 Asherson RA, Cervera R, Triplett DA *et al.* (2001). *Vascular Manifestations of Systemic Autoimmune Diseases*. CRC Press.
- 241 Tauber J, Rudolph K, Rohr M *et al.* (2015). Synthetic Approaches to Anti-Inflammatory Macrolactones of the Oxacyclododecindione Type. *European Journal of Organic Chemistry*, 23.
- 242 Richter J, Sandjo LP, Liermann JC *et al.* (2015). 4-Dechloro-14-deoxy-oxacyclododecindione and 14-deoxy-oxacyclododecindione, two inhibitors of inducible connective tissue growth factor expression from the imperfect fungus *Exserohilum rostratum*. *Bioorg Med Chem* **23**, 556-563.
- 243 Couper KN, Blount DG & Riley EM (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* **180**, 5771-5777.
- 244 Park SJ & Lee YC (2010). Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Respir Res* **11**, 78.
- 245 Korn T, Bettelli E, Oukka M *et al.* (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Im-*

-
- munol **27**, 485-517.
- 246 Chatila T, Silverman L, Miller R *et al.* (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* **143**, 1283-1289.
- 247 de Benedictis FM & Bush A (2012). Corticosteroids in respiratory diseases in children. *Am J Respir Crit Care Med* **185**, 12-23.
- 248 Kaur M, Reynolds S, Smyth LJ *et al.* (2014). The effects of corticosteroids on cytokine production from asthma lung lymphocytes. *Int Immunopharmacol* **23**, 581-584.
- 249 Barnes PJ & Adcock IM (2003). How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med* **139**, 359-370.
- 250 Frevel MA, Bakheet T, Silva AM *et al.* (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol Cell Biol* **23**, 425-436.
- 251 Holtmann H, Winzen R, Holland P *et al.* (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* **19**, 6742-6753.
- 252 Shi M, Zhu J, Wang R *et al.* (2011). Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* **474**, 343-349.
- 253 Murray CS (2008). Can inhaled corticosteroids influence the natural history of asthma? *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **8**, 77-81.
- 254 Salem S, Harris T, Mok JS *et al.* (2012). Transforming growth factor-beta impairs glucocorticoid activity in the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Br J Pharmacol* **166**, 2036-2048.
- 255 Henke J, Erkel G, Brochhausen C *et al.* (2014). The fungal lactone oxacyclododecindione is a potential new therapeutic substance in the treatment of lupus-associated kidney disease. *Kidney Int* **86**, 780-789.
- 256 Ghosh AK & Vaughan DE (2012). PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* **227**, 493-507.
- 257 Denis CM, Chitayat S, Plevin MJ *et al.* (2012). Structural basis of CBP/p300 recruitment in leukemia induction by E2A-PBX1. *Blood* **120**, 3968-3977.
- 258 Landstrom M (2010). The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 585-589.
- 259 Xia ZP, Sun L, Chen X *et al.* (2009). Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* **461**, 114-119.
- 260 Kishimoto K, Matsumoto K & Ninomiya-Tsuji J (2000). TAK1 mitogen-activated

protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem* **275**, 7359-7364.

- 261 Strippoli R, Benedicto I, Perez Lozano ML *et al.* (2012). Inhibition of transforming growth factor-activated kinase 1 (TAK1) blocks and reverses epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells. *PLoS One* **7**, e31492.
- 262 Wu J, Powell F, Larsen NA *et al.* (2013). Mechanism and in vitro pharmacology of TAK1 inhibition by (5Z)-7-Oxozeaenol. *ACS Chem Biol* **8**, 643-650.
- 263 Rawlins P, Mander T, Sadeghi R *et al.* (1999). Inhibition of endotoxin-induced TNF-alpha production in macrophages by 5Z-7-oxo-zeaenol and other fungal resorcylic acid lactones. *Int J Immunopharmacol* **21**, 799-814.
- 264 Winssinger N & Barluenga S (2007). Chemistry and biology of resorcylic acid lactones. *Chem Commun (Camb)*, 22-36.
- 265 Ninomiya-Tsuji J, Kajino T, Ono K *et al.* (2003). A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* **278**, 18485-18490.
- 266 Tanaka H, Nishida K, Sugita K *et al.* (1999). Antitumor efficacy of hypothemycin, a new Ras-signaling inhibitor. *Jpn J Cancer Res* **90**, 1139-1145.
- 267 Jogireddy R, Dakas PY, Valot G *et al.* (2009). Synthesis of a resorcylic acid lactone (RAL) library using fluororous-mixture synthesis and profile of its selectivity against a panel of kinases. *Chemistry* **15**, 11498-11506.
- 268 Dakas PY, Barluenga S, Totzke F *et al.* (2007). Modular synthesis of radicicol A and related resorcylic acid lactones, potent kinase inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 6899-6902.
- 269 Shen W, Mao H, Huang Q *et al.* (2014). Benzenediol lactones: a class of fungal metabolites with diverse structural features and biological activities. *Eur J Med Chem*.
- 270 Acuna UM, Wittwer J, Ayers S *et al.* (2012). Effects of (5Z)-7-oxozeaenol on MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Res* **32**, 2415-2421.
- 271 Singh A, Sweeney MF, Yu M *et al.* (2012). TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers. *Cell* **148**, 639-650.
- 272 Dziembowska M, Danilkiewicz M, Wesolowska A *et al.* (2007). Cross-talk between Smad and p38 MAPK signalling in transforming growth factor beta signal transduction in human glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 1101-1106.
- 273 Xu Q, Tan Y, Zhang K *et al.* (2013). Crosstalk between p38 and Smad3 through TGF-beta1 in JEG-3 choriocarcinoma cells. *Int J Oncol* **43**, 1187-1193.

-
- 274 Walsh GM (2008). Emerging drugs for asthma. *Expert Opin Emerg Drugs* **13**, 643-653.
- 275 Corren J, Lemanske RF, Hanania NA *et al.* (2011). Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* **365**, 1088-1098.
- 276 Vijverberg SJ, Hilvering B, Raaijmakers JA *et al.* (2013). Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. *Biologics* **7**, 199-210.
- 277 Alfonso L, Ai G, Spitale RC *et al.* (2014). Molecular targets of aspirin and cancer prevention. *Br J Cancer* **111**, 61-67.
- 278 Csermely P, Agoston V & Pongor S (2005). The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 178-182.
- 279 Kitano H (2007). A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 202-210.
- 280 Lam JK, Yao X, Fredriksson K *et al.* (2009). in Sorafenib, a Multi-Target Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Attenuates the Induction of Airway Inflammation in a Murine Model of Allergic Asthma American Thoracic Society International Conference Abstracts A2238 American Thoracic Society

ABKÜRZUNGS-

VERZEICHNIS

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
α -SMA	α -smooth muscle actin
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIA	Aspirin induced asthma
Akt.	Proteinase B
ALK	Activin receptor-like kinase
AOA	Allergic occupational asthma
AP	Activator protein
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ARE	Adenylat/Uridylat-reiche Elemente
ASK	Apoptosis signal-regulating kinase
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BD	Bromodomäne
bHLH.	Basic helix-loop-helix
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL	Chemokin (C-C motif) Ligand
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin dependent kinase
CDH	Cadherin
CH.	Cysteine and histidine-rich regions
ChIP	Chromatin-Immunoprecipitation
COX	Cyclooxygenase
CMV	Cytomegalie-Virus
COPD.	Chronic obstructive lung disease
CREB	cAMP response element-binding protein
C _T	Cycle threshold
CTBP	C-terminal binding protein
CTGF	Connective tissue growth factor
CXCL	Chemokin (C-X-C motif) Ligand
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Damage-associated molecular pattern molecule
DEPC.	Diethylpyrocarbonat
Dexa	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA.	Ethylendiamintetraessigsäure

EE	Ethylacetat
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis (aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EIA	Exercise induced asthma
ELK	ETS domain-containing protein
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular regulated kinase
Fc ϵ R	Fc-Rezeptor für IgE
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FLT	FMS-like tyrosine kinase
FSP-1	Fibroblast-specific protein
FZD	Frizzled
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GAS	Interferon- γ Aktivierungssequenz
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GLI1	Glioma 1
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRB	Growth factor receptor bound
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3 β
GTFs	General transcription factors
HAT	Histonacetyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
HH	Hedgehog
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α
HK	Hexokinase
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym A
HPLC	High pressure liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Heat shock protein
HSV	Herpe simplex virus
HTS	High-throughput Screening
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
ICAM	Intracellular adhesion molecule
ICS	inhalierte Kortikosteroide
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IGF.	Insulin-growth factor
IKK α	I κ B-Kinase-Komplex α
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPP.	Isopentenylpyrophosphat
IRF.	Interferon regulatory factor
IRS.	Insulin-Rezeptor-Substrat
ISRE	Interferon-stimulated response element
JAK	Janus-activated kinase
JAM	Junctional adhesion molecule
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KIX	CREB-binding site
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBP	Major basic protein
MCP	Macrophage chemotactic peptide
MEK	Mitogen/Extracellular signal-regulated kinase kinase
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MHC	Major histocompatibility complex
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MLP	Major late promoter
MMP	Matrix-Metalloprotease
mTOR.	Mechanistic target of Rapamycin
NADP.	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NECD.	Notch extracellular domain
NES	nukleäres Exportsignal
NFAT	Nuclear factor of activated t-cells
NF κ B	Nuclear factor- κ B
NICD	Notch intracellular domain
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NTC	no template control
OVA	Ovalbumin
Oxa	Oxacyclododecindion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI.	Plasminogen activator inhibitor
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphat-buffered saline
PCAF	p300/CBP associated-factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIPES	Piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid)
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Postn	Periostin
PP _i	inorganisches Pyrophosphat
PRC	Polycomb repressive complex
PTCH	Patched Receptor
PTPase	Protein-Tyrosin-Phosphatase
QP	Glutamine- and proline-rich domains
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RE	responsive element
RhoA	Ras homolog gene family member A
RID	Receptor interacting domain
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA-Polymerase II
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROR γ t	RAR-related orphan receptor gamma
ROS	Reactive oxygen species
RP	Reversed phase
RT	Raumtemperatur
SBE	Smad binding element
SCP	Small C-terminal domain phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	Sekretierbare plazentale, alkalische Phosphatase
SHH	Sonic hedgehog
SID	Steroid receptor coactivator-1 interaction domain
SMO	Smoothened
SNP	Single-nucleotide polymorphism
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOS	Son of sevenless homolog
SPARC	secreted protein acidic and rich in Cys
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAB	TGF- β activated kinase binding protein
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAF	TBP-associated factor
TAK	TGF- β activated kinase
TBP	TATA binding protein
TCF	T-cell factor

TGF- β	Transforming growth factor β
TGF β RI	TGF- β Rezeptor Typ I
T _H	T-Helferzelle
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TRAF	TNF receptor-associated factor
TSLP	Thymic stromal lymphopietin
TYK	Tyrosinkinase
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WAA	Work-aggravated asthma
WHO	World Health Organization
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70
ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox
ZO	Zonula occludens

CURRICULUM
—
VITAE

Anna-Kristina Rudolph

Promotion

- 08/2013 – 01/2015 **Technische Universität** Kaiserslautern
Doktorandin am Lehrstuhl für Molekulare Biotechnologie und Systembiologie unter der Leitung von PD Dr. Gerhard Erkel
- 08/2010 – 07/2013 **IBWF** Kaiserslautern
Institut für Biotechnologie & Wirkstoffforschung
Doktorandin unter der Leitung von PD Dr. Gerhard Erkel

Ausbildung und Studium

- 06/2010 **Technische Universität** Kaiserslautern
Abschluss als Diplom-Biologin
- 04/2005 – 04/2010 **Technische Universität** Kaiserslautern
Biologiestudium mit den Schwerpunkten
Biotechnologie (Hauptfach)
Pflanzenphysiologie (Nebenfach)
Lebensmittelchemie und Toxikologie (Wahlfach)
- 10/2003 – 03/2005 **Johannes-Gutenberg-Universität** Mainz
Studium der Humanmedizin
- 08/1994 – 06/2003 **Immanuel-Kant-Gymnasium** Pirmasens
Abitur

Publikationen

- 2015 Tauber J, **Rudolph K**, Rohr M, Erkel G, Opatz T. Synthetic Approaches to Anti-Inflammatory Macrolactones of the Oxacyclododecindione Type: Anti-Inflammatory Macrolactones. Eur J Org Chem 16: 3587-3608.
- 2014 Langhanki J*, **Rudolph K***, Erkel G, Opatz T. Total synthesis and biological evaluation of the natural product (-)-cyclonerodiol, a new inhibitor of IL-4 signaling. Org Biomol Chem 12(47):9707-9715.
- 2013 **Rudolph K**, Serwe A and Erkel G. Inhibition of TGF-beta signaling by the fungal lactones (S)-curvularin, dehydrocurvularin, oxacyclododecindione and galiellalactone. Cytokine 61:285-296.
- 2012 Serwe A, **Rudolph K**, Anke T, Erkel G. Inhibition of TGF- β signaling, vasculogenic mimicry and proinflammatory gene expression by isoxanthohumol. Invest New Drugs 30:898-915.

*: gleichberechtigte Autorenschaft

3. Danksagung

Da eine Dissertation immer das Produkt einer jahrelangen wissenschaftlichen Zusammenarbeit darstellt, möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich in dieser Phase beruflich begleitet und die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meinem Doktorvater PD Dr. Gerhard Erkel für seine vielseitige Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft während der Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die ausgewogene Mischung aus mir gewährter wissenschaftlicher Freiheit und wegweisendem Rat hat diese Arbeit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. John Cullum danke ich für die Mitarbeit in meiner Promotionskommission.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Schroda, nicht nur für die Übernahme des Vorsitzes meiner Promotionskommission, sondern vor allem für das in mich gesetzte Vertrauen sowie seine intensive Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Till Opatz von der Universität Mainz möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die Strukturaufklärung sowie Synthese von Cyclonerodiol bedanken.

Desweiteren geht mein Dank an Dominik Schreiber sowie David Grundmann von der Fachhochschule Kaiserslautern für die freundliche Zusammenarbeit sowie die Durchführung der FACS-Messungen.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit danke ich zudem allen derzeitigen sowie ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Biotechnologie und Systembiologie. Besonderer Dank gebührt dabei Frau A. Meffert für ihre Hilfe bei HPLC-Analysen. Bei meinen ehemaligen Kollegen Markus Rohr, Thorsten Walter und Martin Müller möchte ich an dieser Stelle nochmals herzlich für das in allen Belangen tolle Arbeitsklima, die fachlichen Diskussionen und vor allem die Hilfsbereitschaft innerhalb unserer kleinen Arbeitsgruppe bedanken.

3. Eigenständigkeitserklärung

Die vorliegende Dissertation wurde an der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Gerhard Erkel angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter der Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie der Universität Kaiserslautern sind mir bekannt. Insbesondere weiß ich, dass ich vor Vollzug der Promotion zur Führung des Dokortitels nicht berechtigt bin.

Kaiserslautern, 17.06.2015

(Anna-Kristina Rudolph)