

**Einfluss biologisch aktiver Naturstoffe auf
Pluripotenzmarker in der Zelllinie P19 und
Evaluierung potenzieller Wirkstoffe in
zellulären Modellen entzündlicher und
fibrotischer Erkrankungen**

vom Fachbereich Biologie der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität
Kaiserslautern-Landau zur Erlangung des akademischen Grades „Doktor der
Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Thorsten Walter, M.Sc.

Wissenschaftliche Aussprache 20.12.2024

Berichterstattende:

PD. Dr. Gerhard Erkel (Betreuer)

Prof. Dr. Stefan Kins

Kaiserslautern im Jahr 2024

D 386

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thorsten Walter, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel in der Abteilung Molekulare Biotechnologie und Systembiologie der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau angefertigt habe. Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation weder ganz noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde. Alle Beteiligten wurden genannt.

Kaiserslautern, den 21.10.2024

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in den Jahren im Labor, sowie darüber hinaus unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gebührt PD Dr. Gerhard Erkel für die Betreuung und Unterstützung während der Arbeit. Vielen Dank auch für die vielen konstruktiven Gespräche und den wissenschaftlichen und persönlichen Austausch auf allen Ebenen mit Dir.

Herrn Prof. Dr. Michael Schroda für die Unterstützung und Möglichkeit innerhalb seiner Abteilung diese Dissertation anzufertigen.

Frau Prof Dr. Tanja Maritzen für die Übernahme des Promotionsvorsitzes und Herrn Prof. Dr. Stefan Kins für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der AG von Prof. Dr. Till Opatz für die Strukturaufklärungen isolierter Verbindungen und Bereitstellung neuer Derivate.

Dr. Markus Rohr möchte ich für die freundschaftliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit auf unserem gemeinsamen Weg danken. Es war ein großes Vergnügen mit Dir zu arbeiten und zu diskutieren.

Ein großes Dankeschön auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie, insbesondere Karin Gries, Anja Meffert und Dr. Frederik Sommer. Die Arbeitsatmosphäre, Betreuung der Praktika, Betriebsausflüge und das Miteinander wären ohne Euch nur halb so schön gewesen.

Eine wichtige Stütze waren mir auch meine Familie und Freunde. Vielen Dank für Euer Verständnis, Euer offenes Ohr und den Austausch in schwierigen Phasen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner zukünftigen Frau Elena bedanken, für deine Geduld, dein Verständnis, die gemeinsame Laborzeit und die Zeit und Unterstützung darüber hinaus.

Darlegung des Eigenanteil

Thorsten Walter

Einfluss biologisch aktiver Naturstoffe auf Pluripotenzmarker in der Zelllinie P19 und Evaluierung potenzieller Wirkstoffe in zellulären Modellen entzündlicher und fibrotischer Erkrankungen.

Die Arbeit enthält modifizierte Abbildungen aus nachfolgenden Publikationen: Abbildung 1 – Vasic, Barth, & Schmidt (2019); Abbildung 2 – Tsanov *et al.* (2017); Abbildung 3 – Gupta *et al.* (2008); Y. Q. Li (2017); Wagner & Cooney (2013); Wu & Schöler (2014); Abbildung 4 – Edwards *et al.* (2012); Gandhi *et al.* (2016); Abbildung 60 – Chen *et al.* (2020); Liu *et al.* (2016); Zhang *et al.* (2012); Abbildung 61 – Morgado *et al.* (2016); Rybak *et al.* (2008); Shenoy & Blelloch (2014); Stappert *et al.* (2015); Abbildung 62 – Mayr & Heinemann (2013); O'Brien *et al.* (2018); Tabelle 1 – Berdasco & Esteller (2011); Tewary *et al.* (2018)

Folgende Daten aus dem Ergebnisteil, wurden in gleicher oder ähnlicher Form bereits in Rudolph, Walter, & Erkel (2018) publiziert: Abbildung 51 und Abbildung 52. Die Daten aus Tabelle 6 wurden in gleicher oder ähnlicher Form in Weber *et al.* (2020) veröffentlicht.

Die NMR-Messungen und die Strukturaufklärung isolierter Reinsubstanzen wurden von der Arbeitsgruppe Organische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. T. Opatz an der Universität in Mainz durchgeführt. Arbeiten zur Funktionalisierung von Oxa für Target-Pulldown-Studien wurden von Dr. Nina Vierengel (AG Opatz, Universität Mainz) durchgeführt.

Die Versuchsdurchführung des DM-Oxa-Bead-Pulldown-Experiments wurde in Kooperation mit Dr. Anna Kiefer, RPTU, gewährleistet.

Die Messungen der massenspektrometrischen Untersuchung des DM-Oxa-Bead-Pulldown-Experiments wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Frederik Sommer, RPTU, durchgeführt.

Die vorliegende Einschätzung über die erbrachte Leistung von Dritten wurde mit den genannten Personen einvernehmlich abgestimmt.

Datum, Unterschrift Doktorand/in

Datum, Unterschrift Betreuer/in

Darlegung aller benutzten Hilfsmittel und Hilfestellungen

Thorsten Walter

Einfluss biologisch aktiver Naturstoffe auf Pluripotenzmarker in der Zelllinie P19 und Evaluierung potenzieller Wirkstoffe in zellulären Modellen entzündlicher und fibrotischer Erkrankungen.

Die Immunoblot-Aufnahmen wurden mit dem FUSION-FX7 Advance™ imaging System (PEQLAB) durchgeführt. Die densitometrischen Bandenquantifizierungen wurden mit FUSIONCapt Advance (PEQLAB) durchgeführt. Alle Abbildungen wurden in PowerPoint (Microsoft 365) und Corel Photo-Paint 2018 zusammengestellt. Immunofluoreszenz-Bilder wurden mittels des Fluoreszenzmikroskopes BX53F (Olympus, Tokio, Japan) mit entsprechenden Filtereinheiten aufgenommen. Lichtmikroskopische Bilder wurden mit einem Olympus BX53 Mikroskop aufgenommen.

Die graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe der Software „Origin®2019b“ (OriginLab Corporation, Northampton, USA) erstellt. Zur Ermittlung der IC-Werte diente die integrierte Fitting-Funktion. Die statistische Auswertung erfolgte durch Varianzanalyse mittels one-way-Anova und nachfolgendem Tukey-Post-hoc-Test.

Die Messungen der Durchflusszytometrie erfolgten unter Anleitung der Abteilung von Prof. Storchova, RPTU, mithilfe des „Attune NxT Flow Cytometer“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Auswertung der Daten und graphische Darstellung erfolgte mit der Software FCSalyzer.

Die NMR-Messungen und die Strukturaufklärung isolierter Reinsubstanzen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Organische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. T. Opatz an der Universität in Mainz durchgeführt. Die Massenspektrometrie auf einem LC-MS/MS-System (Eksigent nanoLC 425 gekoppelt mit einem TripleTOF 6600, ABSciex) wurde von Dr. Frederik Sommer, RPTU, durchgeführt. Die Analyse der *label-free quantification*-Daten (LFQ) aus der Proteinmassenspektrometrie erfolgte mit MaxQuant (Cox & Mann, 2008). Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Software Plattform „Perseus“ durchgeführt (Tyanova et al., 2016).

Das Literaturverzeichnis wurde mit dem Mendeley Word-Plugin erstellt.

Datum, Unterschrift Doktorand/in

Zusammenfassung

Die therapeutische Anwendung von Stammzelltransplantationen zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen des ZNS ist durch Faktoren wie potentiellen tumorigenen Risiken von iPSCs, ethischen Bedenken bei hESCs und der geringen autolog erschließbaren Menge an Stammzellen limitiert. Bioaktive kleine Moleküle zur Verbesserung der *Stemness* können die Effizienz der iPSC-Reprogrammierung erhöhen, Reprogrammierungs-Transkriptionsfaktoren ersetzen, sowie *in vitro*-Kulturbedingungen schaffen, welche die Proliferation der Stammzellen erweitern und spontane Ausdifferenzierungen minimieren. Anhand der pluripotenten P19-Zelllinie als etabliertem Modellsystem zur Analyse neuronaler Differenzierungs- und Aktivitätsmechanismen wurde der Einfluss der Macrolactone Oxacyclododecindion, Dehydrocurvularin, S-Curvularin und Galiellalacton, sowie daraus abgeleiteter Derivate, auf eine prolongierte *Stemness* anhand der Ausprägung pluripotenter Marker wie Oct-4, Nanog und Lin-28, sowie an der „*stem cell maintenance*“ bzw. Differenzierung beteiligter miRNAs über den neuronalen Differenzierungszeitraum untersucht. Neben einer Steigerung der Oct-4-Promotoraktivität bedingten die Makrolactone Gal, S-Curv und Et-Oxa sowohl auf transkriptioneller, als auch auf translationaler Ebene signifikante Zunahmen der pluripotenten Markergene, wobei die Applikation von 300 nM Et-Oxa den stärksten Effekt aufwies. Ebenso konnte die Expression der Mehrzahl der untersuchten neuronal regulatorischen miRNAs, u.a. Mitglieder der let-7-miRNA-Familie, inhibiert werden. Die Modulation neuronaler miRNAs, sowie Stammzell-Phänotypen durch niedermolekulare Wirkstoffe wie die untersuchten Lactone könnte ein vielversprechendes Therapieziel bieten bzw. die Kultivierungsbedingungen von Stammzellen verbessern.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit beinhaltete die Isolation und weitere biologische Charakterisierung von antiinflammatorischen Naturstoffen aus Pflanzen und Pilzen, die nach wie vor als wichtige Quelle neuer Leitstrukturen für Therapeutika dienen. Zwei Verbindungen mit antiinflammatorischer und antifibrotischer Wirkung konnten aus dem Wurzelextrakt von *Rubia cordifolia* isoliert werden. Das bereits bekannte Anthrachinon Rubiadin sowie eine bis dato unbekannte Omega-9-Fettsäure inhibierten im Wirkungsbereich von 62 μ M bis 169 μ M die TGF- β -aktivierte Signaltransduktion sowie proinflammatorische Zytokine und Markergene auf transkriptioneller und translationaler Ebene. Für das bereits als selektiven Inhibitor des IL-4 induzierten STAT6-Signalwegs beschriebene Sesquiterpen Cyclonerodiol konnte ein inhibitorischer Einfluss auf die mRNA- und Proteinexpression des an der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus bei *Asthma bronchiale* beteiligten Chemokins Eotaxin-3 nachgewiesen werden, ohne die Bindung von Stat6 an den endogenen Eotaxin-3-Promotor zu beeinträchtigen. Darüber hinaus konnte für die in eigenen Vorarbeiten aus *Eurotium herbariorum* isolierte Verbindung TWEh-1 eine Inhibition von Transkriptionsfaktoren und Markergenen, beteiligt an der

EMT im Rahmen der bronchialen Pathogenese von Asthma, nachgewiesen werden. Weiterhin wurde TWEh-1 als Inhibitor der Lumineszenz-Reaktion der *Firefly Luciferase* aus *Photinus pyralis* identifiziert, wobei die O-glykosidisch verknüpfte Furanose wohl als aktives Zentrum dient. Ebenso wurden verschiedene Derivate des potenten antiinflammatorischen Naturstoffs Oxacyclododecindion auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Die Addition einer weiteren Methylgruppe an C-14 erwies sich hierbei als potenteste Derivatisierung, wohingegen der Ersatz der 13-Methylgruppe durch eine 13-Ethylgruppe sowie alternative Halogenierungen die biologische Aktivität abschwächten. Eine erste Funktionalisierung des potentesten Derivates (\pm)-14-Deoxy-14-Methyl-Oxacyclododecindion mit anschließendem *Pulldown* und MS-Analysen lieferte Hinweise auf potentielle Interaktionspartner wie die GTPase *Ras-related protein Rab-7a* und die Glutathion-S-Transferase GSTO-1.

Summary

The therapeutic application of stem cell transplantation for the treatment of CNS neurodegenerative diseases is limited by factors such as potential tumorigenic risks of iPSCs, ethical concerns with hESCs and the small amount of stem cells that can be harvested autologously. Bioactive small molecules to enhance stemness may increase the efficiency of iPSC reprogramming, replace reprogramming transcription factors, and create *in vitro* culture conditions that expand stem cell proliferation and minimize spontaneous differentiation. Using the pluripotent P19 cell line as an established model system for analyzing neuronal differentiation and activity mechanisms, the influence of the macrolactones oxacyclododecindione, dehydrocurvularin, S-curvularin and galiellalactone, as well as derivatives derived from them, on prolonged stemness was investigated based on the expression of pluripotent markers such as Oct-4, Nanog and Lin-28, as well as miRNAs involved in stem cell maintenance and differentiation over the neuronal differentiation period. In addition to an increase in Oct-4 promoter activity, the macrolactones Gal, S-Curv and Et-Oxa caused significant increases in pluripotent marker genes at both the transcriptional and translational levels, with the application of 300 nM Et-Oxa having the strongest effect. Similarly, the expression of most of the investigated neuronal regulatory miRNAs, including members of the let-7 miRNA family, was inhibited. The modulation of neuronal miRNAs and stem cell phenotypes by small-molecule drugs such as the lactones investigated could offer a promising therapeutic target or improve the cultivation conditions of stem cells.

Another component of this work involved the isolation and further biological characterization of anti-inflammatory natural products from plants and fungi, which continue to serve as an important source of new lead structures for therapeutics. Two compounds with anti-inflammatory and anti-fibrotic effects were isolated from the root extract of *Rubia cordifolia*. The already known anthraquinone rubiadin and a previously unknown omega-9 fatty acid inhibited TGF- β -activated

signal transduction as well as proinflammatory cytokines and marker genes in the action range of 62 μM to 169 μM , both at the transcriptional and translational level. For the sesquiterpene cyclonerodiol, already described as a selective inhibitor of the IL-4-induced STAT6 signaling pathway, an inhibitory effect on the mRNA and protein expression of the chemokine eotaxin-3 involved in the maintenance of the inflammatory milieu in bronchial asthma could be demonstrated without affecting the binding of Stat6 to the endogenous eotaxin-3 promoter. In addition, the compound TWEh-1, isolated from *Eurotium herbariorum* in preliminary work, was shown to inhibit transcription factors and marker genes involved in EMT in the bronchial pathogenesis of asthma. Furthermore, TWEh-1 was identified as an inhibitor of the luminescence reaction of the firefly luciferase from *Photinus pyralis*, with the O-glycosidically linked furanose probably serving as the active center. The biological activity of various derivatives of the potent anti-inflammatory natural product oxacyclododecindione was also investigated. The addition of a further methyl group to C-14 proved to be the most potent derivatization, whereas the replacement of the 13-methyl group by a 13-ethyl group and alternative halogenations weakened biological activity. An initial functionalization of the most potent derivative (\pm)-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindione with subsequent pull-down and MS analyses provided indications of potential interaction partners such as the GTPase Ras-related protein Rab-7a and the glutathione S-transferase GSTO-1.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	3
Danksagung	4
Darlegung des Eigenanteil	5
Darlegung aller benutzten Hilfsmittel und Hilfestellungen	6
Zusammenfassung	7
Summary	8
Inhaltsverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	21
Abbildungsverzeichnis	21
1 Einleitung	25
1.1 Stammzellen	25
1.2 iPSCs – Entstehung und Einsatzmöglichkeiten	28
1.3 Stammzelltherapie zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen	31
1.4 P19-Zellen als Modellsystem neuronaler Differenzierung	36
1.5 <i>Stemness</i> -regulierende Faktoren von embryonalen Stammzellen	38
1.5.1 Oct-4	39
1.5.2 Nanog	43
1.5.3 Lin-28	44
1.6 Regulatorische miRNAs der neuronalen Differenzierung	45
1.7 Niedermolekulare Verbindungen zur Verbesserung der <i>Stemness</i>	48
1.7.1 Biologisch aktive Lactone	50
1.8 Asthma	52
1.8.1 Die Rolle proinflammatorischer Zytokine und Chemokine bei der Pathogenese von Asthma	54
1.8.2 <i>Airway remodeling</i> als Folge fibrotischer Prozesse bei Asthma	57
1.8.3 <i>Rubia cordifolia</i>	59
1.9 Zielsetzung	60
2 Material und Methoden	61
2.1 Material	61
2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	61
2.1.2 Lösungen, Medien und Puffer	63
2.1.3 Antikörper	73
2.1.4 Oligonukleotide	74
2.1.5 Plasmide	80

2.1.6	Organismen.....	81
2.2	Methoden	82
2.2.1	Kultivierung und Fermentation von Pilzen.....	82
2.2.2	Kultivierung von Bakterien	86
2.2.3	Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien	88
3	Ergebnisse	109
3.1	Neuronale Differenzierung von P19-Zellen	109
3.1.1	Morphologie von P19-Zellen infolge neuronaler Induktion	109
3.1.2	Neuronale Induktion von P19-Zellen auf mRNA-Ebene	110
3.1.3	Neuronale Induktion von P19-Zellen auf Proteinebene	114
3.2	Einfluss biologisch aktiver Lactone auf den Stammzellcharakter von P19-Zellen....	116
3.2.1	Einfluss biologisch aktiver Lactone auf die Zytotoxizität von P19-Zellen	117
3.2.2	Effekt biologisch aktiver Lactone auf die Promotoraktivität von <i>oct-4</i>	118
3.2.3	Einfluss bioaktiver Lactone auf die Erhaltung des murinen Stammzellcharakters ...	121
3.3	<i>Rubia cordifolia</i>	137
3.3.1	Extraktion von <i>Rubia cordifolia</i>	137
3.3.2	Aktivitätsgebundene Isolierung aus <i>Rubia cordifolia</i>	138
3.3.3	Biologische Charakterisierung von TWRc-1 und TWRc-2 aus <i>Rubia cordifolia</i>	141
3.4	Isolation von TWEh-1 aus <i>Eurotium herbariorum</i>	151
3.4.1	Der Produzentenstamm <i>Eurotium herbariorum</i>	151
3.4.2	Fermentation von <i>E. herbariorum</i>	152
3.4.3	Extraktion und Reindarstellung von TWEh-1	153
3.4.4	Biologische Charakterisierung von TWEh-1.....	154
3.5	Biologische Charakterisierung von Cyclonerodiol	172
3.5.1	Isolation von Cyclonerodiol aus <i>Fusarium sp.</i>	172
3.5.2	Einfluss von Cyclonerodiol auf die mRNA- und Proteinexpression von Eotaxin-3... 172	
3.5.3	Einfluss von Cyclonerodiol auf die Bindung von STAT6 an den endogenen <i>eotaxin-3</i> Promotor	175
3.6	Einfluss verschiedener Derivatisierungen von Oxacyclododecindion auf die antiinflammatorische Aktivität	176
3.6.1	Funktionalisierung von (±)-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion für <i>Target-Pulldown</i> -Studien.....	179
3.6.2	DM-Oxa-Bead-Pulldown-Assay	182
4	Diskussion	192
4.1	Neurodegenerative Erkrankungen	192
4.1.1	Stand der Therapiemöglichkeiten	192
4.2	P19 Zellen als Modellsystem der Pluripotenz und neuronaler Differenzierung.....	195

4.2.1	Neuronale Induktion von P19-Zellen auf transkriptioneller und translationaler Ebene.....	197
4.2.2	Expression <i>Stemness</i> -erhaltender Faktoren neuronal induzierter P19-Zellen.....	201
4.3	Effekt bioaktiver Lactone auf die <i>Stemness</i> neuronal induzierter P19-Zellen.....	203
4.3.1	Verbesserung der Pluripotenz durch niedermolekulare Substanzen.....	208
4.3.2	Potentielle Targets der Makrolactone	212
4.3.3	Generelle Unterschiede der beteiligten Signalwege je nach Organismus	217
4.3.4	Effekt bioaktiver Lactone auf die Expression neuronal regulierender miRNAs	219
4.4	Ausblick und Therapieansätze.....	228
4.5	Einfluss pflanzlicher und pilzlicher Naturstoffe auf inflammatorische Prozesse zur Pathogenese von Asthma.....	229
4.5.1	TWEh-1	229
4.5.2	Antiinflammatorische Eigenschaften von <i>R. cordifolia</i>	238
4.5.3	Cyclonerodiol.....	251
4.5.4	Derivatisierung Oxacyclododecindion	255
5	Literaturverzeichnis	265
6	Anhang.....	292
	Lebenslauf.....	301

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
μF	Mikrofarad
μg	Mirkogramm
μl	Mirkoliter
μM	Mikromolar
10-ODO	(±)-10-Oxo- <i>trans</i> -11-octadecen-13-olid (aus Mais)
13-HOA	(±)-13-Hydroxy-10-oxo- <i>trans</i> -11-octadecensäure (aus Mais)
9-HOA	(±)-9-Hydroxy- <i>trans-cis</i> -10,12-Octadecadiensäure (aus Reis)
ABC	Ammoniumbicarbonat
Acc. Nr.	<i>accession number</i>
AcN	Acetonitril
AD	Alzheimer Krankheit
ad	Auf
ADP	Adenosindiphosphat
AGO	Argonaute
AHR	Hyperreagibilität der Atemwege
Akt	Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
AQs	Anthrachinone
Arac	Cytarabin
ARTS-1	<i>aminopeptidase regulator of TNFR shedding 1</i>
Ascl	<i>achaete-scute complex homolog 1</i>
ASM	Entzündung in der glatten Muskulatur der Atemwege
ASO	Antisense Oligonukleotide
ATP	Adenosintriphosphat
Aβ	Amyloid-β
BAF53a	<i>BRG1- and BRM-associated factor 53a</i>
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BCA	Bicinchoninsäure
BF	Durchlicht
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
Brn2	Pou3f2
BSA	Bovines Serumalbumin
BSM	Bronchialmuskulatur
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. odorata</i>	<i>Chromolaena odorata</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCL-11	Eotaxin-1
CCL13	MCP-4
CCL2	<i>monocyte chemoattractive protein 1 (MCP-1)</i>

CCL-2	MCP-1
CCL24	Eotaxin-2
CCL26	Eotaxin-3
CCL3	<i>macrophage inflammatory protein (MIP)-1α</i>
CCL4	MIP-1 β
CCL5	RANTES
CD	C-Terminale Domäne
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	Aminosäure-Kodierungssequenz
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
ciPSCs	Chemisch induzierbare pluripotente Stammzellen
CK2	Casein Kinase II
CKI α	Caseinkinase I α
CM	Cytomix
CM	Konditioniertes Kulturmedium
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COUP-TFs	<i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor</i>
CPOX	Coproporphyrinogen-Oxidase
CPP	Zellpenetrierende Peptide
CR	Konservierte Regionen
CRABP2	<i>cellular RA-binding protein 2</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSD	<i>cold shock domain</i>
CSPD	1,2-Dioxethan-Chemilumineszenzsubstrat
Cu ²⁺ , Cu ¹⁺	Kupferkationen
CX3CL1	Fraktalkin
CXCR2	CXC-Chemokinrezeptor 2
d	Tag
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DA	Dopamin
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAPT	N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t- butyl ester
DCs	Dendritische Zellen
DE	Distaler Enhancer
dest	Destilliert
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
Dhc	Dehydrocurvularin
D-LH2	Luciferin
DII1C	<i>delta like protein 1</i>
DM-Oxa	(\pm)-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
ds	Doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
<i>E. herbariorum</i>	<i>Eurotium herbariorum</i>
EBs	<i>embryoid bodies</i>
ECC	Embryonale Karzinomzellen
ECL	<i>enchanced chemiluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECP	<i>eosinophil cationic protein</i>
EDTA	Ethylendiaminetraessigsäure
eGFP	<i>enchanced green fluorescent protein</i>
EMA	European Medical Agency
EMT	Epithelliale-mesenchymale Transition
ENS	Enterisches Nervensystem
EpiSCs	Epiblast Stammzellen
ERAP-1	Endoplasmatische Retikulum-assoziierte Aminopeptidase 1
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
ESCs	Embryonale Stammzellen
Esrb	<i>estrogen-related receptor β</i>
EtOH	Ethanol
Et-Oxa	(\pm)-10-Ethyl-14-deoxy-14-methyl-Oxacyclododecindion
Fc ϵ RI	IgE-Rezeptors
FDA	US Food and Drug Administration
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
FGF	Fibroblasten-Wachstums-Faktoren
FGF4	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FKS	Fötales Kälberserum
FLuc	<i>Firefly Luciferase aus Photinus pyralis</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
Gal	Galiellalacton
<i>gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCNF	<i>germ cell nuclear factor</i>
GFRs	Wachstumsfaktor-Rezeptoren
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase-3
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H3K27me3	Tri-Methylierung von Lysin 27 an Histon H3
HCl	Chlorwasserstoff
HD	Homöodomäne
HDAC	Histon-Deacetylase
HDAC3	Histon-Deacetylase 3

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hESCs	Humane embryonale Stammzellen
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
hiPSCs	Humane induzierbare pluripotente Stammzellen
HMG	<i>high mobility group</i>
HODEs	Hydroxyl-Octadecadiensäuren
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRE	<i>hormone response element</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
HRV	Humane Rhinoviren
HSCs	Hämatopoetische Stammzellen
HUVECs	Menschlichen Nabelvenen-Endothelzellen
h ν	Lichtenergie
i.p.	Intraperitoneal
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICM	Innere Zellmasse
IFN- γ	Interferon-gamma
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1R2	Typ 2 Interleukin-1-Rezeptor
IL-6R α	Interleukin-6-Rezeptor α
ILC2	Lymphoide Zellen der Gruppe 2
iN	Induzierte Neuronen
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
iNSCs	Induzierte neurale Stammzellen
IP-10	IFN- γ -induzierbare Protein von 10 kDa
iPSCs	Induzierte pluripotente Stammzellen
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K63	Lys63-Rest (K63)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kinase-Inhibitoren
KM-Wert	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LD50	Mittlere Letale Dosis
LFQ	<i>label free quantification</i>
Lhr1	<i>liver receptor homologue-1</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
Log ₂	Logarithmus zur Basis 2
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotriene
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladung

MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPs	Mikrotubuli-assoziiertes Proteine
MBP	<i>major basic protein</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractive protein 1</i>
MDA	Malondialdehyd
MEF	Embryonalen Fibroblasten
MEK	Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase
MeOH	Methanol
mEpiSCs	Epiblasten-Stammzellen der Maus
mESCs	Murine embryonale Stammzellen
MET	Mesenchymale-epithelliale Transition
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MIP-1 α	CCL3
MIP-1 β	CCL4
miR, miRNA	microRNA
miRISC	miRNA-induzierter Silencing-Komplex
ml	Milliliter
MLP	<i>adenovirus major late promoter</i>
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MND	Motoneuron-Erkrankungen
mol	Mol
MREs	<i>miRNA-response-element</i>
ms	Millisekunde
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
MTG	Myceltrockengewicht
MW	Mittelwert
Myt1l	<i>myelintranscription factor 1 like</i>
N	Normallösung
n	Anzahl
n.s.	Nicht signifikant
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaDoc	Natriumdeoxycholat
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	Neuralen Zelladhäsionsmoleküls 1
ND	N-Terminale Domäne
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm

NHBEC	Normale menschliche Bronchialepithelzellen
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP-40	Nonidet P-40
NPCs	Neuronale Vorläuferzellen
NR	Nuklearer Rezeptor
NSCs	Neurale Stammzellen
NSPCs	Neurale Stamm-/Vorläuferzellen
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff
Oct-4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
OSKM	Oct-4, Sox-2, Klf4 und c-Myc
Oxa	Oxacyclododacindion
p	p-Wert, Signifikanzwert
p. a.	<i>pro analysi</i>
p. o.	<i>per os</i>
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
Parnate	H3K4-Demethylierungsinhibitor Tranylcypromin
Pax6	<i>paired-box-protein 6</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pcaf	<i>p300/CBP-associated factor</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Prakinson Krankheit
PE	Proximaler Enhancer
PEG	Polyethylenglycol
PGC	Primordiale Keimzellen
PGD2	Prostaglandin
pH	pH-Wert
PHB	Prohibitin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIC	<i>complete protease-inhibitor-cocktail</i>
PKC δ	Proteinkinase C Iota
PKIs	Proteinkinaseinhibitoren
PMS	Phenazinmethosulfat
POU	Pit-Oct-Unc
Pou5f1	POU-Domäne, Klasse 5, Transkriptionsfaktor 1
PP	Proximaler Promotor
PPi	Pyrophosphat
prä-miRNA	Vorläufer-miRNA
pri-miRNAs	Primärtranskript
PSA	Polysialinsäure
PSCs	Pluripotente Stammzellen
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR

R	Wiederholung
RA	Retinsäure
RAB7A	RAS-related in Brain 7A
RANTES	<i>regulated on activation, normal t cell expressed and secreted (CCL5)</i>
RARE 1	<i>RA-repressible Enhancer 1</i>
RARE 2	RA-responsives Element
RAREs	Retinsäure-Reaktionselemente
RARs	Retinsäurerezeptor
RBM	Rubiadin-1-methylester
RBP	RNA-bindendes Protein
RepSox	TGF-beta-Rezeptor-Kinase-Inhibitor 616452
REST	<i>RE1 silencing transcription factor</i>
rev	Reverse
RGDs	Arginylglycylasparaginsäure-Sequenzen
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RMS	Rostraler migratorischer Strom
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S	Spezifisch
s	Sekunde
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
SCP1	<i>small C-terminal domain phosphatase 1</i>
S-Curv	S-Curvularin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEAP	Sekretorische Alkalische Phosphatase
SEM	Standardfehler
SF-1	<i>steroidogenic factor 1</i>
SGZ	Subgranuläre Zone
sIL-6R α	Lösliche IL-6-Rezeptoren
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN1	Überlebensmotorneuron 1
SMRT	<i>silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>
<i>snor66</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D Box 66</i>
Sox-2	<i>sex determining region Y-box 2</i>
SRC1/TIF2	<i>steroid receptor coactivator</i>
SVZ	Subventrikuläre Zone
Swi/Snf)	<i>switch/sucrose non fermentable</i>
TAB1	<i>TGF-β activated kinase binding protein</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAK-1	TGF- β -aktivierte Kinasen 1

TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
TE	Trophektoderm
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TGF- β -R1	TGF- β -Rezeptor-I-Kinase
TH	T-Helferzellen
TH2	T-Helfer-2-Zellen
Thr-210	Threonin-210
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TLX	<i>nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1</i>
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF-R1	Typ 1 Tumornekrosefaktorrezeptor
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TR2	<i>testis receptor 2</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TRBP	TAR-RBP
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSLP	Thymisches stromales Lymphopoietin
TSS	Translationsstartstelle
TUT4	<i>terminal uridyl transferase 4/Zcchc11</i>
TWRc-1	6-Hydroxy-7-,9-octadecadienoic-acid
u. a.	Unter anderem
ü. N.	Über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UF	Ultrafiltriert
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolettes Licht
v	<i>volume</i>
V	Volt
VC6T	VPA, Tranylcypromin, CHIR99021 und TGF-beta-Rezeptor-Kinase-Inhibitor 616452
vgl.	Vergleiche
vim	Vimentin
w	<i>weight</i>
WR	Tryptophan-Wiederholungsmotiv
x	-fach
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
XTT	Triphenyltetrazoliumchlorid
ZEB	Zink-Finger-E-Box-Binding
ZNS	Zentralnervensystem
ZnSO ₄	Zinksulfat

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hierarchie von Stammzellen, absteigend nach der Potenz und ihrem Differenzierungspotenzial mit Beispielen ihres jeweiligen Vorkommens bzw. Ursprungs (nach Berdasco & Esteller (2011) und Tewary <i>et al.</i> (2018)).....	26
Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit Referenz und jeweiliger Bezugsquelle	81
Tabelle 3: Verwendeter HPLC-Gradient G1 mit den Eluenten Wasser und Acetonitril.....	85
Tabelle 4: Verwendeter HPLC-Gradient G2 zur Peptidauftrennung mit den Eluenten Solvens A (98 % H ₂ O _{UF} /2 % AcN) und Solvens B (10 % H ₂ O _{UF} /90 % AcN).	102
Tabelle 5: PCR-Einstellungen zur Amplifikation von cDNA aus mRNA und miRNA.....	107
Tabelle 6: Wirkung verschiedener Derivate von Oxacyclododecindion auf die SMAD2/3- und STAT6-abhängige Signaltransduktion.....	178
Tabelle 7: Kriterien zur Ermittlung spezifisch gebundener Proteine an DM-Oxa-Beads infolge der Stimulation.	184
Tabelle 8: Signifikant angereicherte Proteine an DM-Oxa-Beads aus Abbildung 59 mit annotiertem Proteinnamen, Gennamen, molekularer Funktion und zellulärer Komponente.....	191

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammzellbasierte Therapieansätze für neurodegenerative Erkrankungen.....	35
Abbildung 2: Domänenstruktur der Stammzelltranskriptionsfaktoren Oct-4 (a) und Nanog (b), sowie dem RNA-bindenden Protein Lin-28 (c).....	39
Abbildung 3: Schematische Struktur des murinen <i>oct-4</i> -Gens mit Bestandteilen der 5`UTR-regulatorischen Elemente.....	41
Abbildung 4: Typ 2 Inflammation bei atopischem Asthma.....	53
Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der neuronalen Induktion von P19-Zellen. Dargestellt sind die Zeitpunkte der Aussaat von Suspension- und Adhäsionskultur, der Erneuerung des Mediums ZM1, der Induktion mit RA [1 µM], sowie der Substanzapplikationen.....	91
Abbildung 6: Morphologische Veränderungen von P19-Zellen in Abhängigkeit des neuronalen Stimulus mit 1 µM RA.	110
Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der mRNA Expression von neuronalen Markergenen (A) und Markergenen für Pluripotenz (B) in P19-Zellen nach Stimulation mit RA [1 µM].	113
Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Proteinexpressionen von pluripotenten Markern (Oct-4, Lin-28) und dem neuronalen Marker β-3-Tubulin nach initialer neuronaler Stimulation.....	114

Abbildung 9: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von P19-Zellen nach sieben und zwölf Tagen initialer Induktion mit RA.	116
Abbildung 10: Strukturformeln von Oxacyclododecindion (A), Dehydrocurvularin (B), S-Curvularin (C), Galiellalacton (D), (\pm)-14-deoxy-14-methyl-Oxacyclododecindion (E) und (\pm)-10-Ethyl-14-deoxy-14-methyl-Oxacyclododecindion (F).	117
Abbildung 11: Prozentuale Bestimmung der relativen Lebendzellzahl von P19-Zellen bei 48-stündiger Lacton-Behandlung.	118
Abbildung 12: Transiente Transfektion von pDB2-Oct4pro zur Analyse der <i>oct-4</i> -Promotoraktivität in P19-Zellen.	120
Abbildung 13: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die Promotoraktivität von <i>oct-4</i>	121
Abbildung 14: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle Aktivität <i>Stemness</i> -assoziierter Gene nach vier Tagen Kultivierung.	123
Abbildung 15: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle Aktivität neuronaler Markergene nach vier Tagen Kultivierung.	124
Abbildung 16: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle Aktivität <i>Stemness</i> -assoziierter Gene nach sieben Tagen Kultivierung.	125
Abbildung 17: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle Aktivität neuronaler Markergene nach sieben Tagen Kultivierung.	126
Abbildung 18: Immunoblot <i>Stemness</i> -erhaltender Proteine aus dem Zelllysate von P19-Zellen nach 4-tägiger Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M].	128
Abbildung 19: Analyse <i>Stemness</i> -erhaltender Proteine aus dem Zelllysate von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 μ M], sowie vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M].	129
Abbildung 20: Analyse <i>Stemness</i> -erhaltender Proteine aus dem Zelllysate von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 μ M], sowie sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M].	130
Abbildung 21: Analyse <i>Stemness</i> -erhaltender Proteine aus dem Zelllysate von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 μ M], sowie sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M].	131
Abbildung 22: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die Expression neuronal regulatorischer miRNAs nach vier Tagen Kultivierung.	134
Abbildung 23: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die Expression neuronal regulatorischer miRNAs nach sieben Tagen Kultivierung.	136
Abbildung 24: Extraktionsschema zur Reindarstellung von TWRc-1 und TWRc-2.	138

Abbildung 25: Chromatogramm im Gradient G1 (A), UV-/Vis-Spektrum (B) und Strukturformel (C) von TWRc-1.	139
Abbildung 26: Chromatogramm im Gradient G1 (A), UV-/Vis-Spektrum (B) und Strukturformel (C) von TWRc-2.	140
Abbildung 27: Einfluss von TWRc-1 und TWRc-2 auf die TGF- β -induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion.	142
Abbildung 28: Einfluss von TWRc-1 und TWRc-2 auf die IL-4-induzierte STAT6-Signaltransduktion.	143
Abbildung 29: Einfluss von TWRc-1 und TWRc-2 auf die NF- κ B-Signaltransduktion und die Promotoraktivität von <i>ip-10</i>	144
Abbildung 30: Einfluss von TWRc-1 und TWRc-2 auf die Zellviabilität und Lebendzellzahl.....	145
Abbildung 31: Wirkung von TWRc-1 auf die relative mRNA-Menge proinflammatorischer Gene.	146
Abbildung 32: Wirkung von TWRc-2 auf die relative mRNA-Expression proinflammatorischer Gene.....	147
Abbildung 33: Wirkung von TWRc-1 und TWRc-2 auf die relative mRNA-Expression anti-apoptotischer Gene.	149
Abbildung 34: Expression sekretorischer Proteine aus dem Medium von BEAS-2B-Zellen nach Applikation von TWRc-1 und TWRc-2 und Stimulation mit CM (10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β).....	150
Abbildung 35: Fermentationsverlauf von <i>E. herbariorum</i> im 2,5 l-Maßstab im Medium M5 bei 120 rpm und RT.....	152
Abbildung 36: Extraktionsschema zur Reindarstellung von TWEh-1.....	153
Abbildung 37: Chromatogramm im Gradient G1 (A), UV-Vis-Spektrum (B), Massenspektrum mit negativer Ionisierung (C) und vorläufige Struktur (D) von TWEh-1.	154
Abbildung 38: Effekt von TWEh-1 auf die Reporterogenaktivität inflammatorisch relevanter Signaltransduktionswege.	155
Abbildung 39: Relative Zellviabilität von BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von TWEh-1.....	156
Abbildung 40: Einfluss von TWEh-1 auf die Apoptose-/Nekrose-Induktion mittels Durchflusszytometrie.	158
Abbildung 41: Transkriptionslevel von <i>eotaxin-1</i> und <i>eotaxin-3</i> in Abhängigkeit der Bronchialepithel-Zelllinie und des Stimulus und der Induktionszeit.	160
Abbildung 42: Einfluss von TWEh-1 auf die transkriptionelle Aktivität von <i>ccl-11</i> und <i>ccl-26</i>	161
Abbildung 43: Einfluss von TWEh-1 auf die Proteinexpression von Eotaxin-1 und Eotaxin-3.	162
Abbildung 44: Einfluss von TWEh-1 auf die Transkription EMT-assoziiierter Markergene in BEAS-2B-Zellen.....	164
Abbildung 45: Einfluss von TWEh-1 auf EMT-Markerproteine.	166
Abbildung 46: Einfluss von TWEh-1 auf die Angiogenese im <i>Tube Formation Assay</i>	167

Abbildung 47: Einfluss von TWEh-1 auf die SEAP-Aktivität der Plasmide pGE3-NF1 und pTK/SEAP(7xN4).....	169
Abbildung 48: Vergleichender Effekt von TWEh-1 auf die Luciferaseaktivität des Vektors (CAGA) _{9x} -MLP-Luc unter Standardbedingungen (A), unter Prä-Inkubationsbedingungen (B) und unter Post-Inkubationsbedingungen (C)...	170
Abbildung 49: Wirkung von TWEh-1 auf die Luciferaseaktivität.	171
Abbildung 50: Strukturformel von Cyclonerodiol	172
Abbildung 51: Einfluss von Cyclonerodiol auf die IL-4/13-induzierte Eotaxin-3 mRNA- und Protein-Expression in A549-Zellen.....	174
Abbildung 52: Effekt von Cyclonerodiol auf die Bindung von STAT6 an den endogenen <i>eotaxin-3</i> -Promotor.....	175
Abbildung 53: Strukturformel des Naturstoffs Oxacyclododecindion (A) und Grundstruktur der Derivatisierung (B)	177
Abbildung 54: Einfluss von DM-Oxa-Alkin (B) und Linker-DM-Oxa (C) im Vergleich mit DM-Oxa (A) auf die TGF- β -induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion.....	181
Abbildung 55: Funktionalisierung von Linker-DM-Oxa an CarboxyLink- <i>Beads</i> TM mit BCN-NHS-Ester.	182
Abbildung 56: Visualisierung des DM-Oxa- <i>Bead-Pulldowns</i> nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Färbung durch Colloidal Coomassie.	183
Abbildung 57: <i>Pulldown</i> TGF- β -induziert abhängiger Proteine an DM-Oxa- <i>Beads</i>	186
Abbildung 58: <i>Pulldown</i> CM-induziert abhängiger Proteine an DM-Oxa- <i>Beads</i>	189
Abbildung 59: Relative Änderung angereicherter Proteine an DM-Oxa- <i>Beads</i> gegenüber DM-Oxa- <i>Beads</i> mit Konkurrenz durch Präinkubation mit 50-fachem Überschuss bzw. an DM-Oxa- <i>Beads</i> gegenüber Kontroll- <i>Beads</i>	190
Abbildung 60: Niedermolekulare Verbindungen mit Einfluss auf die Erhaltung der <i>Stemness</i> oder Induktion bzw. Verbesserung der Reprogrammierung somatischer Zellen.	211
Abbildung 61: Regulation der Neurogenese und Pluripotenz durch miRNAs.	220
Abbildung 62: Regulation der let-7-miRNA-Biogenese durch Lin-28.....	223
Abbildung 63: Strukturen TWEh-1-ähnlicher Anthrachinone.....	233
Abbildung 64: TWRC-1 und strukturell verwandte Fettsäuren mit biologischer Aktivität.	247

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen bilden während der Entwicklung die Gründerzellen einer jeden Zelle, jedes Organs und Gewebe im Körper von Tieren und Pflanzen. Es handelt sich hierbei um undifferenzierte Zellen, welche noch keine spezifische Funktion ausüben, sich jedoch durch ihre Toti-, Pluri- oder Multipotenz auszeichnen. Während ihrer kontinuierlichen Teilung erhalten die Stammzellen ihre stabilen genetischen Informationen und epigenetische Modifikationen der Chromatin-Struktur. Bis zur Entdeckung der Reprogrammierbarkeit differenzierter Zellen auf Pluripotenz (induzierte pluripotente Stammzellen; iPSC) (Takahashi & Yamanaka, 2006), wurde eine Stammzelle als Zelle mit zwei grundlegenden Eigenschaften definiert, nämlich die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch Zellteilung (asymmetrische Teilung) und die Kompetenz zur Erzeugung spezialisierter Zelltypen durch Differenzierung. Die asymmetrische Teilung ist ein ausgeprägtes biologisches Merkmal, das die Stammzellen gegenüber allen anderen Zelltypen auszeichnet, bei welchen die mitotische Teilung symmetrisch ist (Bellenchi, Volpicelli, Piscopo, Perrone-Capano, & Di Porzio, 2013). Stammzellen werden durch ihre "Potenz" definiert, das heißt ihr Potenzial, spezialisierte Zelltypen hervorzubringen. Die nachfolgende Tabelle listet die Hierarchie der Stammzellen, absteigend in ihrem Differenzierungspotenzial auf (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Hierarchie von Stammzellen, absteigend nach der Potenz und ihrem Differenzierungspotenzial mit Beispielen ihres jeweiligen Vorkommens bzw. Ursprungs (nach Berdasco & Esteller (2011) und Tewary *et al.* (2018)).

Potenz der Zellen		Differenzierungspotenzial	Zellressource Beispiele
Totipotenz		in der Lage alle Zelltypen des Körpers sowie die unterstützenden extraembryonalen Gewebe, einschließlich Nabelschnur und Plazenta, hervorzubringen	Zygote Zellen der ersten Teilungen der befruchteten Eizelle (Embryos Tag 1-3)
Pluripotenz		Differenzierung in Zellen aus jeder der drei Keimschichten: Entoderm Mesoderm Ektoderm	Zellen der inneren Zellmasse des Blastocysten (Epiblast): Embryonale Stammzellen (ESC); Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)
Multipotenz		Linien-spezifische Differenzierung auf die Ausreifung genetisch bestimmter Gewebe beschränkt, in dessen Umgebung („Nischen“) sie zu finden sind	Fetalgewebe Stammzellen aus der Nabelschnur Adulte Stammzellen z.B.: Hämatopoetische, Neuronale oder Mesenchymale Stammzellen
Oligopotenz		in der Lage, zwei oder mehr reife Zelltypen innerhalb eines Gewebes zu bilden. ermöglichen die Regeneration von Zellen mit einer kurzen Lebensspanne	myeloide Stammzellen als Vorläuferzellen für Granulozyten, Monozyten und Erythrozyten
Unipotenz		Können sich nur zu dem Zelltypus differenzieren, dem sie selbst angehören nicht in der Lage, andere Zelltypen hervorzubringen	spermatogoniale Stammzellen der Hoden Satellitenzellen des Skelettmuskels

Die frühesten Stammzellen in der Ontogenese sind totipotent und erstrecken sich über die ersten Teilungen der Zygote über einen Zeitraum von 3 Tagen. Nach einer Reihe genau definierter Teilungen entsteht aus der totipotenten Stammzelle eine Blastozyste, bestehend aus dem Trophoblast, festgelegt auf die Bildung von extraembryonalem Gewebe, sowie der "inneren Zellmasse" (ICM), die sich entweder auf die Bildung des Epiblasts oder des primitiven Endoderms festlegt (Tewary *et al.*, 2018). Die Spezifikation in die Blastozyste resultiert in pluripotenten Zellen des Epiblasts, die bis zu 14 Tage der embryonalen Entwicklung ihre Pluripotenz erhalten. Zu pluripotenten Stammzellen zählen embryonale Stammzellen (ESCs), die aus der inneren Zellmasse von Präimplantationsembryonen stammen, Epiblast-Stammzellen (EpiSCs), die aus der Epiblastschicht der implantierten Embryonen stammen, sowie iPSCs, die artifiziell aus somatischen Zellen durch ektopische Expression bestimmter pluripotenzbezogener Faktoren erzeugt werden (Brons *et al.*, 2007; Kaufman & Evans, 1981; Takahashi & Yamanaka, 2006). Sie ähneln den natürlichen pluripotenten Stammzellen (PSCs) in vielen Merkmalen, wie zellbiologische Eigenschaften, Pluripotenz und epigenetische Signaturen. Durch eine Reihe von Differenzierungsentscheidungen durchlaufen die PSCs eine Linienbindung und entwickeln sich nachfolgend zu somatischen Stammzellen der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm mit weiter eingeschränkter Differenzierungsfähigkeit, die sich durch ihre Multipotenz, der Fähigkeit sich in Zellen eines

bestimmten Organtypus zu differenzieren, auszeichnen (Weissman, 2000). Zu diesen multipotenten Stammzellen zählen auch adulte Stammzellen wie hämatopoetische, neurale und mesenchymale Stammzellen, die bei adulten Organismen eine Art Reparatursystem darstellen, welches über eine lebenslange unbegrenzte Teilungs- und Differenzierungsfähigkeit verfügt, um verletzte Zellen und Gewebe aufzufüllen (Bellenchi *et al.*, 2013). Hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks zum Beispiel sind darauf beschränkt, alle Zelltypen des Blutsystems hervorzubringen. Aus diesen multipotenten Stammzellen entstehen dann weiter spezialisierte Zelltypen, die sich nur in einige wenige Zellen differenzieren, wie beispielsweise lymphoide oder myeloide Vorläuferzellen (Bindu A & B, 2011). Am Ende der Stammzellhierarchie stehen unipotente Stammzellen, wie spermatogoniale Stammzellen, mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung jedoch mit einem begrenzten Entwicklungspotenzial, aus dem nur ein einziger Zelltyp, wie z. B. Spermien, hervorgeht. Aus den unipotenten Stammzellen differenzieren sich schließlich ausgereifte Zelltypen, welche ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben. Hinsichtlich der Terminologie werden unipotente Stammzellen auch mit ausdifferenzierten Zellen gleichgesetzt, oder nach ihrer endgültigen Spezifikation als "nullipotent" bezeichnet, da sie nicht in der Lage sind, andere Zelltypen hervorzubringen (Berdasco & Esteller, 2011; Tewary *et al.*, 2018).

Insbesondere die Langzeitkulturen von Stammzellen *in vitro*, die Aufrechterhaltung ihres undifferenzierten Zustands, die Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur multidirektionalen Differenzierung sind die Voraussetzungen für die Erforschung der Mechanismen und Anwendungen von Stammzellen. Ethische Fragen, lange Zeit ein Engpass bei der Erforschung der regenerativen Medizin auf der Grundlage von ESCs, konnten mit der Entwicklung von iPSCs gelöst werden. iPSCs sind den embryonalen Stammzellen in Morphologie, Gen- und Proteinexpression, epigenetischen Veränderungen, Zellvermehrung, Differenzierung sowie Embryo- und Teratombildung sehr ähnlich. Trotz der später näher betrachteten vielversprechenden Anwendung beinhaltet die Technologie der iPSCs auch diverse Einschränkungen für ihren breiten klinischen Einsatz, wie beispielsweise die Aktivierung von Proto-Onkogenen. Daher ist es zu einem Schwerpunkt der aktuellen Stammzellenforschung geworden, den Wirkmechanismus der Pluripotenz, seine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stammzelleneigenschaft von ESC, sowie bei der Induzierung der Reprogrammierung weiter zu erforschen (G. Chen *et al.*, 2020). Die Erzeugung und langfristige Vermehrung authentischer multipotenter Stammzellen bleibt, durch das Fehlen etablierter Methoden zur Erhaltung, wie sie für die Maus-ESC-Kultur verwendet werden, begrenzt. Die erfolgreiche Erzeugung und Vermehrung stabiler Stammzelllinien erfordert die Entwicklung von

Kulturbedingungen, die den spezifischen Stammzellzustand erfassen und deren langfristige Selbsterneuerung erleichtern.

1.2 iPSCs – Entstehung und Einsatzmöglichkeiten

Die definierenden Eigenschaften von PSCs, die Selbsterneuerung und das Potenzial zur Differenzierung in jeden Zelltyp, eröffnen Möglichkeiten für ihren Einsatz in der regenerativen Medizin. Sir John B. Gurdon hat bereits 1962 in seinem wegweisenden Experiment den Zellkern einer Froscheizelle durch einen Zellkern einer differenzierten somatischen Froschzelle ersetzt. Dieser „Klon-Embryo“ war anschließend in der Lage in alle Zellen des Frosches zu differenzieren, was den Beweis erbrachte, dass auch Zellkerne einer differenzierten Zelle prinzipiell wieder auf ein frühes embryonales Stadium reprogrammiert werden können (Gurdon, 1962). Die Klonierung von Dolly 1996 zeigte, dass Kerne aus differenzierten Säugetierzellen, durch in der Eizelle vorhandene trans-aktive Faktoren, in einen undifferenzierten Zustand reprogrammiert werden können (Campbell, McWhir, Ritchie, & Wilmut, 1996). Diese Entdeckungen führten zu einer Suche nach Faktoren, die eine ähnliche Reprogrammierung ohne somatischen Zellkerntransfer vermitteln könnten. Durch die Nutzung des Wissens, dass ESCs über Reprogrammierungskapazitäten verfügen, identifizierten Takahashi & Yamanaka (2006) die Transkriptionsfaktoren Octamer 3/4 (Oct-4), *sex determining region Y-related HMG box 2* (Sox-2), *Kruppel-like factor 4* (Klf4) und c-Myc, um das Entwicklungspotenzial einer ESC auf eine terminal differenzierte somatische Zelle zu übertragen. Mittels retroviraler ektopischer Expression dieser vier Transkriptionsfaktoren konnten murine embryonale und adulte Fibroblasten in ein pluripotentes Stadium reprogrammiert werden und somit erstmals induzierte PSCs erzeugt werden (Takahashi & Yamanaka, 2006). Die Bedeutung dieser Entdeckung belegt die Tatsache, dass Shinya Yamanaka und Sir John B. Gurdon hierfür im Jahre 2012 den Medizinnobelpreis erhielten. Wenig später bildete die bahnbrechende Neuprogrammierung humaner iPSCs (hiSPCs) aus somatischen Zellen mittels der gleichen Faktoren die Grundlage zur Erzeugung patientenspezifischer pluripotenter Zelllinien (Takahashi *et al.*, 2007). Um iPSCs bei der Behandlung menschlicher Erkrankungen einsetzen zu können, ist es wichtig, zunächst verschiedene Aspekte hinsichtlich der Sicherheit der Zellen für die klinische Anwendung zu prüfen. Die Erstellung solcher patientenspezifischer iPSCs ist jedoch nach wie vor ein technisch und zeitaufwändiges Verfahren und Probleme, wie epigenetische Veränderungen während des Reprogrammierungsprozesses, müssen gelöst werden, bevor die iPSC-Technologie routinemäßig eingesetzt werden kann (Ruggieri *et al.*, 2014). Beispielsweise birgt die Nutzung des Proto-Onkogens *c-myc* eine potenzielle mutagene Wirkung, was die Suche nach Faktoren zur Reprogrammierung ohne Nutzung von *c-myc* vorangetrieben hat (Okita,

Ichisaka, & Yamanaka, 2007). Die Expression von induzierbarem c-Myc in humanen ESCs (hESCs) induzierte darüber hinaus die Apoptose und die Differenzierung in extraembryonale Entoderm- und Trophektodermnlinien bei gleichzeitiger Repression der pluripotenten Marker Oct-4 und Nanog (Sumi, Tsuneyoshi, Nakatsuji, & Suemori, 2007). Diese Erkenntnisse legten nahe, dass Kombinationen von Faktoren ohne potenziell mutagen wirkende Proto-Onkogene wie *klf4* und *c-myc*, beziehungsweise Alternativen zu den Yamanaka-Faktoren, zur Reprogrammierung menschlicher Zellen erforderlich sind. Kurz nach der erstmaligen Reprogrammierung humaner iPSCs gelang einer weiteren Arbeitsgruppe deren Erstellung mittels der bekannten Faktoren Oct-4 und Sox-2, jedoch anstelle der Proto-Onkogene *klf4* und *c-myc* unter Verwendung von *nanog* und *lin-28* (Yu *et al.*, 2007).

Die Herstellung geeigneter Zellen durch iPSCs erfordert eine Umprogrammierung somatischer Zellen und eine anschließende Redifferenzierung. Dieser Prozess ist zum einen sehr aufwändig und langwierig, und zum anderen bergen pluripotente Zellen wie iPSCs das Risiko von Teratomen, wenn sie *in vivo* transplantiert werden (L. Wang *et al.*, 2013). Dies warf die Frage auf, ob Transkriptionsfaktoren direkt andere definierte somatische Zellschicksale und nicht nur einen undifferenzierten Zustand herbeiführen könnten, um das Risiko der Tumorentwicklung von induzierten pluripotenten Stammzellen nach ihrer Transplantation zu reduzieren. Ein neuer Ansatz diese Probleme zu bewältigen, bietet die direkte Konversion somatischer Zellschicksale in einen anderen Zelltypus ohne eine vollständige Reprogrammierung in den pluripotenten Status. Insbesondere wurden funktionelle Neuronen, so genannte induzierte Neuronen (iN), direkt aus Fibroblasten durch retrovirale Zufuhr neural-spezifischer Transkriptionsfaktoren oder microRNAs generiert. Vierbuchen *et al.* (2010) gelang erstmals eine direkte Konversion somatischer Fibroblasten durch die retrovirale ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren *achaete-scute complex homolog 1* (*Ascl1*), *Brn2* (*Pou3f2*) und *myelintranscription factor 1 like* (*Myt1l*) in funktionelle Neuronen. Diese iN-Zellen zeigten neuronale Eigenschaften, elektrophysiologische Aktivität und die Fähigkeit, Synapsen zu bilden, ohne dabei die morphologischen und molekularen Merkmale der ursprünglichen Spenderzellen aufzuweisen (Vierbuchen *et al.*, 2010). Die Generierung von iN-Zellen aus nicht-neuralen Abstammungslinien belegte deutlich, dass die Überexpression einiger weniger "Master"-Faktoren ausreicht, eine spezifische Abstammungsänderung in Zellen aus verschiedenen embryonalen Schichten zu bewirken. Da es sich bei differenzierten Zellen jedoch um post-mitotische Zellen handelt, ist es eine Herausforderung, ausreichende Mengen von Zellen für weitere grundlegende und klinische Anwendungen zu generieren. Zur autologen klinischen Anwendung werden große Mengen an Spenderzellen zur Transplantation benötigt, was ihren Einsatz dahingehend limitiert (Ruggieri *et al.*, 2014).

In diesem Zusammenhang rückte die linienspezifische Transdifferenzierung in das Interesse verschiedener Forschungsgruppen. Hierbei werden somatische Zellen in einem Schritt in linienspezifische Stamm-/Vorläuferzellen einer anderen Keimschicht reprogrammiert, ohne dabei das pluripotente Zwischenstadium zu erreichen. Kim *et al.* (2011) belegten, dass die transiente Induktion der vier Yamanaka- Reprogrammierungsfaktoren (Oct-4, Sox-2, Klf4 und c-Myc) Fibroblasten effizient in funktionelle neurale Stamm-/Vorläuferzellen mit entsprechenden Signalinputs transdifferenzieren kann. Im Vergleich zu induzierten Neuronen (oder iN-Zellen, die direkt aus Fibroblasten umgewandelt werden) haben transdifferenzierte neurale Stammzellen (NSCs) den entscheidenden Vorteil, dass sie *in vitro* expandierbar sind und die Fähigkeit behalten, mehrere neuronale Subtypen und Gliazellen hervorzubringen. Mehrere Arbeiten zeigten in der Folge die direkte Umwandlung von Fibroblasten in induzierte neurale Stammzellen (iNSC), die sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und -differenzierung in Neuronen und Glia auszeichnen und damit eine potenziell unbegrenzte Quelle neuroektodermaler Zellen darstellen (Tian, Zhao, Biswas, & Deng, 2018). Die Differenzierung solcher iNSCs entlang der neuralen Abstammungslinie und die *In-vitro*-Modellierung der Krankheit ermöglichen neben dem besseren Verständnis dieser Krankheiten ein Arzneimittel-Screening und könnten schließlich funktionelle Zellen für die autologe Transplantation bereitstellen. Die klinische Anwendung von iNSCs wird jedoch stark eingeschränkt durch die Verwendung von viralen Vektoren während des direkten Reprogrammierungsprozesses somatischer Zellen (Ruggieri *et al.*, 2014). Retro- oder lentivirale Transduktionssysteme können eine zufällige chromosomale Integration in das Genom der Spenderzelle verursachen, was zu unvorhersehbaren genetischen Funktionsstörungen, wie dem Risiko der Mutagenese und potenzieller Teratombildung führen kann (Jung, Hysolli, Kim, Tanaka, & Park, 2012).

Jüngere experimentelle Arbeiten konzentrierten sich auf die Direktindifferenzierung von Fibroblasten zu Stammzellen unter Vermeidung viraler Integration. Wang *et al.* (2013) nutzten erfolgreich ein episomales System zur Abgabe von Reprogrammierungsfaktoren in Kombination mit einem chemisch definierten Kulturmedium, um epithelähnliche Zellen aus menschlichem Urin in neurale Vorläuferzellen (NPCs) umzuprogrammieren. Um die Risiken einer Insertionsmutagenese durch retrovirale Vektoren zu vermeiden, wurden verschiedene Ansätze zur Erzeugung von iPSCs entwickelt, wie durch nicht-integrierende transiente adenovirale Plasmid-Transfektionen oder das Piggybag-Transposon (Jung *et al.*, 2012; Woltjen *et al.*, 2009; Yu, Vodyanik, Smuga-Otto, Antosiewicz-Bourget, Frane, Tian, Nie, Jonsdottir, Ruotti, Stewart, Slukvin, *et al.*, 2007). Kim *et al.* (2010) generierten erfolgreich

hiPSCs, indem sie definierte Reprogrammierungsproteine direkt durch zellpenetrierende Peptide (CPP) in Fibroblasten einbrachten.

1.3 Stammzelltherapie zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen

Bei einer Vielzahl von Krankheiten des zentralen Nervensystems (ZNS) betreffend gibt es derzeit keine wirksame medikamentöse Behandlung, weshalb eine therapeutische Anwendung einer Stammzelltransplantation eine realistische Hoffnung zur Behandlung bietet. Es besteht großes Interesse an der Gewinnung von humanen neuronalen Stammzellen (NSC), die zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen oder zur Untersuchung im Labor verwendet werden können. Seit der erfolgreichen Etablierung von hESCs durch Thomson 1998, wurden bedeutende Fortschritte in deren Differenzierung in verschiedene Linien biologisch aktiver Zellen, einschließlich Kardiomyozyten, Oligodendrozyten und β -Zellen der Bauchspeicheldrüse, erzielt (Cohen & Melton, 2011).

Die Isolierung und Verwendung von Stammzellen aus fetalem Gewebe oder körperfremdem adultem menschlichem Gewebe bleibt wegen ethischer Bedenken und immunologischer Einschränkungen eine Herausforderung. Die Nutzung von autologen Stammzellen erscheint hier vorteilhaft, da sie sich in spezifischen Punkten von anderen Stammzellquellen unterscheiden. Zum einen entfallen hierbei Bedenken ethischer Natur, wie dies bei hESCs der Fall ist, da die Isolierung der Zellen aus der ICM des Blastocysten eine Zerstörung des Embryos bedeutet. Ein weiterer Vorteil von autologen Stammzellen ist, dass die Gefahr einer Abstoßung durch die Aktivierung von humanen Leukozyten-Antikörpern des Empfängers bei der Transplantation ausbleibt (Taylor, Bolton, & Bradley, 2011). Die Strategie bei einer autologen Stammzelltransplantation besteht in der Entnahme von Stammzellen aus dem Patienten, gefolgt von einer ausreichenden Vermehrung dieser Zellen, bis sie letztendlich transplantiert werden können. Eine Möglichkeit bietet hier die Technologie der iPSCs, da zur Erzeugung patientenspezifischer Zellen für die autologe Transplantation verwendet werden können (Yu, Vodyanik, Smuga-Otto, Antosiewicz-Bourget, Frane, Tian, Nie, Jonsdottir, Ruotti, Stewart, & others, 2007). Seit der bahnbrechenden Studie von Takahashi und Yamanaka (2006) wurden wesentliche Fortschritte erzielt, um sowohl die Effizienz als auch die Sicherheit der Reprogrammierungsschritte zu verbessern. Die erfolgreiche Etablierung krankheits- und patientenspezifischer iPSCs konnte für zahlreiche Krankheiten, darunter auch für die wichtigsten neurodegenerativen Erkrankungen wie die Parkinson-Krankheit (Park *et al.*, 2008), Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Dimos *et al.*, 2008), Spinale Muskelatrophie (Ebert *et al.*, 2009), Alzheimer-Krankheit (Israel *et al.*, 2012) und die Huntington-Krankheit (Park *et al.*,

2008) erreicht werden. Zwar können iPSCs sowohl die ethischen Bedenken in Bezug auf hESCs als auch die Gefahr einer Abstoßungsreaktion aufgrund autologem Zellmaterial umgehen, jedoch haben sich iPSCs hinsichtlich ihres Entwicklungspotentials in NSCs als teilweise ineffizient, zeitaufwendig und sehr variabel innerhalb verschiedener iPSC-Linien erwiesen (B. Y. Hu *et al.*, 2010; L. Wang *et al.*, 2013). Darüber hinaus bergen pluripotente Zellen wie embryonale Stammzellen, als auch iPSCs und aus ihnen gewonnene Zellen potenzielle tumorogene Risiken, was ihren direkten Einsatz in der Zelltransplantation einschränkt (Fong, Gauthaman, & Bongso, 2010). Transplantiert man undifferenzierte embryonale Stammzellen in einen Organismus, so bilden sich Keimzell-Tumore, so genannte Teratome. Dies beweist zwar deren Pluripotenz, zeigt aber auch, dass für einen erfolgreichen klinischen Einsatz höchst effektive Selektionsstrategien entwickelt werden müssen, um zu gewährleisten, dass die transplantierten Zellen ausschließlich aus dem gewünschten Zelltyp bestehen (L. Wang *et al.*, 2013). Neben einem erhöhten Risiko der Teratombildung bedeutet die Transfektion der Yamanaka/Thomson-Faktoren mittels retroviraler Vektoren ein Mutagenese-Risiko infolge einer Integration des retroviralen Genoms in das Genom der Empfängerzelle.

Eine vielversprechende Alternative zu ESCs und iPSCs bilden gewebespezifische adulte Stammzellen, die aus verschiedenen Geweben in fortgeschritteneren Entwicklungsstadien isoliert werden, wie z.B. hämatopoetische Stammzellen, mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen, Stammzellen aus Fruchtwasser und neurale Stammzellen. Autologe Zellquellen bieten den Vorteil, dass sie ethische Probleme und die Notwendigkeit einer Immunsuppression umgehen. Jedoch stellt sich hierbei das Problem der geeigneten Quellen für diese Stammzellen, welche neben ausreichenden Mengen an Spenderzellen ebenso eine angemessene Qualität darstellen sollten. In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte bei der Verwendung adulter Stammzellen für klinische Anwendungen erzielt. Knochenmarktransplantationen mit hämatopoetischen Stammzellen (HSC) werden routinemäßig zur Behandlung von Patienten mit multiplem Myelom, Lymphomen, Leukämie und verschiedenen Autoimmunkrankheiten durchgeführt (Henig & Zuckerman, 2014).

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind eine vielversprechende Quelle von multipotenten, sich selbst erneuernden Zellen, haben aber den Nachteil einer komplexen Redifferenzierung in beispielsweise cholinerge oder dopaminerge Neuronen (Nam, 2015). Multipotente NSC im sich entwickelnden oder adulten Säugetiergehirn zeichnen sich mit den Eigenschaften eines unbegrenzten Wachstums und einem multipotenten Potenzial zur Differenzierung in drei

Haupttypen von ZNS-Zellen, Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten aus (S. U. Kim & de Vellis, 2009).

Mit fortlaufender Entwicklung nimmt die Anzahl adulter Stammzellen in den meisten Geweben ab. Verschiedene Organe besitzen jedoch ein Stammzell-Kompartiment, das sich in einer spezifischen Mikroumgebung befindet, genannt Nische, die ihr Verhalten reguliert. Gemeinsame Bestandteile von Stammzellnischen sind Signale von somatischen Zellen, eine Basalmembran zur Zellverankerung und extrazelluläre Matrizen (ECMs), die die Adhäsion und Aktivität von Signalmolekülen modulieren (Doetsch, 2003). In diesen Stammzellnischen können sich Stammzellen in verschiedenen proliferativen Zuständen befinden. Zum Beispiel zeigen Stammzellnischen in Geweben mit einem hohen Zellumsatz, wie beispielsweise Blutzellen, der Epidermis, dem Darmepithel und den männlichen Keimdrüsen, ein effektives Gleichgewicht zwischen dem Verlust von Zellen und ihrem Ersatz. Stattdessen werden in Geweben, in denen der Zellverlust begrenzt ist, wie der Leber, der Zähne und dem Gehirn, die adulten Stammzellen in einem ruhigen oder proliferationsarmen Zustand gehalten, der durch physiologische und/oder pathologische Stimuli aktiviert werden kann (Bellenchi *et al.*, 2013).

Präklinische Studien mit NSCs belegen, dass diese nicht nur günstige parakrine Wirkungen bei der Regeneration und Reparatur von Nervengewebe haben, sondern auch direktes Differenzierungspotential in verschiedene neuronale Linien beinhalten, um Netzwerke mit umgebenden neuronalen Zellen zu bilden (Ginberg, Arien-zakay, Lazarovici, & Lelkes, 2012; Lindvall & Kokaia, 2010). Das Ziel einer regenerativen Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten ist die funktionelle Reparatur von geschädigtem Nervengewebe durch neurologische Krankheiten, wofür NSCs prädestiniert scheinen. Bei adulten NSCs handelt es sich um gewebsresidente multipotente neurale Vorläuferzellen, die Selbsterneuerungskapazität beinhalten, solange sie undifferenziert erhalten werden können. Unter geeigneten Kulturbedingungen können sie zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ausdifferenziert werden (Nam, 2015). Neben ihrem Vorkommen in sich entwickelnden Stadien der Embryogenese ist das Vorkommen von NSCs im adulten ZNS auf die subgranuläre Zone (SGZ) im *Gyrus dentatus* des Hippocampus, wo neue granuläre Neuronen gebildet werden, und die subventrikuläre Zone (SVZ) der lateralen Ventrikel, wo kontinuierlich neue Neuroblasten produziert werden und durch den rostralen migratorischen Strom (RMS) zum Riechkolben wandern, beschränkt (Bellenchi *et al.*, 2013). Die neurogene Nische um SVZ und SGZ stellt eine einzigartige Mikroumgebung dar, die Proliferation und Differenzierung der NSCs reguliert (Mathieu *et al.*, 2010).

Die Entdeckung neuraler Stammzellnischen im adulten Gehirn hat die Möglichkeit eines endogenen neuronalen Ersatzes für die neuronale Gewebereparatur erhöht, jedoch sind im menschlichen Gehirn diese Vorläuferzellen in der SVZ in relativ geringer Menge vorhanden, und die Gewebsschädigung infolge der neurodegenerativen Erkrankung könnte sich auch auf diese neurogenen Nischen auswirken (Hagl, Heumüller-Klug, Wink, Wessel, & Schäfer, 2013). Darüber hinaus ist die Isolierung ausreichender Mengen von Spendergewebe aus der SVZ an sich schon ein Risiko und könnte die Nischeneigenschaften beeinträchtigen. Eine Reihe von Studien zeigten Veränderungen in der Menge proliferierender Zellen in der menschlichen Hirn-SVZ bei der Parkinson- (PD) und der Alzheimer-Krankheit (AD) (Winner, Kohl, & Gage, 2011). Therapeutische Ansätze verlangen somit eine neuronale Stammzellquelle, die bis ins Erwachsenenalter persistiert, mit einem einfachen und minimal invasiven Zugang. Eine potenzielle Quelle autologer neuraler Stammzellen für Zellersatztherapien bietet das enterische Nervensystem (ENS) aufgrund seiner Ähnlichkeiten mit dem ZNS, wie der komplexen neuronalen Organisation, dem Neurotransmitterspektrum und der chemischen Kodierung (Furness, 2006). Das ENS besteht aus ganglionären und aganglionären Plexus, die enterische Neuronen, enterische Gliazellen und neurale Stamm- und Vorläuferzellen (NSPCs) enthalten (Hagl *et al.*, 2013). Ein kleiner Pool von enterischen NSPCs besteht lebenslang und ist verantwortlich für die Plastizität im ENS. Enterische NSPCs exprimieren typische Stammzellmarker wie Sox-2, Nanog, Oct-4 und auch Nestin, als Markerproteine neuronaler Vorläuferzellen (Hagl *et al.*, 2013). NSPCs aus dem ENS proliferieren und bilden Neurosphären *in vitro*, die sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung als auch die Fähigkeit zur Differenzierung in Neuronen und Gliazellen besitzen (Metzger, Caldwell, Barlow, Burns, & Thapar, 2009). Im Allgemeinen gibt es mehrere Hauptgruppen von Stammzellen, die für therapeutische Zwecke verwendet werden. In diesem Zusammenhang werden embryonale, neurale, induzierte pluripotente und mesenchymale Stammzellen verwendet. Einen Überblick über die verschiedenen Strategien für ihre Anwendung im Rahmen von Stammzelltherapien bei neurodegenerativen Erkrankungen gibt die folgende Abbildung 1.

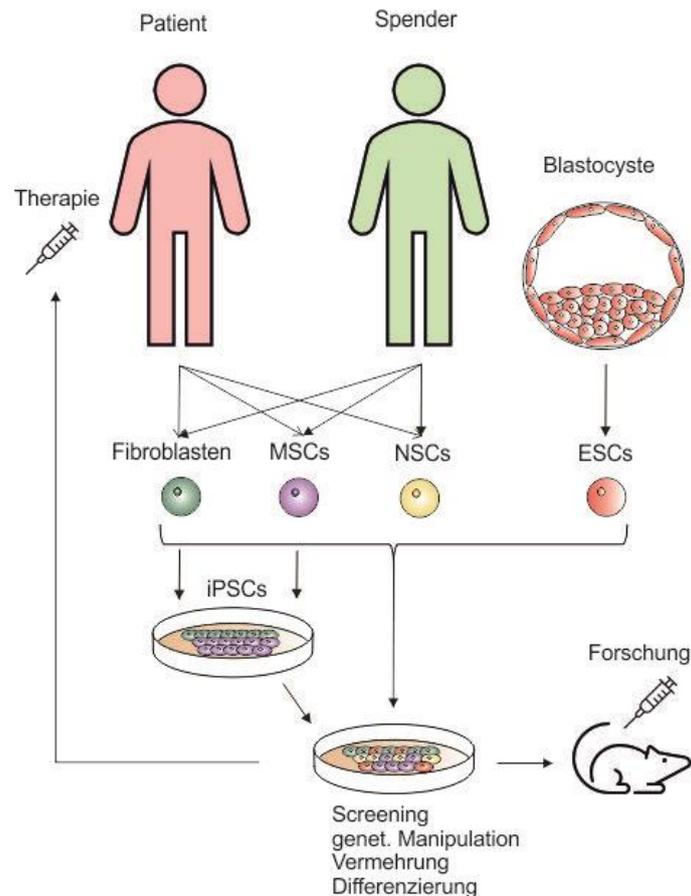


Abbildung 1: Stammzellbasierte Therapieansätze für neurodegenerative Erkrankungen. Als Quelle für verschiedene Stammzelltypen kommen Patienten, gesunde Spender oder im Falle von embryonalen Stammzellen (ESCs) Blastozysten in Frage. Neuronale Stammzellen (NSCs) können abhängig der Patientenquelle autolog oder durch einen Spender genutzt werden. Als Quelle für Fibroblasten und Mesenchymale Stammzellen (MSCs) kommen sowohl Patient, als auch Spender in Frage, wobei hier im Bedarfsfall auch die Reprogrammierung zu induzierten pluripotenten Stammzellen erfolgen kann. Die weitere Prozessierung beinhaltet die ausreichende Vermehrung, Differenzierung, genetische Manipulation, Verwendung für das Screening potentieller Therapeutika oder Testungen an Modellorganismen wie Mäusen oder anderen Organismen. Schließlich werden die Stammzellen Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen zu therapeutischen Zwecken transplantiert (Abbildung nach Vasic *et al.*, 2019).

Die Menge der Stammzellen, die aus embryonalem oder adultem Gewebe isoliert werden kann ist sehr begrenzt, weshalb es notwendig ist, *in vitro*-Kulturbedingungen zu entwickeln, welche die Proliferation der Stammzellen erweitern und spontane Ausdifferenzierungen minimieren, um diese Stammzellen für eine Vielzahl von biologischen Studien, Krankheitsmodellen und stammzellbasierter Therapien nutzbar zu machen (X. Chen, Ye, & Ying, 2015).

1.4 P19-Zellen als Modellsystem neuronaler Differenzierung

Alle Stammzellen zeichnen sich durch die Schlüsselmerkmale Selbsterneuerung und Differenzierung aus. Die erste erfolgreiche Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) im Jahr 1981 belegte, dass Stammzellen unter geeigneten Kulturbedingungen in der Lage sind, sich langfristig selbst zu erneuern und gleichzeitig die Fähigkeit zur Differenzierung in mehrere Zelltypen zu erhalten (Kaufman & Evans, 1981; Martin, 1981). Unter Verwendung geeigneter Kulturbedingungen wurden nachfolgend stabile pluripotente Stammzelllinien aus verschiedenen Arten wie Maus, Ratte und Mensch etabliert.

Die P19-Zelllinie ist eine euploide männliche (40:XY) Mauszelllinie und entstammt einem, durch Transplantation eines 7,5-tägigen Embryos in den Testis, induziertem Teratokarzinom (M. W. McBurney, 1993; M. W. McBurney, Jones-Villeneuve, Edwards, & Anderson, 1982). Teratokarzinome enthalten frühe embryoähnliche Zellen, so genannte embryonale Karzinomzellen (ECCs), die sich durch drei verschiedene Merkmale charakterisieren: Sie sind maligne, sie können sich in jede der drei Keimschichten oder extraembryonales Gewebe differenzieren und sie entwickeln sich normal, wenn sie in die Blastozyste injiziert werden (Kelly & Gatie, 2017). Die aus der Formierung des Tumors isolierten pluripotenten Zellen der P19-Zelllinie besitzen damit die Eigenschaft, sich in Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren. 1982 wurde *in vitro* nachgewiesen, dass Retinsäure (RA) in der Lage ist die Zellen der embryonalen Karzinomzellen P19 zur Differenzierung in neuronales und gliales Gewebe zu stimulieren. Die Induktion mit RA induziert die neuronale Differenzierung, indem sie Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten bildet und anschließend neuronale Netzwerke produziert, die neurophysiologisch funktionell sind (M. W. McBurney, 1993; Monzo *et al.*, 2012a). Aggregate von P19-Zellen, die mit DMSO behandelt werden, differenzieren sich in endodermale und mesodermale Derivate, einschließlich Herz- und Skelettmuskel (Alam, Suzuki, & Tsukahara, 2010). Da die neuronal differenzierten P19-Zellen funktionell primären neuronalen Zellen ähnlich sind, gelten P19-Zellen als ein hervorragendes Modellsystem zur Analyse neuronaler Differenzierungs- und Aktivitätsmechanismen (Canzoniero *et al.*, 1996; Endo, Antonyak, & Cerione, 2009; C. Wang *et al.*, 2006). Die Differenzierung von P19-Neuronen, ausgehend von Neuroepithel-ähnlichen Keimzellen zu post-mitotischen Neuronen entspricht sowohl funktionell, als auch morphologisch dem Differenzierungsweg des zentralen Nervensystem von Säugetieren (Monzo *et al.*, 2012a). Die RA-induzierte Differenzierung ist irreversibel, und die sich entwickelnden post-mitotischen Neuronen überleben für längere Zeit in Kultur oder wenn sie in das ZNS adulter Ratten transplantiert werden. Darüber hinaus reifen RA-induzierte, in die Striata adulter Ratten

transplantierte P19-Zellen, zu voll ausgereiften ZNS-Neuronen mit elektrophysiologischen Eigenschaften (Magnuson, Morassutti, Staines, McBurney, & Marshall, 1995).

Die RA-Aktivität wird vor allem durch Mitglieder der Unterfamilie der Retinsäure-Rezeptoren (RAR), nämlich RAR α , RAR β und RAR γ , vermittelt, die zur Superfamilie der Transkriptionsfaktoren, den so genannten Nukleären Rezeptoren (NR), gehören. Im Zellinneren wird RA an CRABP2 (*cellular RA-binding protein 2*) gebunden zum Zellkern transportiert, wo es an die RARs bindet. Diese bilden Heterodimere mit Mitgliedern der Retinoid-X-Rezeptoren (RXR)-Unterfamilie (RXR α , RXR β und RXR γ) und fungieren so als Liganden-regulierte Transkriptionsfaktoren durch die Bindung spezifischer RA-Erkennungssequenzen (RAREs) in Zielgen-Promotoren (Di Masi *et al.*, 2015). Die Signalweiterleitung wird nach der Aktivierung der RARs durch die RA initiiert, was zur Rekrutierung des Transkriptionskoaktivators p300 und zur Expression von Zielgenen der Primärantwort führt (J. Chen & Li, 2016). Die Transkription der Gene für die primäre Reaktion der RA erfolgt innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden nach Zugabe der RA in Zellkulturexperimenten. Zahlreiche dieser *immediate early* Gene, wie das Transkriptionsfaktor-Homöobox-Gen *hoxa1* besitzen *Enhancer*-DNA-Sequenzen die ein RARE wie beispielsweise Direct Repeat₅ (GGTTCA(N₅)AGTTCA) enthalten, an die der RXR/RAR-Heterodimerkomplex binden kann (Gudas & Wagner, 2011). Als Folge wird die Modifikation der Chromatinstruktur initiiert, der Status verschiedener epigenetischer Markierungen verändert und die Regulation verschiedener Signalwege eingeleitet (Osei-Sarfo & Gudas, 2014). Viele Gene werden später unabhängig vom Vorhandensein einer RARE transkriptionell indirekt reguliert. Diese indirekte Regulation findet statt, weil die direkten Zielgene der RA viele verschiedene Transkriptionsfaktor-Gene enthalten, welche ihre Zielgene transkriptionell aktivieren, um sekundäre Reaktionen zu erzeugen.

RARs sind jedoch nicht nur Liganden-abhängige Regulatoren der Transkription, sondern zeigen auch nicht-transkriptionelle Effekte und aktivieren Kinase-Kaskaden, die in den Zellkern integriert sind. Die nicht-genomischen Wirkungen von RARs erzeugen post-translationale Modifikationen, die mit den kanonischen genomischen Wirkungen in Wechselwirkung stehen. Post-translationale kovalente Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung spielen jedoch ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Aktivität von RARs (Di Masi *et al.*, 2015).

Studien zur neuronalen Funktion und Entwicklung gewinnen zunehmend an Interesse, um die molekularen Mechanismen aufzuklären, die der neuronalen Entwicklung und neurologischen Erkrankungen zugrunde liegen. Es gibt verschiedene Ansätze zur Lösung dieser

herausfordernden Probleme, aber der Bedarf an Zellkulturen ist nach wie vor hoch, weil sie kostengünstig, leicht verfügbar und leicht manipulierbar sind (Nakayama *et al.*, 2014). Studien an P19-Zellen identifizierten eine Reihe von wesentlichen Faktoren für die neuronale Differenzierung wie FGF (*fibroblast growth factor*), BMP (*bone morphogenetic protein*, ein Mitglied der Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Superfamilie und das Notch-Signal, welche auch an der Entwicklung des Säugetierhirns partizipieren, was die Bedeutung von Studien mit Zellkulturlinien belegt (Hiratochi *et al.*, 2007; C. Wang *et al.*, 2006).

1.5 Stemness-regulierende Faktoren von embryonalen

Stammzellen

Die Bestimmung des Zellschicksals einer pluripotenten Stammzelle, entweder die Erhaltung der Pluripotenz oder die Differenzierung in eine der drei Keimschichten, wird sowohl durch extrinsische als auch durch intrinsische Faktoren gesteuert. Intrinsische Faktoren beziehen sich hauptsächlich auf Transkriptionsfaktoren, die eine wesentliche Rolle bei der direkten Kontrolle der Genexpression in Zellen spielen, und die wichtigsten intrinsischen Faktoren im Zentrum des Pluripotenz-Netzwerks von ESCs bilden die Kernkomponenten Oct-4, die Sox-2 und Nanog (K. M. Loh & Lim, 2011). Die drei Haupttranskriptionsfaktoren bilden eine automatische und wechselseitige Regulierung in ESCs. Diese zentralen Transkriptionsfaktoren werden zusammen mit anderen Pluripotenzmarkern wie Esrrb, Klf4, Rex1, Klf2 usw. sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der inneren Zellmasse der Blastozyste exprimiert (Y. H. Loh *et al.*, 2006). Der pluripotente Zustand der Stammzellen wird durch den zentralen Schaltkreis aufrechterhalten, in dem Oct-4, Sox-2 und Nanog ihre eigene Expression, die gegenseitige, sowie auch die Expression mehrerer Gene kontrollieren, die mit Signalwegen der Pluripotenz in Verbindung stehen (Olariu, Lövkvist, & Sneppen, 2016). In dieser Arbeit wurde neben der Expression der beiden Kerntranskriptionfaktoren Oct-4 und Nanog mit Lin-28 auch die post-transkriptionelle Ebene beleuchtet. Die Domänenstruktur der drei untersuchten Pluripotenzmarker ist in der folgenden Abbildung 2 dargestellt. Lin-28 ist als hoch konserviertes RNA-bindendes Protein (RBP) ein post-transkriptioneller Hauptregulator des Zellschicksals, der die Embryonalentwicklung steuert. Es unterstützt die Proliferations- und Stoffwechselkapazitäten von PSCs, fördert die Umprogrammierung zur Pluripotenz und erleichtert den Übergang von naiver zu grundierter Pluripotenz. Die Wirkung wird hierbei durch die Blockade der Biogenese der let-7-microRNA (miRNA)-Familie und durch direkte Translationssteigerung oder -unterdrückung ausgewählter Boten-RNAs vermittelt (Tsanov *et al.*, 2017).

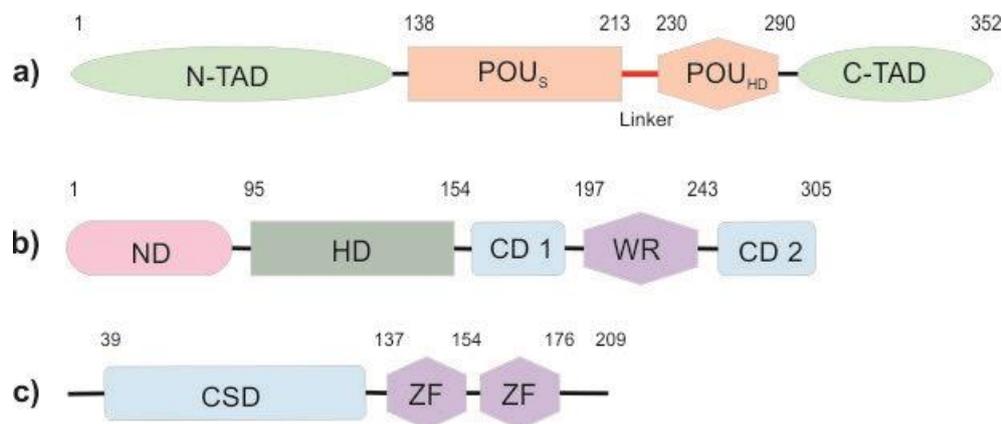


Abbildung 2: Domänenstruktur der Stammzelltranskriptionsfaktoren Oct-4 (a) und Nanog (b), sowie dem RNA-bindenden Protein Lin-28 (c). TAD: Transaktivierungsdomäne; POU: abgeleitet vom Hypophysenspezifischen Pit-1, den Oktamer-bindenden Proteinen Oct-1 und Oct-2 und dem neuronalen Unc-86 aus *C. elegans*; ND: N-terminale Domäne; CD: C-terminale Domäne; HD: Homöodomäne; WR: *tryptophan repeats*; CSD: *cold-shock-domain*; ZF: Zinkfingerdomäne CCHC; Die Zahlen repräsentieren die korrespondierende Aminosäure-Länge. Abbildung nach Tsanov *et al.* (2017).

1.5.1 Oct-4

Pou5f1 (POU-Domäne, Klasse 5, Transkriptionsfaktor 1), auch bekannt als Oct-4 (Oktamerbindender Transkriptionsfaktor 4 oder Oct-3/4), ist ein Homöodomänen-Transkriptionsfaktor der Pit-Oct-Unc- (POU) Familie und wird in hohem Maße in undifferenzierten embryonalen Stammzellen und embryonalen Karzinomzellen exprimiert (Minucci *et al.*, 1996). Oct-4 gilt im Triumvirat der Kerntranskriptionsfaktoren Oct-4/Sox-2/Nanog als wichtigster Faktor der *Stemness*. Oct-4 aktiviert seine Zielgene durch Bindung der POU-Domäne an ein oktameres Sequenzmotiv einer ATGCAAAT-Konsensussequenz. Das Oct-4-Protein besteht aus einer N-terminalen Domäne, einer POU-Domäne und einer C-terminalen Domäne. Die POU-Domäne besteht aus zwei strukturell unabhängigen Unterdomänen: einer 75 Aminosäuren umfassenden aminoterminalen POU-spezifischen (POU_S) Region und einer 60 Aminosäuren umfassenden carboxyterminalen Homöodomäne (POU_{HD}) (vgl.: Abbildung 2). Beide Domänen stellen durch eine Helix-Turn-Helix-Struktur einen spezifischen Kontakt mit der DNA her und sind durch einen Linker aus 17 Aminosäuren verbunden (G. Wu & Schöler, 2014). Die Expression findet ausschließlich in pluripotenten Zellen statt, wohingegen während der Gastrulation Oct-4 vermindert gebildet wird (Ghorbani *et al.*, 2013).. Die Bedeutung von Oct-4 wird unter anderem durch die Tatsache belegt, dass die Überexpression von Oct-4 die Pluripotenz in Zellen ohne Sox-2-Expression wieder herstellen kann (Masui *et al.*, 2007). Oct-4 spezifiziert die ICM während der Embryonalentwicklung durch Inhibition einer Differenzierung in Richtung des Trophektoderms (TE) (Nichols *et al.*, 1998). Für die

Aufrechterhaltung des pluripotenten Status *in vitro* ist hierfür eine sorgfältig ausbalancierte Expression von Oct-4 erforderlich. Eine Inaktivierung von Oct-4 in mESCs führt zu einem rapiden Verlust der Selbsterneuerungskapazität und zu einer Induktion der trophoektodermalen Differenzierung, wohingegen eine weniger als zweifache Überexpression von Oct-4 eine endo- und mesodermale Differenzierung bedingen kann (Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000).

Die Expression des *oct-4*-Gens ist abhängig von wenigstens drei *upstream* gelegenen *cis*-regulierenden Regionen (Abbildung 3), darunter der proximale Promotor (PP), der sich innerhalb der ersten 250 bp der Transkriptionsinitiationsstelle befindet, der proximale Enhancer (PE) und der distale Enhancer (DE) (Yeom *et al.*, 1996). Obwohl Oct-4 in pluripotenten Zelllinien von der ICM über das primitive Ektoderm bis zu primordialen Keimzellen (PGC) kontinuierlich exprimiert wird, wird seine Transkription je nach Entwicklungsstadium durch unterschiedliche Mechanismen gesteuert. Der DE aktiviert die Expression in ICM und PGC, während die Expression im primitiven Ektoderm durch den PE reguliert wird (Yeom *et al.*, 1996). In verschiedenen pluripotenten Zelllinien wie embryonalen Stammzellen, Epiblastenstammzellen und embryonalen Karzinomzellen wird die Expression von Oct-4 ebenfalls durch verschiedene Enhancer gesteuert: DE steuert die Expression in ESCs und F9 ECC-Zellen, während PE die Expression in EpiSCs und den in dieser Arbeit verwendeten P19 ECC-Zellen steuert (Brons *et al.*, 2007; Yeom *et al.*, 1996). Die Existenz zweier unterschiedlicher Mechanismen für die Transkriptionsregulierung deutet darauf hin, dass Oct-4 je nach Zelltyp oder Entwicklungsstadium unterschiedliche Rollen spielen kann. Jeder Enhancer enthält mehrere potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die die *oct-4*-Expression entweder aktivieren oder unterdrücken können. Darüber hinaus unterdrückt die Methylierung dieser Regionen die *oct-4*-Expression in differenzierten Zellen. Mehrere positive und negative Regulatoren binden an das *oct-4*-Gen, um dessen Expression zu regulieren. Es ist bekannt, dass Mitglieder der Superfamilie der *orphan-nuclear*-Rezeptoren wie beispielsweise TLX, an Sp1-Stellen und *hormone response elements* (HREs) im PE und PP binden können, welche die *oct-4*-Expression beeinflussen (G. Wu & Schöler, 2014). *Footprinting*- und Reporteranalysen zeigten, dass sich ähnelnde GC-reiche Regionen wie Sp1 im Promotor, die Stelle 1A im PE-Element und die Stelle 2A im identifizierten DE starkem Schutz und einer Hypermethylierung unterliegen. Diese Elemente sind an der Aktivität des *oct-4*-Promotors beteiligt und beeinflussen die Transkriptionsaktivität (Minucci *et al.*, 1996). Der Transkriptionsfaktor Sp1 ist ein Kernprotein, das zur Familie der Proteine mit Zink-Finger-Domänen gehört, die GC- oder GT-Boxen binden und spielt eine direkte Rolle bei der Transkriptionsaktivierung mehrerer Gene (Y. Q. Li, 2017). Wenn das *oct-4*-Gen exprimiert wird

sind diese Stellen besetzt, wohingegen nach RA-Behandlung in ESCs und P19 ECC-Zellen diese Besetzung aufgehoben ist, parallel zum starken Rückgang der *oct-4*-Genexpression (Minucci *et al.*, 1996). In der nachfolgenden Abbildung 3 ist die genomische Struktur von *oct-4* schematisch mit der 5' untranslatierten Region (UTR) als regulatorischer Komponente dargestellt.

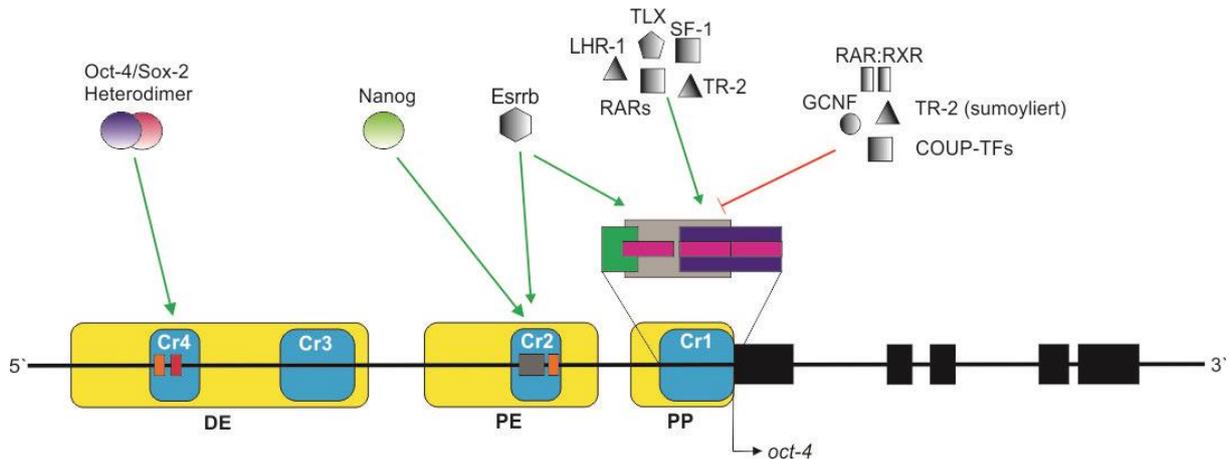


Abbildung 3: Schematische Struktur des murinen *oct-4*-Gens mit Bestandteilen der 5'UTR-regulatorischen Elemente. Im proximalen Promoter (PP) von *Oct-4* befindet sich die CR1 mit einer Sp1-Bindungsstelle (grün), einer SF1/Lhr1-Bindestelle (violett) und einem HRE, das dem kanonischen RA-responsiven Element (RARE) ähnelt (RARE 2 (grau)). Das HRE (pink) ist in drei direkten Wiederholungen, R1 (-108/-103), R2 (-101/-96) und R3 (-95/-90), angeordnet. Der CR1-Bindungskomplex im PP um nukleare Rezeptoren wie *Esrrb* (*estrogen-related receptor β*), *TLX* (*nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1*), *Lhr1* (*liver receptor homologue-1*), *SF-1* (*steroidogenic factor 1*), *TR2* (*testis receptor 2*), *GCNF* (*germ cell nuclear factor*) *RARs* (*retinoic acid receptors*) und *COUP-TFs* (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*) schafft eine nukleosomfreie Region und leitet die Transkription der fünf codierenden Exone (schwarz) ein. RA-induzierte *RAR:RXR*-Heterodimere, *GCNF*, und *COUP-TFs* reprimieren die Transkription, während *TLX*, *Esrrb*, ligandenunabhängige *RARs*, *LRH-1* und *SF-1* das *oct-4*-Gen aktivieren. *TR2* bindet HRE, um, abhängig von seiner Sumoylierung an Lys-238, *Oct-4* zu aktivieren oder zu unterdrücken. Der proximale Enhancer (PE) beinhaltet den *Nanog*-zentrierten Bindungskomplex *CR2* (-1053/-855) um *Esrrb* mit einer 1A-Stelle (orange), sowie das RA-responsible, unabhängig von *RARs*, fungierende Element *RARE-1* (grau). Der distale Enhancer beinhaltet die *CR3* (-1393/-1289) und die *CR4* (-2096/-1966), enthält eine 2A-Stelle (orange) und eine konservierte Octamer/*Sox*-Bindungsstelle (*HMG/POU*-Kassette (rot); -2040/-2024), die für die Autoregulation durch *Oct-4/Sox-2*-Heterodimere wesentlich ist. Angaben zur Position in bp relativ zum *Oct-4*-TSS. Abbildung nach Gupta *et al.* (2008), Y. Q. Li (2017), Wagner & Cooney (2013) und Wu & Schöler (2014).

Die regulatorischen Regionen von *oct-4*-Genen in Säugetieren beinhalten vier konservierte Regionen (CR) mit Homologie (CR1 bis CR4). Wie in Abbildung 3 dargestellt, sind bei Mäusen CR1, CR2, CR3 und CR4 lokalisiert in den Sequenzen -126/-1 (innerhalb von PP), -1053/-855 (innerhalb von PE), -1393/-1289 (innerhalb von DE), und -2096/-1966 (innerhalb von DE), jeweils relativ zur Translationsstartstelle (TSS) von *Oct-4* (Nordhoff *et al.*, 2001). *oct-4* DE enthält eine 2A-Stelle und eine konservierte Octamer/Sox-Bindungsstelle (HMG/POU-Stelle), die für die Autoregulation durch *Oct-4/Sox-2*-Heterodimere wesentlich ist. *Sox-2-Oct-4*-Heterodimere binden an HMG/POU-Stellen in CR4 (Y. Q. Li, 2017) Das *Oct-4-Sox-2*-Heterodimer aktiviert auch die Expression von *nanog* durch direkte Bindung an dessen Promotor. *Nanog* wiederum reguliert positiv die Expression von *oct-4*, *sox-2* und *nanog* selbst (Li, 2010). Analysen der Bindungsstellen von *Oct-4-Sox-2* und *Nanog* im *oct-4*-Gen und ihrer Interaktionspartner zeigten, dass *Oct-4-Sox-2* und *Nanog* zwei regulierende Komplexe bilden, die an die CR4- bzw. CR2-Regionen von *oct-4* binden, um die *oct-4*-Transkription zu aktivieren. Der *Sox-2-Oct-4*-zentrierte CR4-Bindungskomplex ist hierbei der spezifische Transkriptionsregulator; der *Nanog*-zentrierte CR2-Bindungskomplex baut die offene Chromatinstruktur um und reagiert auf aktivierende Signale und der CR1-Bindungskomplex um nukleare Rezeptoren wie *Lhr1*, *TH2*, *TLX* und *RARs* schafft eine Nukleosom-freie Region und leitet die Transkription ein (Y. Q. Li, 2017).

Die CR1-Region von *oct-4* enthält mehrere sich überlappende Bindestellen, darunter eine *Sp1*-Bindungsstelle, eine *SF1*-Bindestelle und ein HRE, das dem kanonischen RARE ähnelt (Nordhoff *et al.*, 2001; Vizlin-Hodzic *et al.*, 2011). Das HRE ist in drei direkten Wiederholungen (R1, R2 und R3) einer AGGTCA-ähnlichen Sequenz angeordnet, wobei R1 und R2 durch ein Basenpaar getrennt sind (DR1) und R2 und R3 direkt nebeneinander liegen (DR0). Die R1-, R2- und R3-Regionen des HRE befinden sich an den Maus-Sequenzen -108/-103, -101/-96 bzw. -95/-90, relativ zum *Oct-4*-TSS (Y. Q. Li, 2017).

Neben *Oct-4* und *Nanog* gehört *Sox-2* zu wichtigsten intrinsischen Faktoren für die Erhaltung und Regulierung der Pluripotenz (Ng & Surani, 2011). Der kooperativen Interaktion zwischen HMG von *Sox-2* und der Pit-Oct-Unc (POU) Homöodomäne von *Oct-4* wird eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Pluripotenz von ESCs zugeschrieben (Boyer *et al.*, 2005). *Sox-2* und *Oct-4* interagieren physisch über ihre Domänen HMG und POU zu einem Heterodimer und binden kooperativ an zwei eng beieinander liegenden Stellen (ein HMG-Motiv und eine POU-Motiv: HMG/POU-Kassette) in den regulatorischen Elementen der *Oct-4*- und *Sox-2*-Zielgene, um deren Expression über eine positive und potenziell selbstverstärkende Regelschleife aufrechtzuerhalten (G. Wu & Schöler, 2014). Das Expressionsniveau von *Sox-*

2 muss, wie auch im Falle von Oct-4, in einem dynamischen Gleichgewicht mit anderen synergistischen Faktoren gehalten werden, um die Pluripotenz von Stammzellen aufrechtzuerhalten, wobei eine erhöhte oder erniedrigte Sox-2-Expression zum Verlust der Pluripotenz in ESCs führt (K. M. Loh & Lim, 2011). Oct-4 und Sox-2 besetzen gemeinsam eine große Anzahl von Enhancern/Promotoren und regulieren die Expressionsniveaus ihrer Zielgene. Sie aktivieren die Expression pluripotenter Gene, darunter sich selbst, während sie die Expression von Schlüsselgenen unterdrücken, die für die *In-vitro*-Differenzierung und *In-vivo*-Entwicklungsprozesse verantwortlich sind, wie z. B. *paired-box-protein 6* (Pax6) (Boyer *et al.*, 2005). Eine forcierte Expression von *oct-4* in *sox-2*-null-ESCs konnte die Pluripotenz aufrechterhalten und für die Aktivierung von Oct-Sox-Enhancern ist Sox-2 nicht erforderlich, was darauf hin weist, dass die wesentliche Funktion von Sox-2 in der Pluripotenz darin besteht, *oct-4* zu aktivieren (Olariu *et al.*, 2016)

1.5.2 Nanog

Das Vorhandensein von Nanog gilt als ein Kennzeichen pluripotenter Zellen *in vivo* und *in vitro*, und der Verlust von Nanog ist ein früher Marker der Differenzierung (Chambers *et al.*, 2007). Nanog ist ein Homöobox-enhaltender Transkriptionsfaktor, der eine wesentliche Funktion bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz der ICM und daraus resultierenden ESCs hat (Chambers *et al.*, 2003). Nanog besteht aus 305 Aminosäuren und besitzt eine zentrale HD-Domäne aus 60 Aminosäureresten, die in Hox-Genen hoch konserviert ist und bevorzugt an TAAT(G/T)(G/T) bindet. Außerdem verfügt Nanog über eine Serin-reiche N-terminale Domäne (ND) und eine C-terminale Domäne (CD), die ein Tryptophan-Wiederholungsmotiv (WR) enthält (Yesudhas, Badoo, Anwar, Panneerselvam, & Choi, 2017).

Nanog wird in pluripotenten Zellen von Säugetieren und sich entwickelnden Keimzellen exprimiert und eine Deletion von Nanog führt zu früher embryonaler Letalität (Mitsui *et al.*, 2003). Die Überexpression von Nanog ist in der Lage, die Pluripotenz und die Selbsterneuerungseigenschaften von ESCs unter Bedingungen aufrechtzuerhalten, die normalerweise zur Differenzierung führen würden (Chambers *et al.*, 2003). Nanog wird daher als ein Kernelement des pluripotenten Transkriptionsnetzwerks angesehen. Nanog wurde zudem als erster Faktor identifiziert, der, unabhängig von LIF (*leukemia inhibitory factor*), in der Lage ist die Pluripotenz zu erhalten. Die ektopische *nanog*-Expression führt zu einer stark erhöhten Selbsterneuerung von ESCs völlig unabhängig von LIF. Im Gegensatz dazu führt die Ausschaltung von Nanog zur Differenzierung von ESCs zu Zellen mit den Eigenschaften des Endoderms (Boer *et al.*, 2007). Der Transkriptionsfaktor Nanog setzt verschiedene Mechanismen ein, um die Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen zu fördern. In

Anwesenheit von LIF, das die Selbsterneuerung fördert, gestaltet Nanog das Pluripotenznetzwerk neu, indem es die Zugänglichkeit von Chromatin und die Bindung anderer Pluripotenzfaktoren an Enhancer fördert (Y. Q. Li, 2017). In Abwesenheit von LIF blockiert Nanog die Differenzierung durch Aufrechterhaltung von H3K27me3 (Tri-Methylierung von Lysin 27 an Histon H3), einer repressiven Histonmarkierung an Differenzierungsgenen (Heurtier *et al.*, 2019).

Die Expression von Nanog ist ebenso wie die Expression von Oct-4 und Sox2 abhängig von der Bindung des Oct-4-Sox-2-Heterodimers an ein *cis*-regulatorisches Element im Promotor von *nanog* (Rodda *et al.*, 2005). Nanog wiederum reguliert positiv die Expression von *oct-4*, *sox-2* und *nanog* selbst (Y. H. Loh *et al.*, 2006). Nanog ist ein Hauptregulator für die *oct-4*-Expression und wirkt durch direkte Bindung an eine Stelle (-990 bis -1010 bp relativ zur TSS) innerhalb der CR2-Region des *oct-4*-Enhancers (Y.-Q. Li, 2010) (vgl. Abbildung 3).

1.5.3 Lin-28

Lin-28A ist ein über verschiedenste Arten hinweg hochkonserviertes, RNA-bindendes Protein, welches als wichtiger Regulator an verschiedenen physiologischen Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung, Entwicklung und Metabolismushomöostase beteiligt (I. Heo *et al.*, 2009; H. Zhu *et al.*, 2011, 2010). Im Gegensatz zu *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), wo ein *lin-28*-Gen bekannt ist, sind in Wirbeltieren zwei paraloge Gene identifiziert worden, welche für Lin-28A und Lin-28B codieren (Moss & Tang, 2003). Allen Lin-28 Proteinen gemeinsam ist die einzigartige Paarung zweier Domänen, der *cold shock domain* (CSD) und der Zinkfingerdomäne CCHC, welche beide RNA binden können (Abbildung 2) (Mayr & Heinemann, 2013). In diesen Regionen besitzen Lin-28A und Lin-28B eine hohe Sequenzidentität, unterscheiden sich jedoch in einigen wenigen Punkten. Lin-28B besitzt eine verlängerte C-terminale Region, enthält ein Kernlokalisierungssignal und ist gegenüber dem hauptsächlich im Cytoplasma befindlichen Lin-28A im Zellkern lokalisiert (S. H. Lee *et al.*, 2014; Piskounova *et al.*, 2011). Lin-28A ist jedoch ebenfalls in der Lage zum Nukleus zu translozieren. Lin-28A wird im Allgemeinen, als auch in dieser Arbeit, mit Lin-28 beschrieben.

Lin-28 wird in hohem Maße in undifferenzierten humanen und murinen ESCs exprimiert, wobei die Expressionsrate einer strikten Kontrolle unterliegt. Eine Überexpression in hESCs hatte eine verminderte Teilungsrate und gesteigerte Differenzierung in Richtung der extraembryonalen Entoderm-Linie zur Folge (Darr & Benvenisty, 2009). Ein Knockdown der *lin-28*-Expression in mESCs führte zu einer verminderten Expression von *oct-4* und *nanog* und damit zu einem beeinträchtigten Potenzial der Selbsterneuerung (I. Heo *et al.*, 2009). Die

Bedeutung von Lin-28 als Pluripotenzfaktor wurde vor allem hinsichtlich der Induktion zu iPSCs unterstrichen, wobei Lin-28 zusammen mit den Kerntranskriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2 und Nanog von Yu *et al.* (2007) genutzt wurde, um die Reprogrammierung humaner Fibroblasten zu ermöglichen. Die pleiotropen Funktionen von Lin-28 sind in erster Linie auf eine direkte Bindung seiner Ziel-RNAs zurückzuführen. Lin-28A hemmt die Reifung und fördert den Abbau von miRNAs der let7-Familie und beeinflusst somit Zielgene von let7-miRNAs wie *c-myc*, *ras*, *cyclin D1* und *lin-28* selbst, die als Regulatoren der Zellproliferation und der *Stemness* fungieren (Mayr & Heinemann, 2013). Neben der Funktion als miRNA-bindendes Protein konnte für Lin-28 darüber hinaus auch eine Bindung spezifischer Untergruppen von mRNAs in mESCs, einschließlich Oct-4, sowie weiterer am Zellzyklus beteiligter Faktoren, nachgewiesen werden, wodurch deren Translation moduliert wird (Bingsen, Zhang, & Huang, 2009). Korrelierend hierzu konnten Qiu *et al.* (2009) in hESCs eine direkte Bindung von Lin-28 an die codierende Region von *oct-4* und somit der post-translationalen Regulation von Oct-4 durch Lin-28 nachweisen. Nach der Transkription von *oct-4* rekrutiert Lin-28 die RNA-Helikase A, um die Translation der mRNA von Oct-4 zu fördern (Qiu *et al.*, 2009).

1.6 Regulatorische miRNAs der neuronalen Differenzierung

Die Existenz von microRNAs (miRNAs; miR) wurde vor mehr als 30 Jahren durch Lee *et al.* (1993) beschrieben, wo die negative Regulierung des Transkriptionsfaktors LIN-14 durch eine kleine nicht-kodierende RNA, bezeichnet als *lin-4*, im ersten Larvenstadium der Entwicklung von *C. elegans* entdeckt wurde. In der Folge wurden mehr als 2000 humane miRNAs identifiziert und es wird angenommen, dass etwa 30 % der humanen proteinkodierenden Gene von miRNAs kontrolliert werden (Brennan & Henshall, 2020).

Im Zuge der post-transkriptionellen Regulation spielen die ubiquitär exprimierten miRNAs eine entscheidende Rolle. miRNAs sind kleine, nicht-codierende 20~24 Nukleotide-lange RNAs, die an komplementäre Zielmotive in mRNAs von proteincodierenden Genen binden, um eine post-transkriptionelle Stilllegung durch Transkriptdegradation oder Translationsunterdrückung zu erreichen (Pasquinelli, 2012). Diese Bindungsmotive finden sich überwiegend in den 3' UTRs der Ziel-mRNAs, jedoch gibt es auch Beispiele für die Existenz vieler natürlich vorkommender miRNA-*Targets* in Aminosäure-Kodierungssequenzen (CDS). Als Beispiele hierfür wurden unter anderem die Maus-Gene *nanog*, *oct-4* (*pou5f1*) und *sox-2* beschrieben, deren CDS Zielsequenzen der miRNAs miR-134, miR-296 und miR-470 beinhalten (Tay, Zhang, Thomson, Lim, & Rigoutsos, 2008).

Eine einzelne miRNA kann mehrere hundert *Targets* haben und ebenso kann ein Gen Zielstellen für verschiedene miRNAs haben, wodurch die Herunterregulierung durch mehrere miRNAs synergistisch beeinflusst wird (Peter, 2010).

Die Biogenese von miRNAs ist ein mehrstufiger Prozess, beginnend mit ihrer Transkription von der RNA-Polymerase II oder III aus den Introns kodierender Gene oder aus intergenen langen nicht-kodierenden RNAs. Diese mehrere hundert Basenpaare langen Primärtranskripte (pri-miRNAs) enthalten eine oder mehrere miRNAs innerhalb so genannter Haarnadelstrukturen. Diese Strukturen werden durch den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus dem RNA-bindenden Protein DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) und der RNA-Endonuklease Drosha, vom pri-miRNA-Transkript im Kern abgespalten (Alarcón, Lee, Goodarzi, Halberg, & Tavazoie, 2015). Die entstandenen etwa 50-70 Nukleotide langen prä-miRNA-Strukturen mit dem für die RNase-III-vermittelten charakteristischen 2-Nukleotid 3' Überhang, werden durch einen Exportin-5 (XPO5)/RanGTP-Komplex in das Zytoplasma exportiert, wo sie durch die Endonuclease Dicer in Kombination mit dem TAR RNA-binding protein (TRBP) zu etwa 21 Nukleotid-langen doppelsträngigen RNAs (dsRNAs) weiterverarbeitet werden (Denli, Tops, Plasterk, Ketting, & Hannon, 2004). Der von Dicer erzeugte kleine RNA-Duplex, bestehend aus einem *guide strand* und einem *passenger strand* wird anschließend an ein Argonaute 1-4 (AGO1-4) Protein geladen, um einen Effektor-Komplex zu bilden, der als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird (M. Ha & Kim, 2014). Dabei wird der *passenger strand* degradiert und der *guide strand*, oder auch die reife miRNA, verbleibt auf dem AGO-Protein. RISC erkennt dann die Ziele durch partielle Basenpaarung der miRNA mit, typischerweise, der 3'UTR einer mRNA, oder, seltener, dem offenen Leseraster (Shenoy & Blelloch, 2014). Die Zielspezifität von RISC beruht auf seiner Interaktion mit komplementären Sequenzen auf der Ziel-mRNA, den sogenannten miRNA-Response-Elementen (MREs). Der Grad der MRE-Komplementarität bestimmt, ob ein AGO2-abhängiges Schneiden der Ziel-mRNA oder eine RISC-vermittelte Translationshemmung und eine Degradation der Ziel-mRNA erfolgt. Eine vollständig komplementäre miRNA:MRE-Interaktion induziert die AGO2-Endonukleaseaktivität und zielt auf den Abbau der mRNA ab. Bei einer unvollständigen Basenpaarung kommt es zu einer translationalen Repression durch Blockade des eukaryotischen Initiationsfaktors 4A und einer durch Deadenylierung-bedingten Degradation der mRNA durch Exonukleasen (O'Brien *et al.*, 2018)

Als RNA-regulierende Elemente sind miRNAs an zellulären Prozessen wie Entwicklung, Proliferation und Differenzierung beteiligt, als auch an der Entstehung mehrerer Krankheiten, darunter Krebs, Immun-, Herz-Kreislauf- und neurologische Erkrankungen. Neben ihrem

Wirken als Schlüsselregulatoren bei verschiedenen neuroprotektiven Mechanismen, sind miRNAs auch an der Pathogenese von Erkrankungen des ZNS beteiligt, indem sie die Funktion oder Regeneration von Neuronen verändern (T.-Y. Ha, 2011). Eine Dysregulation von miRNAs ist assoziiert mit der Entwicklung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Huntington und ALS (Nelson, Wang, & Rajeev, 2008). Die Notwendigkeit intakter miRNAs für die Funktion des ZNS wurde beispielsweise durch Knockdown-Studien bestätigt, wo die Ablation von Dicer zu einer unreifen Neurogenese führte (De Pietri Tonelli *et al.*, 2008).

Eine entscheidende regulatorische Rolle nehmen miRNAs auch bei der neuronalen Differenzierung, bzw. der Expression von Stammzellregulatoren ein (Y. Shi *et al.*, 2010). Ein potenter Inhibitor der Pluripotenz und Promotor der neuronalen Abstammung ist die evolutionär konservierte let-7 miRNA-Familie (Stappert *et al.*, 2015). Überexpressionen von let-7a oder let-7b in NSCs verstärken die neurale Differenzierung und induzieren die Bildung von Neuronen. Die Blockierung der Aktivität durch Antisense-Knockdown wiederum hat eine verbesserte Proliferation neuraler Vorläuferzellen zur Folge (Schwamborn, Berezikov, & Knoblich, 2009; Zhao *et al.*, 2010). In undifferenzierten Zellen wird Lin-28 stark exprimiert und blockiert durch Bindung der pri- oder prä-let-7-miRNA deren Prozessierung durch Drosha oder Dicer (Mayr & Heinemann, 2013). Während der neuronalen Differenzierung akkumuliert ausgereifte let-7 miRNA und reprimiert die Expression des *Stemness*-erhaltenden Faktors Lin-28 durch die Bindung an dessen 3'UTR, wodurch eine positive Rückkopplungsschleife entsteht (Y. Huang, 2012). Auch weitere pro-proliferative Genexpression wie beispielsweise der Proto-Onkogene Ras und c-Myc oder das am Zellzyklus beteiligte Cyclin D1 werden durch die Expression von let-7-miRNA inhibiert (Mayr & Heinemann, 2013). Wie die let-7-miRNAs ist die Expression der miR-125 während der neuronalen Differenzierung von ESCs und ECCs induziert. Die miR-125 reguliert hierbei die dendritische Morphogenese und Synapsenbildung und übt mit der let-7 Familie zusammen einen reprimierenden Einfluss auf die *lin-28*-Expression in NSCs aus (Shenoy & Belloch, 2014).

Die miRNAs miR-9 und miR-124 richten sich während der neuronalen Differenzierung gegen Komponenten des globalen Repressors neuronaler Gene REST (RE1 Silencing Transcription Factor). Die Expression von miR-124 und miR-9/9* wird durch REST kontrolliert. Während der neuronalen Differenzierung werden miR-124 und miR-9/9* hochreguliert und verstärken ihre eigene Expression, indem sie sich gegen ihre negativen Regulatoren richten. (Stappert *et al.*, 2015). Die Bedeutung der miRs-9 und -124 wird belegt durch die Beobachtung, dass humane

Fibroblasten durch Expression von miR-9/9*-124 Neuronen-ähnliche Phänotypen zeigten und post-mitotische Neuronenmarker wie MAP2 exprimierten (Yoo *et al.*, 2011).

Hinsichtlich der Expression des *Stemness*-erhaltenden Kerntranskriptionsfaktors Oct-4 ist die Interaktion der miR-145 mit diesem von Interesse. In undifferenzierten humanen ESCs unterdrückt die Bindung von Oct-4 die Promotoraktivität der miR-145, während bei der neuronalen Differenzierung miR-145 eine direkte Repression der Pluripotenzgene *oct-4*, *sox-2* und *klf-4* durch Bindung der 3`UTR vermittelt (N. Xu, Papagiannakopoulos, Pan, Thomson, & Kosik, 2009).

Die Verknüpfung von miRNAs mit spezifischen Funktionen während der neuronalen Entwicklung ist angesichts der beschriebenen Interaktionen von großem Wert für ein tieferes Verständnis sowohl physiologischer als auch pathologischer Prozesse im ZNS. Die Deregulierung der miRNA-Aktivität wird mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht und miRNAs und deren Expressionsmodulation könnten vielversprechende Ziele für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze darstellen (Stappert *et al.*, 2015).

1.7 Niedermolekulare Verbindungen zur Verbesserung der *Stemness*

ESCs und ihre Aufrechterhaltung in einem undifferenzierten Zustand sind eng mit der Entwicklung der regenerativen Medizin verbunden. Insbesondere Langzeitkulturen von ESCs *in vitro* unter Beibehaltung des Grundstatus der Selbsterneuerung und der Fähigkeit einer multidirektionalen Differenzierung sind Gegenstand der Anwendungsforschung. iPSCs, die aus embryonalen Fibroblasten der Maus in Zellen mit ESC-Eigenschaften reprogrammiert wurden, bilden hierbei einen vielversprechenden Ansatz mit dem ethische Probleme der Stammzellforschung infolge der Nutzung embryonaler Zellen umgangen werden können (G. Chen *et al.*, 2020). Eine Induktion pluripotenter Stammzellen aus somatischen Zellen stellt eine potentiell unlimitierte Zellressource für die Erforschung von Krankheiten und den Einsatz in der regenerativen Medizin dar. Die klinische Anwendung von iPSCs wird jedoch begrenzt durch technisch anspruchsvolle Strategien wie den Kerntransfer und die Integration in die chromosomale DNA durch virenvermittelte Gene, welche Proto-Onkogene aktivieren und zu einem Krebsrisiko führen können (De Los Angeles & Daley, 2013). Eine Erzeugung von iPSCs ohne potenziell mutagen wirkende Proto-Onkogene wie *klf4* und *c-myc* sowie die Verwendung nicht-integrativer Methoden wie retro- und lentiviraler Transgen-Expression veranlasste die Forschung zur Suche nach weiteren Faktoren, welche die Pluripotenz induzieren können. Die

gegenwärtige Entwicklung der iPSC-Induktionstechnologie konzentriert sich hauptsächlich auf den Ersatz und die Reduzierung der Transkriptionsfaktoren, die Änderung des Modus der Geneinführung durch die Entwicklung verschiedener nicht-integrierter Geneinführungsmethoden, sowie die Erweiterung des Ausgangszelltyps (G. Chen *et al.*, 2020). Bislang wurden insbesondere im Forschungsfeld Niedermolekularer Wirkstoffe zur Verbesserung der Pluripotenz bzw. als Ersatz für die Transkriptionsfaktor-basierte Induktion enorme Fortschritte erzielt. Niedermolekulare Wirkstoffe haben diverse Vorteile, weil sie zellpermeabel, nicht immunogen, kostengünstiger, leichter synthetisierbar und standardisierbar sind. Außerdem sind ihre Auswirkungen auf die Hemmung und Aktivierung der Funktion bestimmter Proteine oft reversibel und können durch Variation der Konzentrationen fein abgestimmt werden (Hou *et al.*, 2013).

Hou *et al.* (2013) belegten erstmals, dass pluripotente Stammzellen aus somatischen Zellen der Maus durch eine Kombination von sieben niedermolekularen Verbindungen ohne Einsatz der ektopischen Expression von Transkriptionsfaktoren erzeugt werden können. Die chemisch induzierten pluripotenten Stammzellen (CiPSCs) ähneln embryonalen Stammzellen in Bezug auf ihre Genexpressionsprofile, ihren epigenetischen Status und ihr Potenzial zur Differenzierung und Keimbahnübertragung, jedoch konnten sowohl die Effizienz mit einem Wirkungsgrad von lediglich 0,2 %, als auch die mit 36 Tagen lange Induktionszeit nicht überzeugen (G. Chen *et al.*, 2020; Hou *et al.*, 2013). Durch die Verwendung von kleinen Molekülen sind exogene "Master-Gene" für die Reprogrammierung des Zellschicksals überflüssig. Die chemische Reprogrammierungsstrategie hat das Potenzial, funktionelle, wünschenswerte Zelltypen für klinische Anwendungen zu generieren, jedoch ist eine Verbesserung der Effizienz der iPSC-Induktion notwendig, um den Einsatz von Transkriptionsfaktoren zu reduzieren. Hierbei ist die Aktivierung und Modulation verschiedener an der Pluripotenz beteiligter Signalwege von entscheidender Bedeutung um den Einfluss Niedermolekularer Wirkstoffe hierauf nutzbar zu machen.

Die Bestimmung des Zellschicksals einer pluripotenten Stammzelle, sowohl die Erhaltung der Pluripotenz oder die Differenzierung in eine der drei Keimschichten betreffend, wird einerseits durch intrinsische Faktoren, wie beispielsweise die bereits beschriebenen Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Nanog gesteuert. Daneben steuern auch extrinsische Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren über verschiedene Signalwege erhebliche Auswirkungen auf die Expressionsniveaus intrinsischer Transkriptionsfaktoren (S. Zhang, 2014). Mehrere extrazelluläre, Zytokin-induzierte Signalwege wie die LIF-, die TGF- β - und die Wnt-Signalübertragung spielen nachweislich eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung

des Schicksals muriner ESCs (Ng & Surani, 2011). Unter ihnen sind die Funktionen von LIF und BMP als die klassischsten extrinsischen Signale fest etabliert. LIF fungiert als Zusatz im Kulturmedium, um die Pluripotenz durch die Aktivierung des nachgeschalteten STAT3 zu erhalten, und in Abwesenheit von Serum oder Feeder-Zellen können ESCs der Maus durch LIF in Kombination mit BMP4 aufrechterhalten werden (Q.-L. Ying, Nichols, Chambers, & Smith, 2003). Hinsichtlich des kanonischen Wnt-Signalweges belegten Sato *et al.* (2004), dass dessen Aktivierung ausreicht, um die Selbsterneuerung sowohl von hESCs als auch von mESCs aufrechtzuerhalten. Auch eine Inhibition der MAPK/ERK-Signaltransduktion durch niedermolekulare Verbindungen wie Pluripotin und PD0325901 oder Kompetitoren der Tyrosin-Kinase-Aktivität von Wachstumsfaktoren wie SU5402 oder Sunitimab erwies sich in verschiedensten Studien als *Stemness*-erhaltend und um mESCs in einem undifferenzierten Zustand zu halten. Hinsichtlich des TGF- β -Signals hat eine Inhibition positiven Einfluss, indem die Transformation von mesenchymalen in epitheliale Zellen (MET) induziert, und der für die Reprogrammierung hinderliche Umkehrprozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) inhibiert wird. Die Inhibition von TGF- β -Signalen, einschließlich der TGF- β -Rezeptor-Kinase-Inhibitoren SB-431542 (Maherali & Hochedlinger, 2009), E-616452 (RepSox) (Ichida *et al.*, 2009) und A-83-01 (Y. Zhang *et al.*, 2012), hat sich in verschiedenen Studien als wichtig für die somatische Zellreprogrammierung von mESCs und hESCs erwiesen.

1.7.1 Biologisch aktive Lactone

Neben eines potentiell antiinflammatorischen Effektes auf die gegebenenfalls durch die andauernde Neuroinflammation beeinträchtigte Stammzellnische gewinnt der Einsatz und die Erforschung von kleinen bioaktiven Verbindungen zur Verbesserung der *Stemness* und als Reprogrammierungs-Induktor für iPSCs und iNSCs zunehmend an Bedeutung. Da die endogene Neurogenese nur in begrenzten Regionen wie z.B. dem *Gyrus dentatus* im Hippocampus und der SVZ stattfindet und mit fortschreitender Krankheit beeinträchtigt ist, gewann die Überlegung des Einsatzes reprogrammierter iNSCs aus somatischen Zellen zur Behandlung von Erkrankungen des ZNS an Bedeutung. Um die Grenzen der viralen Reprogrammierung von iNSCs zu überwinden, werden vermehrt bioaktive kleine Moleküle erforscht, um einerseits die Effizienz der iNSC-Reprogrammierung zu erhöhen oder Reprogrammierungs-Transkriptionsfaktoren zu ersetzen, wodurch iNSCs für die klinische Anwendung leichter zugänglich werden (Tian *et al.*, 2018). Die in dieser Arbeit hinsichtlich ihres *Stemness*-verbessernden Potentials untersuchten Makrolactone Oxacyclododecindion, Dehydrocurvularin, S-Curvularin und Galiellalacton zeigten hier in Vorarbeiten einen differenzierungshemmenden Einfluss (Henke *et al.*, 2014; Schreiber, 2015).

Ebenso zeigten die untersuchten Makrolactone eine potente Inhibition des, an der Zelldifferenzierung beteiligten, TGF- β -Signals, was in Bezug auf die Reprogrammierung somatischer Zellen eine mögliche Applikation in diesem Bereich bedeuten könnte (Maherali & Hochedlinger, 2009). Die Hemmung von Signalen der TGF- β -Familie lenkt das Schicksal von ESCs hin zur neuronalen Ektoderm-Linie, was die Bildung embryonaler neuronaler Stammzellen begünstigt. Embryonale neuronale Stammzellen können sich nach entsprechender Kultivierung zu komplexen Anordnungen von Neuronen, Glia-Zellen, Astrozyten und Oligodendrozyten des ZNS entwickeln (Watabe & Miyazono, 2009). Außerdem fördert eine fortschreitende Seneszenz der NSCs die Sekretion von Entzündungsfaktoren in Stammzellnischen. Plasma von gealterten Mäusen induzierte bei Endothelzellen des Gehirns die Apoptose von NSCs in der SVZ mittels Sekretion des proinflammatorischen TGF- β , was zu einer Verringerung der Anzahl, Proliferation und Differenzierung führte (Pineda *et al.*, 2013). Des Weiteren offenbarten alle Verbindungen einen nachfolgend beschriebenen antiinflammatorischen Effekt auf verschiedenste beteiligte Signaltransduktionen. Man geht davon aus, dass eine persistierende Entzündung eine zentrale Rolle bei zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS wie Alzheimer, Parkinson und ALS einnimmt und proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) eine verringerte Proliferation von NSCs und die Hemmung der Differenzierung von NSC-Vorläufern zu Neuronen zur Folge haben (C. M. Willis *et al.*, 2022).

(S)-Curvularin (S-Curv) und Dehydrocurvularin (Dhc) wurden durch Fermentation des Produzentenstammes *Penicillium sp.* IBWF3-93, Galiellalacton (Gal) durch Fermentation des Ascomyceten IBWFA111-95 und Oxacyclododecindion (Oxa) durch Fermentation des Deuteromyceten *Exserohilum rostratum* IBWF99121, wie bereits beschrieben, gewonnen, (Gerhard Erkel *et al.*, 2008; Weidler, Rether, Anke, & Erkel, 2000; Yao *et al.*, 2003). Oxa wurde initial bereits als potenter Inhibitor der IL-4-abhängigen STAT6-Signaltransduktion isoliert und beschrieben (Gerhard Erkel *et al.*, 2008). Zu den weiteren Wirkungen von Oxa zählen die Inhibition der TGF- β -induzierten SMAD2/3-Signaltransduktion, eine Inhibition der TGF- β -induzierten pro-fibrotischen Genexpression, sowie eine starke entzündungshemmende und antifibrotische Wirkung in einem *In-vivo*-Mausmodell des systemischen *Lupus erythematosus* (Henke *et al.*, 2014; A.-K. Rudolph, 2015; K. Rudolph, Serwe, & Erkel, 2013). (S)-Curv und Dhc werden von einer Reihe von Pilzen wie Alternaria-, Aspergillus-, Cochliobolus-, Curvularia- und Penicillium-Arten produziert, und wurden bereits als zytotoxische, antibakterielle, nematizide, antitypanosomale und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B)-hemmende Metaboliten beschrieben (Aly *et al.*, 2011; G. Li, Zhang, Xu, Dong, & Liu, 2007; Munro, Musgrave, & Templeton, 1967). Darüber hinaus inhibiert

S-Curv dosisabhängig die STAT1-Signaltransduktion und deren Zielgen, die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) basierend auf einer Inhibition der STAT1-Tyr701-Phosphorylierung durch die vorgeschaltete Tyrosinkinase JAK2 (Janus-Kinase) (Yao *et al.*, 2003). Gal ist ein hochwirksamer und selektiver Inhibitor der IL-6-Signalübertragung durch STAT3 und hemmt die STAT3-Signalübertragung von aktiviertem STAT3 an die DNA (Weidler *et al.*, 2000). Die Hemmung der STAT3-Bindung an die DNA basiert auf der Wirkung von Gal als Cystein-reaktiver Inhibitor, der kovalent an ein oder mehrere Cysteine in STAT3 bindet und so die DNA-Bindung beeinflusst (Don-Doncow *et al.*, 2014). Darüber hinaus inhibierte Gal die Interferon-gamma (IFN- γ) induzierte STAT1/2-Signaltransduktion, sowie die induzierte Expression von NF- κ B-, AP-1- und NF-AT-abhängigen Reportergenen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Potential der Macrolactone und verwandter Derivate auf *Stemness*-erhaltende Faktoren und an der *Stemness*- bzw. Differenzierung beteiligter miRNAs untersucht werden.

1.8 Asthma

Asthma ist eine Erkrankung der Atemwege, von der weltweit etwa 300 Millionen Menschen betroffen sind und deren Prävalenz in den letzten 50 Jahren zugenommen hat. Die chronische Entzündung bei Asthma basiert auf einem komplexem Zusammenspiel von Umweltfaktoren, Atemwegsobstruktion, bronchialer Hyperreaktivität und Entzündung (Foster *et al.*, 2017). Das Hauptmerkmal, das zu klinischen Symptomen führt, ist die Kontraktion der glatten Muskulatur und eine chronische Entzündung, die zu einer Verengung der Atemwege und einer Obstruktion führt. Zahlreiche Auslöser können eine Bronchokonstriktion hervorrufen, darunter allergische Reaktionen, Atemwegsinfektionen, körperliche Anstrengung, Reizstoffe und nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente bei bestimmten Patienten. Persistierende Entzündungen in den Atemwegen können zu strukturellen Veränderungen führen, wie z. B. Schleimhypersekretion, Hyperplasie der glatten Muskulatur, subepithelialer Fibrose, Blutgefäßproliferation und Infiltration von Entzündungszellen (Ishmael, 2011). Die meisten Allergene und viele Luftschadstoffe lösen über die Aktivierung von *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) oder Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) die Produktion von Zytokinen und Chemokinen durch Epithelzellen aus. Dies führt dann zur Aktivierung von dendritischen Zellen (DCs), welche die Chemokine CC-Chemokin-Ligand 17 (CCL17) und CCL22 freisetzen, um T-Helfer 2 (TH2)-Zellen und angeborene lymphoide Zellen der Gruppe 2 (ILC2) zu rekrutieren, die zur Entzündung der Atemwege beitragen (Hammad & Lambrecht, 2021). Bei Gewebeschäden oder Allergenexposition werden epitheliale Zytokine wie IL-25, IL-33 und thymisches stromales Lymphopoietin (TSLP) freigesetzt, um Typ-2-Immunantworten zu initiieren oder bestehende

Typ-2-Entzündungen zu verstärken. Diese vorgelagerten Mediatoren stimulieren Immunzellen zur Produktion von Typ-2-Zytokinen und tragen auch zum Priming und zur Polarisierung naiver T-Zellen zu CD4+ TH2-Zellen bei (Gandhi *et al.*, 2016). TH2-Zellen sezernieren die proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und induzieren die Proliferation von B-Zellen und die anschließende Produktion von Antikörpern, die einen Isotypenswitch durchlaufen, was zu hohen Konzentrationen von zirkulierendem IgE führt (Abbildung 4). IgE bindet an den hochaffinen IgE Rezeptor FcεRI auf Basophilen und Mastzellen, und die Vernetzung von IgE auf diesen Zellen führt zu einer zellulären Aktivierung und der Degranulation verschiedener Entzündungsmediatoren wie Histamin, Prostaglandine und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-13 und TNF-α und TGF-β, wodurch die Typ-2-Reaktion weiter verstärkt wird. In den unteren Atemwegen führt dieses Typ-2-Entzündungsmilieu zu Eosinophilie, Schleimproduktion und Kontraktilität der glatten Muskulatur (Hammad & Lambrecht, 2021). Diese Prozesse sind wichtige schützende Immunfunktionen zur Beseitigung parasitärer Infektionen, sind jedoch pathologisch als Reaktion auf harmlose Antigene oder Allergene und führen zu Allergien und bei persistierender Inflammation zu Asthma.

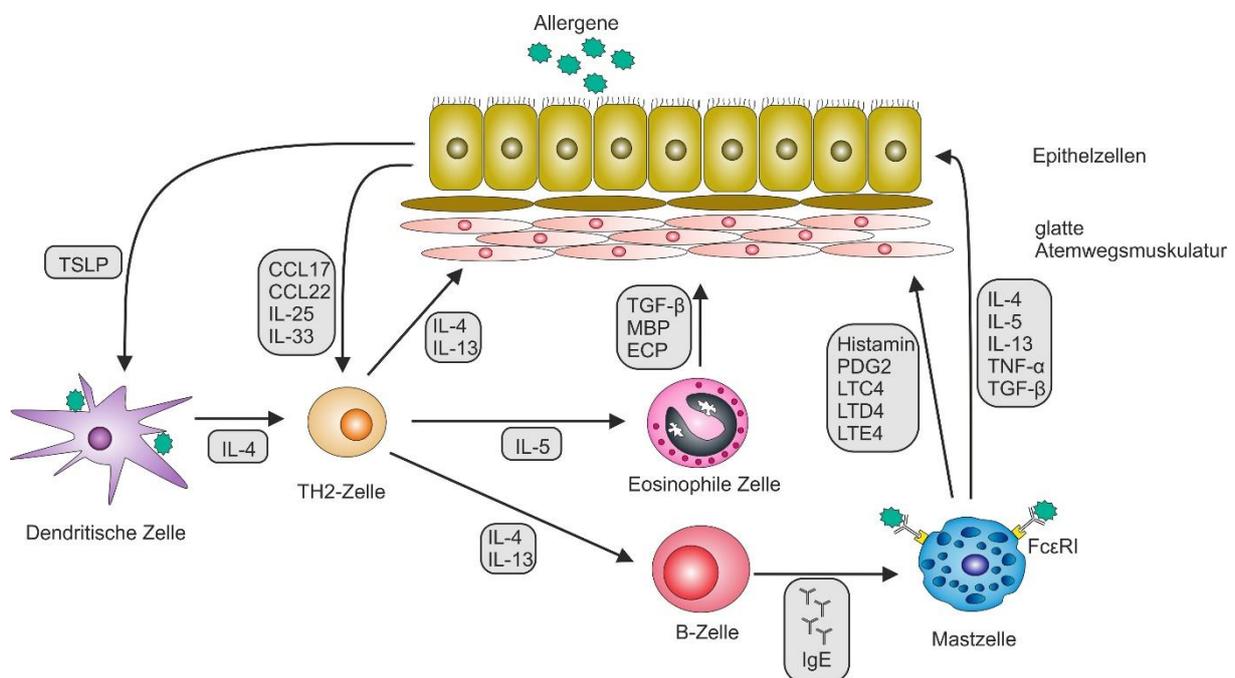


Abbildung 4: Typ 2 Inflammation bei atopischem Asthma. Die Allergenpräsentation durch dendritische Zellen (DCs) fördert die Aktivierung von T-Helfer-2-Zellen (TH2). Das Typ-2-Zytokin IL-4 treibt dabei die Differenzierung und klonale Expansion von T-Helferzellen (TH) in TH2-Zellen und die weitere Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 an. Epithelzellen stimulieren die Freisetzung der TH2-Zellen

fördernden Chemokine CC-Chemokin-Ligand 17 (CCL17) und CCL22 sowie der Zytokine TSLP, IL-25 und IL-33. Die Chemokine vom TH2-Typ rekrutieren TH2-Zellen in die Atemwege, die ihrerseits IL-4, IL-5 und IL-13 absondern. IL-5 fördert die Eosinophilie, und die entstehenden Eosinophilen setzen die Entzündungsmediatoren Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP) und TGF- β frei, die eine Entzündung in der glatten Muskulatur der Atemwege (ASM) auslösen. IL-4 und IL-13 bewirken in den B-Zellen einen Wechsel der Antikörperklasse zu Immunglobulin E (IgE), so dass die B-Zellen allergenspezifisches IgE sezernieren. Dieser Antikörper bindet dann den hochaffinen IgE Rezeptor Fc ϵ RI auf Mastzellen, und die Vernetzung des Allergens mit dem mastzellgebundenen IgE führt zur Degranulation der Mastzellen und zur Freisetzung von vorgebildeten Mediatoren, darunter Histamin, Prostaglandin (PGD₂) und Leukotriene (LTC₄, LTD₄ und LTE₄). Diese Mediatoren verursachen eine Bronchokonstriktion und eine weitere Entzündung der Atemwege. Mastzellen produzieren auch die TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 sowie weitere Zytokine, darunter TGF- β und TNF- α , die weitere TH2-Immunreaktionen und Entzündungen fördern (geändert nach Edwards *et al.*, 2012 und Gandhi *et al.*, 2016).

1.8.1 Die Rolle proinflammatorischer Zytokine und Chemokine bei der Pathogenese von Asthma

Bei vielen Asthmatikern wird die chronische Entzündung der Atemwege durch die von TH2-Zellen sekretierten proinflammatorischen Zytokine IL-4-, IL-5- und IL-13 angetrieben (Abbildung 4). Diese Typ-2-Zytokine fördern als Entzündungsmediatoren charakteristische Merkmale der Erkrankung wie Eosinophilie, Schleimhypersekretion, Hyperreagibilität der Atemwege (AHR), IgE-Isotypenswitch, die gesteigerte Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc ϵ RI) auf Mastzellen und Anfälligkeit für Exazerbationen (Hammad & Lambrecht, 2021). Die Zytokine IL-4 und IL-13 führen zur Aktivierung des zytoplasmatischen Transkriptionsfaktors STAT6 und der IL-4/IL-13/STAT-6-Signalweg gilt als wichtiger Modulator der Pathophysiologie von Asthma. Die Signalisierung von IL-4 und IL-13 wird durch zwei unterschiedliche Rezeptordimere der Rezeptortypen I (IL-4R α und γ c) und II (IL-4R α und IL-13R α 1) vermittelt, wobei die IL-4 Signaltransduktion über beide Rezeptortypen, IL-13 hingegen nur über den Typ II IL-4R Signale übermittelt (Oh, Geba, & Molfino, 2010). Verschiedene Studien an Mäusen zeigten, dass IL-4 für die initiale Phase der allergischen Entzündungsreaktion in den Atemwegen hauptverantwortlich ist, welche die Ansammlung von Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen bedingt. IL-13 dagegen spielt besonders in der späteren Effektorphase der allergischen Reaktion eine Rolle und fördert die persistierende Entzündung, die AHR, die Schleimproduktion und die Entstehung der Fibrose (Foster *et al.*, 2017). IL-4 spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung unspezialisierter T0-Zellen zu TH2-Zellen, der Umstellung der B-Zellen von IgG- auf IgE-Produzenten und der Hochregulierung von Fc ϵ RI auf Mastzellen. IL-13 teilt einige Funktionen

von IL-4, indem es die IgE-Sekretion auslöst und strukturelle Veränderungen in den Atemwegen bewirkt, spielt jedoch keine Rolle bei der Förderung der TH2-Zelldifferenzierung (Peter J. Barnes, 2009). IL-5 spielt eine Schlüsselrolle bei eosinophilen Entzündungen, da es die Differenzierung von Eosinophilen aus Vorläufern im Knochenmark fördert und auch das Überleben von Eosinophilen in den Atemwegen verlängern kann (Peter J. Barnes, 2018). Die Eosinophilen setzen Entzündungsmediatoren wie Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP) und TGF- β frei, was eine Entzündung in der glatten Muskulatur der Atemwege (ASM) induziert (Edwards *et al.*, 2012).

Andere proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6, werden in erhöhten Mengen im Sputum und in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Personen mit Asthma und chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) gefunden, wo sie zu einer Verstärkung des inflammatorischen Milieus beitragen. TNF- α wird in verschiedenen Zellen der asthmatischen Atemwege exprimiert, darunter Makrophagen, Mastzellen, T-Zellen, Epithelzellen und Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur, und spielt durch die Aktivierung von NF- κ B eine Schlüsselrolle bei der Verstärkung der asthmatischen Entzündung und Aktivierung von Makrophagen (Ishmael, 2011). IL-1 β -Spiegel sind bei schwerem Asthma und COPD erhöht, und ähnlich wie TNF- α hat IL-1 β entzündungsfördernde Wirkungen und wird mit Makrophagenaktivierung und neutrophiler Entzündung in Verbindung gebracht (Peter J. Barnes, 2018). Die entzündlichen Zytokine IL-1 β und TNF- α vermitteln die frühe Immunreaktion innerhalb von Stunden nach der Infektion und induzieren die Expression von Chemokinen (chemotaktische Zytokine) in der epithelialen Umgebung (Smit & Lukacs, 2006). IFN- γ wird als vorherrschendes Zytokin hauptsächlich von TH1- Zellen sezerniert spielt eine wichtige Rolle bei der TH-1 polarisierten Entzündungsreaktion nach Infektion, beispielweise mit Viren. Das IFN- γ -induzierbare Protein von 10 kDa (IP-10) ist an der durch Viren ausgelösten Asthmaexazerbation beteiligt, was erklärt, weshalb IFN- γ -Spiegel bei Asthmapatienten in der Regel reduziert sind, obwohl sie bei Patienten mit schwerem Asthma und akuten Exazerbationen erhöht sind (Takaku *et al.*, 2011).

Chemokine sind eine Familie von basischen Heparin-bindenden Polypeptidmediatoren mit einem Molekulargewicht von etwa 8-10 kDa, die für die Prozesse der selektiven, orientierten Leukozytenrekrutierung zu Entzündungs- oder Verletzungsherden von besonderer Bedeutung sind. Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Bewegung mononukleärer Zellen im gesamten Körper, die eine adaptive Immunantwort hervorrufen und zur Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten beitragen. Durch Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren tragen Chemokine stark zur Chemotaxis von

Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen, Monozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen (NK), T-Lymphozyten und B-Lymphozyten bei (C. Liu *et al.*, 2018). Die etwa 50 humanen Chemokine werden aufgrund der Position der ersten beiden Cysteinreste in ihrer biochemischen Struktur grundsätzlich in vier Hauptgruppen eingeteilt: CXC, CX3C, C und CC (Ahmadi, Hassanshahi, Khorramdelazad, Zainodini, & Koochakzadeh, 2016). Es gibt keine einfache Eins-zu-eins-Einteilung zwischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren. Chemokine binden mit nanomolarer Affinität und die meisten Chemokinrezeptoren können mehrere Liganden binden, z. B. kann CCR3 durch CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL11, CCL24 und CCL26 gebunden werden (Palmqvist, Wardlaw, & Bradding, 2007). Ebenso sind viele Chemokine in der Lage an mehr als einen Rezeptor zu binden, wie z. B. CCL5, was an CCR1, CCR3 und CCR5 bindet (C. Liu *et al.*, 2018).

Die größte Familie besteht aus den ca. 28 CC-Chemokinen, deren ersten beide der vier Cysteinreste nebeneinander liegen. CC-Chemokine üben auf fast alle Entzündungszellen, außer Neutrophile, eine starke chemotaktische Wirkung aus, und locken diese an Orte chronischer Entzündungen (Charo & Ransohoff, 2006). CC-Chemokine unterstützen im Allgemeinen die Rekrutierung von Monozyten, Lymphozyten und Eosinophilen in der Spätphase der Entzündungsreaktion (Smit & Lukacs, 2006). Das am besten charakterisierte CC-Chemokin ist das *monocyte chemoattractive protein 1* (MCP-1), das in der systematischen Nomenklatur als "Chemokin-Ligand CCL2" bezeichnet wird. Es ist ein starker Agonist für Monozyten, dendritische Zellen, Gedächtnis-T-Zellen und Basophile. Andere CC-Chemokine sind das *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) und RANTES (CCL5), welches in asthmatischen Atemwegen durch Epithel- und glatten Muskelzellen vermehrt exprimiert wird (Peter J. Barnes, 2009).

Neben aktivierten DCs und TH2-Zellen fungieren Eosinophile auch als wichtige Effektorzellen bei der Entzündung der Atemwege bei Asthma. Das Eindringen von Eosinophilen in die Atemwege steht in engem Zusammenhang mit dem Schweregrad von Asthma (C. Liu *et al.*, 2018). Eosinophile werden aktiviert und setzen Granulat-assoziierte Proteine frei, die eine Verletzung des Atemwegsepithels, eine Kontraktion der glatten Muskulatur, eine Infiltration von Entzündungszellen und eine AHR verursachen (Luster, 1998). In diesem Prozess fungieren CCL5 und CCL11 durch Bindung an CCR3 als starke eosinophile Chemoattraktoren. CCR3 wird auf TH2-Zellen und vor allem auf Eosinophilen exprimiert und vermittelt die chemotaktische Reaktion auf verschiedene Chemokine, darunter CCL11, CCL24, CCL26, CCL13 (auch als MCP-4 bekannt) und CCL5, die alle in den Atemwegen von Asthmatikern vermehrt vorkommen (Peter J. Barnes, 2009). Die Rekrutierung von Eosinophilen erfolgt als

Reaktion auf Chemoattraktoren, insbesondere durch die nach den Zielzellen benannten CC-Chemokine Eotaxin-1 (CCL-11), Eotaxin-2 (CCL-24) und Eotaxin-3 (CCL-26) (Provost *et al.*, 2013). Die Oberflächenrezeptoren CCR3 und CCR4 der TH2-Zellen binden direkt an die von den Epithelzellen ausgeschütteten Chemokine. Nachdem sie durch die Wirkung dieser Chemokine angeregt wurden, infiltrieren TH2-Zellen den Entzündungsherd, wo sie Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-13 und TNF- α absondern. Diese Zytokine wiederum verursachen eine verstärkte Schleimsekretion in den Atemwegen und eine Zerstörung der Epithelstruktur der Atemwege, was die Entzündung der Atemwege und die AHR weiter fördert (C. Liu *et al.*, 2018)

Eine zweite Familie von Chemokinen besteht aus den 16 CXC-Chemokinen, die einen einzigen Aminosäurerest zwischen den ersten beiden kanonischen Cysteinen aufweisen. CXC-Chemokine haben eine starke Wirkung auf die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten in der frühen Phase einer Entzündungsreaktion (Smit & Lukacs, 2006). CXCL8 wird von Makrophagen, T-Zellen, Epithelzellen und Neutrophilen sezerniert und wirkt über eine hochaffine Bindung an den CXC-Chemokinrezeptor 2 (CXCR2) chemotaktisch für Neutrophile (Peter J. Barnes, 2018). CXCL8 aktiviert auch Monozyten und kann die Rekrutierung dieser Zellen zu Gefäßläsionen steuern. Einige Asthmapatienten zeigen einen neutrophil-prädominanten Phänotyp, basierend auf der chemotaktischen Wirkung der Chemokine CXCL8 und CXCL10 auf Neutrophile, ohne offensichtliche TH2-Zytokine (Takaku *et al.*, 2011). CXCL8 und CXCL10 können auch an CXCR2 bzw. CXCR3 auf Eosinophilen binden, um die Rekrutierung von Eosinophilen zu fördern (C. Liu *et al.*, 2018). Fraktalkin (CX3CL1) als einzigem Mitglied der CX3C-Familie und zwei Mitglieder einer vierten Familie mit nur einem Cystein bilden die weiteren Chemokin-Familien (Smit & Lukacs, 2006).

1.8.2 *Airway remodeling* als Folge fibrotischer Prozesse bei Asthma

Persistierendes Asthma ist durch strukturelle Veränderungen gekennzeichnet, die als *airway remodeling* bezeichnet werden. Dieser fortlaufende Umbau und die Rekonstruktion der asthmatischen Lunge umfasst eine subepitheliale Fibrose, eine Myofibroblastenhyperplasie, eine Myozytenhyperplasie und/oder -hypertrophie, eine Verdickung der Basalmembran, Becherzellenhyperplasie mit Schleimhypersekretion und eine erhöhte Masse der glatten Atemwegsmuskulatur (Doerner & Zuraw, 2009). Ein pathologisches Merkmal von Asthma sind chronische Verletzungen und Reparaturen, die zu einer Dysfunktion der epithelialen Barrierefunktion führen. In diesem Zusammenhang führen erhöhter oxidativer Stress, Wachstumsfaktor- und Zytokinstimulation zusammen mit extrazellulärem Matrixkontakt zu einer transkriptionellen Reprogrammierung der Epithelzelle. Dieser Prozess führt zur EMT, einem Zellzustand, der mit dem Verlust der epithelialen Polarität, der Expression

mesenchymaler Marker, einer erhöhten Mobilität und dem Umbau der extrazellulären Matrix einhergeht (Ijaz *et al.*, 2014). Die EMT ist ein wesentlicher Bestandteil der Entwicklung, und die ihr zugrunde liegenden Prozesse werden bei der Wundheilung, Fibrose und Krebsentstehung aktiviert. EMT und der reverse Prozess der MET regulieren auch die Differenzierung embryonaler Stammzellen, induzierte Pluripotenz und das Verhalten von Krebsstammzellen (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014). Auf der Grundlage dieses biologischen Kontextes kann die EMT in drei Typen eingeteilt werden. EMT Typ 1 bezeichnet die Phase des Entwicklungsprozesses, EMT Typ 2 ist an der Wundheilung und Geweberegeneration beteiligt, bei der sich während Verletzungen und chronischen Entzündungen Gewebefibroblasten aus Epithelzellen bilden und EMT Typ 3 findet in epithelialen Krebszellen statt und ist für das Fortschreiten von Krebs und die Metastasierung verantwortlich (Das, Bhattacharya, Chikkaputtaiah, Hazra, & Pal, 2019).

Schlüsselereignisse der EMT bilden die Auflösung der epithelialen Zell-Zell-Verbindungen, der Verlust der apikal-basalen Polarität, die Reorganisation der Zytoskelettarchitektur und die Veränderung der Zellform. Weiterhin kommt es zu einer Herabregulierung der epithelialen Genexpressionssignatur und Aktivierung von Genen, die zur Definition des mesenchymalen Phänotyps beitragen, erhöhter Motilität; und in vielen Fällen der Fähigkeit, Proteine der extrazellulären Matrix abzubauen, um ein invasives Verhalten zu ermöglichen (Lamouille *et al.*, 2014). Die Herabregulierung des epithelialen Markers E-Cadherin wird durch die verstärkte Expression von mesenchyalem neuralem Cadherin (N-Cadherin) ausgeglichen, was zu einem "Cadherin-Switch" führt, der die Zelladhäsion verändert (C. W. Li *et al.*, 2012). An den Veränderungen der Genexpression zur Unterdrückung des epithelialen Phänotyps und Aktivierung des mesenchymalen Phänotyps sind die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug (Snail2), Twist und Zink-Finger-E-Box-Binding (ZEB), deren Expression früh in der EMT aktiviert wird, als Hauptregulatoren maßgeblich beteiligt (Ijaz *et al.*, 2014).

TGF- β gilt als Hauptinduktor der EMT und trägt zur Gewebefibrose bei, einschließlich der Nieren-, Leber- und Lungenfibrose. Die Konzentration von TGF- β ist in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Asthmatikern erhöht und die Zunahme von TGF- β -exprimierenden Zellen in der Bronchialschleimhaut korreliert mit der Dicke der Basalmembran der Atemwege und dem Schweregrad der Erkrankung (Kamitani *et al.*, 2011). Durch TGF- β induziert, setzen diese Transkriptionsfaktoren eine Kaskade von Ereignissen in Gang, die zur Unterdrückung von E-Cadherin und zur Aktivierung von mesenchymalen Markern führen (Das *et al.*, 2019). Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β können durch Aktivierung des NF- κ B-Signalweges in Kombination mit TGF- β die Progression von EMT beschleunigen und die

Expression der EMT-spezifischen Transkriptionsfaktoren verstärken (Doerner & Zuraw, 2009; G. Shi *et al.*, 2018).

1.8.3 *Rubia cordifolia*

Pflanzen sind ein unschätzbares Reservoir für die Entdeckung neuer Arzneimittel, die im Laufe der Geschichte und in allen Kulturen zu medizinischen Zwecken verwendet wurden. Die traditionelle chinesische Medizin (TCM), ist eine Fundgrube von Medikamenten, die in mehr als 100 Ländern für die Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt werden. *Rubia cordifolia* (*R. cordifolia*), gemeinhin als Indischer Krapp bezeichnet, gehört zur Familie der Rubiaceae. Die Familie der Rubiaceae besteht aus etwa 450 Gattungen und 6.500 Arten, darunter Bäume, Sträucher und Kräuter. *Rubia* hat etwa 60 Arten, von denen *R. cordifolia* eine mehrjährige krautige Kletterpflanze mit langen, zylindrischen und roten Wurzeln ist. *R. cordifolia* ist weit verbreitet in Afrika, im tropischen Asien, in Indien, Malaysia, China, Japan und im tropischen Australien (Adwankar, Chitnis, Khandalekar, & Bhadsavale, 1980). Die industriell nutzbare Heilpflanze, findet sowohl in der TCM, als auch im Ayurveda unter ihrem Sanskrit-Namen *Manjistha* als Bestandteil traditioneller pflanzlichen Rezepturen Anwendung zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen (Wen *et al.*, 2022). Abgesehen von ihrem hohen medizinischen Wert ist die Pflanze eine Quelle für natürliche Farbstoffe, die von der Industrie genutzt wird. Die Pflanze enthält erhebliche Mengen an Sekundärmetaboliten, wie Alkaloide, Glykoside, Flavonoide, Phenole und Anthrachinone (Natarajan *et al.*, 2019). Auch im Ayurveda wird *R. cordifolia* als färbendes Mittel für medizinische Öle verwendet und äußerlich auf entzündete Stellen, Geschwüre und Frakturen angewandt. Die Wurzeln der Pflanze werden als entzündungshemmendes, blutstillendes, antidyszentrisches, fiebersenkendes, schmerzstillendes und anthelminthisches Mittel verwendet. Mollugin, einer der aus der Pflanze gewonnenen Wirkstoffe, hemmt nachweislich die TNF-induzierte Expression von Entzündungsmolekülen durch Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in Dickdarmkrebszellen (K.-J. Kim *et al.*, 2009; Patil, Mohan, Kasture, & Kasture, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des Methanolextraktes der Wurzel von *Rubia cordifolia* auf die TGF- β -aktivierte pro-fibrotische Signaltransduktion und weitere inflammatorische Signalmoleküle untersucht werden.

1.9 Zielsetzung

Bei einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen des ZNS gibt es derzeit keine wirksame medikamentöse Behandlung, weshalb eine therapeutische Anwendung einer Stammzelltransplantation eine realistische Hoffnung zur Behandlung von Neurodegenerationen mit motorischen Defiziten bietet, wobei ein zentrales Problem die Erschließung von geeignetem Spendergewebe bleibt. Aus diesen Gründen werden bioaktive kleine Moleküle zur Verbesserung der *Stemness* erforscht, um die Effizienz der iPSC-Reprogrammierung zu erhöhen und potenziell tumorigene Reprogrammierungs-Transkriptionsfaktoren zu ersetzen. Die in dieser Arbeit hinsichtlich ihres *Stemness*-verbessernden Potentials untersuchten Makrolactone Oxacyclododecindion, Dehydrocurvularin, S-Curvularin und Galiellalacton, sowie daraus abgeleitete Derivate, zeigten in Vorarbeiten einen differenzierungshemmenden Einfluss, der, neben eines potentiell antiinflammatorischen Effektes auf die gegebenenfalls durch die Neuroinflammation beeinträchtigte Stammzellnische, für eine prolongierte *Stemness* nützlich sein könnte.

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation des Einflusses dieser antiinflammatorischen Macrolactone auf die *Stemness* und neuronale Differenzierung anhand der Ausprägung pluripotenter Marker wie Oct-4, Nanog und Lin-28 und an der „*stem cell maintenance*“ bzw. an der Differenzierung beteiligter miRNAs mittels der pluripotenten Stammzelllinie P19.

Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht in der Isolation und initialen biologischen Charakterisierung antiinflammatorischer und antifibrotischer Verbindungen aus getrockneten Wurzeln der traditionellen Heilpflanze *Rubia cordifolia*, sowie die weitergehende biologische Charakterisierung des in eigenen Vorarbeiten aus *Eurotium herbariorum* isolierten TWEh-1, sowie des Naturstoffs Cyclonerodiol.

Außerdem sollen weitere Informationen zur Struktur-Wirkungsbeziehung des Makrolactons Oxacyclododecindion anhand der antiinflammatorischen Wirkung davon abgeleiteter Derivate, sowie deren Funktionalisierung für *Pulldown*-Versuche zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner durch Massenspektrometrie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe der Organischen Chemie der Universität Mainz gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

2.1.1.1 Bestandteile für mikrobielle Fest- und Flüssigmedien

Bacto Agar	BD Difco, Heidelberg
Bacto Pepton	BD Difco, Heidelberg
Bacto Yeast Extract	BD Difco, Heidelberg
Calciumchlorid	Riedel de Haen, Selze
Eisen(III)-chlorid	Merck, Darmstadt
Glucose	Riedel de Haen, Selze
Hefeextrakt	Hartge H., Hamburg
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Merck, Darmstadt
Maltose	AppliChem, Darmstadt
Malzextrakt	Lindenmeyer, Weinsberg
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Spanager	Carroux, H., Hamburg
Zinksulfat (Heptahydrat)	Merck, Darmstadt

2.1.1.2 Weitere Chemikalien

Acrylamid Lösung 40 % (v/v)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose LE	Genaxxon, Ulm
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CHAPS	Qiagen, Hilden
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coelenterazine	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
Complete Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth, Karlsruhe
D(+)-Glucose	Riedel-de Haën, Seelze

Diabur Test 5000 (Glucoseteststreifen)	Roche Diagnostics, Mannheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DMEM-Medium	Gibco Life Technologies, Paisley, GB
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 37 % (v/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Gelatine	Merck, Darmstadt
GelRed	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Kälberserum, fötales	Gibco Life Technologies, Paisley, GB
L-Cystein	Merck, Darmstadt
Luminol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin, Zeva
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat (NaDoc)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
p-Cumarsäure	Roth, Karlsruhe
Penicillin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Phenol-/Chloroform-Lösung	Roth, Karlsruhe
Retinsäure (all-trans-RA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Rinderserumalbumin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 1640 Medium	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA 10x Lösung	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach
Tween-20	Roth, Karlsruhe

Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Fluka, St. Gallen
ε-Aminocaprinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2.1.1.3 Lösungsmittel HPLC grade/p.a.:

2-Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Acetonitril	VWR International GmbH, Darmstadt
Cyclohexan	VWR International GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethylacetat	VWR International GmbH, Darmstadt
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt

2.1.2 Lösungen, Medien und Puffer

2.1.2.1 Medien

2.1.2.1.1 Nährmedien für die Zellkultur

Zur Inaktivierung des Komplementsystems im fötalen Kälberserum (FKS) wurde dieses vor Zugabe zu den Zellkulturmedien vor Verwendung 30 Minuten lang bei 56 °C erwärmt. Vor Gebrauch wurden die für die Zellkultur verwendeten Medien auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Den Zellkulturmedien wurden zum Schutz vor Infektionen eine Antibiotika-Lösung, bestehend aus Penicillin G (6,5 mg/ml) und Streptomycin (10 mg/ml) zugesetzt.

ZM1	DMEM-Medium	
	Kälberserum, fötales (FKS)	10 % (v/v)
	Antibiotika-Lösung	1 % (v/v)
	Pyruvat	1 % (v/v)

ZM1b Wie ZM1, nur mit 0,5 % fötalem Kälberserum

ZM1c Wie ZM1, jedoch komplett ohne FKS und ohne Antibiotika

2.1.2.1.2 Nährmedien für Bakterien und Pilze

Zur Herstellung von Festmedien wurden 2 % Spanagar hinzugefügt. Wurde das Medium zusätzlich mit Antibiotika versetzt, erfolgte dies erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen

des Mediums auf $< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit NaOH, bzw. HCl (jeweils 1 M).

M1	HA-Medium	
	Malzextrakt	10 g
	Glucose	4 g
	Hefeextrakt	4 g
	Leitungswasser	ad 1 l
	pH	5,5
M2	HMG-Medium	
	Malzextrakt	10 g
	Glucose	10 g
	Hefeextrakt	4 g
	Leitungswasser	ad 1 l
	pH	5,5
M3	MA-Medium	
	Malzextrakt	10 g
	Leitungswasser	ad 1 l
	pH	5,5
M4	DM-Medium	
	Malzextrakt	20 g
	Leitungswasser	ad 1 l
	pH	5,5
M5	BAF-Medium	
	Maltose	20 g
	Glucose	10 g
	Pepton	2 g
	Hefeextrakt	1 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g
	KH ₂ PO ₄	0,5 g
	FeCl ₃	10 mg
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,78 mg

	CaCl ₂	0,1 M
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
	pH	5,5
M6	LB-Medium	
	Bacto Trypton	10 g
	Bacto Yeast Extract	10 g
	NaCl	4 g
	H ₂ O _{UF}	ad 1 l
	pH	7,2
M6b	LB-Amp-Medium	
	wie M6, nur mit Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin nach Autoklavierung	

2.1.2.2 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anderweitig beschrieben, wurde ultrafiltriertes Wasser (H₂O_{UF}) verwendet. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl, bzw. NaOH.

2.1.2.2.1 Plasmidpräparation

P1	1 x TAE-Puffer (Gelelektrophorese)	
	Tris-Base	40 mM
	Essigsäure	20 mM
	EDTA	1 mM
	pH	8
P2	6 x DNA-Ladepuffer	
	Glycerin	30 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	EDTA	60 mM
	Tris-HCl (pH 8)	20 mM
L1	L1 Plasmid Maxipräparation	
	Glucose	50 mM

	Tris	25 mM
	EDTA	10 mM
	pH	7,5
L1b	Resuspendierungslösung Plasmid Minipräparation	
	Tris	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAse	100 mg/ml
	pH	8
L2	L2 Plasmid Maxi-/Mini-Präparation	
	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
L3	L3 Plasmid Maxipräparation	
	Kaliumacetat	3 M
	Eisessig	2 M
L3b	Neutralisierungslösung Plasmid Minipräparation	
	Kaliumacetat	3 M
	pH	5,5
L4	L4 Plasmid Maxipräparation	
	Natriumacetat	3 M
	pH	5,2
L5	CaCl ₂ -Glycerin-Lösung	
	CaCl ₂	100 mM
	Glycerin	30 % (v/v)
P3	TE-Puffer	
	Tris-HCl (pH 8)	10 mM

EDTA	1 mM
------	------

Die zur Kontrolle der Plasmide verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs GmbH (Beverly, USA) bezogen.

2.1.2.2.2 Lösungen der Zellkulturbehandlung

L6	Phosphatgepufferte Salzlösung (1 x PBS)	
	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,1 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	pH	7,4
	Vor ihrer Verwendung wurde die Lösung autoklaviert.	
L7	Gelatine-Beschichtungslösung	
	Gelatine	0,1 % (w/v)
	Vor ihrer Verwendung wurde die Lösung autoklaviert.	
L8	Giensa-Färbelösung	
	Giensa-Lösung	10 % (v/v)
	NaCl-Lösung (0,9 %)	90 % (v/v)
	Vor ihrer Verwendung wurde die Lösung filtriert.	
L9	XTT-Färbelösung	
	XTT in Medium M1	1 mg/ml
	PMS in PBS (1 x)	1,25 mM
	Endkonzentration PMS in 1 mg/ml XTT	25 µM

2.1.2.2.3 Zellextraktion

Der Proteaseinhibitorcocktail (PIC) wurde einer Stocklösung entnommen. Eine Tablette cComplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Merck, Darmstadt) wurde hierfür in 2 ml H₂O_{UF} gelöst (25 x), und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

P4	Totex-Puffer (Zellextraktion)	
	HEPES	20 mM
	NaCl	250 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
	β-Glycerophosphat	10 mM
	NaF	10 mM
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P5	RIPA-Puffer (Zellextraktion)	
	NaCl	150 mM
	Tris	50 mM
	NP-40	1 % (v/v)
	EDTA	5 mM
	SDS	0,1 % (v/v)
	Natriumdeoxycholat	0,1 % (v/v)
	NaF	10 mM
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P6	NP-40 Lyse-Puffer (Zellextraktion, nicht denaturierend)	
	NaCl	137 mM
	Tris-HCl	20 mM
	NP-40	1 % (v/v)
	EDTA	2 mM

	Glycerin	20 % (v/v)
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P7	ChIP-Lyse-Puffer	
	Tris-HCl (pH 8)	25 mM
	KCl	85 mM
	NP-40	0,5 % (v/v)
P8	ChIP-Kernlyse-Puffer	
	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	1 % (v/v)
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P9	ChIP-Verdünnungs-Puffer	
	Tris-HCl (pH 8)	16,7 mM
	NaCl	167 mM
	EDTA	1,2 mM
	SDS	0,01 % (v/v)
	Triton X-100	1,1 % (v/v)
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P10	ChIP-Hochsalz-Wasch-Puffer	
	HEPES (pH 7,9)	50 mM
	NaCl	500 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	0,1 % (v/v)
	Triton X-100	1 % (v/v)
	Natriumdeoxycholat	0,1 % (v/v)
P11	ChIP-Elutions-Puffer	
	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	EDTA	10 mM

	SDS	1 % (v/v)
P12	S1-Puffer	
	Saccharose	0,25 M
	MgCl ₂	10 mM
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P13	S3-Puffer	
	Saccharose	0,88 M
	MgCl ₂	0,5 mM
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P14	SDS-Puffer	
	Tris (pH 7,4)	50 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	4 % (w/v)
<u>2.1.2.2.4 SDS-Gelelektrophorese, Western Blot</u>		
P15	SDS-PAGE Lauf-Puffer (1 x)	
	Tris-HCl	24,8 mM
	Glycin	134,2 mM
	SDS	0,1 % (v/v)
P16	SDS-Proben-Puffer (5 x)	
	Tris-HCl	250 mM
	Glycerin	50 %
	SDS	10 % (w/v)
	DTT	250 mM
	EDTA	50 mM
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
P17	Transferpuffer T1	
	ε-Aminocapronsäure	40 mM

	Transferpuffer T2 Vor Benutzung frisch angesetzt	ad 100 ml
P18	Transferpuffer T2 Tris-Base (pH 10,4) Isopropanol	25 mM 20 % (v/v)
P19	Transferpuffer T3 Tris-Base (pH 10,4) Isopropanol	300 mM 20 % (v/v)
P20	TBS-Puffer (1 x) NaCl Tris-HCl	150 mM 50 mM
P21	Waschpuffer (Western Blot) NaCl Tris-HCl Tween-20 pH	150 mM 50 mM 0,1 % (v/v) 8
P22	Blocking-Puffer (Western Blot) Magermilchpulver	3 % (w/v) in Waschpuffer P21
P23	Strip-Puffer (Western Blot) Tris-HCl SDS pH β -Mercaptoethanol Zugabe kurz vor Benutzung	62,5 mM 2 % (w/v) 6,8 0,8 %
L10	ECL-Lösung I	

	Tris-HCl	100 mM
	Luminol	2,5 mM
	p-Cumarsäure	0,4 mM
L11	ECL-Lösung II	
	Tris-HCl	100 mM
	H ₂ O ₂	0,00013 % (v/v)
	pH	8,5
L12	Colloidal Coomassie Färbelösung	
	Ammoniumsulfat	8 % (w/v)
	Phosphorsäure	2 % (w/v)
	Colloidal Brilliant G-250	0,08 % (w/v)
	Methanol (frisch hinzugeben)	20 % (v/v)
L13	Entfärbelösung	
	Ethanol	40 % (v/v)
	Eisessig	7 % (v/v)
<u>2.1.2.2.5 <i>Pulldown</i> für die Proteinmassenspektrometrie</u>		
P24	Hochsalz-TBS-Puffer (1 x)	
	NaCl	300 mM
	Tris-HCl	50 mM
P25	Waschpuffer <i>Pulldown</i>	
	1 % (v/v) NP-40-Lyse-Puffer (P6) in TBS-Puffer (P20)	
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P26	Hochsalz-Waschpuffer <i>Pulldown</i>	
	1 % (v/v) NP-40-Lyse-Puffer (P6) in Hochsalz-TBS-Puffer (P24)	
	Proteaseinhibitorcocktail	1 x
P27	Laemmli-Proben-Puffer (2 x)	

Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
Glycerin	20 %
SDS	4 % (w/v)
DTT	100 mM
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

2.1.2.2.6 Probenvorbereitung Proteinmassenspektrometrie

P28	ABC-Puffer	
	Ammoniumbicarbonat	40 mM
P29	Reduktionspuffer	
	Ammoniumbicarbonat	40 mM
	DTT	10 mM
P30	Alkylierungspuffer	
	Ammoniumbicarbonat	40 mM
	Iodacetamid	100 mM
L14	Lösung A	
	Acetonitril	2 % (v/v)
	Ameisensäure	1 % (v/v)
L15	Lösung B	
	Acetonitril	80 % (v/v)
	Ameisensäure	1 % (v/v)

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primärantikörper

Zielprotein	Hersteller (Art.Nr.)	Quelle	Molekulargewicht (kDa)
Oct-4	CST (83932)	Kaninchen	45
Lin-28	CST (8706)	Kaninchen	26
β -3-Tubulin	CST (5568)	Kaninchen	55
β -3-Tubulin (IF)	Merck (MAB1637)	Maus	55

Nestin (IF)	Merck (MAB353)	Ratte	207
Eotaxin-1	SCBT (sc-374233)	Maus	8
Eotaxin-3	PeptoTech (500-M32)	Maus	8,4
Periostin	SCBT (sc-398631)	Maus	84
MCP-1 (CCL-2)	SCBT (sc-32771)	Maus	12
RANTES (CCL-5)	SCBT (sc-514019)	Maus	8
IP-10	SCBT (sc-14639)	Ziege	10
TNF- α	SCBT (sc-133192)	Maus	26
α -Tubulin	CST (2125)	Kaninchen	52
β -Actin	CST (4970)	Kaninchen	45
STAT6	CST (5397)	Kaninchen	110
Acetyl-Histon H3 (Lys9)	Merck (07-352)	Kaninchen	17
Snail	CST (3879)	Kaninchen	29
Twist	SCBT (sc-81417)	Maus	28
Slug	SCBT (sc-166476)	Maus	30
N-Cadherin	CST (13116)	Kaninchen	140
E-Cadherin	CST (3195)	Kaninchen	135
Lamin b	SCBT (sc-377000)	Maus	67
Normal Rabbit IgG	Merck (12-370)	Kaninchen	

2.1.3.2 Sekundärantikörper

Zielprotein	Hersteller	Quelle
Anti-Mouse-IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen (A-11029)	Ziege
Anti-Rat IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen (A-11006)	Ziege
Anti-rabbit-IgG-HRP	CST (7074)	Ziege
Anti-mouse-IgG-HRP	SCBT (SC-2005)	Ziege
m-IgGk BP-HRP	SCBT (SC-516102)	Maus
Anti-goat-IgG-HRP	SCBT (SC-2020)	Esel

2.1.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) hergestellt.

2.1.4.1 Oligonukleotide für die Chromatin Immunpräzipitation

Zur Analyse von immunpräzipitiertem Chromatin wurden Primer nach Zhang *et al.* (2012) gewählt. Diese amplifizieren den Bereich -110 bis +85 Basenpaare relativ zum Startpunkt der Transkription innerhalb des Eotaxin-3 Promotors. Der amplifizierte Bereich beinhaltet die proximale STAT6-Bindestelle (TTCTCTGGAA) und eine TATA-Box (X. Zhang *et al.*, 2012).

Eot-3 S6 for:	5'-GTTGGGTCAAAGTGCTGCTTCTG-3'
Eot-3 S6 rev:	5'-GGTGGAGACTCAGGAGGGAGGC-3'
Genbank Acc. Nr.:	XM_017011671.1
Produktlänge:	195 bp

Als Positivkontrolle wurden Primer zur Amplifikation einer 171 bp großen Region des humanen *gapdh*-Promotors (4471, New England Biolabs, Beverly, USA) genutzt.

2.1.4.2 *real-time*-PCR-Primer

Abkürzung	Primer 5' > 3'	Genbank Acc. Nr.	Produktlänge [bp]	Genname	Organismus
ccl-11 (for)	TACCCCTTCAGCGACTAGAGAG	NM002986.3	162	<i>chemokine (C-C motif) ligand 11</i>	<i>Homo sapiens</i>
ccl-11 (rev)	GAGTTGGAGATTTTTGGTCCAG				
ccl-2 (for)	ATCAATGCCCCAGTCACC	NM002982	216	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	<i>Homo sapiens</i>
ccl-2 (rev)	AGTCTTCGGAGTTTGGG				
ccl-26 (for)	ACCTGAGAAGGGCCTGATTTGC	NM_006072.4	150	<i>chemokine (C-C motif) ligand 26</i>	<i>Homo sapiens</i>
ccl-26 (rev)	GGCTTGTGGCTGTATTGGAAGC				
ccl-5 (for)	TACCATGAAGGTCTCCGC	NM001278736	199	<i>chemokine (C-C motif) ligand 5</i>	<i>Homo sapiens</i>
ccl-5 (rev)	GACAAAGACGACTGCTG				
col1a (for)	TCGTCCGAGCAGACGGGAGTT	NM000088.3	88	<i>alpha-1 type 1 collagen</i>	<i>Homo sapiens</i>
col1a (rev)	AGGGGGTTAGCGTCCGCTCA				
cox-2 (for)	TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT	NM000963	305	<i>cyclooxygenase 2</i>	<i>Homo sapiens</i>
cox-2 (rev)	AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT				
cxcl-1 (for)	AGGCAGGGGAATGTATGTGC	NM001511	224	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>	<i>Homo sapiens</i>
cxcl-1 (rev)	AGCCCCTTTGTTCTAAGCCA				
cxcl-10 (for)	TGAGCCTACAGCAGAGGAA	NM001565.3	105	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>	<i>Homo sapiens</i>
cxcl-10 (rev)	TACTCCTTGAATGCCACTTAGA				
e-cad (for)	ACACCCGGGACAACGTTTAT	NM001317186.1	226	<i>e-cadherin</i>	<i>Homo sapiens</i>
e-cad (rev)	GGGTCAGTATCAGCCGCTTT				
gapdh (for)	CCTCCGGGAAACTGTGG	NM002046.6	140	<i>glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase</i>	<i>Homo sapiens</i>
gapdh (rev)	AGTGGGGACACGGAAG				

gapdh (for)	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	NM008084.3	172	<i>glyceraldehyd-3-phosphat-</i>	<i>Mus musculus</i>
gapdh (rev)	ACACATTGGGGGTAGGAACA			<i>dehydrogenase</i>	
il-6 (for)	TCTCCACAAGCGCCTTCG	NM000600	193	<i>interleukin-6</i>	<i>Homo sapiens</i>
il-6 (rev)	CTCAGGGCTGAGATGCCG				
Il-8 (for)	TGCCAAGGAGTGCTAAAG	NM000584	197	<i>interleukin-8</i>	<i>Homo sapiens</i>
Il-8 (rev)	CTCCACAACCCTCTGCAC				
lin-28 (for)	GCGAAGATCCAAAGGAGACAGGTG	NM145833.1	63	<i>lin-28</i>	<i>Mus musculus</i>
lin-28 (rev)	CATTCCTTGGCATGATGGTCTAGC				
mmp-9 (for)	CGACGTCTTCCAGTACCGAG	NM004994.2	189	<i>matrix-metalloprotease-9</i>	<i>Homo sapiens</i>
mmp-9 (rev)	GTTGGTCCCAGTGGGGATTT				
nanog (for)	TGATTCAGAAGGGCTCAGCA	NM028016.3	89	<i>nanog</i>	<i>Mus musculus</i>
nanog (rev)	AAGGCTTCCAGATGCGTTCA				
n-cad (for)	GAAGGACAGCCTCTTCTCAATGTG	NM001792.4	121	<i>n-cadherin</i>	<i>Homo sapiens</i>
n-cad (rev)	TCACGGCATAACCATGCCATC				
ncam (for)	TGCCAAAGAAGCCAACATGG	NM001081445.1	144	<i>neural cell adhesion molecule 1</i>	<i>Mus musculus</i>
ncam (rev)	CGGACTGGCTGTGTCTTGAA				
nestin (for)	ACCTATGTCTGAGGCTCCCTATCCTA	NM016701.3	201	<i>nes</i>	<i>Mus musculus</i>
nestin (rev)	GAGGTTGGATCATCAGGGAAGTG				
oct-4 (for)	TTCAGCCAGACCACCATCTGTC	NM013633.3	143	<i>pou domain, class 5, transcription</i>	<i>Mus musculus</i>
oct-4 (rev)	AGGGTCTCCGATTTGCATATCTCC			<i>factor 1</i>	
snail (for)	ACCACTATGCCGCGCTCTT	NM005985.4	115	<i>snail family transcriptional</i>	<i>Homo sapiens</i>
snail (rev)	GGTCGTAGGGCTGCTGGAA			<i>repressor 1</i>	
tnf-α (for)	TCTTCTGCCTGCTGCACTTTGG	NM000594.3	224	<i>tumor-necrosis-factor-α</i>	<i>Homo sapiens</i>
tnf-α (rev)	ATCTCTCAGCTCCACGCCATTG				

<i>twist</i> (for)	TACGCCTTCTCGGTCTGGAG	NM000474.4	238	<i>twist family bHLH transcription</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>twist</i> (rev)	CCCCACGCCCTGTTTCTTTG			<i>factor 1</i>	
<i>vim</i> (for)	AGATGCTTCAGAGAGAGGAAGCC	NM003380.5	71	<i>vimentin</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>vim</i> (rev)	CAGAGACGCATTGTCAACATCCTG				
β-3-<i>tub</i> (for)	TTTTCGTCTCTAGCCGCGTG	NM023279.3	100	<i>betall-tubulin</i>	<i>Mus musculus</i>
β-3-<i>tub</i> (rev)	GATGACCTCCCAGAACTTGGC				

2.1.4.3 miRNA spezifische Primer

Die miRNA-Primer wurden entsprechend der Datenbanken von Quantabio (Berkeley, USA) und mirBase (University of Manchester, UK) gewählt.

Name	Genbank Acc. Nr.	Primer 5' > 3'	miRNA
mmu-miR-9-5p	MIMAT0000142	CGCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATG	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
mmu-miR-124-3p	MIMAT0000134	ACGCGGTGAATGCCAAAA	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
mmu-miR-125a-5p	MIMAT0000135	GAGACCCTTTAACCTGTGAAAAA	UCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA
mmu-miR-128-1-5p	MIMAT0016982	GCCGTAGCACTGTCTGAAAA	CGGGGCCGUAGCACUGUCUGA
mmu-miR-145a-5p	MIMAT0000157	CAGTTTTCCAGGAATCCCTAA	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU
mmu-let7a-5p	MIMAT0000521	CCGAGCTGAGGTAGTAGGTTGTATA	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
mmu-let7b-5p	MIMAT0000522	CGTTCTGAGGTAGTAGGTTGTGTG	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU
mmu-let7c-5p	MIMAT0000523	CCGAGCTGAGGTAGTAGGTTGTATG	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
mmu-let7d-5p	MIMAT0000383	GGGACGAGAGGTAGTAGGTTGC	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
mmu-let7e-5p	MIMAT0000524	CGGTGGTGGTGAGGTAGGAG	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
mmu-let7f-5p	MIMAT0000525	CGGTGGTGGTGAGGTAGTAGA	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
Universal Primer		GCATAGACCTGAATGGCGGTA	

2.1.5 Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden durch Transformation von *E. coli* TOP 10F' gewonnen (vgl.: 2.2.2.2) und zur Transfektion der Zelllinien genutzt.

<u>pGL3-TK-7xN4</u>	Reportergenvektor, bei dem das Gen der Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines Oligomers (7 x) der C/EBP-N4-Konsensussequenz (Bindungsstelle für das STAT6-Homodimer), sowie eines HSV-TK Promotors steht. Als Grundgerüst diente der Vektor pGL-3-Basic (Promega, Mannheim)
<u>TOPO/STAT6</u>	Expressionsvektor, bei dem das Gen von humanem STAT6 unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors steht, und auf dem Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) basiert.
<u>pGAS-TA-Luc</u>	Reportergenvektor, bei dem die Expression der Firefly-Luciferase unter der Kontrolle einer zweifachen Kopie der IFN- γ -Aktivierungssequenz (GAS) upstream eines TA-Minimalpromotors steht.
<u>pISRE-TA-Luc</u>	Reportergenvektor, bei dem die Expression der Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines Oligomers (5 x) der ISRE-Konsensussequenz downstream eines TA-Minimalpromotors steht.
<u>pNF-κB-Luc</u>	Reportergenvektor, bei dem die Firefly-Luciferase-Expression durch vier Kopien der NF- κ B-Konsensussequenz und einem minimalen HSV-TK Promotor reguliert wird (BD Clontech, Heidelberg)
<u>(CAGA)_{9x}-MLP-Luc</u>	Reportergenvektor, bei dem die Firefly-Luciferase-Expression unter Kontrolle einer 9-fachen Kopie der SMAD3/4-Konsensussequenz und eines minimalen Adenovirus „major late“ Virus Promotors (MLP) steht. Das Grundgerüst basiert auf dem Plasmid pGL-3-Basic (Promega, Mannheim). Der Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. S. Dooley zur Verfügung gestellt.
<u>pGL3-IL-8pro</u>	Reportergenvektor, dessen Firefly-Luciferase-Expression durch den humanen IL8-Promotor reguliert ist (1,5 kb; -1481 bis +45 nt).
<u>pGL4-IP-10pro</u>	Reportergenvektor, bei dem die Firefly-Luciferase-Expression unter Kontrolle des humanen CXCL-10-Promotors (972 bp; -875 bis +97 nt) steht. Als Grundgerüst diente der Vektor pGL4.11-Basic (Promega, Mannheim).

<u>pRL-EF-1α</u>	Konstitutiv aktive Expression des Reportergens, unter der Kontrolle des humanen Elongationsfaktor 1 α Promotors. Als Reportergen diente entweder die Luciferase aus <i>Renilla reniformis</i> , oder das rot fluoreszierende Protein DS-Red aus <i>Discosoma sp.</i> (Rohr, 2018).
<u>pDS-Red-EF-1α</u>	
<u>pGE3-NF1</u>	Reportergenvektor, bei dem die Expression der Sekretorischen Alkalischen Phosphatase (SEAP) unter der Kontrolle eines Oligomers (5 x) der NF- κ B-Konsensussequenz downstream eines HSV-TK-Promotors steht (Gerhard Erkel, Anke, & Sterner, 1996).
<u>pTK/SEAP(7xN4)</u>	Reportergenvektor, dessen SEAP-Expression unter der Kontrolle eines Oligomers (7 x) der C/EBP-N4-Konsensussequenz (Bindungsstelle für das STAT6-Homodimer), sowie eines HSV-TK Promotors steht. Als Grundgerüst diente der Vektor pGL-3-Basic (Promega, Mannheim).
<u>pDB2-Oct-4pro</u>	Reportergenvektor, bei dem die Expression des <i>enhanced green fluorescent protein</i> (eGFP) unter der Kontrolle des murinen POU5F1 (Oct-4) -Promotors (2,17 kb; -2170 bis +7 nt) steht. Der Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Mohammad Hossein Nasr Esfahani zur Verfügung gestellt (Ghorbani <i>et al.</i> , 2013)

2.1.6 Organismen

2.1.6.1 Bearbeiteter Pilzstamm

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Pilzstamm *Eurotium herbariorum* wurde freundlicherweise von der „Asthma and Allergy Research Group“ der Universität München, unter der Leitung von Frau Prof. Erika von Mutius zur Verfügung gestellt.

2.1.6.2 Bakterien für die Transformation

Für die Transformation und Gewinnung der Plasmide wurde der Bakterienstamm *E. coli* TOP 10F' verwendet.

Genotyp: F' [lac^q, Tn10(tet^R)], mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsLStr^R), endA1, nupG

2.1.6.3 Zelllinien

Es wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Zelllinien verwendet:

Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit Referenz und jeweiliger Bezugsquelle

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
A549	Humane alveolare Lungenkarzinomzelllinie	DSMZ ACC 107
BEAS-2B	humane Bronchialepithelzelllinie, Adenovirus 12-SV40 Virus Hybrid transformiert	ATCC CRL-9609
HepG2	humane, hepatozelluläre Karzinomzelllinie	DSMZ ACC 180
P19	murine, embryonale Karzinomzelllinie	DSMZ ACC 316

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Fermentation von Pilzen

Alle Arbeitsschritte mit Pilzkulturen wurden zur Wahrung der Sterilität an einer Werkbank mit horizontalem Luftstrom (Horizontal-Flow Werkbank Typ HF, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH) durchgeführt.

2.2.1.1 Anzucht und Passagieren der Pilze

Die Anzucht der Pilzkulturen wurde auf Petrischalen mit dem jeweiligen Festmedium gewährleistet. Hierfür wurde ein Agarwürfel (ca. 1 cm³) einer Dauerkultur als Inokulum genutzt. Nach annähernd vollständigem Durchsetzen des Festmediums mit Mycel, oder nach 4 Wochen Inkubation, wurde dem Medium ein peripherer Agarwürfel entnommen, welcher als Inokulum einer frischen Petrischale mit jeweiligem Festmedium diente.

2.2.1.2 Dauerhafte Lagerung der Pilzkulturen

Zur dauerhaften Lagerung wurden ausgehend von Reinkulturen des Pilzes 2 bis 3 Agarstücke in Reagenzgläser mit Schrägagar (M1) überimpft. Sobald der Pilz ein gleichmäßiges Wachstum auf dem Schrägagar zeigte, wurde die Wachstumsfläche mit Paraffinöl überdeckt, das Reagenzglas mit einem Silikonstopfen verschlossen und die Dauerkultur bei Raumtemperatur gelagert. Eine Erneuerung der Dauerkulturen erfolgte im Abstand von einem Jahr.

2.2.1.3 Fermentation von Pilzen in Schüttelkolben

Die Fermentation in Schüttelkulturen wurde zur Herstellung von Fermenter-Vorkulturen, Medienversuchen und der Wirkstoffproduktion genutzt, und erfolgte in unterschiedlichen Maßstäben (0,25 l bis 2,5 l). Die Wachstumsmedien wurden mittels Agarwürfel (ca. 1 cm³), ausgehend von einer gut bewachsenen Festmediumplatte inokuliert. Die Fermentation wurde auf einer Rundschüttelmaschine (120 U/min) bei Raumtemperatur durchgeführt (Witter, Anke,

& Sterner, 1998). Bei Medienversuchen und zur Wirkstoffproduktion wurden regelmäßig Proben entnommen (50 ml) und der pH-Wert, Myceltrockengewicht, Glucosegehalt und der Wirkstoffgehalt bestimmt.

2.2.1.4 Fermentation von Pilzen im 20 l-Maßstab

Die Fermentation im 20 l-Maßstab erfolgte in entsprechenden Fermentern vom Typ C-6 (Biolafitte, Paris, Frankreich). Vor dem Autoklavieren wurden dem Medium 3-5 ml Silicon-Entschäumer zugegeben. Als Inokulum dienten 250 ml einer gut bewachsenen Schüttelkultur, die unter angelegtem Überdruck dem Fermenter zugeführt wurde. Die Fermentation wurde bei Raumtemperatur, einer Rührerdrehzahl von 120 U/min und einer Belüftung von 3 l Luft/min (Cyclonerodiol) bzw. 2 l Luft/min (TWEh-1) durchgeführt. Während der Fermentation wurden unter Wahrung der Sterilität 50 ml-Proben entnommen. Damit wurde der pH-Wert, der Glucosegehalt sowie das Myceltrockengewicht (MTG) bestimmt. Außerdem wurde anhand der Probe der Wirkstoffgehalt im Medium überprüft.

2.2.1.5 Fermentationsanalysen

Während des Fermentationsprozesses wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit alle 1-3 Tage eine Probe (50 ml) steril entnommen. Anhand der Probe wurde direkt pH-Wert und Glukosegehalt bestimmt und das Mycel durch Firtation von der Kulturbrühe getrennt. Das Mycel wurde zur Bestimmung des Myceltrockengewichts getrocknet und die Kulturbrühe zur Erstellung des Rohextraktes und zur Bestimmung des Wirkstoffgehaltes extrahiert. Der erhaltene Rohextrakt wurde in einem definierten Volumen in Methanol gelöst und gleiche Volumina zur Ermittlung des Wirkstoffgehaltes mittels analytischer HPLC untersucht.

2.2.1.5.1 pH-Wert und Myceltrockengewicht

Der pH-Wert der gezogenen Proben wurde mit einem elektronischen pH-Messgerät (MP220, Mettler-Toledo, Columbus, USA) erfasst. Das Mycel wurde durch Filtration auf eingewogenen Rundfiltern (Schleicher & Schüll, Dassel) von der Kulturbrühe getrennt. Die Rundfilter wurden ü. N. bei 65 °C getrocknet und zur Ermittlung des Myceltrockengewichtes gewogen.

2.2.1.5.2 Glukosebestimmung

Während der Fermentation wurde der Glucosegehalt mittels Diabur Test 5000-Teststreifen (Roche Diagnostics, Mannheim) bestimmt.

2.2.1.5.3 Wirkstoffbestimmung

Zur Ermittlung des Wirkstoffgehaltes wurde mittels analytischer HPLC eine Standardkurve definierter Wirkstoffkonzentrationen erstellt. Diese diente im Anschluss der Bestimmung der in den Tagesproben enthaltenen Wirkstoffmenge.

2.2.1.6 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Nach Ende der Fermentationszeit wurde das Mycel durch Filtration über einem Büchner-Trichter von der Kulturbrühe getrennt. Die Kulturbrühe wurde zweimal mit einer Volumeneinheit Ethylacetat ausgeschüttelt und extrahiert. Das organische Lösungsmittel wurde anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und mittels Rotationsverdampfer unter Vakuum bis zur Trocknung eingeengt. Das so gewonnene Rohextrakt wurde in entsprechenden Konzentrationen Lösungsmittel aufgenommen, um die Extrakte in den biologischen Aktivitätsassays einzusetzen.

2.2.1.7 Extraktion getrockneter Pflanzenextrakte

Um organische Substanzen aus *Rubia cordifolia* zu extrahieren, wurden 500 g getrocknete Wurzeln in einem Erlenmeyerkolben mit ausreichend Methanol bedeckt und für mindestens 2 Stunden unter Schütteln extrahiert. Die Extraktionsbrühe wurde mittels Faltenfilter (Schleicher & Schüll, Dassel) von den Wurzeln getrennt und nachfolgend wie oben beschrieben im Vakuum eingeengt.

2.2.1.8 Festphasenchromatographie

Eine erste Auftrennung der Rohextrakte erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel 60 (0,063-0,2 mm, Fa. Merck, Darmstadt) und Elution mit einem Cyclohexan-Ethylacetat-Gradienten unter Normaldruck. Alternativ oder nachfolgend wurden die Extrakte mit einer Festphasenextraktionssäule (Chromabond C18 ec, Macherey-Nagel, Düren) aufgetrennt und auf präparative und analytische Systeme vorbereitet. Als Eluenten dienten hierbei Methanol/H₂O_{UF}- oder AcN/H₂O_{UF}-Gemische. Die Gradienten wurden bei der Festphasenchromatographie entsprechend der Retentionszeiten der vorangegangenen analytischen HPLC-Läufe jedes Extraktes angepasst.

2.2.1.9 HPLC-Analyse

Zur Untersuchung der gewonnenen Rohextrakte und deren Metabolitenspektren wurden HPLC-Analysen durchgeführt. Vor dem Einsatz für die HPLC-Analyse wurden die Proben, sofern nicht bereits durch eine Festphasenextraktionssäule (Chromabond C18 ec, Macherey-Nagel, Düren) vorbereitet, über Einmalfilter (Chromafil Pet-45/15 MS, Macherey-Nagel, Düren) filtriert, um nichtlösliche Substanzen zu entfernen. Zur Analyse wurde das Hewlett Packard

1100 Series HPLC System (Agilent, Santa Clara, USA) mit RP18-Trennsäule (LiChrospher® 5 µm, 125 x 2 mm, Merck KGaA, Darmstadt) eingesetzt. Um bekannte Verbindungen in den Extrakten identifizieren zu können, wurden Standard-Laufparameter (G1) gewählt. Damit war die Vergleichbarkeit der Retentionszeiten und UV-Spektren mit der vorhandenen Datenbank gegeben. Soweit nicht anderweitig angegeben, erfolgte die Analyse bei vortemperierter Säule (40 °C) mit einem Injektionsvolumen von 1-20 µl. Der Fluss von Gradient G1 wurde entsprechend dem Innendurchmesser der Säulen angepasst.

Tabelle 3: Verwendeter HPLC-Gradient G1 mit den Eluenten Wasser und Acetonitril.

Säulenmaterial	Zeit [min]	Acetonitril [%]
RP18	0	1
	20	100
	24	100
	25	1

2.2.1.10 Reindarstellung von Wirkstoffen

2.2.1.10.1 Präparative HPLC

Die letztendliche oder annähernde Reindarstellung der Wirkstoffe erfolgte mittels einer präparativen HPLC-Anlage (Jasco PU-1586 mit „Multiwavelength“-Detektor UV-1570, Jasco, Easton, USA). Zur Trennung kamen die folgenden Säulen, entsprechend dem Laufverhalten der Eluate, zum Einsatz:

- RP18-Säule (Nucleosil, 7 µm, 250 x 21 mm, Macherey-Nagel, Düren) gekoppelt mit einer RP18-Vorsäule (Nucleosil, 7 µm, 50 x 21 mm, Macherey-Nagel, Düren)
- Pentafluorphenyl-propyl-modifizierte Kieselgel-Säule (Nucleodur PFP 5 µm, 150 x 4,6 mm, Macherey-Nagel, Düren)
- Eclipse XDB-Phenyl-Säule (ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl, 5 µm, 150 x 4,6 mm, Agilent, Santa Clara, USA)

Alle Säulen wurden mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten verwendet. Das Wasser wurde bei Bedarf zur Erhöhung der Trennschärfe mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure angesäuert. Konnte mittels präparativer HPLC die letztliche Reindarstellung nicht komplett gewährleistet werden,

oder fanden sich noch Verunreinigungen, wurde das Hewlett Packard 1100 Series HPLC System (Agilent, Santa Clara, USA) mit RP18-Trennsäule (LiChrospher[®] 5 µm, 125 x 4 mm, Merck KGaA, Darmstadt) mit gekoppeltem Fraktionssammler (Agilent 1100 Series G1364C AFC Fraction Collector) eingesetzt.

2.2.1.10.2 HPLC-MS-Analyse

Die Ermittlung der Massenspektren nach Reindarstellung der Substanzen erfolgte mit Hilfe einer „Quadrupole ion trap“ (4000 QTRAP, ABSciex, Darmstadt), gekoppelt an das Hewlett Packard 1100 Series HPLC System (Agilent, Santa Clara, USA). Als Säulenmaterial für Vor- (Superspher, 10 x 2 mm, Merck, Darmstadt) und Trennsäule (Superspher, 125 x 2 mm, Merck, Darmstadt) fand RP18 Verwendung. Die Trennung erfolgte mit dem Standardgradient G1 (vgl. Tabelle 3) bei einem Fluss von 0,45 ml/min. Zur Bestimmung der Massenspektren wurden folgende Einstellungen verwendet:

Quelle: heated nebulizer; Scan Typ: enhanced MS; Scan Rate: 1000 Da/s; Scan Bereich: 50 – 800 m/z; Collision: 1; Nebulizer Current: 4 mA; Temperatur: 400 °C; Ionenquelle Gas 1: 30 psi; Interface heater: on; Declustering potential: 90 V; Collision energy: 10 V

2.2.1.10.3 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen und die Strukturaufklärung isolierter Reinsubstanzen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Organische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. T. Opatz an der Universität in Mainz durchgeführt.

2.2.2 Kultivierung von Bakterien

Alle Arbeitsschritte mit Bakterien wurden, soweit nicht anderweitig angegeben an einer Horizontal-Flow Werkbank (Typ HF, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH) durchgeführt.

2.2.2.1 **Anzucht und Lagerung von Bakterien**

E. coli wurden in Petrischalen mit dem Medium M6 angezogen, welches gegebenenfalls mit dem entsprechenden Selektionsmarker versetzt wurde. Inokulierte Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und im Anschluss zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Lagerung von transformierten *E. coli* wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden Übernachtskulturen (37 °C, 120 rpm) in Medium M6 mit Selektionsmarker angesetzt, um nachfolgend 0,5 ml der Bakterienkultur mit 0,5 ml sterilem Glycerin zu versetzen und bei -80 °C zu lagern. Zur Rekultivierung einer Kryokultur wurde mittels Impföse ein Verdünnungsausstrich auf entsprechenden Festmedienplatten angefertigt.

2.2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (TOP 10F')

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde mittels CaCl₂ gewährleistet (Sambrook & Russell, 2001). Zur Transformation wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 50 ng Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden und eine Zugabe von 1 ml Medium M6. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden 50 µl der Zellsuspension auf LB-Festmediumplatten (M6b) mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden Einzelkolonien auf *master plates* des gleichen Mediums überimpft. Diese Kolonien wurden für Plasmid-Präparationen verwendet.

2.2.2.3 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.2.3.1 Plasmid-Minipräparation

Zunächst wurde der gewünschte *E. coli*-Klon von einer *master plate* im 3 ml-Maßstab über Nacht bei 37 °C in Reagenzgläsern in Medium M6 mit entsprechendem Selektionsmarker unter Schütteln (120 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation in 2 ml Eppendorfgefäßen pelletiert (5000 x g, 4 °C, 10 min) und in 200 µl L1b durch Vortexen resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl L2 und mehrmaligem Invertieren 5 min auf Eis. Die Suspension wurde durch Zugabe von 200 µl L3b neutralisiert und die Zellbestandteile durch Zentrifugation pelletiert (12000 x g, 15 min, RT). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Plasmide mit 1 Volumenanteil Isopropanol 20 min bei -20 °C gefällt. Nach Pelletierung der DNA (12000 x g, 30 min, RT) wurde die DNA mit EtOH (70 % v/v) gewaschen und das Pellet im Anschluss getrocknet. Die DNA wurde in 30-60 µl sterilem H₂O_{UF} oder P3 resuspendiert und die Konzentration mittels Nanodrop (ND-2000™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Plasmide bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3.2 Plasmid-Maxipräparation

Die Maxipräparation diente der Aufreinigung größerer Mengen an Plasmid-DNA. Dabei wurde, ausgehend von der angefertigten *master plate*, der gewünschte Klon von *E. coli* TOP 10F' zunächst in 3 ml M6 mit Selektionsmarker bei 37 °C für 6-8 h unter Schütteln (120 rpm) inkubiert. Die Vorkultur diente als Inokulum für 500 ml des gleichen Mediums in 1 l Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen, wobei die Fermentation über Nacht bei gleichen Parametern durchgeführt wurde. Die Pelletierung der Zellen erfolgte bei 5000 g und 4 °C für 15 min, um anschließend das Zellpellet in eiskalter L1 zu resuspendieren. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym erfolgte eine zehnminütige Inkubation auf Eis. Zur Lyse der Zellen wurden 12 ml L2 hinzugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde

durch Zugabe von 7,5 ml eiskalter L3 neutralisiert, die Zellbestandteile 10 Minuten auf Eis gefällt und bei 12000 g und 4 °C für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, mit 20 ml Isopropanol 30 min bei Raumtemperatur gefällt, und anschließend bei 12000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 5 ml H₂O_{UF} mit 250 µg RNase gelöst und nach vorsichtigem Mischen 1 h bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurde zweimal mit einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung extrahiert (12000 g; 15 min; 4 °C), wobei jeweils die organische Phase verworfen wurde. Der wässrige Überstand mit der Plasmid-DNA wurde mit 0,1 Volumenäquivalent L4, sowie 2-3 Volumenäquivalent EtOH bei -20 °C über Nacht gefällt. Die Pelletierung der DNA erfolgte bei 12000 g und 4 °C für 15 min. Im Anschluss wurde die DNA mit 70 %-igem EtOH p.a. gewaschen, getrocknet, in sterilem H₂O_{UF} oder P3 aufgenommen und bis zu ihrer Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Diese Plasmid-DNA zur Transfektion von HepG2-Zellen eingesetzt. Zur Transfektion der Zelllinien BEAS-2B und P19 wurde die Plasmid-DNA nach Pelletierung des 500 ml-Ansatzes mittels des *Endotoxin-free plasmid DNA purification Kits* (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben Endotoxin-frei aufgereinigt.

2.2.2.3.3 Plasmid-Restriktion und Gelelektrophorese

Die Restriktion der DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Beverly, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Als Laufpuffer und zum Lösen der Agarose wurde 1 x TAE-Puffer (P1) verwendet. Der Agarosegehalt des Gels variierte in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße von 1-2 %. Die aufgetragene Probenmenge betrug maximal 1 µg. Die Elektrophorese selbst erfolgte bei 0,7 V/cm, wobei zur Abschätzung der DNA-Größe flankierende Banden des DNA-Größenmarkers („GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)) eingesetzt wurden. Die Färbung der DNA wurde durch Zugabe von GelRed® (Biotium Inc., Fremont, USA), 1:1000 im Ansatz, gewährleistet. Die Banden wurden mittels eines Gellesegeräts (Fusion FX7 advanced, Vilber Lourmat, Eberhardzell) detektiert.

2.2.3 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien

Zur Wahrung der Sterilität wurden alle Arbeitsvorgänge mit Zelllinien an einer Sicherheitsbank der Klasse II (MSC-Advantage, Thermo-Scientific, Schwerte) durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Heracel, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei feuchter, humankörperähnlicher Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C. Polyethylenflaschen mit Filterdeckel und einer Wachstumsfläche von 25 cm² bis 175 cm² (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) dienten als Kultivierungsgefäße.

2.2.3.1 Passagieren der Zelllinien

Alle Zelllinien in dieser Arbeit wachsen unter Normalbedingungen adhärent. Die Monolayerkulturen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe einer Trypsinlösung (1 x) vom Flaschenboden gelöst. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von frischem Medium ZM1 gestoppt, die Zellen vorsichtig darin resuspendiert, und abhängig von Zelldichte und Verdopplungsgeschwindigkeit anteilig in frisches Medium passagiert. Das Passagieren der Zelllinien erfolgte in der Regel alle 2 bis 3 Tage.

2.2.3.2 Kryokonservierung von Zelllinien

Die längere Lagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Hierfür wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in Medium ZM1 eingestellt. Um der Bildung von Eiskristallen vorzubeugen wurde der Zellsuspension 10 % (v/v) DMSO zugegeben und 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden zunächst für 24 h in mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehältern (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei -80 °C gelagert um die Kühlgeschwindigkeit (ca. -1 °C/min) zu regulieren. Danach wurden die Kryoröhrchen in Stickstoff-Lagerungstanks überführt. Um kryokonservierte Zellen erneut zu kultivieren, wurde das Kryoröhrchen in erwärmtem H_2O_{UF} aufgetaut und in eine Kulturflasche (75 cm²) mit erwärmtem Medium ZM1 überführt. Nach der Zelladhäsion wurde am nächsten Tag das Medium erneuert und die Zellen wie beschrieben weiter passagiert.

2.2.3.3 Induktion der Neurogenese von P19-Zellen

Die Kultivierung von P19-Zellen wurde mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss niedermolekularer Substanzen mit antiinflammatorischen Effekten auf die *Stemness* von P19-Zellen bei Induktion der Neurogenese zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen über einen Zeitraum von bis zu zwölf Tagen inkubiert. Die Zellen wurden zunächst, wie unter 2.2.3 beschrieben kultiviert und das Medium ZM1 24 h vor Versuchsbeginn erneuert. Am Versuchstag wurden die Zellen mittels Trypsinlösung von der Wachstumsfläche gelöst, pelletiert (800 g, 4 °C, 10 min), die Zellzahl auf 1×10^5 Zellen/ml in frischem Medium ZM1 eingestellt und je 10 ml in eine sterile Petrischale (94/16 mm, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) überführt. Zu diesen Ansätzen wurden nun die Testsubstanzen, sowie der neuronale Induktor Retinsäure appliziert. Die Aussaat von P19-Zellen in normalen Petrischalen als Suspensionskultur verhinderte die Adhäsion und förderte die Aggregation der Zellen zu sogenannten *embryoid bodies*, was ihre Neurogenese induziert (Bain, Ray, Yao, & Gottlieb, 1994). Nach 2 Tagen wurden die Zellen mittels Liquepette vorsichtig aus den Petrischalen abgenommen, pelletiert (500 g, RT, 5 min), in frischem Medium ZM1 vorsichtig resuspendiert, und erneut für weitere 2 Tage in Petrischalen unter erneuter

Testsubstanzapplikation ausgesät. Nach 4 Tagen wurde die Suspensionskultur wie beschrieben abgenommen und pelletiert. Das Zellpellet wurde einmal in PBS gewaschen und danach erfolgte die Vereinzelung der Zellen mittels 3-minütiger Inkubation in 2 ml einer Trypsinlösung (1 x). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 ml ZM1 gestoppt und die Zellen auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen (100/20 mm, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) unter erneuter Testsubstanzapplikation ausgesät. Die Beschichtung der Zellkulturschalen erfolgte mit 1 ml/Schale der Gelatine-Beschichtungslösung (L7) 4-5 Stunden vor der Aussaat. Nach 30-minütiger Trocknung innerhalb der Sterilbank wurden die Zellkulturschalen bis zur Aussaat im Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt. Kurz vor der Applikation der Zellen wurde überschüssige Gelatine-Lösung abgenommen. Nach weiteren 2 Tagen erfolgte die Abnahme des alten Mediums, die Zugabe frischen Mediums ZM1, sowie eine neuerliche Substanzapplikation. Die Testsubstanzen wurden somit letztmalig an Tag 6 (d6) nach Versuchsbeginn aufgebracht und an Tag 7 wurden diese Versuche beendet, wobei die neuronale Differenzierung ohne Behandlung bis Tag 12 (Erneuerung des Mediums alle 2 Tage) inkubiert wurde. In Abbildung 5 ist der zeitliche Versuchsablauf vereinfacht graphisch dargestellt.

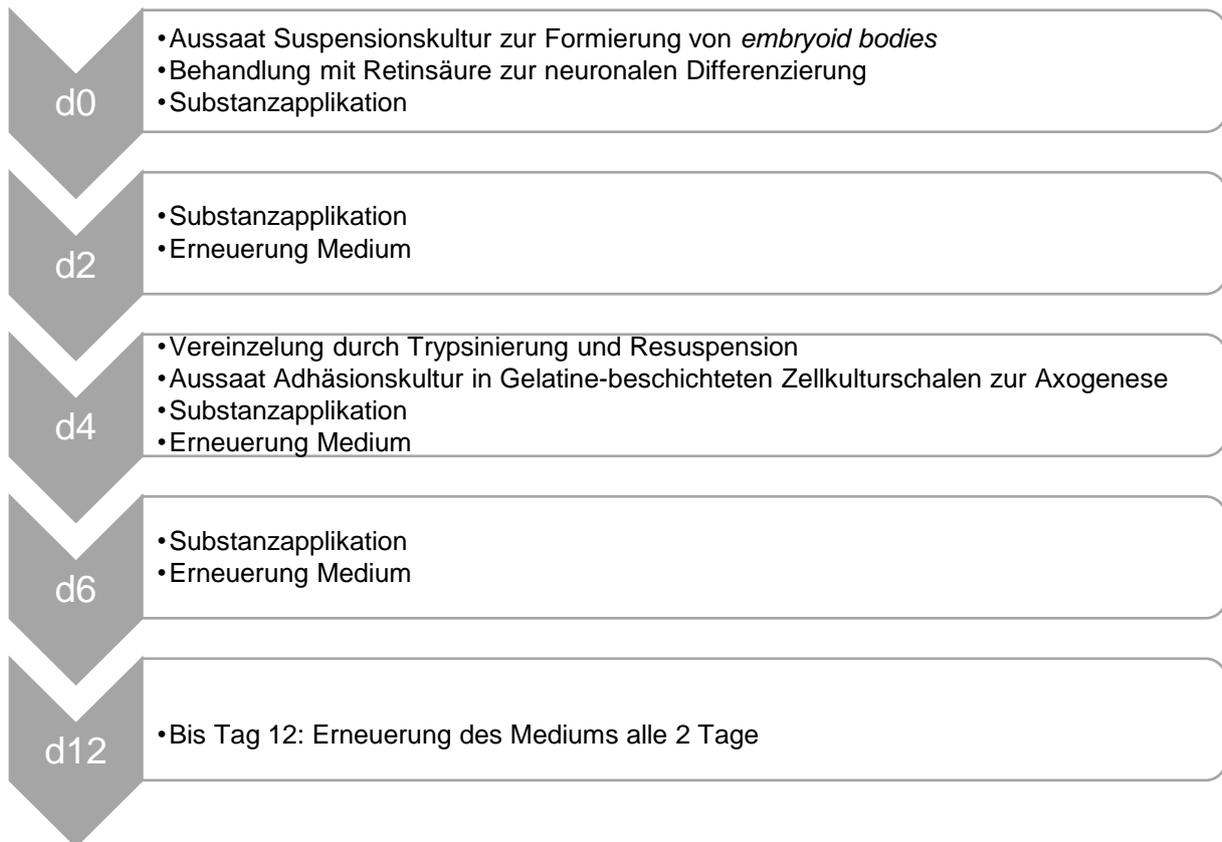


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der neuronalen Induktion von P19-Zellen. Dargestellt sind die Zeitpunkte der Aussaat von Suspension- und Adhäsionskultur, der Erneuerung des Mediums ZM1, der Induktion mit RA [1 μ M], sowie der Substanzapplikationen.

2.2.3.4 Transfektionsmethoden

2.2.3.4.1 Elektroporation der Zelllinien HepG2 und BEAS-2B

Die Kultivierung der HepG2-Zellen und BEAS-2B-Zellen erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben in Medium ZM1 in Zellkulturflaschen (75/175 cm²Wachstumsfläche). Das Medium wurde 24 h vor Versuchsbeginn erneuert. Am Versuchstag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, durch Trypsinierung vom Flaschenboden abgelöst und pelletiert (800 g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in Medium ZM1c aufgenommen und die Zellzahl auf eine Dichte von 6×10^6 - 1×10^7 Zellen/ml (HepG2) bzw. 1 - 2×10^7 Zellen/ml (BEAS-2B) eingestellt. Die Elektroporation wurde in sterilen Küvetten (Elektrodenabstand 0,4 cm, Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt, wobei diese mit 400 μ l Zellsuspension und 100 μ g (BEAS-2B: 50 μ g) der jeweiligen Plasmid-DNA versehen wurden. Nach zehnmütiger Vorinkubation auf Eis und vorsichtiger Durchmischung, erfolgte die Elektroporation bei 975 μ F und 200 Volt (Gene Pulser II, BioRAD, München), wobei Zeitkonstanten zwischen 50 und 80 ms (BEAS-2B: 50 bis 100 ms) eingehalten werden konnten. Unmittelbar danach wurden

die Elektroporationsküvetten mit erwärmtem Medium ZM1 aufgefüllt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Küvetteninhalt in 25 ml vorgewärmtes ZM1 überführt. Nach Resuspension wurden jeweils 1 ml in eine Vertiefung einer sterilen 24-Well Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert.

2.2.3.4.2 Transfektion der Zelllinie P19

Die Transfektion der murinen P19-Zelllinie erfolgte mittels des Transfektionsreagenz jetPRIME® (Polyplus-transfection SA, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich) nach Angaben des Herstellers. 24 h vor der Transfektion wurden 1 ml Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen/ml in jeweils eine Vertiefung einer 24-Well Mikrotiterplatte in Medium ZM1 ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt und das Volumen pro Vertiefung auf 500 µl reduziert. Zur Transfektion wurden zunächst die Mengen an verwendeter Plasmid-DNA und jetPRIME® Reagenz optimiert (vgl. Abbildung 12, A). 4 h nach der Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium ZM1 ersetzt.

2.2.3.5 Reportersysteme

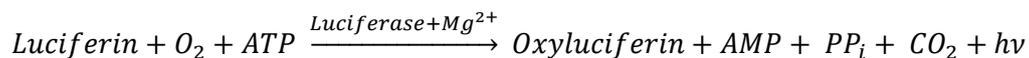
Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene Arten von Reporter genen zum Einsatz. Die Reporter gene wurden mittels Transfektion in eukaryotischen Zellen transgen exprimiert. Sie dienten dabei der Untersuchung des Einflusses von Testsubstanzen auf Signaltransduktionswege und die Promotoraktivität ausgewählter Gene. Die Expression des Reporter gens steht hierbei unter der Kontrolle regulatorischer Einheiten wie oligomerer Bindestellen für Transkriptionsfaktoren oder Promotorsequenzen und ist direkt proportional zur Aktivierung dieser regulatorischen Elemente (S. T. M. Allard & Kopish, 2008).

24 h nach der Transfektion mittels Elektroporation, bzw. 4 h nach Transfektion mit jetPRIME® wurden die Testsubstanzen in den entsprechenden Medien (HepG2, BEAS-2B: ZM1b; P19: ZM1) appliziert, sowie die zu untersuchende Signaltransduktion oder Promotoraktivität durch spezifische Zugabe eines Induktors induziert. Nach 24 h wurde das Medium über der Wachstumsfläche entfernt und die Zellen mit 50 µl/Well Passive Lysis Buffer (1 x, Promega, Madison, USA) unter 10-minütigem Schütteln (200 rpm) lysiert. Anschließend erfolgte die Messung der jeweiligen Reporter genaktivität, oder eine Lagerung des Lysates bei -80 °C bis zur Messung.

Bei den verwendeten Reporter genen handelte es sich um Chemolumineszenz-Systeme und Fluoreszenz-basierte Systeme.

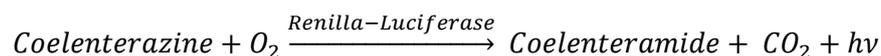
2.2.3.5.1 Luciferase-Assay

Die Mehrzahl der experimentellen Reporter-genvektoren dieser Arbeit kennzeichnen sich durch die Expression der Luciferase aus *Photinus pyralis*. Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden in eine weiße 96-Well Mikrotiterplatte 20 µl des Lysates überführt. Die Enzymaktivität wurde in einem Plattenlesegerät (FLUOstar OMEGA, BMG Labtech, Ortenberg) bestimmt, wobei mittels Injektors die Zugabe von 20 µl des Substrates (Luciferase 1000 Assay System, Promega, Madison, USA) erfolgte. Die Lichtemission wurde im Intervall (1 s) für 10 s gemessen. Zur Berechnung der relativen Luciferaseaktivität wurde der Median dieser Kinetik herangezogen. Die Reaktion infolge der Substratzugabe läuft gemäß folgender Gleichung ab:



Zusätzlich zum experimentellen Reporter-genvektor wurde ein Kontrollvektor Co-transfiziert. Das verwendete Kontrollplasmid pRL-EF1α trägt in seiner ursprünglichen Form als Reporter-gen die Luciferase aus *Renilla reniformis*. Die konstitutiv aktive Expression der *Renilla*-Luciferase ermöglicht als interne Kontrolle eine Normalisierung der Expression des experimentellen Reporter-genplasmids. Somit können zum einen Varianzen in Versuchsdurchführung, Zellzahl und Probenaufbereitung ausgeglichen, als auch mögliche cytotoxische Effekte detektiert werden.

Die Bestimmung der *Renilla*-Luciferase-Aktivität erfolgt entsprechend der *Firefly*-Luciferase, wobei als Substrat Coelenterazine umgesetzt wird:



Zur Normalisierungsberechnung wurde der Median der Messung (10 s mit 1 s Intervallen) herangezogen.

2.2.3.5.2 SEAP-Assay

Die Sekretorische Alkalische Phosphatase (SEAP) diente als alternatives Reporter-gen zur *Firefly*-Luciferase. Die Aktivität der SEAP wurde im Kulturmedium der transfizierten Zellen gemessen, da sie nach Expression in das Medium sekretiert wird. Als Substrat wurde CSPD, ein 1,2-Dioxethan-Chemilumineszenzsubstrat, verwendet. Die ebenfalls im Plattenlesegerät (FLUOstar OMEGA, BMG Labtech, Ortenberg) detektierte Lichtemission resultiert hierbei aus einer Dephosphorylierung von CSPD durch die SEAP. Das entstehende instabile Dioxethan-Anion zerfällt unter Lichtemission. Die Zugabe eines Enhancerreagenzes verstärkt diese Emission. Die Bestimmung der SEAP-Aktivität erfolgte mit Hilfe des Phospha-Light Systems

(Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers in einer 96-Well-Mikrotiterplatte.

2.2.3.5.3 Fluoreszenzbasierte Reportergensysteme

Als Alternative zum verwendeten Kontrollplasmid pRL-EF1 α wurde ein Plasmid genutzt, bei dem die *Renilla*-Luciferase durch das rot fluoreszierende Protein Ds-Red-Express ersetzt wurde. Zur Signalermittlung wurden, wie in 2.2.3.5 Lysate erstellt, wovon 40 μ l in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte überführt wurden. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Plattenlesegerät (FLUOstar OMEGA, BMG Labtech, Ortenberg) bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emission von 590 nm. Die erhaltenen Werte wurden zur Normalisierung des experimentellen Reportergens eingesetzt.

Zur Untersuchung der murinen Oct-4-Promotoraktivität wurde das Plasmid pDB2-Oct-4pro genutzt. Hierbei fungierte das grün fluoreszierende Protein eGFP als Reporter gen. Die Erstellung der Zelllysate erfolgte analog zu 2.2.3.5, wobei erneut 40 μ l in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte überführt wurden. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Plattenlesegerät (FLUOstar OMEGA, BMG Labtech, Ortenberg) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emission von 509 nm.

2.2.3.6 **Analyse cytotoxischer Effekte**

Mögliche cytotoxische Effekte der isolierten Verbindungen wurden durch Mikroskopieren der Zellen in 24-stündigen Intervallen untersucht.

2.2.3.6.1 Giemsa-Färbung mit Monolayerkulturen

Zusätzlich zu der mikroskopischen Auswertung erfolgte 24 h nach Substanzapplikation die quantitative Bestimmung der Cytotoxizität durch Giemsa-Färbung (Casey, Veale, & Smith, 1983). Die Kultivierung der Zellen lief wie unter 2.2.3 beschrieben in Medium ZM1 ab. Am Versuchstag wurden die Zellen durch Trypsinierung vom Flaschenboden abgelöst, die Zellzahl auf eine Dichte von 4×10^4 (BEAS-2B; P19) bzw. 2×10^5 (HepG2) Zellen/ml mit dem Medium ZM1 eingestellt und jeweils 1 ml der Zellsuspension in die Vertiefung einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Applikation der Testsubstanzen in frischem Medium ZM1. Nach weiteren 24 h Inkubation mit gleichen Parametern wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 0,5 ml PBS pro Loch gespült und durch Zugabe von 0,3 ml Methanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach Entfernen des Methanols und einer zehnmütigen Trocknung bei 37 °C wurden die Zellen mit 0,5 ml Giemsa-Lösung (L8) für 5 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach Absaugen der Färbelösung wurden die Zellen mit 0,5 ml H₂O_{UF} gewaschen, um

ungebundene Färbelösung zu entfernen. Der Farbstoff wurde durch Zugabe von 0,3 ml 0,1 N HCl unter Schütteln extrahiert (10 min). Je 200 µl der Extrakte wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt und die Absorption in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 600 nm gemessen (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg). Als Kontrollen dienten Ansätze mit Medium und ohne Testsubstanz.

2.2.3.6.2 XTT-Assay

Der XTT-Assay stellt eine effektive Methode zur Erfassung von Zell-Proliferation und Sensitivität gegenüber Wirkstoffen dar. Die Methode basiert auf der Reduktion des XTT-Tetrazoliumsalzes zu einem farbigen Formazan Derivat mittels der mitochondrialen Dehydrogenase, wobei Phenazinmethosulfat (PMS) als zwischengeschalteter Elektronakzeptor die Reduktion verbessert (Scudiero *et al.*, 1988). Die Zellen wurden wie in 2.2.3.6.1 beschrieben angezogen und mit den Testsubstanzen in der gewünschten Konzentration für 24 h behandelt. Nach dieser Inkubation der Zellen wurden vorsichtig 0,5 ml des Mediums pro Well entfernt und mit 250 µl der frisch angesetzten vorgewärmten XTT-Lösung (L9) ersetzt. Nach einer Inkubation der Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte eine stündliche Messung der Absorption bei 480 nm. Als Kontrollen dienten Ansätze nur mit Medium ZM1 und unbehandelte Zellen.

2.2.3.6.3 Durchflusszytometrie zur Analyse apoptotischer/nekrotischer Effekte

BEAS-2B-Zellen wurden wie in 2.2.3 beschrieben kultiviert und 24 h vor Versuchsbeginn das Medium ZM1 erneuert. Am Versuchstag wurden die Zellen mit Trypsinlösung von der Wachstumsfläche gelöst, die Zellzahl auf 3×10^5 Zellen/ml in Medium ZM1 eingestellt und je 10 ml der Zellsuspension in eine Zellkulturschale (100/20 mm, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) gefüllt. Nach 24 h erfolgte die Applikation der Testsubstanzen in frischem Medium ZM1. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 200 µl Trypsinlösung von der Wachstumsfläche gelöst. Die Trypsinreaktion wurde mit 1 ml Medium ZM1 gestoppt. Nach Resuspendieren mit Liquipetten (Elkay Laboratory Products, Basingstoke, UK) wurde zunächst die Zellzahl mittels Durchflusszytometer „Attune NxT Flow Cytometer“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Die Ermittlung der Zahl apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen erfolgte im Anschluss durch Färbung äquivalenter Zellzahlen mit dem „Annexin V-Cy5 Apoptosis detection kit“ (Abcam, Cambridge, UK) nach Angaben des Herstellers. Propidiumiodid wurde dem „FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) entnommen und nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung erfolgte mithilfe des „Attune NxT Flow Cytometer“

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Auswertung der Daten und graphische Darstellung erfolgte mit der Software FCSalyzer (S. Mostböck, Regensburg).

2.2.3.7 Erstellung von Proteinlysaten

2.2.3.7.1 Proteinlysate humaner Zelllinien (BEAS-2B, A549)

Die Zellen wurden wie unter 2.2.3 beschrieben kultiviert und 24 h vor Versuchsbeginn das Medium ZM1 erneuert. Am Versuchstag wurden die Zellen mittels Trypsinlösung von der Wachstumsfläche gelöst, pelletiert (800 g, 4 °C, 10 min), die Zellzahl in frischem Medium ZM1 eingestellt und je 10 ml in eine sterile Zellkulturschalen (100/20 mm, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) überführt. Nach 24 h Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde das Medium durch frisches Medium ZM1b ersetzt und die Zellen für 24 h ausgehungert. Nach 1-stündiger Vorinkubation mit den Testsubstanzen wurden die jeweiligen Induktoren zugesetzt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit und ohne Induktor. Nach den jeweiligen Induktionszeiten wurden die Zellkulturschalen auf Eis gekühlt und der Überstand bei Bedarf in sterile Falcons (BD Biosciences, Bedford, USA) überführt und mit PIC (1 x) versetzt. Der Zellrasen wurde zweimal mit eiskaltem PBS gespült, mit einem Zellschaber (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) von der Wachstumsfläche gelöst und in 1 ml PBS in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und pelletiert (1000 x g, 4 °C, 10 min). Durch Zugabe von RIPA-Puffer (P5) oder Totex-Puffer (P4) wurden die Zellen lysiert und für spätere Verwendung, ebenso wie die Überstände, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10000 x g, 10 min, 4 °C) entfernt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch das Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt (Thermo Scientific, Waltham, USA).

2.2.3.7.2 P19 Proteinlysate

P19-Zellen wurden wie unter 2.2.3.3 beschrieben mit dem neuronalen Stimulus Retinsäure induziert und den entsprechenden Testsubstanzen behandelt. Bei Erstellung der Proteinlysate ausgehend von der Suspensionskultur innerhalb der ersten 4 Tage, wurden die Zellen mittels Liquipetten vorsichtig aus den Petrischalen abgenommen. Die Petrischalen wurden zweimal mit PBS gespült, und diese Suspension zur ersten Abnahme hinzugefügt, um verbliebene Zellen nicht zu verlieren. Diese Zellsuspension wurde anschließend pelletiert (500 g, RT, 5 min), in 10 ml Medium ZM1 resuspendiert und in 2 Ansätze mit je 5 ml aufgeteilt. Ein Ansatz wurde weiter kultiviert (mit entsprechender Behandlung), und ein Ansatz diente zur Erstellung der Zelllysate. Hierfür wurden die Zellen nach Zentrifugation zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und pelletiert (1000 x g, 4 °C, 10 min). Durch Zugabe

von RIPA-Puffer (P5) wurden die Zellen lysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation ($10000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) entfernt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch das Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt (Thermo Scientific, Waltham, USA).

2.2.3.7.3 Erstellung nativer Proteinlysate

Native Proteinlysate wurden erstellt, um potentielle Interaktionspartner von DM-Oxa nach 2.2.3.9 zu identifizieren. Das Medium ZM1 der BEAS-2B-Zellen wurde 24 h vor Versuchsbeginn erneuert. Am Folgetag wurden die konfluenten Zellen mittels Trypsinbehandlung von der Wachstumsfläche gelöst und mittels Zentrifugation pelletiert ($800 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Zellen wurden in 10 ml vorgewärmten Medium ZM1b resuspendiert, auf eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt, und jeweils 10 ml der Zellsuspension in Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h Inkubation in Serum-reduziertem Medium ZM1b erfolgte eine 45-minütige Induktion (TGF- β [5 ng/ml], CM [10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ , 5 ng/ml IL1- β], Negativkontrolle ohne Induktion). Nach der Induktionszeit wurde zunächst der Überstand entfernt und der Zellrasen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS mittels steriler Zellkulturschaber abgeschabt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Mittels Zentrifugation ($1000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) wurden die Zellen pelletiert, das Zellpellet in 200 μl eiskaltem NP-40 Lyse-Puffer (P6) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation ($10000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) entfernt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch das Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt (Thermo Scientific, Waltham, USA). Für das DM-Oxa-*Pulldown* Experiment wurden pro Ansatz 100 μg Protein der jeweiligen Proben eingesetzt.

2.2.3.7.4 Analyse sekretierter Proteine im Zellüberstand

Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurde das Zelllysate wie in Abschnitt 2.2.3.7.3 beschrieben bei Bedarf aufgearbeitet. Der Zellüberstand wurde zunächst in sterilen Falcons (BD Biosciences, Bedford, USA) zentrifugiert ($1000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) um Zelltrümmer zu beseitigen. Anschließend wurde PIC (1 x) zugesetzt, die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach Auftauen der Proben auf Eis wurde eine TCA-Fällung mit anschließender Aceton-Waschung durchgeführt. Hierzu wurde den Proben unter Invertieren 10 % (v/v) TCA hinzugefügt und die Proteine über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proteine in 1,5 ml Eppendorfgefäßen pelletiert

(16000 x g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet wurde in 100 µl H₂O_{UF} mithilfe eines Glasstabes zerrieben. Im Anschluss wurde die Suspension mit 1 ml eiskaltem Aceton versetzt und über einen Zeitraum von 1 h (Lagerung bei -20 °C) 4 x für 30 s gevortext. Nach einer Inkubation bei -20 °C über Nacht wurden die Proteine erneut pelletiert (12000 x g, 10 min, 4 °C), flüssiges Aceton restlos entfernt und das Pellet bei RT für 5 min getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in SDS-Puffer (P14) aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.3.7.5 Erstellung cytoplasmatischer und nukleärer Proteinextrakte

Die Fraktionierung in cytosolische und nukleäre Proteinextrakte wurde anhand der REAP-Methode mit einigen Abwandlungen durchgeführt (Suzuki, Bose, Leong-Quong, Fujita, & Riabowol, 2010). Die Pelletierung und Fraktionierung von BEAS-2B-Zellen in 0,1 % (v/v) NP-40-PBS erfolgte laut Suzuki *et al.* (2010). Nach Abnahme von 300 µl der cytoplasmatischen Fraktion, wurde das Pellet mit den nukleären Proteinen über ein Sucrose-Kissen aufgereinigt. Hierfür wurde das Pellet in 500 µl S1-Puffer (P12) aufgenommen und über 500 µl S3-Puffer (P13) geschichtet. Es folgte eine Pelletierung (2800 g, 4 °C, 10 min) und Resuspension der nukleären Fraktion in 200 µl 1 % (v/v) NP-40-PBS. Der erhöhte Anteil von NP-40 wurde in der cytoplasmatischen Fraktion zur späteren Proteinbestimmung entsprechend angepasst. Die nukleäre Fraktion wurde mittels Ultraschallbehandlung (Sonde MS72, Bandelin Sonopuls, Berlin) bei 2 Zyklen von 5 s mit 10 % Intensität auf Eis aufgeschlossen.

2.2.3.7.6 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Lysaten wurde das „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ (Promega, Madison, USA) verwendet. Der Assay beruht auf der Chelation zweier Moleküle Bicinchoninsäure (BCA) mit einem von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ reduziertem Kupferion (Walker, 1994). Die Absorption des wasserlöslichen Komplexes wurde bei 562 nm im Plattenlesegerät (FLUOstar OMEGA, BMG Labtech, Ortenberg) bestimmt. Eine Standardkurve mit definierten Konzentrationen an BSA diente zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen in den Proben.

2.2.3.7.7 SDS-PAGE, Western Immunoblotting

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Proben wurden mit SDS-Proben-Puffer (5 x, P16) versetzt (Endkonzentration 1 x) und zur Denaturierung der Proteine für 5 min auf 95 °C erhitzt. Zur Auftrennung wurde ein SDS-Polyacrylamid-Trenngel (10-12 %) mit einem 3 %-igen SDS-Polyacrylamid-Sammelgel überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 50 V im Sammelgel und bei 100 V im Trenngel in Puffer SDS-PAGE Lauf-Puffer (1 x, P15). Als Größenmarker wurde der „peqGOLD Protein

Marker V Prestained“ (VWR, Radnor, USA) verwendet. Die Proteine wurden anschließend mittels eines Semi-Dry Elektrobloppers (PerfectBlue™ Sedec™, VWR, Radnor, USA) unter Verwendung der Transferpuffer T1-T3 (P17-P19) auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare, Chicago, USA) übertragen. Der Übertrag wurde durch eine Ponceau-Färbung überprüft und die Membran mittels Blocking-Puffer (P22) abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper nach Herstellerangabe bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran nach Entfernen des Primärantikörpers dreimal mit Waschpuffer (P21) gewaschen und danach für 1,5 h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Alle Inkubationen mit Antikörpern, als auch die Waschungen wurden unter orbitaler Schüttelbewegung durchgeführt. Nach neuerlicher dreimaliger Waschung mit P21 wurde die Membran mit äquivalenten Anteilen der ECL-Lösungen I und II (L10 und L11) benetzt und die Chemolumineszenz in einer Analysekommer (Fusion-FX7 advanced, Vilber Lourmat, Eberhardzell) detektiert. Einige Membranen wurden mehrfach mit Primärantikörpern inkubiert. Hierfür wurden die Membranen nach Erstdetektion mit Strip-Puffer (P23) behandelt, um gebundene Antikörper von den Proteinen zu lösen und eine neue Inkubation mit einem weiteren Antikörper zu ermöglichen. Die Membran wurde mit Puffer P23 bei 50 °C für 45 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Entfernen des Puffers P23 wurde die Membran mehrfach mit H₂O_{dest.} gespült und anschließend mit P21 mindestens dreimal gewaschen. Danach wurde die Membran erneut abgesättigt (P22) und konnte mit Primärantikörper inkubiert werden.

2.2.3.8 Immunhistochemische Färbung von P19-Zellen

2.2.3.8.1 ECM-Beschichtung von Deckgläsern

Die Deckgläser (Ø 12 mm, Carl Roth, Karlsruhe) wurden zunächst mit 70 % EtOH und nachfolgender UV-Behandlung für 1 h sterilisiert und in eine sterile 6-Well-Platte (Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen) überführt. Zur Vermeidung späterer Austrocknung wurden die Zwischenräume mit H₂O_{dest.} befüllt. Pro Deckglas wurden 130 µl Matrigel (1:100 in ZM1c; 5 s gevortext) eisgekühlt als Beschichtungstropfen aufgebracht und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Beschichtungstropfen wurde erst unmittelbar vor der Aussaat der Zellen verworfen.

2.2.3.8.2 Immunfluoreszenzfärbung

P19-Zellen wurden 4 Tage als Suspensionskultur mit initialer Induktion durch Retinsäure kultiviert (vgl. 2.2.3.3). An Tag 4 wurden 100 µl mit 5 x 10⁴ Zellen/ml Suspension auf ein beschichtetes Deckglas aufgebracht und 1 h zum Anwachsen inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Die Vertiefung der 6-Well-Platte wurde danach auf 2 ml Medium ZM1 aufgefüllt. Das Medium wurde fortan alle 2 Tage erneuert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und

einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde durch eine Inkubation (RT, 20 min) mit Formaldehyd (4 % (v/v) in PBS) eine Fixierung der Zellen erzielt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS diente 0,5 %-iges Triton (10 min) zur Permeabilisierung der Zellmembranen. Die Deckgläser wurden anschließend nach erneutem Waschen mit PBS (3 x 10 s) mit 3 % (w/v) BSA für 30 min geblockt. Die Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte für jeweils 1 h im Dunkeln, wobei jeweils davor und danach 3-malige Waschungen mit PBS erfolgten. Die Visualisierung neuronal induzierter Strukturen erfolgte durch Eindecken der Deckgläser mit VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) mittels des Fluoreszenzmikroskopes BX53F (Olympus, Tokio, Japan) mit entsprechenden Filtereinheiten.

2.2.3.9 *Pulldown*-Assay zur Analyse potentieller Interaktionspartner

2.2.3.9.1 Vorbereitung der *Beads*

Zunächst wurden die *Beads* auf 50 µl pro Ansatz, was 18,8 µg DM-Oxa-*Beads* bedeutete, aufgeteilt. Zur Bindung des potentiellen Targets standen somit 10,9 µg des anteilig vorhandenen DM-Oxa zur Verfügung. Anschließend wurden die *Beads* (18 x DM-Oxa-*Beads*, 18 x Kontroll-*Beads*) mit Waschpuffer (P25) auf 1 ml aufgefüllt, 3 x 5 min unter Rotation inkubiert, wobei die *Beads* jeweils durch Zentrifugation (1500 g, 2 min, 4 °C) pelletiert wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die DM-Oxa-*Beads* in Waschpuffer (P25) bis zu ihrer Verwendung belassen und die Kontroll-*Beads* pelletiert.

2.2.3.9.2 Präinkubation mit Kontroll-*Beads*

Die Kontroll-*Beads* wurden mit Waschpuffer (P25) und der entsprechenden Proteinmenge (100 µg/Ansatz) auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt, für 1 h unter Rotation bei RT inkubiert und abschließend mittels Zentrifugation (1500 g, 2 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde, wie folgt, weiter genutzt und die pelletierten Kontroll-*Beads* bis zu ihrer Weiterverwendung auf Eis gelagert.

2.2.3.9.3 Vorbehandlung mit DM-Oxa zum Ausschluss unspezifischer Zielproteine

Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden die Proben ohne Vorbehandlung in den folgenden Schritten äquivalent behandelt. Der Überstand aus der Präinkubation wurde in frischen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 545 µg DM-Oxa (Faktor 50 gegenüber dem in den DM-Oxa-*Beads* verfügbaren DM-Oxa) inkubiert. Die Zugabe des DM-Oxa erfolgte gelöst in 10 µl EtOH, dementsprechend wurden Proben ohne Vorbehandlung mit 10 µl EtOH versetzt. Die Proben wurden nun 30 min auf einem Rotator bei RT inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurden die gewaschenen DM-Oxa-*Beads* pelletiert (1500 g, 4 °C, 2 min).

2.2.3.9.4 Inkubation mit DM-Oxa-Beads

Die DM-Oxa-Beads wurden nun 2 h unter Rotation bei RT mit den entsprechenden vorbehandelten Proteinproben inkubiert und abschließend pelletiert (1500 g, 4 °C, 2 min). Die DM-Oxa-Beads, sowie die Kontroll-Beads der Präinkubation wurden mit Hochsalz-Waschpuffer (P26) auf 1 ml aufgefüllt, 3 x 5 min unter Rotation inkubiert, wobei die Beads jeweils durch Zentrifugation (1500 g, 2 min, 4 °C) pelletiert wurden. Nach der abschließenden Zentrifugation wurde der Überstand komplett abgenommen, die Beads in 50 µl Laemmli-Proben-Puffer (2 x, P27) bei 95°C 5 min aufgeköcht, zentrifugiert (16000 g, 1 min, RT), und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert

2.2.3.10 **Probenvorbereitung auf die Proteinmassenspektrometrie**

2.2.3.10.1 In-Gel-Verdau von Proteinen

Gleiche Volumina der Proteingemische wurden auf ein SDS-Gel geladen. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Proben vollständig aus dem Sammelgel in das Trenngel migrierten. Das Gel wurde in Entfärbelösung (L13) 2 x 5 min fixiert, 1 x mit H₂O_{dest.} gewaschen und anschließend ü. N. mit Colloidal Coomassie Färbelösung (L12) gefärbt. Nachfolgend wurde mit 1 % (v/v) Eisessig entfärbt, bis der Hintergrund wieder klar erschien. Die Proteinbanden wurden mit einer Rasierklinge in 1 mm³ große Stücke gewürfelt, in frische 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und in Entfärbelösung (L13) weiter vollständig entfärbt. Der vollständigen Entfärbung folgte eine jeweils dreimalige Waschung mit 300 µl ABC-Puffer (P28) für 5 min und Entwässerung mit 70 % AcN für 15 min unter Schütteln bei 900 rpm. Nach dem Entfernen des Überstandes erfolgte die komplette Dehydratation durch eine 5-minütige Inkubation mit 100 % AcN und einer Trocknung im Vakuum. Die Reduzierung erfolgte durch 15-minütige Inkubation bei 55 °C mit 60 µl Reduktionspuffer (P29). Nach 15-minütigem Abkühlen auf RT wurde der Überstand abgenommen und die Alkylierung durch Zugabe von 60 µl Alkylierungspuffer (P30), für 15 min unter Lichtausschluss, vollzogen. Die Gelstücke wurden anschließend mit 100 µl ABC-Puffer für 10 min nach initialem Vortexen gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Gel durch 10-minütige Inkubation mit 200 µl AcN (100 %) entwässert und im Vakuum getrocknet. Zu den getrockneten Gelstücken erfolgte nun die Zugabe von 100 µl einer 100 µg/ml Trypsinlösung in ABC-Puffer und einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. Nach weiteren 5 min auf RT wurden die Eppendorfgefäße soweit mit ABC-Puffer aufgefüllt, bis alle Proben komplett bedeckt waren. Nach Inkubation bei 37 °C ü. N. wurde die Enzymlösung durch Abnahme des Überstandes nach kurzer Zentrifugation entfernt und die Peptide durch Zugabe von 100 µl einer 2 %-igen Ameisensäure für 20 min unter

Schütteln extrahiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte bei 20-minütigem Schütteln eine zweite Extraktion mit 100 µl einer Lösung aus 10 % AcN und 2 % Ameisensäure, sowie eine dritte Extraktion (Vortexen und Schütteln) mit 200 µl einer Lösung aus 60 % AcN und 1 % Ameisensäure. Beide Extraktionen wurden mit der ersten vereinigt und unter Vakuum bis zur Trocknung eingeeengt.

2.2.3.10.2 Entsalzung mit C₁₈-StageTips

Die StageTips wurden unter Verwendung von Empore™ C₁₈ Extraktionsscheiben (Varian, Palo Alto, USA) selbst angefertigt. Die Äquilibration der StageTips erfolgte mit 50 µl Lösung B (L15, 500 g, 5 min, RT) und 100 µl Lösung B (L14, 500 g, 5 min, RT). Die extrahierten Peptide wurden zunächst in 50 µl Lösung A gelöst, 5 min soniziert, gevortext, und weitere 3 min soniziert. Die nun gelösten Peptide wurden an die StageTips gebunden (5 µg/disc) und 3 x mit 50 µl Lösung A gewaschen (500 g, 5 min, RT). Die Elution erfolgte 2 x mit je 50 µl Lösung B. Die eluierten Peptide wurde mittels SpeedVac fast vollständig eingeeengt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.3.11 **Proteinmassenspektrometrie**

Zur Auftrennung der Peptidgemische wurde eine ekspert™ nanoLC425 (AB Sciex LLC, Framingham, USA) genutzt. Als feste Phase fand eine Säule von 25 x 0,075 mm mit einer Partikelgröße von 3 µm mit dem Packmaterial ReproSil-Pur 120 C_{18aq} (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen) Verwendung. Die Lösungen zur Auftrennung bestanden aus Solvens A (98 % H₂O_{UF}/2 % AcN) und Solvens B (10 % H₂O_{UF}/90 % AcN), die mit einem Fluss von 0,3 µl/min im Gradienten G2 gepumpt wurden.

Tabelle 4: Verwendeter HPLC-Gradient G2 zur Peptidauftrennung mit den Eluenten Solvens A (98 % H₂O_{UF}/2 % AcN) und Solvens B (10 % H₂O_{UF}/90 % AcN).

Säulenmaterial	Zeit [min]	Solvens B [%]
C _{18aq}	0	2
	1	2
	65	35
	69	50
	70	90

75	90
77	2
95	2

Die Analyse der Peptide erfolgte in einem Triple TOF 6600 nach Ionisierung mittels DuoSpray™ Ionenquelle.

Messeinstellungen:

MS¹:

Num. Cycles: 9168; Polarity: Positive; Period Cycle Time: 1799 ms; Pulser Frequency: 16.906 kHz; Accumulation Time: 250 ms

Exp. Parameter: CUR: 35; GS1: 7; GS2: 0; IHT: 120; ISVF: 2300

Mass Range Parameter: CE: 8; DP: 80; IDIx: 0; IDUx: 5; IRDx: 15000; IRWx: 10000; IWlx: 0; IWUx: 5; XA1: 224,003

Start Mass: 350; End Mass: 1250

MS²:

Num. Cycles: 9168; Polarity: Positive; Period Cycle Time: 1799 ms; Pulser Frequency: 16.906 kHz; Accumulation Time: 50 ms

Exp. Parameter: CUR: 35; GS1: 7; GS2: 0; IHT: 120; ISVF: 2300

Mass Range Parameter: CE: 0; CES: 0; DP: 80; IDIx: 0; IDUx: 5; IRD: 30; IRDx: 15000; IRW: 15; IRWx: 10000; IWlx: 0; IWUx: 5; XA1: 70,16

Start Mass: 110; End Mass: 1600

2.2.3.12 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde weitestgehend nach (Carey, Peterson & Smale, 2009) wie nachfolgend durchgeführt.

2.2.3.12.1 Erstellung der Zellextrakte

A549-Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80 % inkubiert. 24 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit Medium ZM1b ausgehungert. Am Folgetag wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 2 x 10⁶ Zellen/ml in Medium ZM1b Konzentrationen in Zellkulturschalen (100/20 mm, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) ausgesät und die Testsubstanzen in den entsprechenden Konzentrationen appliziert. Als Kontrollen dienten Zellen ohne Induktor und Testsubstanz. Nach einstündiger Vorinkubation erfolgte die Induktion mit IL-4/IL-13 (10 ng/ml) für weitere 30 min. Durch Zugabe von 1 % (v/v) Formaldehyd für 10

min bei RT unter Schütteln (120 rpm) wurden die Zellen fixiert und durch Inkubation (120 rpm, RT, 5 min) mit Glycin (0.25 M) die Reaktion abgestoppt. Die Zellen wurden in sterile 15 ml Flacons überführt, pelletiert (10 min, 4°C, 1000 x g) und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 10 ml eiskaltem ChIP-Lyse-Puffer (P7) für 10 min auf Eis. Durch Zentrifugation (230 x g, 4 °C, 10 min) wurden die Zellkerne pelletiert, in 1 ml ChIP-Kernlyse-Puffer (P8) resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Fragmentierung des Chromatins auf eine Größe von 500-1000 bp wurde mittels Ultraschall-Sonde MS72 (Bandelin Sonopuls 2200, Berlin) durch 10 Zyklen (20 % Intensität, 20 s, 60 s Pause) auf Eis erreicht. Zur Kontrolle der Fragmentierung wurden 20 µl der Proben mit NaCl (200 mM) versetzt und die Quervernetzung über Nacht bei 65 °C aufgehoben. Nach dem Abbau von RNA durch Zugabe von 10 µg RNase A für 1 h bei 37 °C erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion und abschließender Ethanol-Präzipitation. Die Visualisierung der DNA-Fragmentgrößen in einer Analysekammer (Fusion-FX7 advanced, Vilber Lourmat, Eberhardzell) wurde mittels Auftrennung (2 %-iges Agarosegel, 0,7 V/cm) und Färbung mit GelRed® (1:1000 im Ansatz) gewährleistet.

2.2.3.12.2 Immunpräzipitation

Das Chromatin wurde auf Eis aufgetaut und zunächst zentrifugiert (16000 g, 15 min, 4°C) um SDS zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Konzentration der DNA mittels NanoDrop (ND-2000™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermittelt. Für die Immunpräzipitationen wurden je Ansatz 70 µg Chromatin mit ChIP-Verdünnungs-Puffer (P9) auf ein Volumen von 300 µl in frischen 1,5 ml Eppendorfgefäßen verdünnt. Die Protein A/G-PLUS-Agarose (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) wurde vor Gebrauch mit Heringssperma (200 µg/ml) und BSA (1 % w/v) 2 h bei 4 °C vorbehandelt. Das Chromatin wurde anschließend zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 2 h bei 4°C auf einem Rotator mit geblockter Agarose inkubiert und der Überstand (1000 x g, 2 min, 4 °C) anschließend mit den entsprechenden Antikörpern nach Herstellerangabe ü. N. bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Durch Zentrifugation (1000 x g, 2 min, 4 °C) wurde die Agarose pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Agarose 4-mal mit ChIP-Hochsalz-Wasch-Puffer (P10) und abschließend zweimal mit TE-Puffer (P3) auf einem Rotator gewaschen (RT, 10 min). Nach Zentrifugation (1000 x g, 2 min, 4 °C) wurde das Pellet in 300 µl ChIP-Elutions-Puffer (P11) mit 20 µg Proteinase K für 2 h bei 55°C bei leichter Agitation (120 rpm) inkubiert. Die Formaldehydvernetzung wurde durch Inkubation bei 65 °C über Nacht (120 rpm) aufgehoben. Aus dem Überstand wurde nach Zentrifugation (10000 x g, 5 min, RT) die DNA mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion und abschließender Ethanol-

Präzipitation isoliert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Immunpräzipitierte DNA wurde als Template zur Analyse mittels qRT-PCR eingesetzt.

2.2.3.13 Expressionsanalysen von mRNA

Die Extraktion von RNA wurde unter speziellen Vorkehrungen gewährleistet, um dem Abbau durch RNAsen vorzubeugen. Sämtliche Arbeitsschritte wurden mit eigens hierfür vorgesehenen Pipettenspitzen mit Filtereinsatz und zuvor autoklaviertem H₂O_{UF} durchgeführt.

2.2.3.13.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA wurde bei den adhären kultivierten Zelllinien BEAS-2B und A549 durchgeführt, sowie bei der Zelllinie P19 als Suspensionskultur bis Tag 4 und Adhäsionskultur nach Tag 4. Die ausgesäte Zellzahl und Behandlung mit den Testsubstanzen war äquivalent zur Proteinisolation, beschrieben in 2.2.3.7.1. Teilweise wurden die Ansätze zur Isolation von Gesamt-RNA nicht in Zellkulturschalen mit 10 ml Medienvolumen, sondern in 6-Well-Platten (Greiner-bio-one GmbH, Frickenhausen) mit 2 ml Endvolumen durchgeführt, wobei die RNA aus zwei Vertiefungen des gleichen Ansatzes zusammengeführt wurden. Nach Erreichen der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit eiskaltem PBS gespült. Die Lyse erfolgte mit Zugabe von 1 ml/Zellkulturschale (0,5 ml/6-Well) TRIzol® Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf die Wachstumsfläche. Nach 1-minütiger Einwirkungszeit wurden die Proben gründlich resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Bei einer P19-Suspensionskultur wurden die Zellen nach Zentrifugation (500 g, 4 °C, 10 min) einmal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml TRIzol® Reagenz wie beschrieben lysiert. Nach dem Auftauen wurden die Ansätze 5 min bei RT zur kompletten Dissoziation inkubiert und danach mit 0,2 ml Chloroform versetzt gevortext und weitere 5 min inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4 °C), wobei die wässrige Phase unter Vermeidung einer Verschleppung von Bestandteilen der Interphase in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wurde. Zur Fällung der RNA wurden 0,5 ml Isopropanol zugegeben, die Proben gevortext und nach 10-minütiger Inkubation bei RT zentrifugiert (12000 g, 10 min, 4 °C). Unter Vortexen wurde die RNA in 1 ml 75 %-igem Ethanol 2-mal gewaschen und jeweils zentrifugiert (12000 g, 10 min, 4 °C). Nach der letzten Zentrifugation wurde überschüssiges Ethanol abgenommen, die RNA unter dem Abzug für 10 min getrocknet und in 30-50 µl H₂O_{UF} resuspendiert, mittels Nanodrop (ND-2000™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) die Konzentration bestimmt, und die RNA zur cDNA-Synthese weiterverwendet.

2.2.3.13.2 Bestimmung der Konzentration und Qualität von Nukleinsäuren

Alle Nukleinsäuren wurden vor ihrer Verwendung quantitativ und qualitativ mittels einer photometrischen Analyse an einem UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop (ND-2000™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) untersucht. Hierbei wurde die Absorption der jeweiligen Lösung bei 260 nm und 230/280 nm gemessen. Die Qualität der Probe kann durch das Verhältnis der Absorption von Nukleinsäuren (260 nm) zur Absorption bei 280 nm (aromatische Aminosäurereste von Proteinen, Phenol) oder 230 nm (organische Lösungen, Peptidbindung von Proteinen) ermittelt werden. Die Quantität der Probe wird unter Annahme des gleichen mittleren Absorptionskoeffizienten aller Nukleotide mit dem Lambert-Beer'schen-Gesetz berechnet. Wurden qualitativ Verunreinigungen festgestellt, wurde die Nukleinsäure ü. N. mit 0,1 Volumeneinheiten Natriumacetat und 2,5 Volumeneinheiten Ethanol gefällt und erneut wie beschrieben gewaschen.

2.2.3.13.3 cDNA-Synthese aus mRNA

Nach Isolation der RNA (vgl. 2.2.3.13.1) wurde diese mittels der „M-MLV-Reverse Transcriptase“ (Promega, Madison, USA) in cDNA umgeschrieben. Um mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA zu entfernen wurde zunächst mit der „PerfeCTa®DNase I“ (Quantabio, Beverly, USA) die DNA abgebaut, und dieser Ansatz nachfolgend für die Synthese der cDNA verwendet:

DNase-Verdau	RNA	300 ng-3 µg
	Reaction Buffer (10 x)	1 µl
	PerfeCTa®DNase I (2 U/µl)	0,5 µl
	H ₂ O _{UF}	ad 10 µl
	Inkubation 30 min bei 37 °C	
	Stop Buffer (10 x)	1 µl
	Inkubation 10 min bei 65 °C	
cDNA-Synthese	Oligo(dT) ₁₈ -Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
	Inkubation 5 min bei 70 °C	
	M-MLV-Reaction Buffer (5 x)	5 µl
	dNTPs (100 mM)	2 µl
	RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
	M-MLV-RT (200 U/µl)	1 µl
	Inkubation 90 min bei 42 °C	
	Inkubation 5 min bei 72 °C	

Die Ansätze wurden jeweils nach dem Beifügen der Komponenten vor Inkubation kurz gevortext und an zentrifugiert. Die cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.13.4 cDNA-Synthese aus miRNA

Die miRNA aus P19-Zellen wurde mittels des „qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit“ nach Herstellerangaben polyadenyliert und in cDNA umgeschrieben. Ausgangsmaterial war jeweils 1 µg isolierter Gesamt-RNA aus 2.2.3.13.1.

2.2.3.13.5 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Die Expressionsanalysen von revers transkribierter mRNA und miRNA wurden mit Hilfe des „StepOnePlus™ Real-Time System“ (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Die Amplifikation der cDNA wurde hierbei anhand der Interkalierung von Fluoreszenzfarbstoffen (EvaGreen®, SYBR® Green) in doppelsträngige Nukleinsäuren quantitativ festgehalten, wobei das emittierte Fluoreszenzsignal mit der Menge an DNA-Transkript korreliert. Als Template wurden 20-150 ng zu cDNA umgeschriebener RNA eingesetzt und mit Hilfe des „5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix“ (Solis Biodyne, Tartu, Estland) amplifiziert. Die Expression der revers transkribierten miRNA aus P19-Zellen wurde unter Verwendung des „PerfeCTa® SYBR Green SuperMix“ (Quantabio, Beverly, USA) analysiert.

Tabelle 5: PCR-Einstellungen zur Amplifikation von cDNA aus mRNA und miRNA.

Schritt	cDNA aus mRNA			cDNA aus miRNA	
	Zyklen	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]
Aktivierung	1	95	12	95	2
Denaturierung		95	0,15	95	0,05
Annealing	40	56	0,30	60	0,15
Elongation		72	30	70	15

Zur Überprüfung der Primer-Spezifität wurde im Anschluss jeweils eine Schmelzkurvenanalyse bei einer Temperaturerhöhung von 56 °C auf 95 °C (Heizrata 0,1 °C/s) durchgeführt. Die Denaturierung des PCR-Produktes resultiert hierbei in einem Abfall des Fluoreszenzsignals, welches graphisch in einem Maximum der ersten Ableitung resultiert. Bei mehreren Maxima muss von Primer-Dimeren, amplifizierten Verunreinigungen oder einer Unspezifität ausgegangen werden. Die Effizienz neu designter Primer wurde mit Hilfe der Steigung der linearen Regressionsgeraden einer cDNA-Verdünnungsreihe ermittelt.

Die Auswertung der qRT-PCR-Analysen erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach dem mathematischen Modell von Pfaffl (2001). Als Referenzgene fungierten bei Analysen der mRNA die Expressionen der humanen und murinen (P19) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*). Als Referenzgen der miRNA-Analyse aus P19-Zellen fungierte aufgrund stabiler gleichmäßiger Expression die Small Nucleolar RNA, C/D Box 66 (*snord66*).

2.2.3.14 Graphische und statistische Auswertung

Die graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe der Software „Origin®2019b“ (OriginLab Corporation, Northampton, USA) erstellt. Zur Ermittlung der IC-Werte diente die integrierte Fitting-Funktion. Die statistische Auswertung erfolgte durch Varianzanalyse mittels one-way-Anova und nachfolgendem Tukey-Post-hoc-Test.

Die Analyse der *label-free quantification*-Daten (LFQ) aus der Proteinmassenspektrometrie erfolgte mit MaxQuant (Cox & Mann, 2008). Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Software Plattform „Perseus“ durchgeführt (Tyanova et al., 2016).

3 Ergebnisse

3.1 Neuronale Differenzierung von P19-Zellen

Die P19-Zelllinie entstammt einem embryonalen Maus-Teratokazinom und zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, als pluripotente Zelllinie durch verschiedene Stimuli in Zelltypen aller drei Keimblätter ausdifferenziert werden zu können (M. W. McBurney, 1993). Die Induktion mit RA führt zur Ausbildung von Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten, die als neuronale Netzwerke physiologische Funktionalität aufweisen (Monzo *et al.*, 2012b). Durch die funktionelle Ähnlichkeit neuronal ausdifferenzierter P19-Zellen zu primären neuronalen Zellen stellen sie ein hervorragendes Modellsystem zur Analyse neuronaler Differenzierungsmechanismen dar (Canzoniero *et al.*, 1996). Die Induktion von P19-Zellen mit RA wurde mit dem Ziel durchgeführt, die neuronale Differenzierung der Zellen und somit den Verlust der pluripotenten *Stemness* zu verfolgen. P19-Zellen wurden nach initialem Stimulus mit 1 μM RA für vier Tage in einer Suspensionskultur in Petrischalen kultiviert, bevor an Tag 4 die Aussaat als Adhäsionskultur erfolgte, welche durchgängig in Serum-haltigem Medium ZM1 durchgeführt wurde (vgl. 2.2.3.3).

3.1.1 Morphologie von P19-Zellen infolge neuronaler Induktion

Um die neuronale Differenzierung von P19-Zellen zu induzieren, wurden diese in Petri-Schalen (*bacterial grade*) überführt, um die Aggregation zu *embryoid bodies* (EBs) zu gewährleisten. Die durch Zell-Zell-Kontakte entstehenden EBs ermöglichen die Differenzierung von ESCs durch physikalische und chemische Signale in ihrer unmittelbaren extrazellulären Mikroumgebung (Bratt-Leal, Carpenedo, & McDevitt, 2009). An Tag 2 der nach Abbildung 5 durchgeführten neuronalen Differenzierung können diese charakteristischen EBs sowohl in mit RA-induzierten, als auch in uninduzierten P19 Suspensionskulturen beobachtet werden (Abbildung 6). An Tag 7 konnten nach Adhäsion der Zellen auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen erste morphologische Veränderungen anhand Neuriten-ähnlicher Verzweigungen festgestellt werden. Nach zwölf Tagen nahm die Anzahl und auch die Ausprägung infolge von Zell-Zell-Verbindungen dieser Neuriten-ähnlicher Strukturen (schwarze Pfeile) deutlich zu. Die uninduzierte Kultur hingegen zeigte weder nach sieben, noch nach zwölf Tagen Neuriten-ähnliche Zellverbindungen.

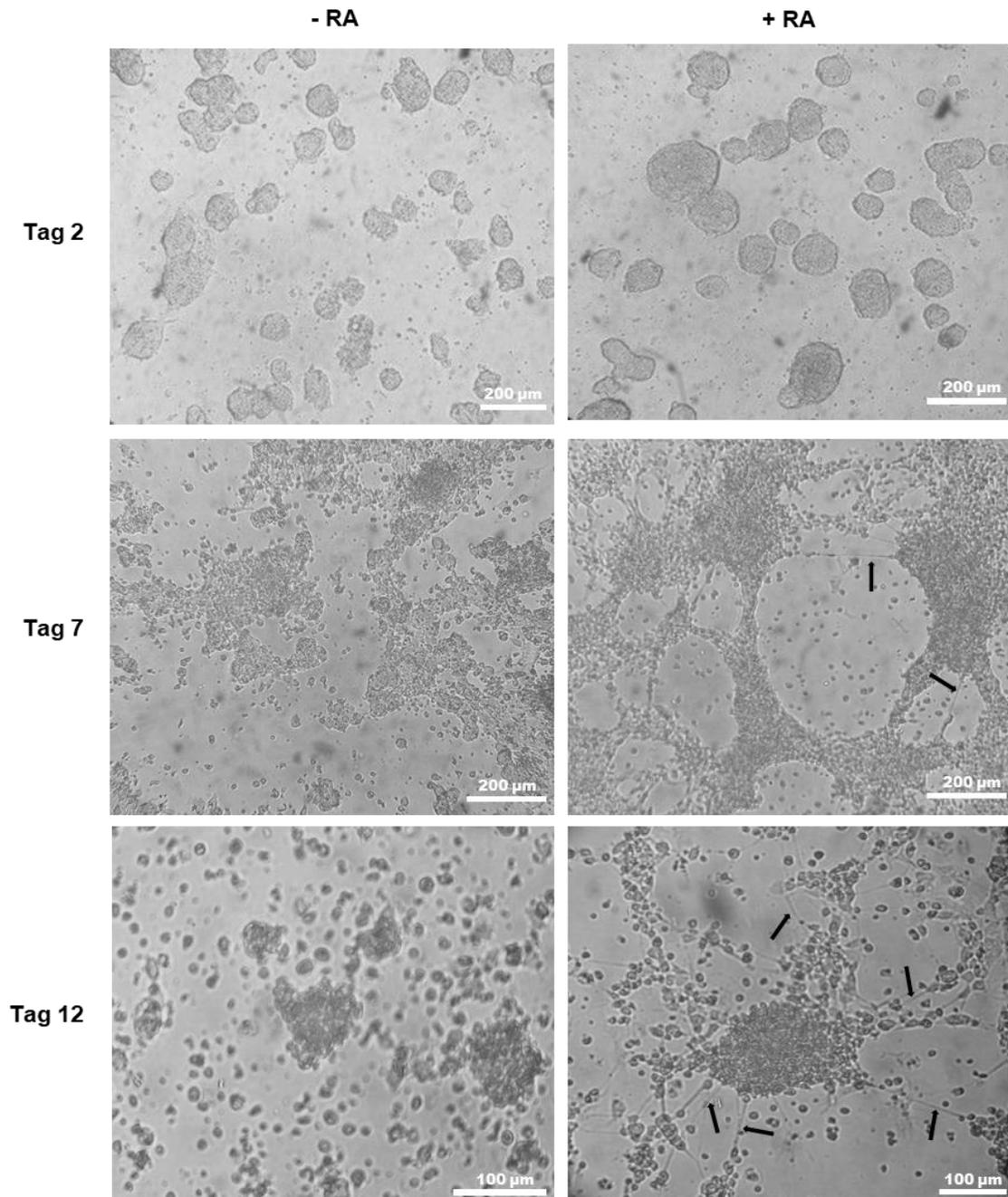


Abbildung 6: Morphologische Veränderungen von P19-Zellen in Abhängigkeit des neuronalen Stimulus mit 1 μM RA. Neuriten-ähnliche Zellausläufer wurden entsprechend markiert (schwarze Pfeile). Dargestellt sind beispielhafte mikroskopische Aufnahmen (IMT-2, Olympus, Tokyo, Japan) an den Tagen 2, 7 und 12 mit und ohne neuronale Induktion.

3.1.2 Neuronale Induktion von P19-Zellen auf mRNA-Ebene

Die Induktion von P19-Zellen durch RA wurde zunächst auf transkriptioneller Ebene untersucht. P19-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben neuronal induziert und kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Gesamt-RNA isoliert (vgl. 2.2.3.13.1). Nach

Erstellung der cDNA wurden die Expressionsraten der Gene mittels qRT-PCR ermittelt. Untersucht wurde die Expression von Genen, die nach Stimulation mit RA infolge der neuronalen Differenzierung vermehrt exprimiert werden sollten. Als Markergene hierfür dienten *β-3-Tubulin*, *ncam* und *nestin*. Bei Nestin handelt es sich um ein Intermediärfilamentprotein, welches als Markerprotein neuronaler Vorläuferzellen charakterisiert wird. Diese Zellen werden auch als NSCs bezeichnet, da sie in der Lage sind, sich in alle Zellarten des ZNS zu entwickeln (Z. G. Jin *et al.*, 2006). Die vorübergehende Expression während der neuronalen Entwicklung beschränkt sich auf den Zeitraum der Multipotenz, in der Zellen noch die Fähigkeit besitzen, sich in eine Teilmenge von Zelltypen zu differenzieren (Martínez-Cerdeño & Noctor, 2018). Bei der letztendlichen Differenzierung von NSCs zu Zellen des ZNS wird die Expression von Nestin durch Proteine des Neurofilaments ersetzt (Dahlstrand, Lardelli, & Lendahl, 1995). Zu diesen charakteristischen Neurofilamentproteinen zählt insbesondere das Mikrotubuli-Element *β-3-Tubulin*. Während allgemeine Tubuline eine Rolle bei einer Vielzahl von Zellprozessen (Mitose, Motilität, etc.) spielen, ist das spezifisch auf Neuronen lokalisierte *β-3-Tubulin* an der Neuro- und Synaptogenese, sowie Axonführung und Aufrechterhaltung beteiligt (Nakayama *et al.*, 2014). Die Expression von *β-3-Tubulin* korreliert mit den frühesten Phasen der neuronalen Differenzierung (Laferrière & Brown, 1996). Als weiteres Markergen der neuronalen Differenzierung wurde die Expression des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls 1 (NCAM) untersucht. Als Oberflächenprotein auf Neuronen und Glia-Zellen vermittelt es Zell-Zell-Kontakte, ist am Neuritenwachstum und der Synaptogenese beteiligt, und unterstützt die synaptische Plastizität (Kleene *et al.*, 2010; Yang, Hou, Jiang, & Zhang, 2014). Eine Induktion von NCAM in der P19-Zelllinie infolge des neuronalen Stimulus mit RA wurde bereits beschrieben (Jiří Pacherník *et al.*, 2007). Der zeitliche Verlauf der transkriptionellen Expression dieser neuronalen Marker ist in Abbildung 7 (A) dargestellt. Infolge der Stimulation mit RA nimmt die transkriptionelle Aktivität von *ncam* stetig bis auf Faktor 11,6 gegenüber der uninduzierten Kontrolle zu, liegt insgesamt jedoch bis auf den Zeitpunkt 24 h nach Induktion unter dem Expressionslevel von *β-3-tubulin* und *nestin*. Die mRNA Expression von *nestin* steigt bis Tag 7 kontinuierlich auf Faktor 64 an und sinkt an Tag 12 auf das bereits an Tag 4 vorhandene Expressionsniveau (40-fach gegenüber uninduziert). Einen ähnlichen Verlauf lässt die mRNA Expression von *β-3-tubulin* erkennen, die an Tag 7 mit Faktor 64 ihr Maximum erreicht. An Tag 12 sinkt die mRNA Expression auf ein Niveau knapp 17-fach erhöht gegenüber der Kontrolle.

Neben der Untersuchung neuronaler Marker wurde auch die zeitliche Expression von Markern für Pluripotenz infolge einer Stimulation mit RA untersucht (Abbildung 7, B). In Embryonalen

Stammzellen, zu welchen auch die murine Zelllinie P19 zählt, wird der pluripotente Zustand weitestgehend durch die Kerntranskriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2 und Nanog bestimmt. Oct-4 ist ein Transkriptionsfaktor der Pit-Oct-Unc- (POU) Familie und wird in hohem Maße in undifferenzierten ESCs und ECC exprimiert (Minucci *et al.*, 1996). Nanog gilt ebenfalls als Kernelement des pluripotenten transkriptionellen Netzwerks, da es in allen pluripotenten Säugerzellen vorkommt, und die konstitutive Expression eine Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen ermöglicht (Chambers *et al.*, 2007). Lin-28 ist ein evolutionär konserviertes RNA-bindendes Protein, und als solches Hauptregulator der Pluripotenz von ESCs. Gemeinsam mit den Kerntranskriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2 und Nanog fungiert es bei der Umprogrammierung somatischer Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs; Zhong *et al.*, 2010). Die transkriptionelle Aktivität von *oct-4* und *lin-28* sinkt nach initialem RA-Stimulus stetig bis auf ein 91- bzw. 38-fach erniedrigtes Niveau an Tag 7. An Tag 12 erreicht die mRNA Expression eine Erniedrigung um Faktor 83 (*oct-4*) bzw. Faktor 20 (*lin-28*). Die transkriptionelle Expression von *nanog* sinkt kontinuierlich bis Tag 12 (Faktor 26) der neuronalen Differenzierung.

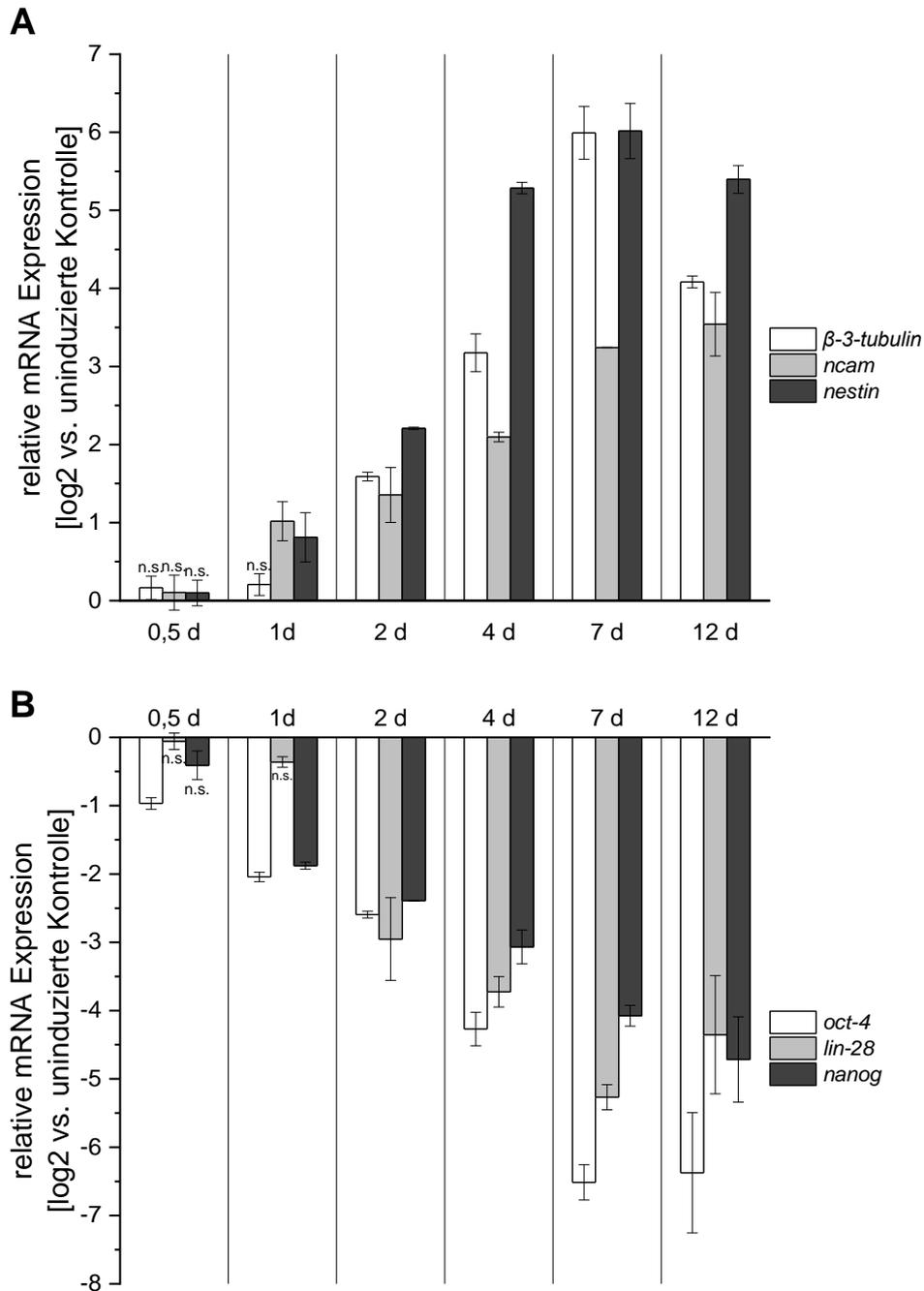


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der mRNA Expression von neuronalen Markergenen (A) und Markergenen für Pluripotenz (B) in P19-Zellen nach Stimulation mit RA [1 μ M]. P19-Zellen wurden initial mit RA [1 μ M] stimuliert und für die angegebene Dauer inkubiert, wobei die anfängliche Suspensionskultur an Tag 4 (4 d) als Adhäsionskultur ausgesät wurde. Die dargestellten Werte repräsentieren die Expressionsrate als log2 im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes. (Mittelwerte aus drei biologischen zu je zwei technischen Replikaten \pm SEM; Signifikanzniveau: $p \leq 0,05$ oder falls nicht signifikant: n.s.)

3.1.3 Neuronale Induktion von P19-Zellen auf Proteinebene

Die Induktion von P19-Zellen mit RA wurde mit dem Ziel durchgeführt, die neuronale Differenzierung der Zellen und somit den Verlust der pluripotenten *Stemness* zu verfolgen. Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der neuronalen Induktion anhand bestimmter Markerproteine auf transkriptioneller Ebene untersucht. Hierbei konnte zum einen die Abnahme von Markergenen für Pluripotenz, als auch die transkriptionelle Zunahme neuronaler Markergene nach initialem Stimulus mit RA belegt werden (Abbildung 7). Um zu erörtern, inwieweit sich diese Ergebnisse mit dem Proteinlevel bestimmter Markergene decken, wurden Proteinlysate des zeitlichen Verlaufs der neuronalen Differenzierung nach Abbildung 5 hergestellt. 100 µg dieser Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und wie in 2.2.3.7.7 beschrieben per Western Immunoblotting die Proteinexpression analysiert (Abbildung 8).

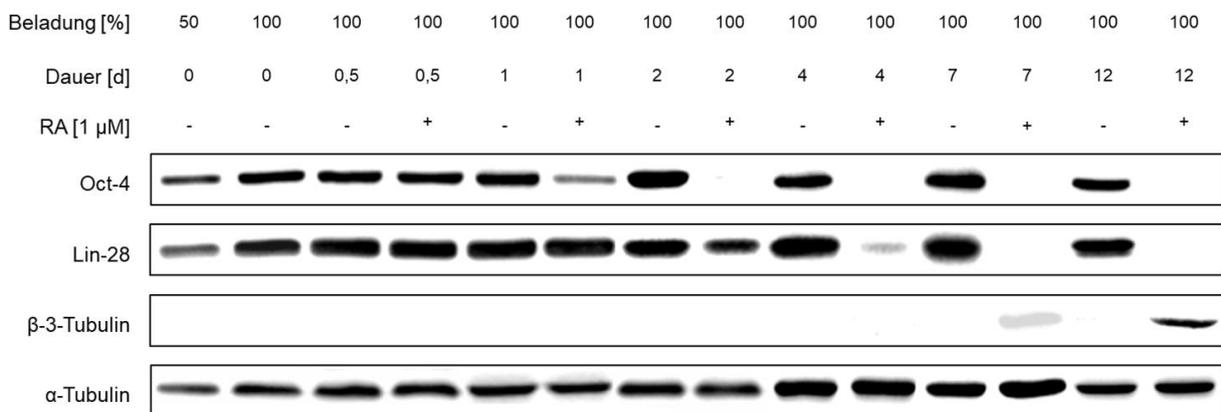


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Proteinexpressionen von pluripotenten Markern (Oct-4, Lin-28) und dem neuronalen Marker β -3-Tubulin nach initialer neuronaler Stimulation. P19-Zellen wurden initial mit RA [1 µM] stimuliert und für die angegebene Dauer inkubiert, wobei die anfängliche Suspensionskultur an Tag 4 als Adhäsionskultur ausgesät wurde. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus drei biologischen Replikaten. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich die Expression von α -Tubulin detektiert.

Um den initialen pluripotenten Status der Zelllinie P19 zu dokumentieren, wurden ebenfalls Lysate der Ausgangskulturen der neuronalen Differenzierung erstellt und als Tag 0 mit aufgetragen. Die Expression von Oct-4 und Lin-28 als Markerproteine für Pluripotenz konnte sowohl in der Ausgangskultur an Tag 0 als auch nach 12 h (Tag 0,5) ohne reduzierenden Einfluss des RA-Stimulus nachgewiesen werden. Bis zum Abschluss der Versuchsreihe an Tag 12 wurden beide Proteine konstant in nicht-induzierten Proben exprimiert. Durch die initiale Stimulation mit RA verringerte sich die Proteinexpression von Oct-4 bereits nach 24 h und konnte nach 48 h nicht mehr nachgewiesen werden. Im Falle von Lin-28 zeigte sich eine erste Abnahme der Proteinmenge 48 h nach neuronaler Induktion, verstärkte sich nach vier Tagen und konnte im Vergleich zur uninduzierten Probe des gleichen Zeitpunktes an den

Tagen 7 und 12 nicht mehr nachgewiesen werden. Die Proteinexpression des neuronalen Markers β -3-Tubulin konnte in keiner uninduzierten Probe detektiert werden. Nach Induktion mit 1 μ M RA zeigte sich eine schwache Expression nach sieben Tagen, welche nach zwölf Tagen deutlicher nachgewiesen werden konnte.

Um die neuronale Differenzierung insbesondere hinsichtlich ihrer morphologischen strukturellen Veränderungen und der zeitlichen Ausprägung der neuronalen Marker weiter zu untersuchen, wurden P19-Zellen nach ihrer initialen Stimulation mit RA nach vier Tagen in Suspension auf beschichtete „Glascoverslips“ ausgesät und bis Tag 12 weiter kultiviert. Die Ausprägung der neuronalen Marker β -3-Tubulin und Nestin wurden schließlich, wie in 2.2.3.8.2 beschrieben, anhand Fluoreszenz-markierter Antikörper nachgewiesen. Dargestellt in Abbildung 9 sind beispielhaft gewählte Ausschnitte von P19-Zellen im Laufe der neuronalen Differenzierung. Bis Tag 7 konnte β -3-Tubulin mittels Fluoreszenzfärbung nicht nachgewiesen werden. An Tag 7 zeigt sich eine leichte cytoplasmatische Ausprägung der Mikrotubuli-Proteine, wohingegen nach zwölf Tagen eine dendritische Expansion des Zellkörpers anhand der Färbung von β -3-Tubulin sichtbar wurde. Im Falle des Intermediärfilaments Nestin zeigten sich an Tag 7 Zellen mit gleichartig gefärbtem cytoplasmatischen Raum, wohingegen nach zwölf Tagen diese gleichgeartete Verteilung von Nestin rückläufig war.

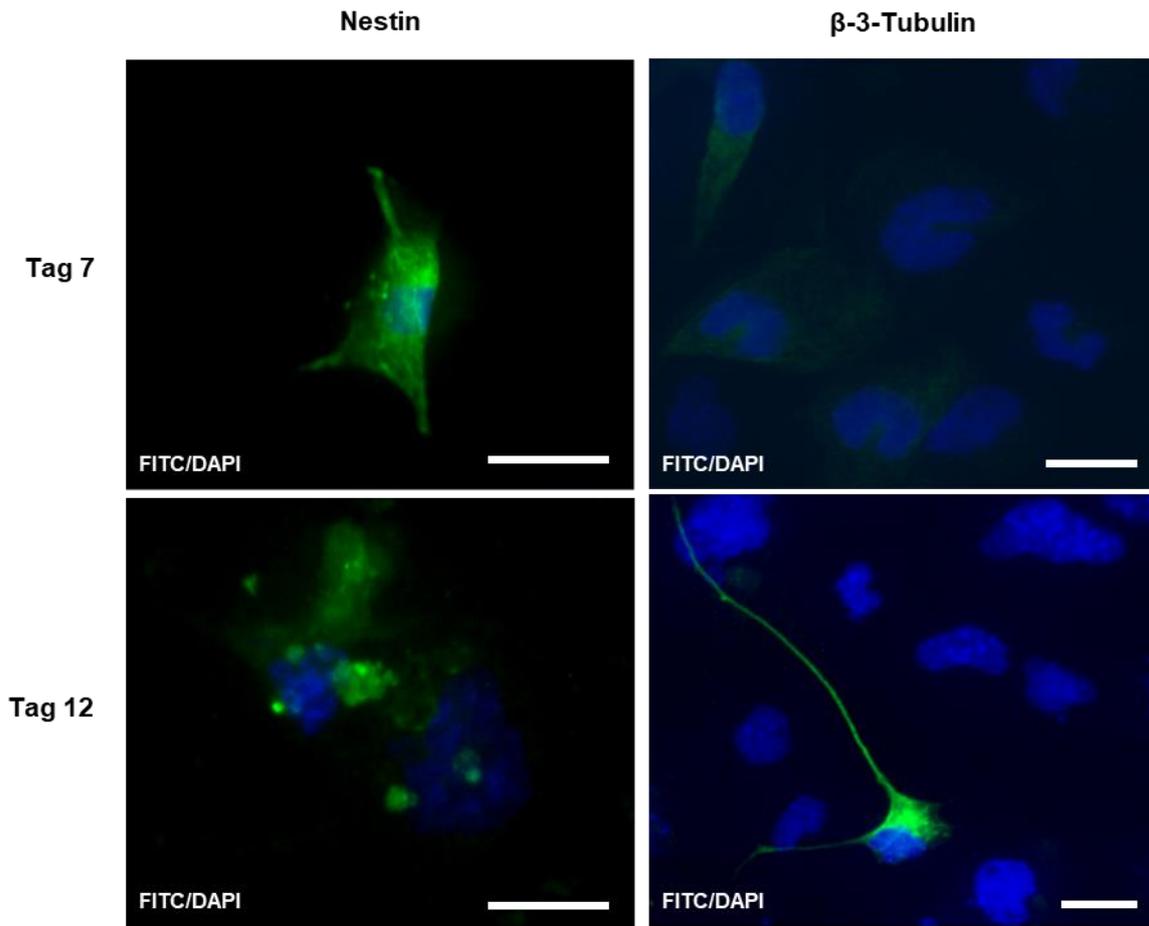


Abbildung 9: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von P19-Zellen nach sieben und zwölf Tagen initialer Induktion mit RA. Die Visualisierung neuronal induzierter Strukturen erfolgte nach Inkubation mit entsprechenden Antikörpern gegen Nestin und β -3-Tubulin durch Eindecken der Deckgläser mit VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) mittels des Fluoreszenzmikroskopes BX53F (Olympus, Tokio, Japan) mit den entsprechenden Filtereinheiten FITC (Emit. max.: 519 nm) und DAPI (Emit. max.: 461 nm) (bar = 20 μ m).

3.2 Einfluss biologisch aktiver Lactone auf den Stammzellcharakter von P19-Zellen

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass biologisch aktive Substanzen wie Galiellalacton oder Dehydrocurvularin einen differenzierungshemmenden Einfluss auf kultivierte post-natale Einzelzellen des ENS ausüben (Schreiber, 2015). Des Weiteren konnte für den antiinflammatorisch aktiven Naturstoff Oxacyclododecindion eine Inhibition der an der neuronalen Differenzierung beteiligten miRNAs mmu-let-7f-5p und mmu-miR-9-5p in einem MRL Fas^{lpr}-Mausmodell zur Pathogenese von systemischem *Lupus erythematoses* festgestellt werden (Henke, 2014). Ebenso konnte Arbeitsgruppen-intern eine Inhibition der humanen let7-Familie von microRNAs durch S-Curvularin nachgewiesen werden. Bei allen Substanzen

handelt es sich überdies um potente Inhibitoren des an der Zelldifferenzierung beteiligten TGF- β -Signalweges. Im Rahmen der noch ausstehenden Totalsynthese wurden außerdem bereits verschiedene Derivate des Naturstoffes Oxa wie (\pm)-14-deoxy-14-methyl-Oxacyclododecindion (DM-Oxa) und (\pm)-10-Ethyl-14-deoxy-14-methyl-Oxacyclododecindion (Et-Oxa) zur Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehung sowie einer möglichen Modulation der antiinflammatorischen Wirkung durch die AG Opatz (Institut für Organische Chemie, Uni Mainz) erzeugt (Abbildung 10).

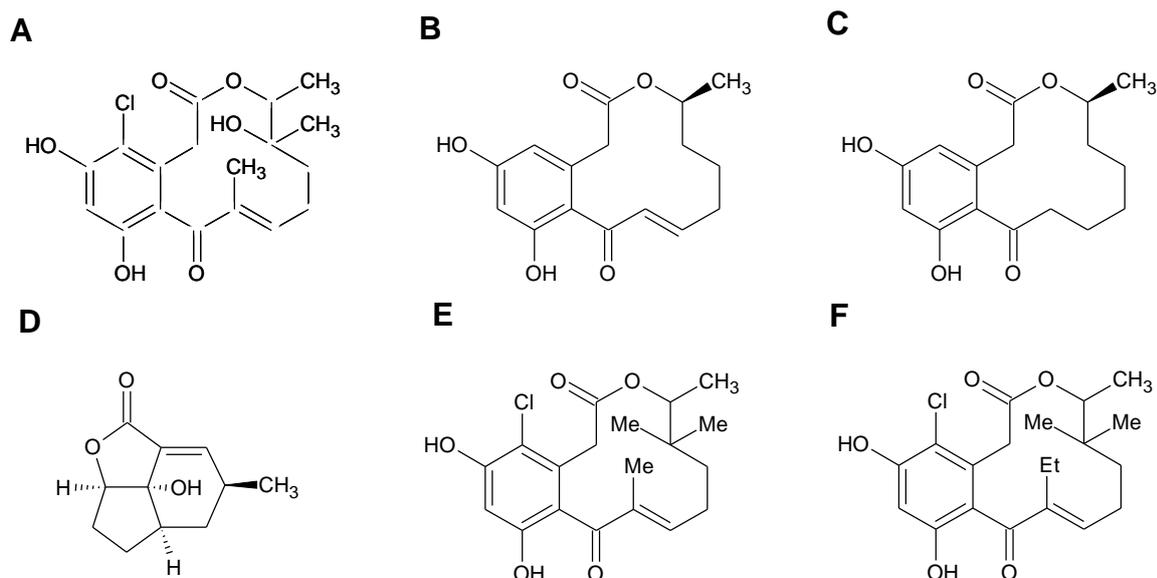


Abbildung 10: Strukturformeln von Oxacyclododecindion (A), Dehydrocurvularin (B), S-Curvularin (C), Galiellalacton (D), (\pm)-14-deoxy-14-methyl-Oxacyclododecindion (E) und (\pm)-10-Ethyl-14-deoxy-14-methyl-Oxacyclododecindion (F).

3.2.1 Einfluss biologisch aktiver Lactone auf die Zytotoxizität von P19-Zellen

Zunächst wurden die beschriebenen Naturstoffe Oxacyclododecindion (Oxa), Dehydrocurvularin (Dhc), S-Curvularin (S-Curv) und Galiellalacton (Gal), sowie die vom Naturstoff Oxacyclododecindion abgeleiteten synthetischen Derivate DM-Oxa und Et-Oxa in verschiedenen Konzentrationen auf ihre Kompatibilität mit der P19-Zelllinie unter gleichzeitiger Stimulation mit RA getestet. Hierfür wurden P19-Zellen wie unter 2.2.3.6.1 beschrieben kultiviert und ausgesät. Die Applikation mit verschiedenen Konzentrationen an Testsubstanz erfolgte bei gleichzeitiger Zugabe von 1 μ M RA. Die Lebendzellfärbung erfolgte nach 48 h Inkubationszeit.

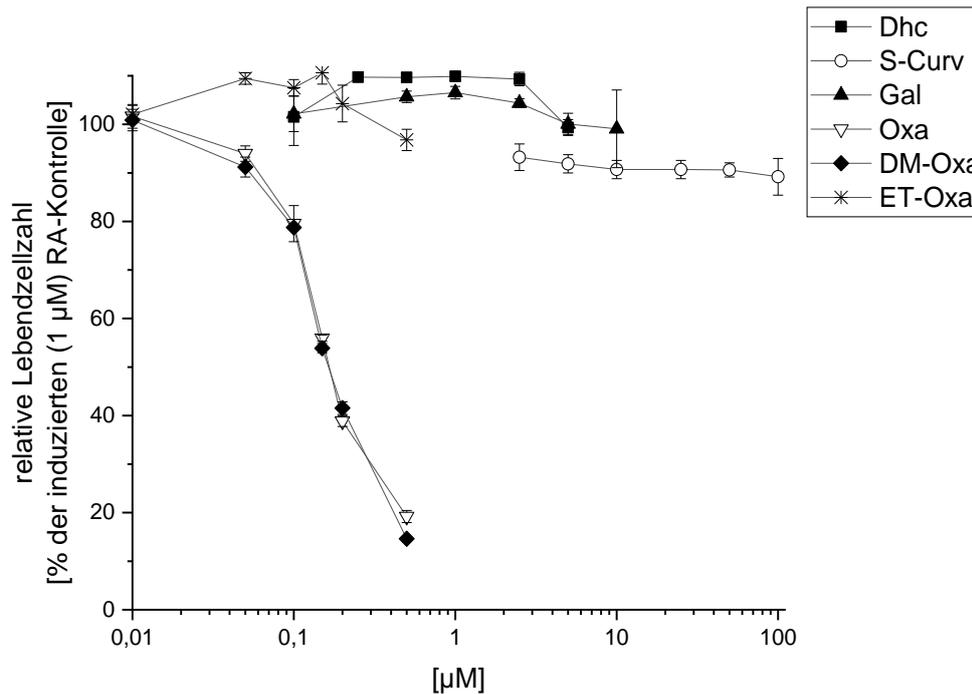


Abbildung 11: Prozentuale Bestimmung der relativen Lebendzellzahl von P19-Zellen bei 48-stündiger Lacton-Behandlung. P19-Zellen wurden 48 h mit RA [1 µM] und jeweils sechs verschiedenen Konzentration der Testsubstanzen Dhc, S-Curv, Gal, Oxa, DM-Oxa und Et-Oxa behandelt und im Anschluss die Absorption Giemsa-gefärbter Zellen im Vergleich zur RA-Kontrolle ermittelt. (MW ± SEM aus drei biologischen Replikaten zu je zwei technischen; $p \leq 0,05$).

Hinsichtlich der Lebendzellzahl von P19-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit den antiinflammatorischen Pilzmetaboliten, bzw. synthetisch abgeleiteten Derivaten konnte festgestellt werden, dass die Makrolactone Dhc (100 nM-5 µM), S-Curv (2,5 µM-100 µM) und Gal (100 nM-10 µM) in den eingesetzten Konzentrationen keinen negativen Einfluss ausüben (Abbildung 11). Ebenso kann dies bei dem Oxa-Derivat Et-Oxa in den Konzentrationen von 10 bis 500 nM beobachtet werden. Der Naturstoff Oxacyclododecindion sowie sein Derivat DM-Oxa zeigten jedoch einen konzentrationsabhängigen Abfall der Lebendzellzahl mit einer LD_{50} von jeweils um 170 nM. Für die folgenden Versuche zur Untersuchung des Einflusses auf die *Stemness* mit initialer neuronaler Induktion wurden aufgrund des toxischen Einflusses Oxa und DM-Oxa nicht weiter untersucht, und die Analyse auf die Substanzen Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa begrenzt.

3.2.2 Effekt biologisch aktiver Lactone auf die Promotoraktivität von *oct-4*

Zur Untersuchung der Oct-4 Promotoraktivität wurde das Plasmid pDB2-Oct-4 mittels jetPRIME© (Fa. Polyplus, Illkirch, Frankreich) in die murine embryonale Karzinomzelllinie P19 transient transfiziert. Der Vektor pDB2-Oct-4pro wurde freundlicherweise von Prof.

Mohammad Hossein Nasr Esfahani vom „Royan Institute for Biotechnology“ (Isfahan, Iran) zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden verschiedenste Parameter evaluiert, um die Transfektion mittels Elektroporation zu gewährleisten, was jedoch ohne Erfolg blieb. Aufgrund dessen wurde das jetPRIME® Transfektionsreagenz genutzt, wobei die Bedingungen hierfür optimiert wurden. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen an Vektor-DNA von pDB2-Oct-4pro eingesetzt, um die Transfektionseffizienz zu bestimmen. Hierbei erwies sich die Transfektion mit 1 µg Plasmid-DNA pro 24-Well-Vertiefung mit einer Zellaussaat von 5×10^4 Zellen/ml am effektivsten. Die relative Reportergenaktivität lag 5,1-fach über der untransfizierten Kontrollprobe, wohingegen die Transfektion mit 0,5 µg lediglich eine 2,9-fach erhöhte relative Fluoreszenz gegenüber der Kontrollprobe zeigte (Abbildung 12, A). Als Zeitpunkt für die Ermittlung der Reportergenaktivität von Oct-4 erschien nach der in Abbildung 8 erniedrigten Proteinexpression nach zwei Tagen infolge des neuronalen Stimulus, 48 h als sinnvoll. Eine Applikation von 1 µM RA 4 h nach erfolgter Transfektion für weitere 48 h resultierte in einer, relativ zur unbehandelten Positivkontrolle, um 55 % verminderten Fluoreszenz. Nachfolgend wurde die Auswirkung der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die Promotoraktivität von Oct-4 ohne Induktion (Abbildung 13, A), sowie mit neuronalem Stimulus (Abbildung 13, B) untersucht.

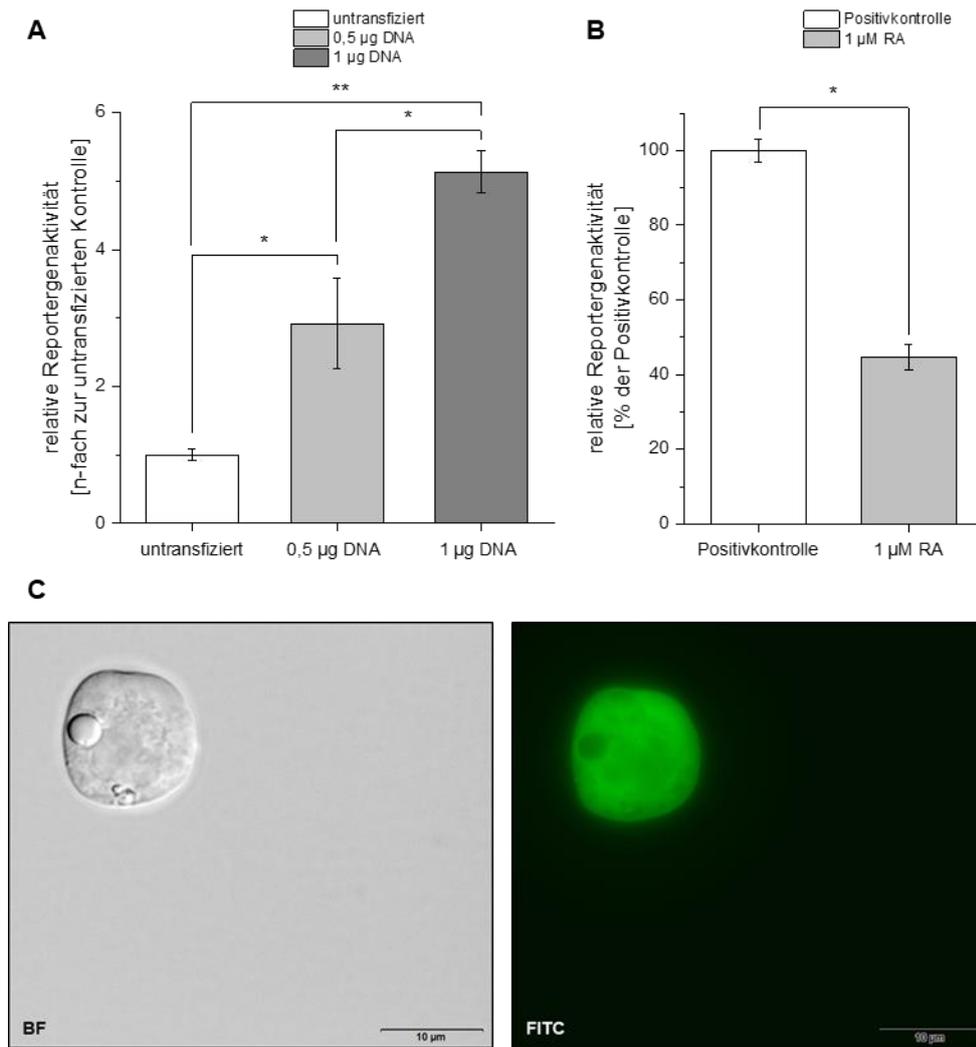


Abbildung 12: Transiente Transfektion von pDB2-Oct-4pro zur Analyse der *oct-4*-Promotoraktivität in P19-Zellen. A: Relative Reportgenaktivität nach 48 h transienter Expression in Abhängigkeit der Plasmidkonzentration. B: Reportergenaktivität RA-stimulierter [1 µM] transient transfizierter P19-Zellen relativ zur unstimulierten Kontrolle nach 48 h. C: Beispielhafte Darstellung einer P19 Zelle nach erfolgreicher transienter Transfektion mit pDB2-Oct-4pro bei Durchlicht (BF) und Filtereinheit FITC (Emit. max.: 519 nm).

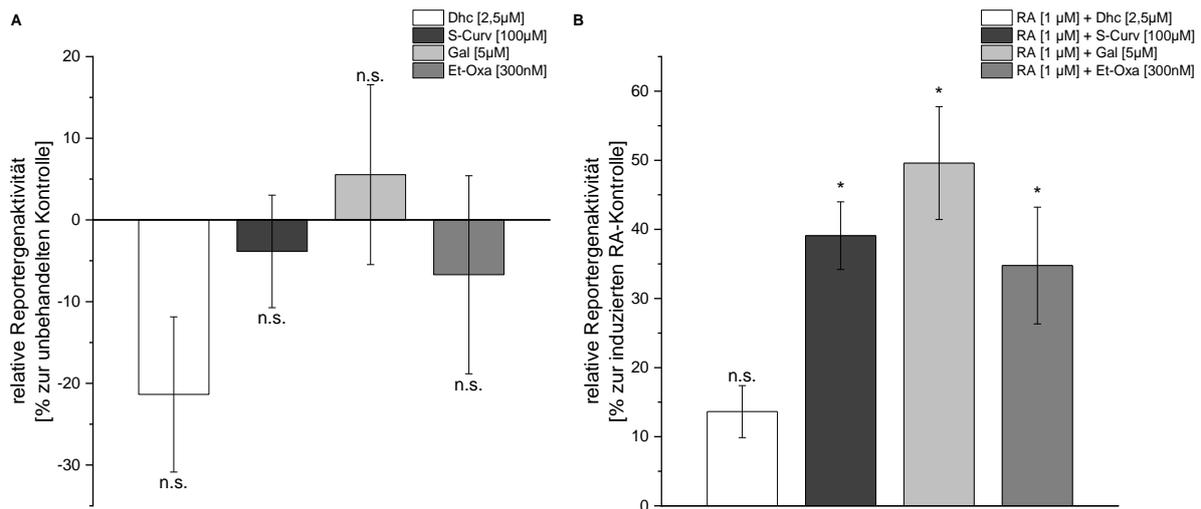


Abbildung 13: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die Promotoraktivität von *oct-4*. P19-Zellen wurden transient mit dem Plasmid pDB2-Oct-4pro transfiziert und die Reporteraktivität nach 48 h Inkubation durch Fluoreszenzmessung ermittelt. A: Einfluss der Testsubstanzen im Vergleich zur unbehandelten transfizierten Kontrolle. B: Einfluss der Testsubstanzen vergleichend zur RA [1 µM]-induzierten Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM aus drei biologischen Replikaten zu je zwei technischen Replikaten (n.s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$).

Keine der getesteten Substanzen hatte signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität von *oct-4* ohne gleichzeitige Induktion mit RA. Die relative Reporteraktivität im Vergleich zur mit RA induzierten Kontrolle konnte durch Behandlung mit S-Curv um 39 %, durch Gal um 49 %, und Et-Oxa um 34 % erhöht werden, wobei die Zunahme im Falle von Dhc nicht das erforderliche Signifikanzniveau erreichte (Abbildung 13, B).

3.2.3 Einfluss bioaktiver Lactone auf die Erhaltung des murinen Stammzellcharakters

Durch die Induktion mit RA konnte hinsichtlich der murinen embryonalen Teratokarzinom-Zelllinie P19 eine Stimulation der neuronalen Differenzierung mit einhergehender Abnahme von Pluripotenzmarkern auf verschiedenen Ebenen nachgewiesen werden. Die Abnahme des Pluripotenzmarkers Oct-4 auf Proteinebene lässt sich bereits 24 Stunden nach neuronaler Induktion belegen (vgl. Abbildung 8), wohingegen Lin-28 nach vier Tagen in seiner Proteinexpression reprimiert wird. Ebenso konnte auf transkriptioneller Ebene eine stetige Abnahme beider Genexpressionen bis Tag 7 der neuronalen Differenzierung verfolgt werden (Abbildung 7, B). Die durch RA reduzierte Promotoraktivität von Oct-4 konnte durch die Testsubstanzen erhöht werden (Abbildung 13, B), was den Schluss einer positiven Regulation der Pluripotenz durch diese Substanzen zulässt. Vor diesem Hintergrund wurde nun der

Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle und translationale Expression von Pluripotenzmarkern, sowie neuronalen Markern mit und ohne Behandlung durch Retinsäure an den Tagen 4 und 7 untersucht.

3.2.3.1 Effekt bioaktiver Lactone auf *Stemness*- und neuronal-regulierende mRNAs

Abbildung 14 (A) zeigt hinsichtlich des Einflusses der Lactone auf die mRNA-Expression der Pluripotenzgene *lin-28*, *oct-4* und *nanog* bei unstimulierten P19-Zellen nach vier Tagen keinen signifikanten Effekt. Die höchsten Änderungsraten konnten durch 100 μ M S-Curv auf *lin-28* und 300 nM Et-Oxa auf *nanog* festgestellt werden, welche in beiden Fällen eine nicht signifikante Verminderung der mRNA-Menge um den Faktor 2 bedingten. Die initiale Stimulation mit 1 μ M RA hatte die Abnahme der mRNA-Expression aller drei Gene zur Folge, wobei *lin-28* 11-fach, *oct-4* 9,5-fach und *nanog* 5,9-fach gegenüber der nicht-induzierten Kontrolle reprimiert wurden (Abbildung 14, B). Die Transkriptmenge von *oct-4* konnte durch alle Testsubstanzen signifikant gegenüber der Stimulation mit RA erhöht werden, wobei 100 μ M S-Curv (5,1-fach) und 300 nM Et-Oxa (4,8-fach) den stärksten Effekt zur Folge hatten. Ebenso konnte die mRNA-Menge von *nanog* durch alle Substanzen, wenn auch nur im Falle von S-Curv und Gal signifikant, gesteigert werden, wobei hier 100 μ M S-Curv mit einer Steigerung um den Faktor 6,5 die stärkste Änderung bedingte. Das *lin-28*-Transkript erfuhr lediglich durch die 4-tägige Behandlung mit 300 nM Et-Oxa eine signifikante Steigerung mit einer Änderung um den Faktor 2,8.

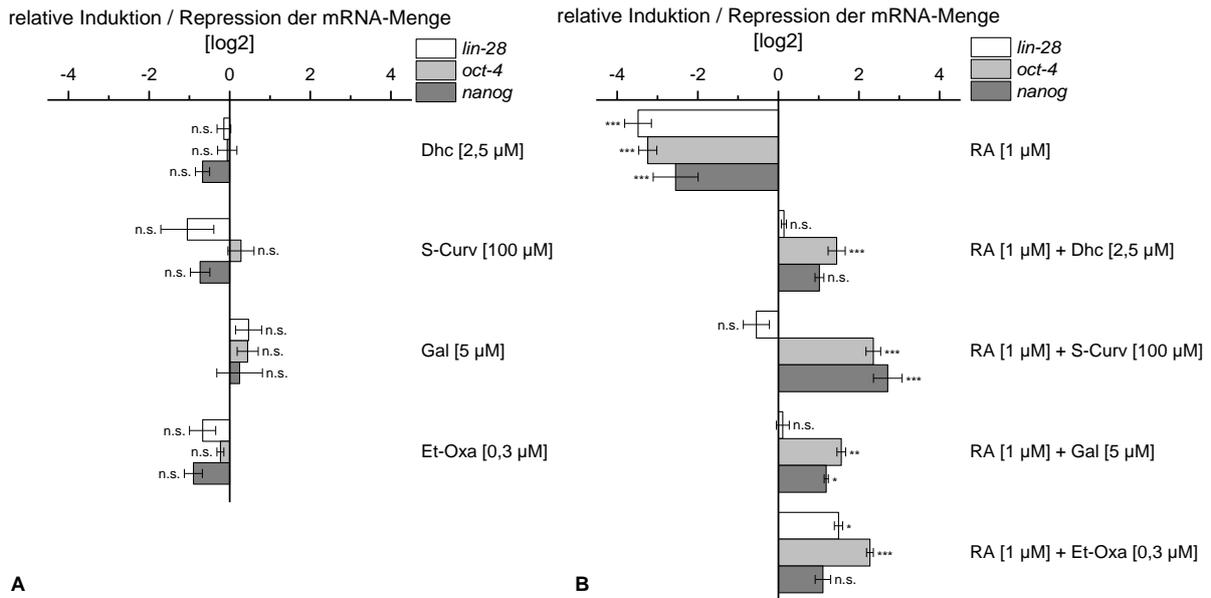


Abbildung 14: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle Aktivität *Stemness*-assoziiierter Gene nach vier Tagen Kultivierung. A: Analyse *Stemness*-erhaltender mRNAs von P19-Zellen nach vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 µM], S-Curv [100 µM], Gal [5 µM] und Et-Oxa [0,3 µM]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der mit dem jeweiligen Lacton Dhc [2,5 µM], S-Curv [100 µM], Gal [5 µM] und Et-Oxa [0,3 µM] behandelten gegen unbehandelte P19-Zellen angegeben. B: Analyse *Stemness*-erhaltender mRNAs von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 µM], sowie vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 µM], S-Curv [100 µM], Gal [5 µM] und Et-Oxa [0,3 µM]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der induzierten gegen die uninduzierte P19-Zellen, bzw. mit dem jeweiligen Lacton behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben. Als Referenzgen diente jeweils die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*). (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Der Einfluss der Substanzen auf die Transkriptmenge der neuronalen Markergene *β -3-tubulin*, *ncam* und *nestin* an Tag 4 ist in Abbildung 15 veranschaulicht. Eine signifikante Änderung auf die nicht-RA-induzierte Ausprägung der Marker konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 15, A).

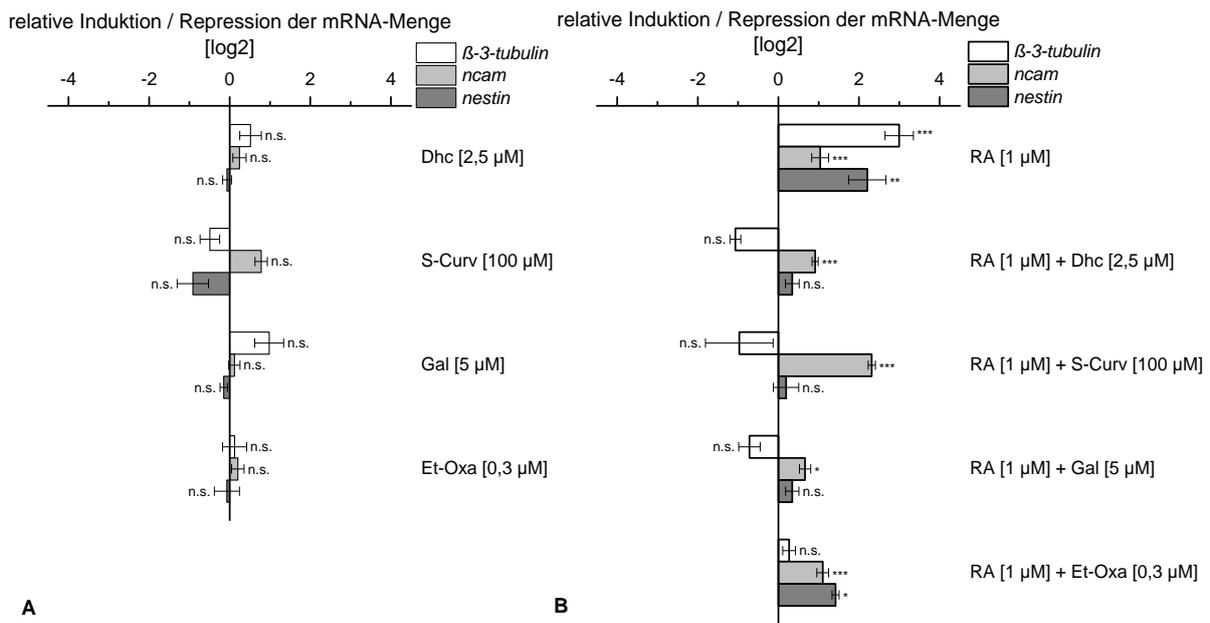


Abbildung 15: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle Aktivität neuronaler Markergene nach vier Tagen Kultivierung. A: mRNA-Expression neuronaler Markergene von P19-Zellen nach vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der mit dem jeweiligen Lacton Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M] behandelten gegen unbehandelte P19-Zellen angegeben. B: mRNA-Expression neuronaler Markergene von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 μ M], sowie vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der induzierten gegen die uninduzierte P19-Zellen, bzw. mit dem jeweiligen Lacton behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben. Als Referenzgen diente jeweils die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*). (Mittelwert +/- SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Eine erhöhte transkriptionelle Aktivität infolge der Induktion mit RA konnte bei allen drei Markern festgestellt werden (Abbildung 15, B). Die mRNA-Expression von *ncam* wurde durch alle Verbindungen verstärkt, wobei 100 μ M S-Curv eine 5-fach erhöhte Transkriptmenge zur Folge hatte. Die Transkripte von β -3-tubulin wurden nicht signifikant beeinflusst, und bezüglich der mRNA-Menge von *nestin* führte die Behandlung mit 300 nM Et-Oxa zur einzigen signifikanten Änderung mit einer Zunahme gegenüber der RA-Probe um den Faktor 2,6.

Die P19-Zellen wurden entsprechend dem in Abbildung 5 aufgeführten Schema weiter als Adhäsionskultur inkubiert und das transkriptionelle Level der Gene nach sieben Tagen erneut untersucht. Bezüglich der mRNA-Expression der Pluripotenzmarker führte die

Substanzapplikation in keinem der Fälle zu einer Zunahme gegenüber uninduzierten Zellen (Abbildung 16, A). 100 μM S-Curv und 300 nM Et-Oxa bedingten hier eine Abnahme des Transkriptlevels von *nanog* um Faktor 6.

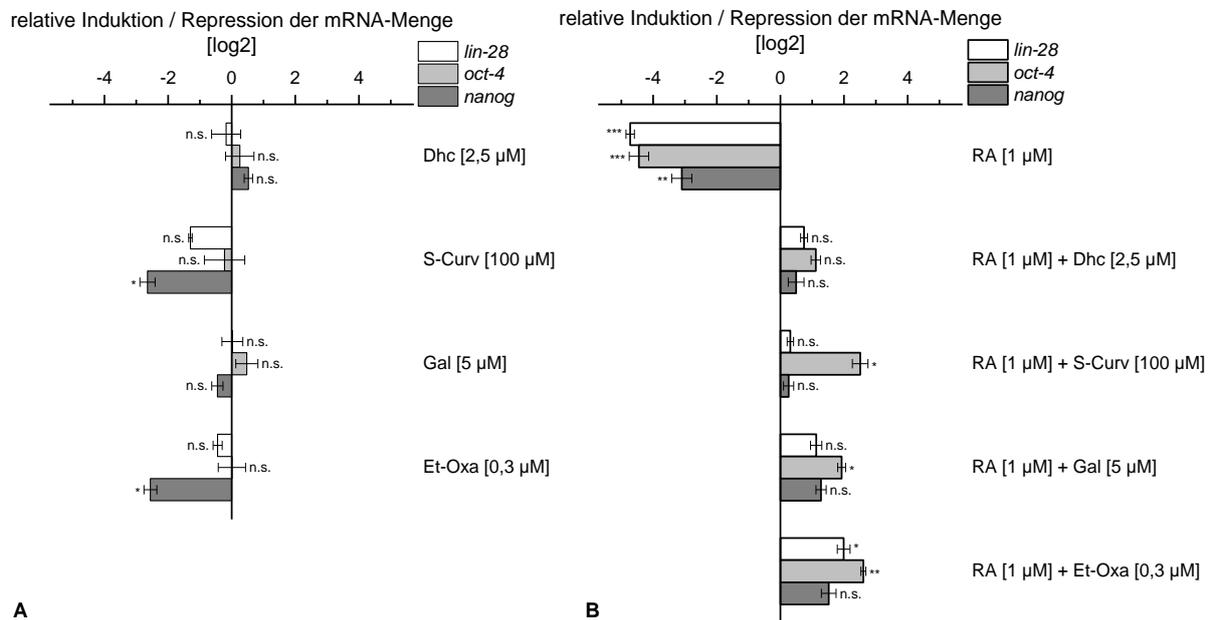


Abbildung 16: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle Aktivität *Stemness*-assoziiierter Gene nach sieben Tagen Kultivierung. A: Analyse *Stemness*-erhaltender mRNAs von P19-Zellen nach sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μM], S-Curv [100 μM], Gal [5 μM] und Et-Oxa [0,3 μM]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [\log_2] der mit dem jeweiligen Lacton Dhc [2,5 μM], S-Curv [100 μM], Gal [5 μM] und Et-Oxa [0,3 μM] behandelten gegen unbehandelte P19-Zellen angegeben. B: Analyse *Stemness*-erhaltender mRNAs von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 μM], sowie sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μM], S-Curv [100 μM], Gal [5 μM] und Et-Oxa [0,3 μM]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [\log_2] der induzierten gegen die uninduzierte P19-Zellen, bzw. mit dem jeweiligen Lacton behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben. Als Referenzgen diente jeweils die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*). (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Die 7-tägige Inkubation der P19-Zellen nach RA-Stimulation führte zu einer Transkriptabnahme aller Pluripotenzgene, die infolge der Applikation aller Testsubstanzen wieder erhöht werden konnte (Abbildung 16, B). Hierbei zeigte die Transkriptmenge von *oct-4* infolge der Behandlung mit S-Curv (5,7-fach), Gal (3,8-fach) und Et-Oxa (6-fach) signifikante Zunahmen, wobei Et-Oxa überdies die mRNA-Expression von *lin-28* um den Faktor 4 signifikant steigerte.

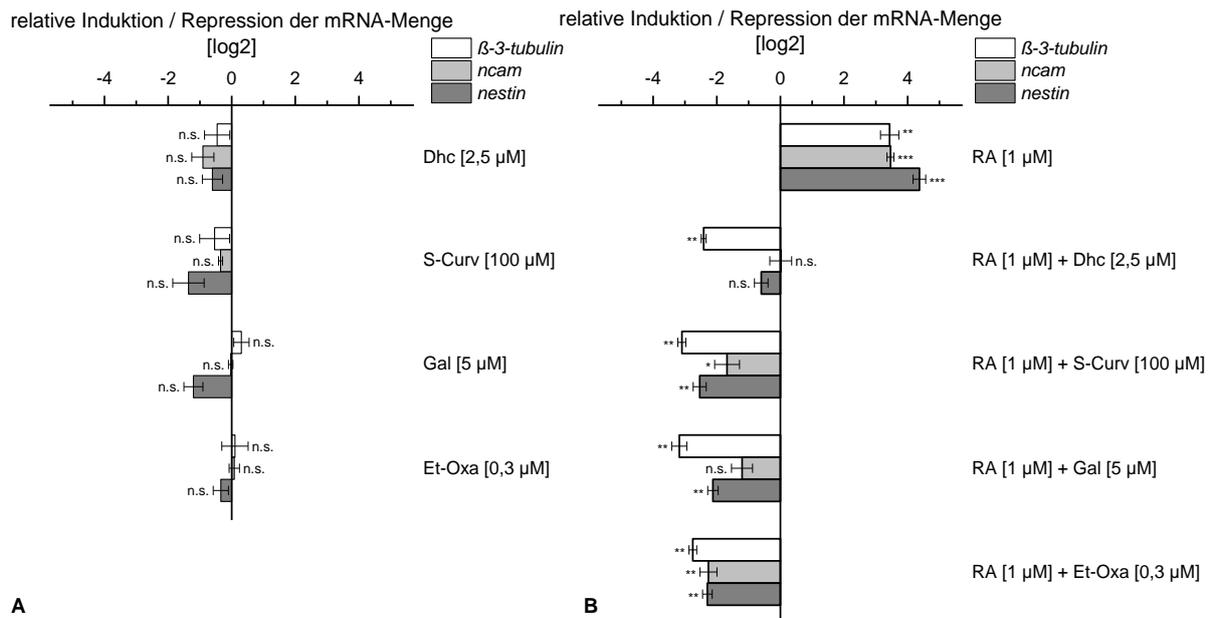


Abbildung 17: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die transkriptionelle Aktivität neuronaler Markergene nach sieben Tagen Kultivierung. A: mRNA-Expression neuronaler Markergene von P19-Zellen nach sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 µM], S-Curv [100 µM], Gal [5 µM] und Et-Oxa [0,3 µM]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log₂] der mit dem jeweiligen Lacton Dhc [2,5 µM], S-Curv [100 µM], Gal [5 µM] und Et-Oxa [0,3 µM] behandelten gegen unbehandelte P19-Zellen angegeben. B: mRNA-Expression neuronaler Markergene von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 µM], sowie sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 µM], S-Curv [100 µM], Gal [5 µM] und Et-Oxa [0,3 µM]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log₂] der induzierten gegen die uninduzierte P19-Zellen, bzw. mit dem jeweiligen Lacton behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben. Als Referenzgen diente jeweils die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*). (Mittelwert +/- SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; n.s. = nicht signifikant, p ≤ 0,05 = *, p ≤ 0,01 = **, p ≤ 0,001 = ***)

Ebenso wie nach vier Tagen konnte an Tag 7 keine signifikante Änderung der nicht-RA-induzierten neuronalen Markerausprägung auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Abbildung 17, A). Die Induktion mit RA erhöhte die Transkriptlevel aller neuronalen Marker, und konnte bei *β-3-tubulin* durch alle Verbindungen mindestens 5,3-fach reduziert werden. Bis auf Dhc führten die Substanzen zudem zu einer mindestens 4,3-fachen signifikanten Senkung der Transkription von *nestin*. Eine signifikante Reduktion durch S-Curv und Et-Oxa erfolgte ebenso die transkriptionelle Aktivität von *ncam* betreffend.

Insgesamt kann von einem reduzierenden Einfluss auf die Transkription neuronal assoziierter Markergene, insbesondere durch 100 µM S-Curv, 5 µM Gal und 300 nM Et-Oxa gesprochen werden, welcher sich allerdings erst nach sieben Tagen der neuronalen Differenzierung zeigt.

Die transkriptionelle Auswirkung auf die *Stemness* wurde ebenfalls weitestgehend durch diese drei Verbindungen positiv reguliert, wobei der negative Einfluss von S-Curv und Et-Oxa auf die uninduzierte mRNA-Expression von *nanog* nach sieben Tagen konträr hierzu steht.

3.2.3.2 Effekt bioaktiver Lactone auf Pluripotenz-erhaltende Proteine

Um die positiven Effekte der Verbindungen Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die *oct-4* Promotoraktivität nach 48 h (vgl. Abbildung 13, B), sowie auf die Transkription pluripotenter Marker nach vier und sieben Tagen zu bestätigen, wurden nachfolgend, ebenfalls an den Tagen 4 und 7, Gesamt-Zelllysate aus P19-Zellen erstellt (siehe Abschnitt 2.2.3.7.2). Die Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Immunoblotting quantitativ verglichen (2.2.3.7.7). Auf Proteinebene wurden lediglich die Pluripotenzmarker Lin-28 und Oct-4 analysiert, da die Proteinexpression von β -3-Tubulin unter dem Detektionsniveau blieb. In der Analyse der neuronalen Induktion (vgl. Abbildung 8) konnte β -3-Tubulin auf Proteinebene nach sieben Tagen nachgewiesen werden. Aufgrund des limitierenden Effektes der Substanzen, welche naturgegeben in erschöpfendem Maße vorhanden waren, wurden die Ansätze nach vier Tagen aufgeteilt (vgl. Abbildung 5), was die zu analysierende aufgetragene Proteinmenge verminderte und eine Proteindetektion von β -3-Tubulin erschwerte. Darüber hinaus muss erwähnt werden, dass β -3-Tubulin als spezifischer Neuronenmarker ausschließlich in post-mitotischen, ausdifferenzierten Neuronen exprimiert wird, was die Zellzahl, und somit die Proteinmenge im Gegensatz zu weiter teilungsfähigen Zellen reduziert (Breuss, Leca, Gstrein, Hansen, & Keays, 2017). Hauptaugenmerk der bearbeiteten Thematik sollte der Einfluss der biologisch aktiven Lactone auf die Erhaltung der *Stemness* sein, weswegen die neuronale Proteinexpression bei dieser Analyse aus den genannten Gründen ausgespart blieb.

Ebenso wie auf transkriptioneller Ebene wurde der Einfluss der Lactone auf die Expression der Pluripotenzmarker sowohl nach Induktion mit RA, als auch ohne initialen Stimulus untersucht. Hinsichtlich der Expression von Lin-28 und Oct-4 ohne Induktion mit RA hatte die Applikation der Lactone keinen signifikanten Effekt, wenngleich, bis auf Dhc, eine generelle Zunahme der Proteinexpressionen beobachtet werden konnte (Abbildung 18).

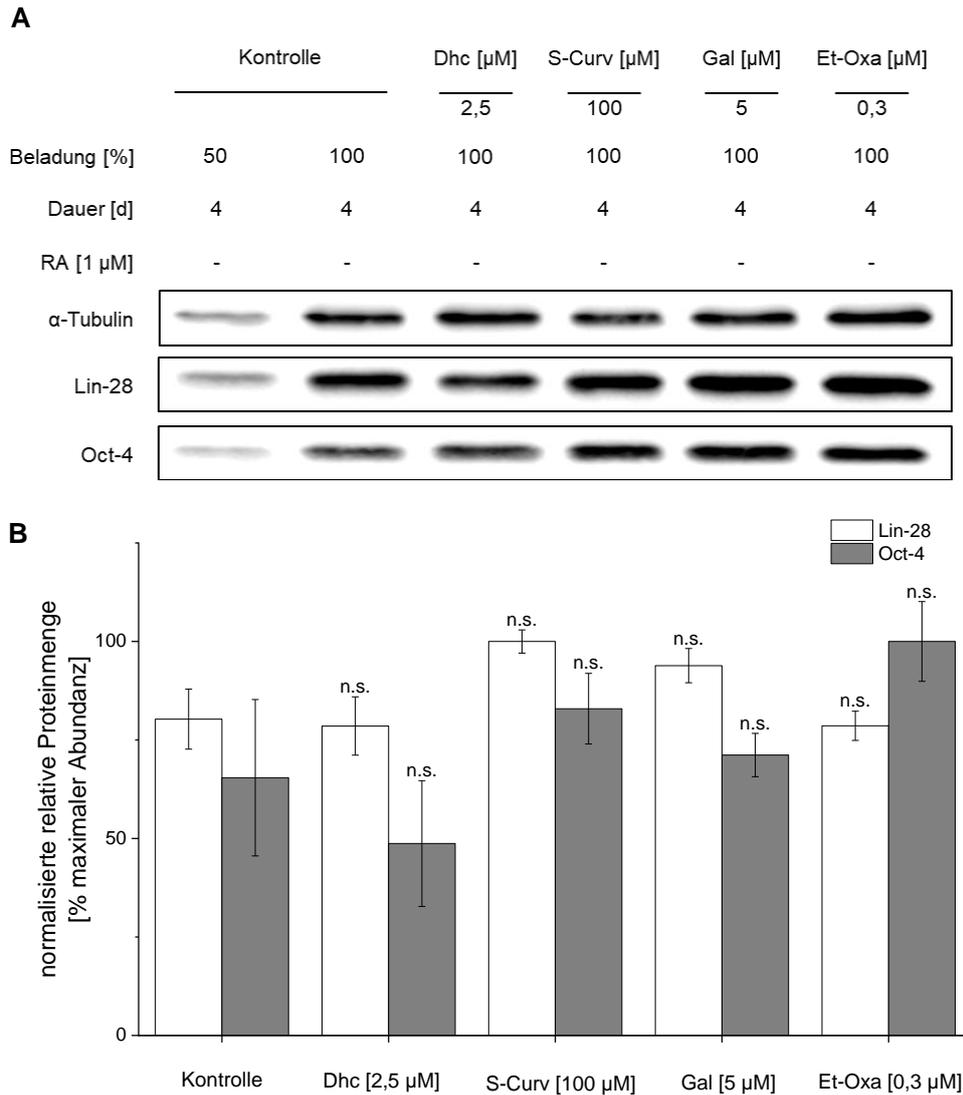


Abbildung 18: Immunoblot *Stemness*-erhaltender Proteine aus dem Zelllysat von P19-Zellen nach 4-tägiger Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μM], S-Curv [100 μM], Gal [5 μM] und Et-Oxa [0,3 μM]. A: Repräsentativ dargestellt ist ein Western Immunoblot aus drei biologischen Replikaten. B: Densitometrische Auswertung der drei biologischen Replikate. (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten; Varianzanalysen erfolgten gegen die unbehandelte Kontrolle: Behandlung vs. Kontrolle: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Eine Stimulation mit 1 μM RA bedingte nach vier Tagen eine erhebliche Abnahme der Proteinexpression von Lin-28 (Abbildung 19). Eine Expression von Oct-4 war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Durch Inkubation mit den Testsubstanzen konnte die relative Proteinmenge von Lin-28 in allen Fällen erhöht werden, wenngleich die gesteigerte Expression im Falle von Dhc (12 %) und S-Curv (22 %) nicht das Signifikanzniveau erfüllte. Gal steigerte die relative Proteinexpression von Lin-28 um 40 % signifikant, und auch die

Applikation von Et-Oxa vermochte die Expression um 37 % statistisch relevant zu steigern. Auf transkriptioneller Ebene korreliert dies hinsichtlich des positiven Einflusses von Et-Oxa auf die mRNA-Expression von Lin-28 (Abbildung 14), jedoch wurde für Gal kein positiver Effekt auf die Transkriptmenge von Lin-28 nach vier Tagen festgestellt. Die durch RA verminderte Proteinmenge von Oct-4 konnte durch die Lactone S-Curv (97 %), Gal (59 %) und Et-Oxa (79 %) signifikant gesteigert werden. Die gesteigerte Proteinexpression korreliert mit der ebenfalls erhöhten relativen Transkriptmenge von Oct-4 an Tag 4 durch diese Lacton-Behandlungen (Abbildung 14). Der Nachweis von Dhc-behandeltem Oct-4 war statistisch nicht belegbar.

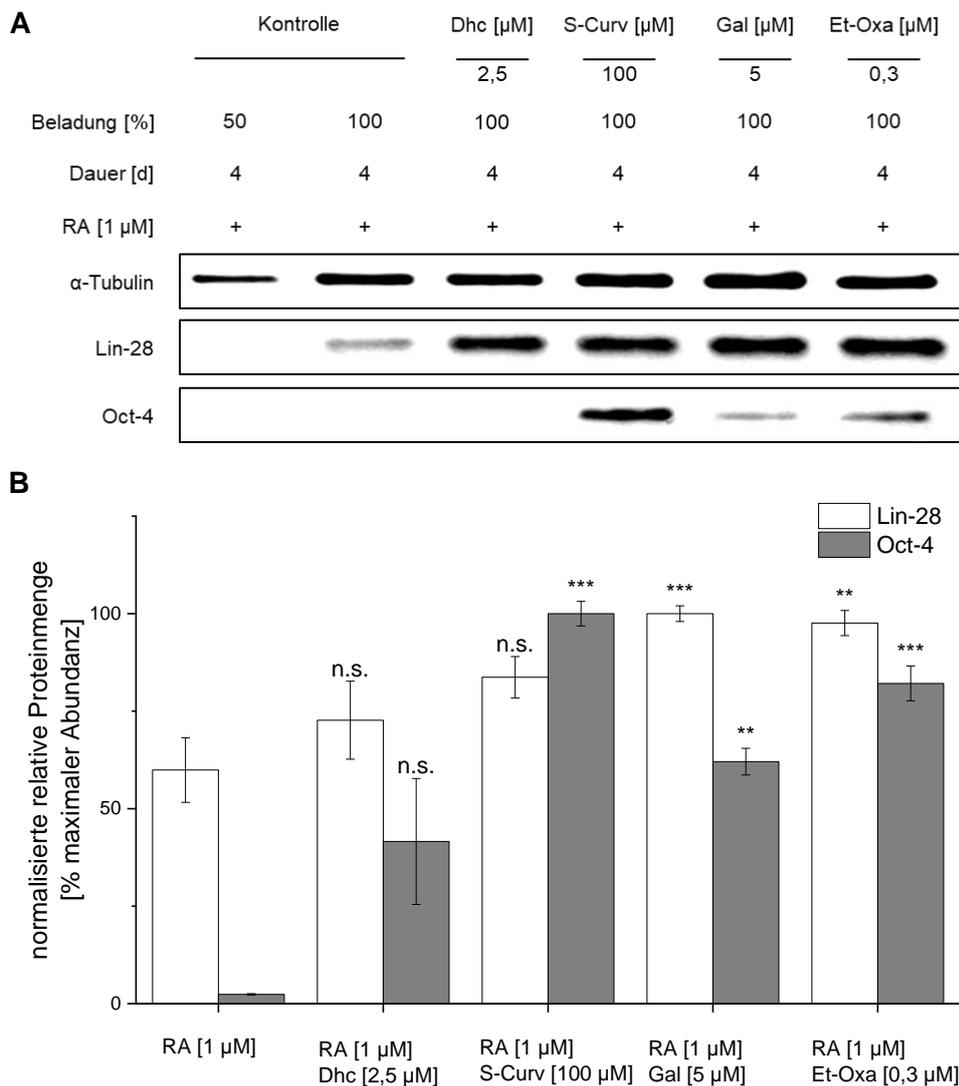


Abbildung 19: Analyse *Stemness*-erhaltender Proteine aus dem Zelllysat von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [$1 \mu\text{M}$], sowie vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [$2,5 \mu\text{M}$], S-Curv [$100 \mu\text{M}$], Gal [$5 \mu\text{M}$] und Et-Oxa [$0,3 \mu\text{M}$]. A: Repräsentativ dargestellt ist ein Western Immunoblot aus drei biologischen Replikaten. B: Densitometrische Auswertung der drei biologischen Replikate.

(Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten; Varianzanalysen erfolgten gegen die RA-induzierte Kontrolle: Behandlung vs. RA-induzierte Kontrolle: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Nachfolgend wurde die Proteinexpression von Lin-28 und Oct-4 nach sieben Tagen zunächst ohne Induktion mit RA untersucht. Die Behandlung mit den Lactonen hatte hinsichtlich der Oct-4 Proteinexpression keinerlei signifikante Auswirkung. Die relative Proteinmenge von Lin-28 konnte durch die pilzlichen Lactone S-Curv und Gal um 31 % bzw. 38 % signifikant gesteigert, während Dhc und Et-Oxa hierbei keinen Einfluss ausübten (Abbildung 20).

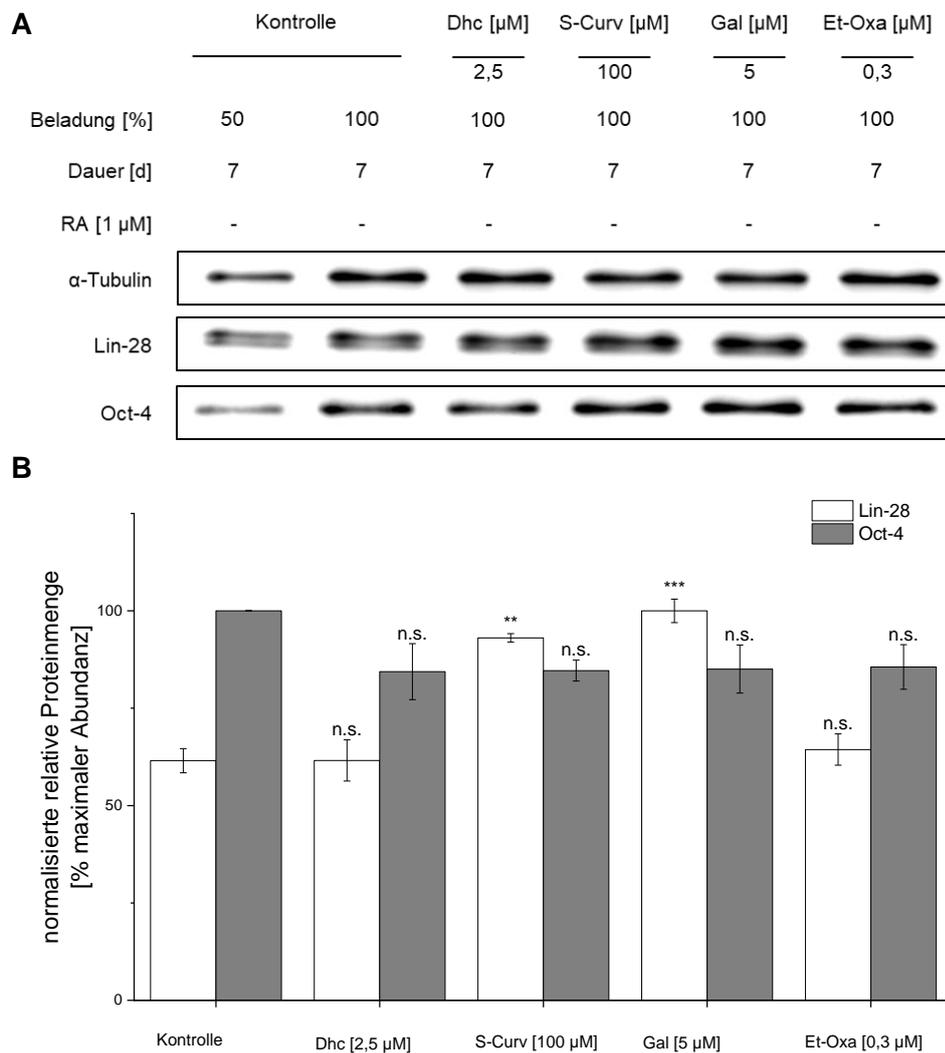


Abbildung 20: Analyse *Stemness*-erhaltender Proteine aus dem Zelllysat von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1μ M], sowie sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [$2,5 \mu$ M], S-Curv [100μ M], Gal [5μ M] und Et-Oxa [$0,3 \mu$ M]. A: Repräsentativ dargestellt ist ein Western Immunoblot aus drei biologischen Replikaten. B: Densitometrische Auswertung der drei biologischen

Replikate. (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten; Varianzanalysen erfolgten gegen die unbehandelte Kontrolle: Behandlung vs. Kontrolle: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

In Abbildung 21 ist der Einfluss der Testsubstanzen auf die Proteinexpression nach RA-Induktion dargestellt. Die Proteinexpression von Oct-4 konnte lediglich in der mit 300 nM Et-Oxa behandelten Probe nachgewiesen werden. Lin-28 wurde durch Behandlung mit allen Lactonen in seiner Expression verstärkt, signifikant jedoch nur im Falle von Et-Oxa mit 76 %-iger Steigerung gegenüber der RA-Kontrolle.

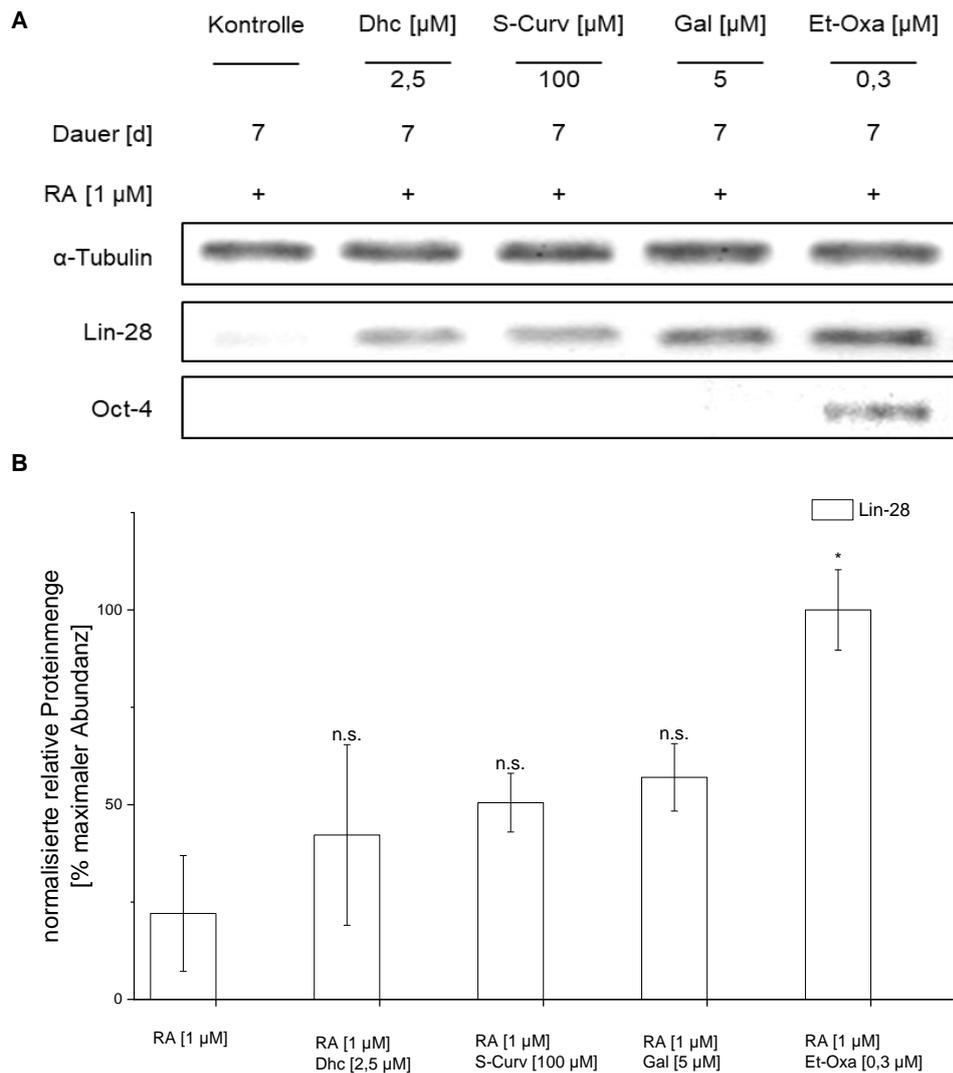


Abbildung 21: Analyse *Stemness*-erhaltender Proteine aus dem Zelllysate von P19-Zellen nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 μ M], sowie sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M]. A: Repräsentativ dargestellt ist ein Western Immunoblot aus drei biologischen Replikaten. B: Densitometrische Auswertung der drei biologischen

Replikate. (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten; Varianzanalysen erfolgten gegen die induzierte Kontrolle: Behandlung vs. Kontrolle: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$)

3.2.3.3 Einfluss von Lactonen auf die Expression neuronal regulierender miRNAs

microRNAs sind als RNA-regulierende Elemente an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Entwicklung, Proliferation und Differenzierung beteiligt. Mit einer Länge von 20 bis 22 Nukleotiden werden diese RNA-Moleküle gewebespezifisch exprimiert und wirken post-translational als negative Regulatoren der Genexpression (Y. Shi *et al.*, 2010). Die Expression von miRNAs ist ubiquitär, wobei über 50 % der humanen miRNAs im ZNS exprimiert werden (Shao *et al.*, 2010). Eine entscheidende Rolle nehmen sie bei der Kontrolle des Gleichgewichtes zwischen Selbsterneuerung oder Linien-spezifischer Differenzierung von Stammzellen ein, indem sie an der Expression von Stammzellregulatoren beteiligt sind (Y. Shi *et al.*, 2010). Zu diesen miRNAs zählen unter anderem Mitglieder der evolutionär konservierten let-7 Familie, die entscheidend an Prozessen der Selbsterneuerung und Differenzierung von NSCs beteiligt sind. So induzierte beispielsweise die Überexpression von let-7a in NSCs die Neuronenbildung und let-7b führte zum Austritt aus dem Zellzyklus und unterstützte die neuronale Differenzierung (Schwamborn *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Insbesondere der Zusammenhang einer post-translationalen Regulation der let-7 Familie von miRNAs durch das RNA-bindende Protein Lin-28 ist angesichts des Einflusses der Lactone auf die Lin-28 Expression interessant (Roush & Slack, 2008). Lin-28 inhibiert die Prozessierung der primären let-7 Transkripte durch die Ribonuklease III Drosha, sowie die Prozessierung der miR-128 durch Competition mit der Endoribonuklease Dicer (Breving & Esquela-Kerscher, 2010). Im umgekehrten Fall der neuronalen Differenzierung akkumuliert ausgereifte let-7 miRNA und reprimiert die weitere Expression von Lin-28 durch Bindung der 3' UTR der Lin-28 mRNA (Y. Huang, 2012). Neben Vertretern der let-7 Familie übt ebenso die miR-125 3' UTR-abhängig einen reprimierenden Einfluss auf die Lin-28 Expression aus. Der in NSCs stark exprimierte transkriptionelle Repressor neuronaler Gene REST (RE1-Silencing Transcription Factor) inhibiert die Expression der miRs-9 und -124, wohingegen während der Differenzierung Teile des REST-Komplexes durch miR-9 und miR-124 negativ post-translational beeinflusst werden (Shenoy & Blelloch, 2014). Die Regulation der miR-145 ist eng mit der Expression des Pluripotenzfaktors Oct-4 in einer doppelt negativen Rückkopplung verknüpft. Im Pluripotenzstadium wird die Promotoraktivität der miR-145 durch Bindung von Oct-4 reprimiert. Die miR-145 selbst wird im Stadium der Differenzierung hoch reguliert und unterdrückt durch Bindung an die 3' UTR der Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2 und Klf-4 deren Expression, und somit die Fähigkeit der Zellselbsterneuerung (N. Xu *et al.*, 2009).

Die beschriebenen, neuronal regulatorischen miRNAs wurden nachfolgend in ihrer Expression mit oder ohne neuronalen Stimulus mit 1 μ M RA, und bei Applikation der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa nach vier (Abbildung 22) und sieben (Abbildung 23) Tagen untersucht. Ohne initiale Stimulation mit RA nach vier Tagen führte die Applikation mit Gal und Et-Oxa nur zu geringfügigen Veränderungen in der Expression der untersuchten miRNAs, welche eine 1,8-fache Erhöhung nicht überschritten. Den größten Einfluss übte hierbei S-Curv mit neun von elf signifikant erhöhten miRNAs aus, wobei eine Erhöhung um den Faktor 3,2 nicht überschritten wurde. Die Applikation von Dhc hatte in einer 2,3-fachen Erhöhung der Transkriptionsrate von let-7e ihre größte Änderung (Abbildung 22, A).

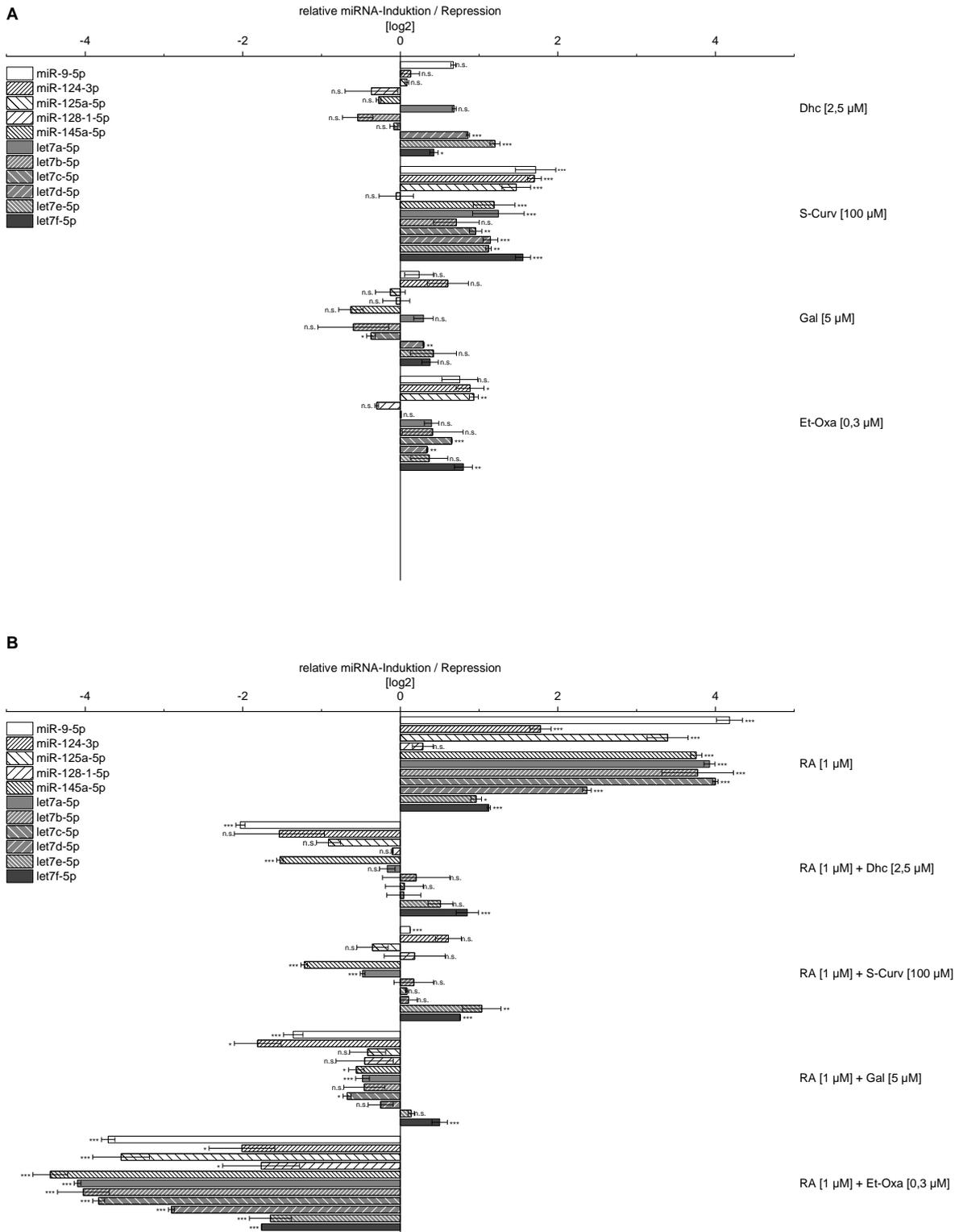


Abbildung 22: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die Expression neuronal regulatorischer miRNAs nach vier Tagen Kultivierung. A: Expression der miRNAs aus der Gesamt-RNA von P19-Zellen nach vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 µM], S-Curv [100 µM], Gal [5 µM] und Et-Oxa [0,3 µM]. B: Expression von miRNAs aus der Gesamt-RNA von P19-Zellen vier Tage

nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 μ M], sowie vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der behandelten gegen die unbehandelten P19-Zellen (A), bzw. mit dem jeweiligen Lacton behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben (B). Als endogene Kontrolle wurde jeweils die miRNA-Expression der Small Nucleolar RNA, C/D Box 66 (*snord66*) genutzt. (Mittelwert +/- SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Durch initiale Stimulation mit 1 μ M RA konnten alle miRNAs, bis auf miR-128, in ihrer relativen Expression nach vier Tagen signifikant gesteigert werden, wobei miR-9 mit Faktor 18 die größte und let-7e mit Faktor 2 die geringste Änderung erfuhren (Abbildung 22, B). Den mit Abstand stärksten reprimierenden Einfluss auf RA-induzierte Expressionen der neuronalen miRNAs übte die Behandlung mit 300 nM Et-Oxa aus. Hierbei konnten alle miRNAs signifikant reduziert werden, wobei bis auf miR-9 und let-7c alle Expressionen unter das uninduzierte Niveau gesenkt wurden. Die let-7f-miRNA wurde durch die Applikation der drei anderen Testsubstanzen in ihrer Expression 1,4- bis 1,8-fach positiv beeinflusst. Eine vermehrte Expression um den Faktor 2 konnte überdies bei let-7e durch S-Curv beobachtet werden. Dhc konnte die Expressionen der miR-9 (4-fach) und miR-145 (2,9-fach) signifikant negativ beeinflussen. Durch Applikation von 100 μ M S-Curv verringerten sich die Expressionsraten von miR-145 (2,3-fach) und let-7a (1,4-fach) signifikant. Gal konnte fünf der elf miRNAs signifikant reduzieren, wobei die miRs-9 (Faktor 2,5) und -124 (Faktor 3,5) die größte Änderung erfuhren.

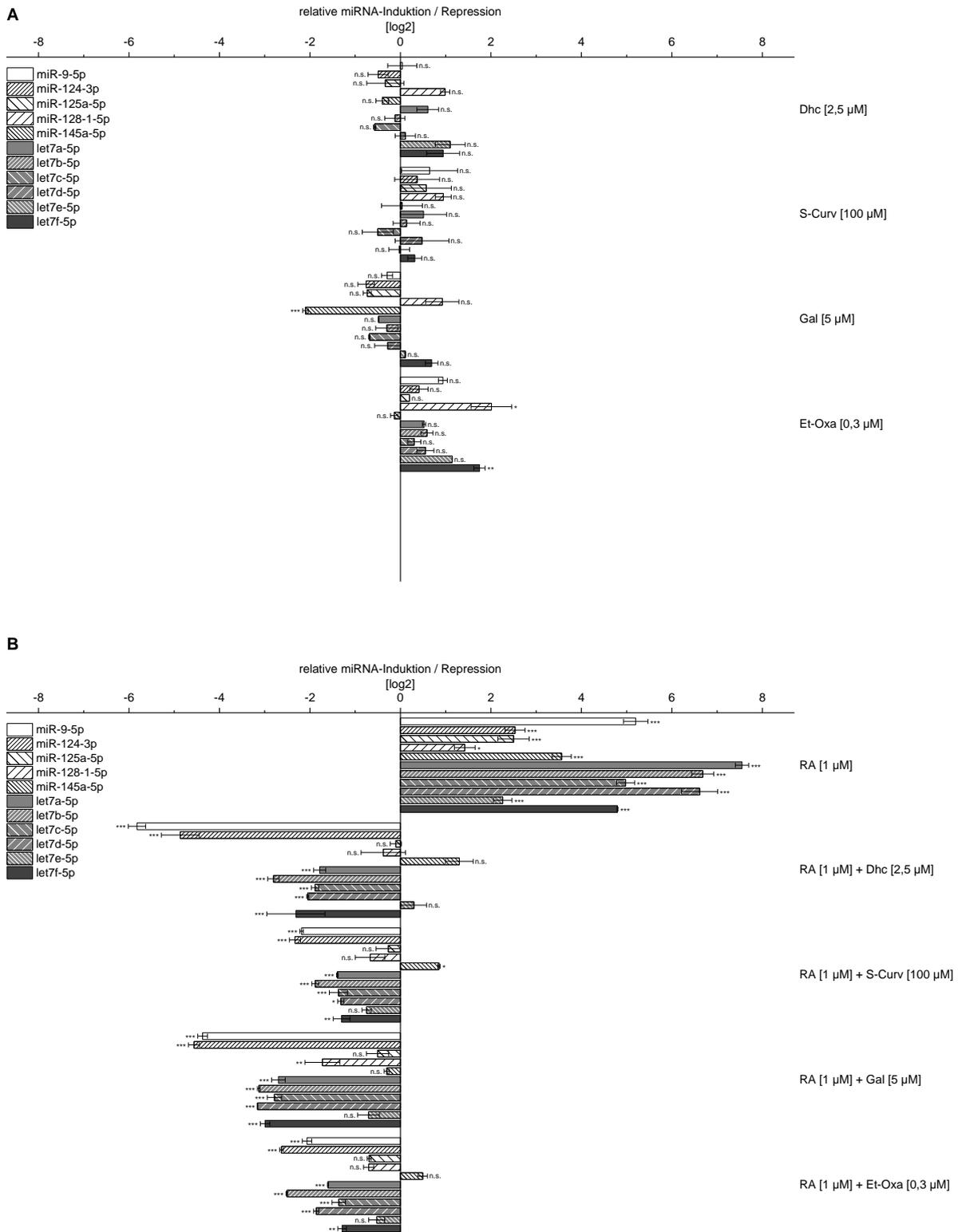


Abbildung 23: Einfluss der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa auf die Expression neuronal regulatorischer miRNAs nach sieben Tagen Kultivierung. A: Expression der miRNAs aus der Gesamt-RNA von P19-Zellen nach sieben Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 µM], S-Curv [100 µM], Gal [5 µM] und Et-Oxa [0,3 µM]. B: Expression miRNAs aus der Gesamt-RNA von P19-Zellen sieben

Tage nach initialer neuronaler Induktion mit RA [1 μ M], sowie vier Tagen Behandlung mit den Lactonen Dhc [2,5 μ M], S-Curv [100 μ M], Gal [5 μ M] und Et-Oxa [0,3 μ M]. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der behandelten gegen die unbehandelten P19-Zellen (A), bzw. mit dem jeweiligen Lacton behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben (B). Als endogene Kontrolle wurde jeweils die miRNA-Expression der Small Nucleolar RNA, C/D Box 66 (*snord66*) genutzt. (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Eine 7-tägige Applikation der Testsubstanzen führte ohne RA-Induktion bei Dhc und S-Curv zu keiner signifikanten Änderung der miRNA Expressionen (Abbildung 23, A). Einzig die miR-145 wurde durch 5 μ M Gal um den Faktor 4,2 reprimiert. Die Behandlung mit Et-Oxa führte bei unstimulierten P-19 Zellen zu einer Induktion der miR-128- und let-7f-Expressionen (3,3-fach). Die Induktion mit RA hatte nach sieben Tagen eine signifikante Expressionssteigerung aller miRNAs zur Folge (Abbildung 23, B). Die miR-128 wurde mit Faktor 2,7 am schwächsten, die let-7a miRNA mit Faktor 187 am stärksten beeinflusst. Durch Dhc konnten die Expressionen von sieben der elf miRNAs um mindestens das 3,4-fache reduziert werden, wobei die miRNAs-9 (56-fach) und -124 (29-fach) unter das uninduzierte Expressionsniveau gesenkt wurden. Durch die Inkubation mit Gal wurden acht der elf miRNAs in ihrem Transkriptionsniveau gesenkt, wobei auch hier die miRs-9 (20-fach) und -124 (23-fach) die stärkste Repression erfuhren. Auch S-Curv bedingte bei sieben miRNAs eine Reduktion der Expression um wenigstens den Faktor 2,5 (let-7d) und höchstens den Faktor 5 (miR-124). Der starke inhibitorische Effekt durch 300 nM Et-Oxa konnte nach sieben Tagen nicht mehr in diesem Maße festgestellt werden, obgleich sieben der elf miRNAs signifikant reduziert wurden. Hierbei konnte der stärkste Effekt in Bezug auf die miRNAs miR-124 (6,2-fach) und let-7b (5,7-fach) beobachtet werden.

3.3 *Rubia cordifolia*

Rubia cordifolia gehört zur Familie der *Rubiaceae* und wird auch als indischer Krapp bezeichnet. Die Wurzeln können eine Länge von bis zu einem Meter erreichen und eine Dicke von 12 mm im Durchmesser erreichen. In der traditionellen indischen Heilkunst Ayurveda dienen die Wurzeln als Quelle medizinischer Anwendungen.

3.3.1 Extraktion von *Rubia cordifolia*

Getrocknete Wurzeln, bereit gestellt von Sanofi, wurden mit ausreichend Methanol bedeckt und unter Schütteln für 2 h extrahiert. Die Extraktionsbrühe wurde unter Vakuum bis zur Trocknung eingeengt und nachfolgend mittels Chromatographie an Kieselgel 60 aktivitätsgebunden fraktioniert.

3.3.2 Aktivitätsgebundene Isolierung aus *Rubia cordifolia*

Ausgehend von dem Rohextrakt aus 500 g getrockneter Wurzeln wurden die durch Chromatographie an Kieselgel 60 erhaltenen Fraktionen auf ihre inhibitorische Aktivität auf die durch TGF- β 1 induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion untersucht. Die weitere Aufreinigung, ausgehend von der mit dem Gradienten 50:50 (Cyclohexan : Ethylacetat) inhibitorisch aktivsten Fraktion (Restaktivität von 2 % der TGF- β 1 induzierten SMAD2/3-Signaltransduktion; Daten nicht gezeigt), erfolgte nach Aktivität der weiteren Fraktionierung und ist im nachfolgenden Diagramm dargestellt.

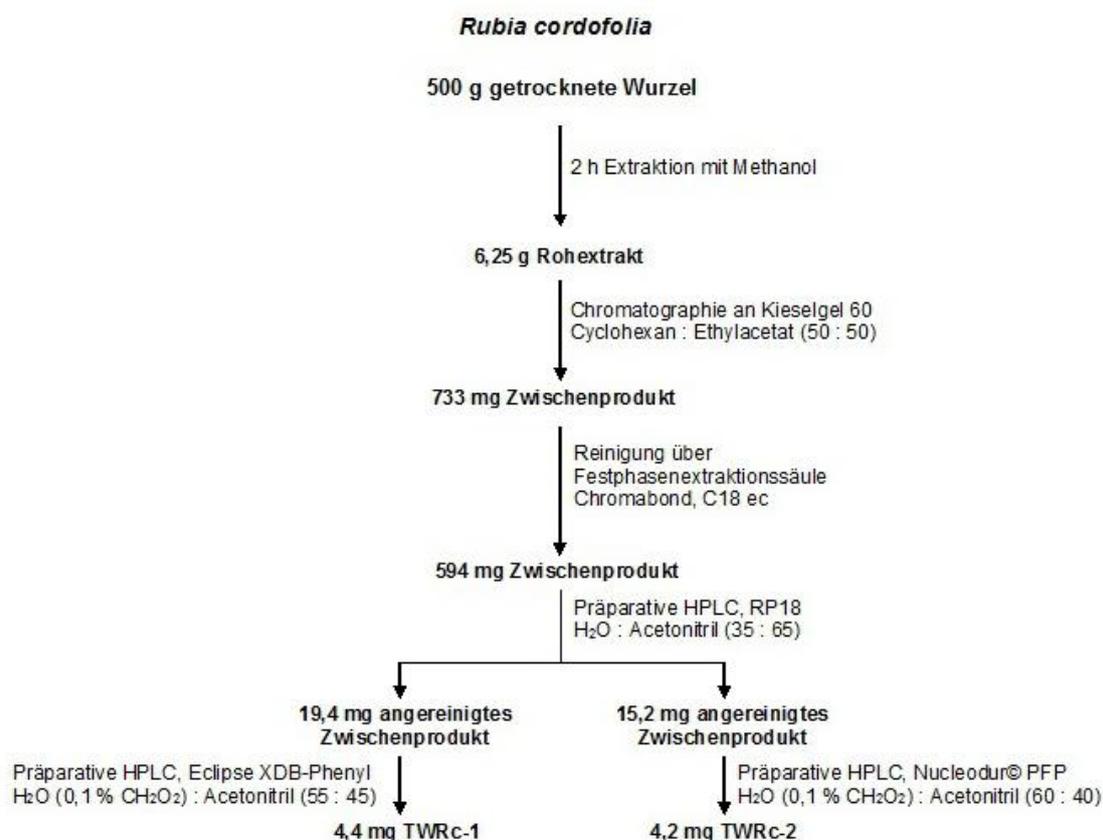


Abbildung 24: Extraktionsschema zur Reindarstellung von TWRc-1 und TWRc-2.

3.3.2.1 Physikalisch-chemische Analyse von TWRc-1

Die Substanz in ungelöstem Zustand kennzeichnet sich durch hyalinen, öligen Charakter, welcher in Lösung ebenfalls farblos verbleibt. Die Löslichkeit bei höheren Konzentrationen als 1 mg/ml ist in polar-protischen Lösungsmitteln stark vermindert. Die Strukturaufklärung (Abb. 21, C) mittels NMR-Spektroskopie wurde freundlicherweise von der AG Opatz (Institut für Organische Chemie, Uni Mainz) durchgeführt und lieferte für TWRc-1 die Summenformel

$C_{18}H_{32}O_3$. Die Bestimmung des Molekulargewichtes mittels positiver und negativer Elektrospray-Ionisation lieferte ein Molekulargewicht von 296,4 g/mol mit folgenden Masse-zu-Ladung-Verhältnissen:

ESI-MS (pos.): m/z (%) = 279.2 (100) $[M-H_2O+H]^+$, 319.2 (29) $[M+Na]^+$

ESI-MS (neg.): m/z (%) = 295.2 (100) $[M-H]^-$.

Es handelt sich hierbei um eine bis dato in dieser Form unbekannte ungesättigte Hydroxyfettsäure (oder auch Omega-9-Fettsäure) mit dem IUPAC-Namen 6-Hydroxy-7-,9-octadecadienoic acid, deren Struktur in Abbildung 25 (C) dargestellt ist. Die Bezeichnung in dieser Arbeit verbleibt beim Trivialnamen TWRc-1. Das UV-Vis-Spektrum (Abbildung 25, B) zeigt ein Absorptionsmaximum bei 233 nm und die Retentionszeit im Gradient G1 (mit 0,1 % HCOOH) beträgt 15,85 min (Abbildung 25, A).

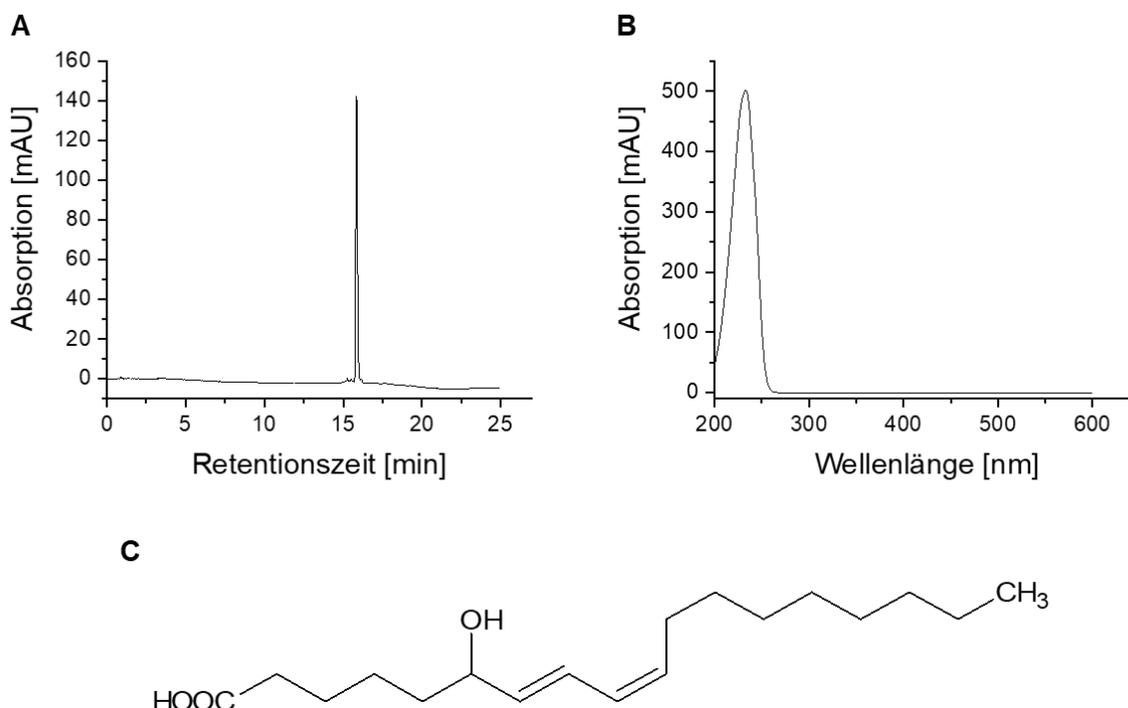


Abbildung 25: Chromatogramm im Gradient G1 (A), UV-/Vis-Spektrum (B) und Strukturformel (C) von TWRc-1.

3.3.2.2 Physikalisch-chemische Analyse von TWRc-2

In Lösung hat die Verbindung eine gelbe Färbung, die sich ungelöst als gelbes Pulver niederschlägt. Polar-protische Lösungsmittel eignen sich schlecht, um die Substanz in Lösung zu bringen. Mittels NMR-Spektroskopie erfolgte die Strukturaufklärung (Abbildung 26, C) mit der Summenformel $C_{18}H_{32}O_3$, freundlicherweise durchgeführt von der AG Opatz (Institut für

Organische Chemie, Uni Mainz), lieferte für TWRc-1 die Summenformel $C_{15}H_{10}O_4$. Mit Hilfe positiver und negativer Elektrospray-Ionisation wurde die massenspektrometrische Analyse durchgeführt, wobei ein Molekulargewicht von 254,2 g/mol, mit folgenden Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen, für die Verbindung aufgeklärt wurde:

ESI-MS (pos.): m/z (%) = 255.0 (100) $[M+H]^+$

ESI-MS (neg.): m/z (%) = 253.1 (100) $[M-H]^-$

Die Substanz konnte als Rubiadin identifiziert werden, ein Anthrachinon, substituiert durch Hydroxygruppen an den Positionen 1 und 3 und eine Methylgruppe an Position 2 (Abbildung 26, C). Der IUPAC-Name lautet 1,3-Dihydroxy-2-methylantracene-9,10-dione. Im UV-Vis-Spektrum beträgt das Absorptionsmaximum 278 nm, bei weiteren lokalen Maxima von 204 nm, 245 nm und 413 nm (Abbildung 26, B). Im Gradient G1 (mit 0,1 % $HCOOH$) eluiert TWRc-2 bei einer Retentionszeit von 14,52 min (Abbildung 26, A).

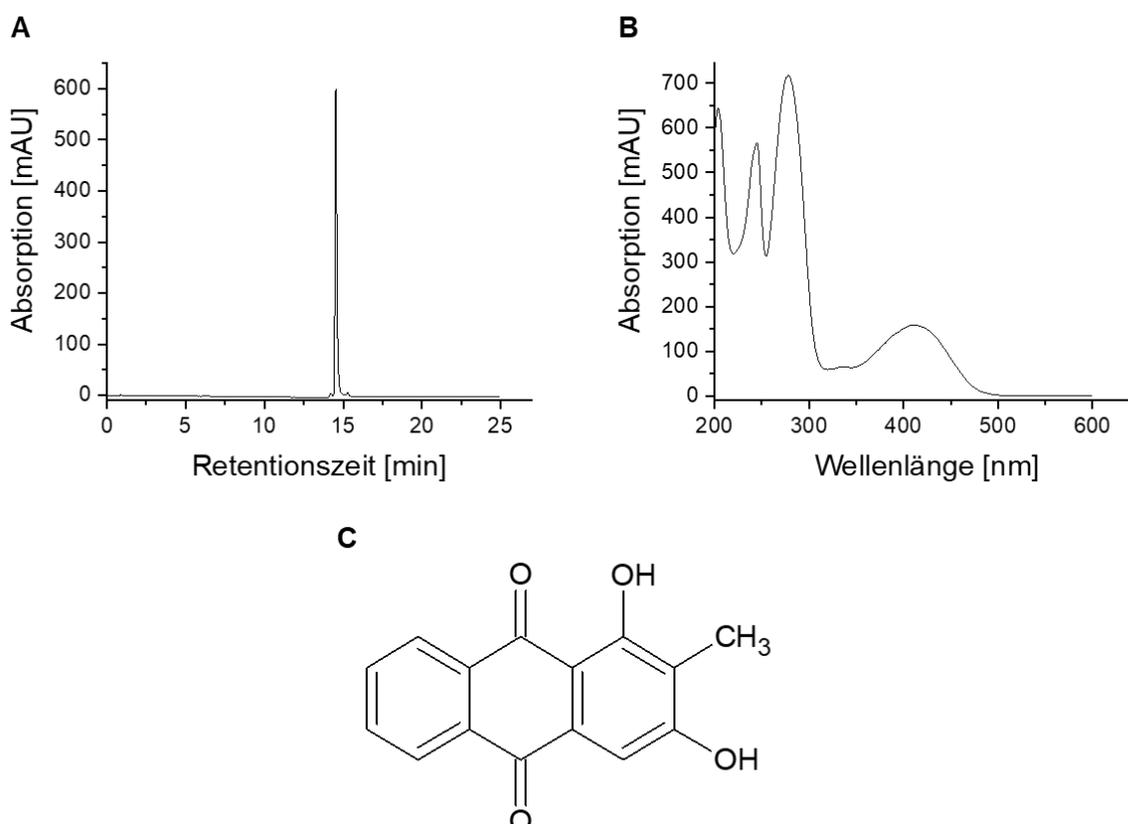


Abbildung 26: Chromatogramm im Gradient G1 (A), UV-/Vis-Spektrum (B) und Strukturformel (C) von TWRc-2.

3.3.3 Biologische Charakterisierung von TWRc-1 und TWRc-2 aus *Rubia cordifolia*

Rubia cordifolia gilt in der ayurvedischen Medizin als wichtige Heilpflanze zur Behandlung verschiedener Krankheiten. Der Pflanzenextrakt zeigte in einem induziertem Ratten-Pfotenödem-Modell antiinflammatorische Effekte (D. S. Antarkar, Chinwalla, Bhatt, & Vaiya, 1983). Des Weiteren wurden für Rubiadin, einem aus der Wurzel von *Rubia cordifolia* isoliertem Dihydroxyanthrachinon antioxidative Effekte, sowie präventive Effekte gegen die oxidative Lipiddegradation beobachtet (Tripathi, Sharma, & Manickam, 1997). Analgetische und antiinflammatorische Aktivität von Extrakten aus *Rubia cordifolia* wurden überdies von Shen *et al.* (2018) in einem Spektrum-Effekt-Beziehungs-Assay mittels HPLC-*fingerprints* untersucht, und unter anderem Rubiadin (TWRc-2) zugeschrieben. Die initiale Aufreinigung von *Rubia cordifolia* vollzog sich aktivitätsgebunden hinsichtlich eines inhibierenden Einflusses auf die durch TGF- β induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion. Diese Signaltransduktion spielt bei vielen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Angiogenese eine Rolle, und wird in Bezug auf die pathophysiologische Ausprägung einer pulmonalen Fibrose infolge einer chronischen asthmatischen Endzündung der Atemwege als Hauptinduktor der EMT angesehen (B. C. Willis & Borok, 2007).

3.3.3.1 Wirkung von TWRc-1 und TWRc-2 auf die SMAD2/3-vermittelte Signaltransduktion

Zur initialen Aktivitätsgebundenen Fraktionierung der Extraktionsbrühe aus getrockneten Wurzeln der Pflanze *Rubia cordifolia* wurde die, für die Entstehung von EMT primär entscheidende, TGF- β -induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion auf Basis eines Reportergenassays untersucht (Kasai, Allen, Mason, Kamimura, & Zhang, 2005). BEAS-2B-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt CAGA_{9x}-MLP-Luc, sowie dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1 α transient transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Applikation verschiedener Konzentrationen der Testverbindungen sowie die Stimulation mit 5 ng/ml TGF- β für weitere 24 h. Die Luciferaseaktivität des experimentellen Plasmids wurde gegen die Aktivität des Kontrollvektors pRL-EF1 α normalisiert.

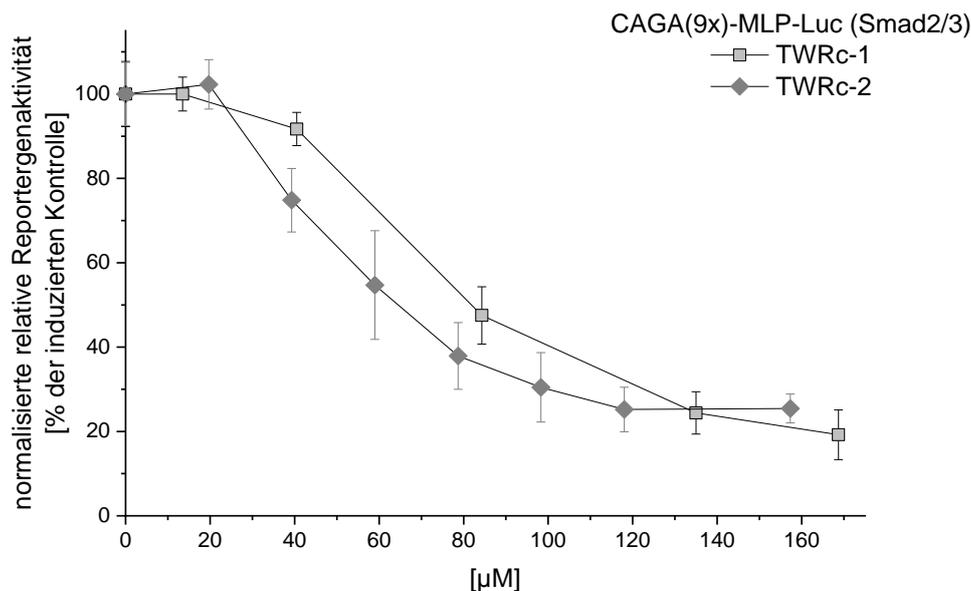


Abbildung 27: Einfluss von TWRc-1 und TWRc-2 auf die TGF- β -induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion. BEAS-2B-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt CAGA_{9x}-MLP-Luc transient transfiziert. Zur internen Normalisierung wurde der konstitutiv aktive Kontrollvektor pRL-EF1 α Co-transfiziert. Die Applikation von verschiedenen Konzentrationen TWRc-1 bzw. TWRc-2, sowie die Induktion mit 5 ng/ml TGF- β erfolgte für 24 h. Die Expression der *Firefly*-Luciferase wurde gegen die Expression der *Renilla*-Luciferase des Kontrollvektors normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten ($p \leq 0,001$).

Für die SMAD2/3-abhängige Signaltransduktion in BEAS-2B-Zellen aus Abbildung 27 ergab sich für TWRc-1 eine IC₅₀ von 82 μ M ($\pm 3,01 \mu$ M). TWRc-2 inhibierte diese Signalweiterleitung mit einer ermittelten IC₅₀ von 62 μ M ($\pm 6,53 \mu$ M). Die höchstapplizierte Konzentration von 168,7 μ M (TWRc-1) und 157,3 μ M (TWRc-2) führte zu einer maximal verringerten Restaktivität von nicht weniger als 20 %.

3.3.3.2 Wirkung von TWRc-1 und TWRc-2 auf inflammatorisch relevante Signaltransduktionen

Um zu erörtern, ob die Hemmung durch beide Verbindungen Signalkaskadenspezifisch erfolgt, oder ob proinflammatorische und weitere Asthma-pathologische Signaltransduktionen ebenfalls, oder in stärkerem Maße beeinflusst werden, wurde ihr Einfluss auf weitere Signalwege und Promotoraktivitäten untersucht. Hierfür wurde zunächst die Wirkung einer JAK-STAT-Signaltransduktion, in diesem Fall auf die durch IL-4 induzierte STAT6-abhängige Signaltransduktion untersucht. Hierfür wurden BEAS-2B-Zellen mit dem Reportergenplasmid pGL-3-TK-7xN₄, dem Expressionsvektor TOPO/STAT6, sowie dem konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL-EF1 α transient transfiziert. 24 Stunden nach Induktion mit 10 ng/ml IL-4

und Applikation der Verbindungen wurde die Luciferaseaktivität gegen die Aktivität des Kontrollvektors pRL-EF1 α ermittelt.

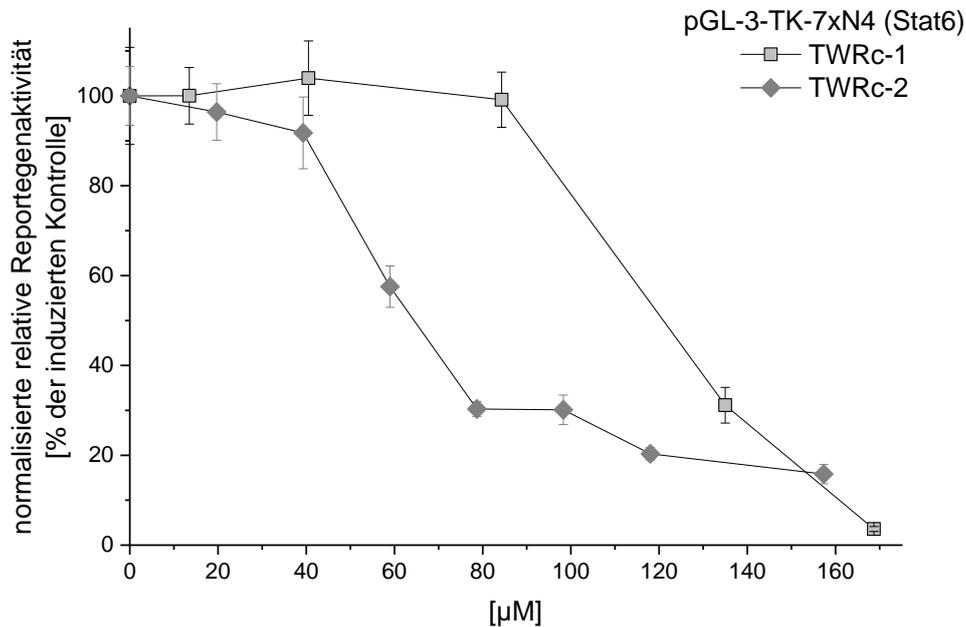


Abbildung 28: Einfluss von TWRc-1 und TWRc-2 auf die IL-4-induzierte STAT6-Signaltransduktion. BEAS-2B-Zellen wurden mit den Vektoren pGL-3-TK-7xN4 und TOPO/STAT6 transient transfiziert. Der konstitutiv aktive Kontrollvektor pRL-EF1 α wurde zur Normalisierung Co-transfiziert. Nach 24 h wurden verschiedene Konzentrationen TWRc-1 bzw. TWRc-2 appliziert, sowie mit 10 ng/ml IL-4 für weitere 24 h induziert. Die Expression des experimentellen Reportergens wurde gegen die Expression des Kontrollvektors pRL-EF1 α normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten ($p < 0,001$)

Für die STAT6-abhängige Signaltransduktion in BEAS-2B-Zellen, dargestellt in Abbildung 28, ergab sich für TWRc-1 eine IC_{50} von 126 μ M ($\pm 5,31 \mu$ M) und eine bestimmbare IC_{90} von 151 μ M ($\pm 2,6 \mu$ M). TWRc-2 inhibierte zwar die betreffende Signalweiterleitung mit einer ermittelten IC_{50} von 63 μ M ($\pm 5,54 \mu$ M), jedoch konnte bei der höchstapplizierten Konzentration von 157,3 μ M eine Restaktivität von nicht weniger als 16 % ermittelt werden, weshalb keine IC_{90} errechnet wurde.

Um festzustellen, ob beide Verbindungen auch Einfluss auf die initiale Entzündungsreaktion haben, wurde auf der Basis von Reportergenen der NF- κ B-vermittelte Signalweg und die Promotoraktivität des entzündungsrelevanten Gens *ip-10* untersucht. Hierzu wurden BEAS-2B-Zellen mit den Reportergenvektoren pNF- κ B-Luc (NF- κ B), bzw. pGL-4-IP-10pro (*ip-10* Promotoraktivität) transient mittels Elektroporation in BEAS-2B-Zellen eingebracht, sowie jeweils mit pRL-EF1 α Co-transfiziert. Die Induktion erfolgte mit dem proinflammatorischen

Zytokin TNF- α (NF- κ B) und TNF- α in Kombination mit IFN- γ und IL1- β (*ip-10*-Promotoraktivität).

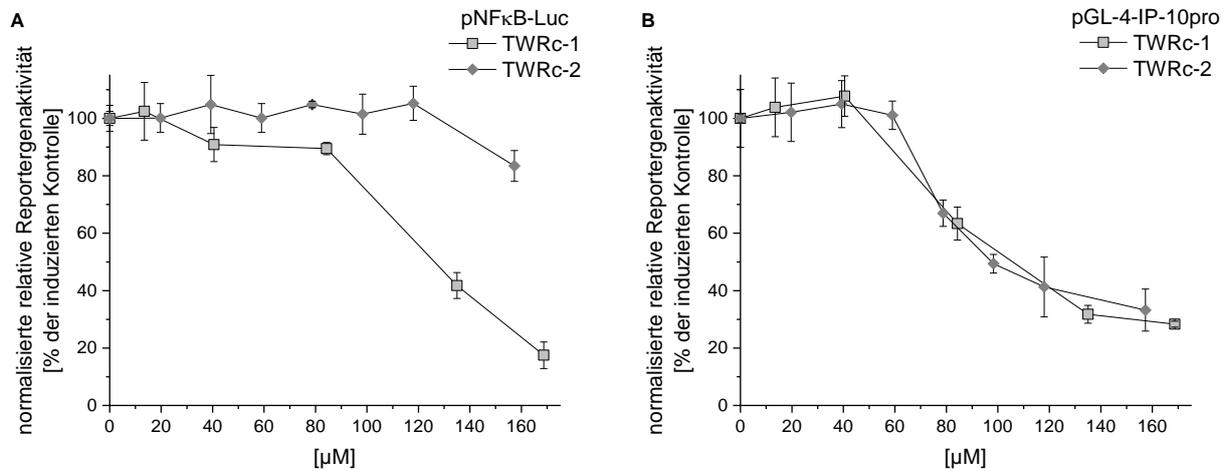


Abbildung 29: Einfluss von TWRc-1 und TWRc-2 auf die NF- κ B-Signaltransduktion und die Promotoraktivität von *ip-10*. BEAS-2B-Zellen wurden mit den Vektoren pNF- κ B-Luc (NF- κ B) bzw. pGL-4-IP-10pro (*ip-10*-Promotoraktivität) transient transfiziert. Der konstitutiv aktive Kontrollvektor pRL-EF1 α wurde zur Normalisierung Co-transfiziert. Nach 24 h wurden verschiedene Konzentrationen TWRc-1 bzw. TWRc-2 appliziert, sowie mit 10 ng/ml TNF- α bzw. 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β für weitere 24 h induziert. Die Expression des experimentellen Reportergens wurde gegen die Expression des Kontrollvektors pRL-EF1 α normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten ($p < 0,01$; NF- κ B) ($p < 0,001$; *ip-10*-Promotoraktivität).

TWRc-1 inhibierte die NF- κ B-abhängige Signalübertragung (Abbildung 29, A), als auch die *ip-10*-Promotoraktivität (Abbildung 29, B) in den entsprechenden Reporteranalysen mit IC_{50} -Werten von 128 μ M ($\pm 3,23 \mu$ M) bzw. 88 μ M ($\pm 2,69 \mu$ M). Durch TWRc-2 konnte lediglich in Bezug auf die reduzierte Reporteraktivität des *ip-10*-Promotors eine IC_{50} von 94 μ M ($\pm 3,79 \mu$ M) ermittelt werden, wohingegen die Signaltransduktion durch NF- κ B weitgehend unbeeinflusst blieb und lediglich die Höchstkonzentration von 157,3 μ M eine Inhibition von 16 % bedingte. Zur internen Normalisierung wurde, wie bereits erwähnt, der Vektor pRL-EF1- α Co-transfiziert um Schwankungen in der Zellviabilität, Transfektionseffizienz und der Probenaufbereitung weitestgehend auszuschließen. Hieraus zeigte sich, dass alle applizierten Konzentrationen zu keiner nennenswerten Inhibition des konstitutiv aktiven Promotors des Elongationsfaktors α führte (Daten diesbezüglich bereits normalisiert).

3.3.3.3 Einfluss von TWRC-1 und TWRC-2 auf Zytotoxizität und Zellviabilität

Mikroskopische Effekte, welche vergleichend unter Einfluss der applizierten Verbindungen und unbehandelt betrachtet wurden, konnten nicht festgestellt werden. Um sicher zu stellen, dass die Wirkung beider *R. cordifolia*-Isolate tatsächlich nicht in einer Minderung der Zellviabilität begründet oder auf zytotoxische Effekte zurückzuführen ist, wurde zum einen der Einfluss auf die metabolische Aktivität mittels eines XTT-Assays (vgl.: 2.2.3.6.2), und zum anderen zytotoxische Effekte durch eine Giemsa-Färbung (vgl.: 2.2.3.6.1) untersucht. Die Applikation der Testsubstanzen erfolgte jeweils für 24 h, nachdem, wie in 2.2.3.6.1 beschrieben, BEAS-2B-Zellen in einer definierten Zellzahl bereits 24 h bebrütet wurden. Zur Ermittlung der Zellviabilität und der Lebendzellzahl wurde die Absorption behandelter Zellen gegen unbehandelte Zellen aufgetragen. Die Konzentrationen, als auch die Inkubationszeiten wurden den Reporterassays entsprechend gewählt.

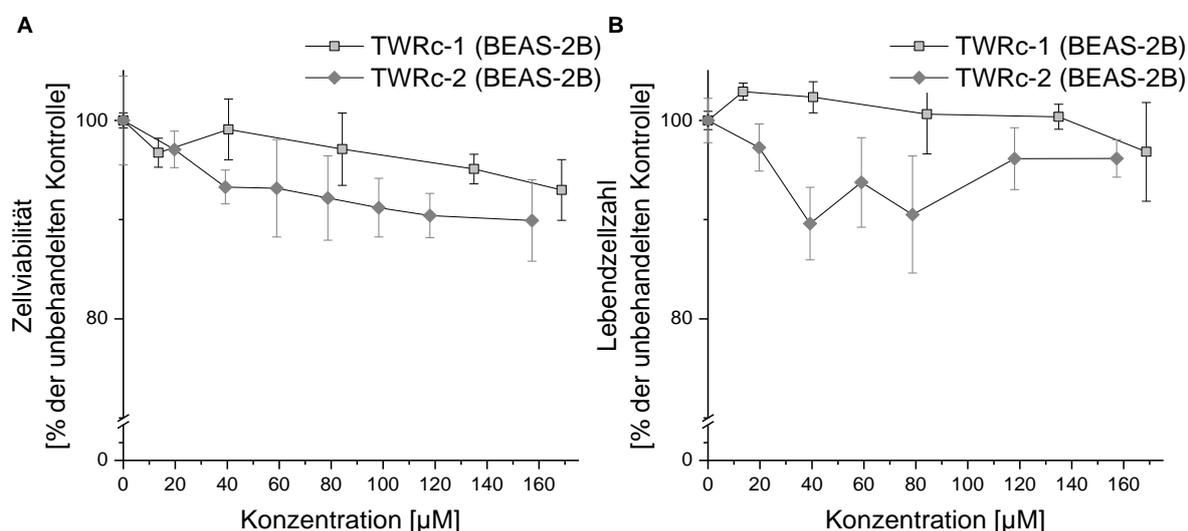


Abbildung 30: Einfluss von TWRC-1 und TWRC-2 auf die Zellviabilität und Lebendzellzahl. A: BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an TWRC-1/2 behandelt und die Zellviabilität mittels XTT-Assay quantitativ bestimmt. B: BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an TWRC-1/2 behandelt und die Lebendzellzahl anhand Giemsa-gefärbter Zellen quantitativ bestimmt. (Dargestellt ist der MW \pm SEM von jeweils drei biologischen zu je zwei technischen Replikaten; $p = n.s$ vs. unbehandelt).

Sowohl TWRC-1, als auch TWRC-2 zeigten hinsichtlich der quantitativ bestimmten Lebendzellzahl durch Giemsa-Färbung und der metabolischen Aktivität via XTT-Test keine Beeinflussung von mehr als 10 % in Bezug auf unbehandelte BEAS-2B-Referenzzellen (Abbildung 30).

3.3.3.4 Effekt von TWRc-1 und TWRc-2 auf die Transkription inflammatorisch relevanter Gene

Ausgehend von der Betrachtung der inhibitorischen Wirkung auf die *cxcl-10*-Promotoraktivität (Abbildung 29, B) durch beide *R. cordifolia*-Isolate wurde nachfolgend der Einfluss auf transkriptioneller Ebene auf die mRNA-Expression von *ip-10* und weiterer proinflammatorischer Gene untersucht. Hierzu wurden BEAS-2B-Zellen für eine Stunde mit zwei Wirkstoffkonzentrationen vorinkubiert und weitere 7 h mit Cytomix (CM, 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β) stimuliert. Danach erfolgte, wie unter 2.2.3.13 beschrieben, die Extraktion der RNA und Erstellung der cDNA. Die relative Quantifizierung mittels qRT-PCR ist in den Abbildung 31 Abbildung 32 graphisch erfasst. Induzierte und nicht-induzierte Ansätze ohne Wirkstoff dienen jeweils als Kontrolle.

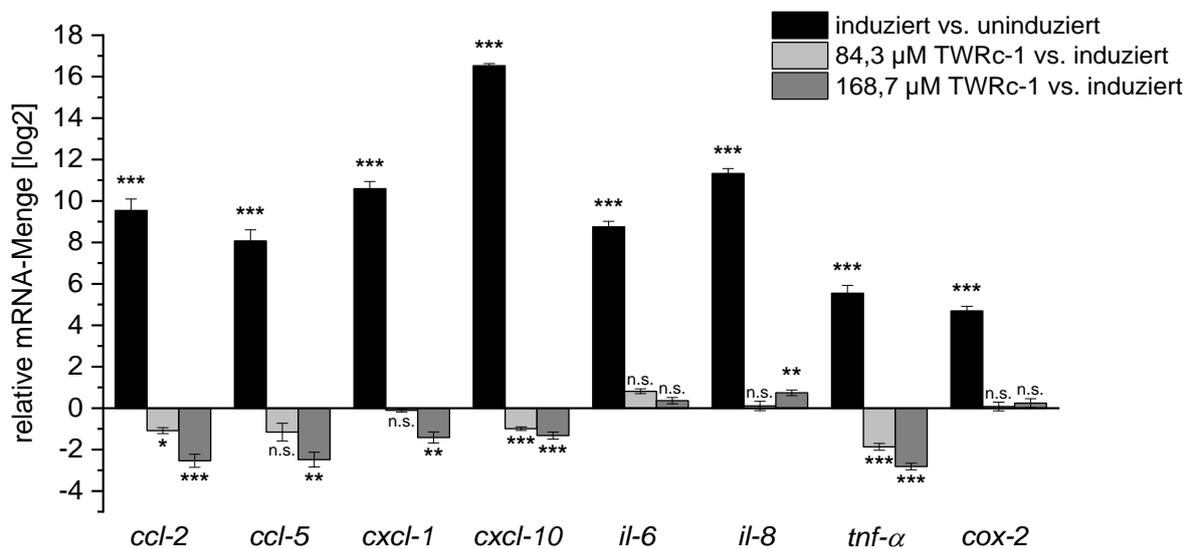


Abbildung 31: Wirkung von TWRc-1 auf die relative mRNA-Menge proinflammatorischer Gene. Nach einstündiger Vorbehandlung mit 84,3 μ M und 168,7 μ M TWRc-1 wurden die BEAS-2B-Zellen 7 h mit CM (10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β) stimuliert. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der induzierten gegen die uninduzierten Zellen, bzw. von TWRc-1 behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben. Als Referenzgen diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*). (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Bei Betrachtung des Einflusses von TWRc-1 auf das Transkriptlevel zeigten alle mRNA-Mengen der inflammatorisch bedeutsamen Chemokine und Zytokine eine durch Induktion mit CM gesteigerte mRNA-Expression um wenigstens den Faktor 47, wobei die geringste

Steigerung der mRNA-Menge (26-fach) das Enzym Cyclooxygenase-2 betraf (Abbildung 31). Die stärkste Induktion der mRNA-Expression mit einer nahezu 10^5 -fachen Steigerung konnte bei dem CXC-Chemokin *ip-10* beobachtet werden. Durch $168,7 \mu\text{M}$ TWRc-1 konnte die mRNA-Expression des Zytokins *tnf- α* (7-fach), sowie der Chemokine *ccl-2* (6-fach), *ccl-5* (5-fach), *cxcl-1* (3-fach) und *cxcl-10* (2-fach) signifikant reduziert werden. Die niedrigere Konzentration von $84,3 \mu\text{M}$ führte ebenso im Falle von *tnf- α* zur größten (3-fach) Inhibition der Transkriptmenge, wohingegen die Chemokine *ccl-2*, *ccl-5* und *cxcl-10* alle um den Faktor 2 transkriptionell gehemmt wurden. Die Transkriptlevel von *il-6* und *il-8*, sowie *cox-2* blieben durch TWRc-1 unbeeinflusst.

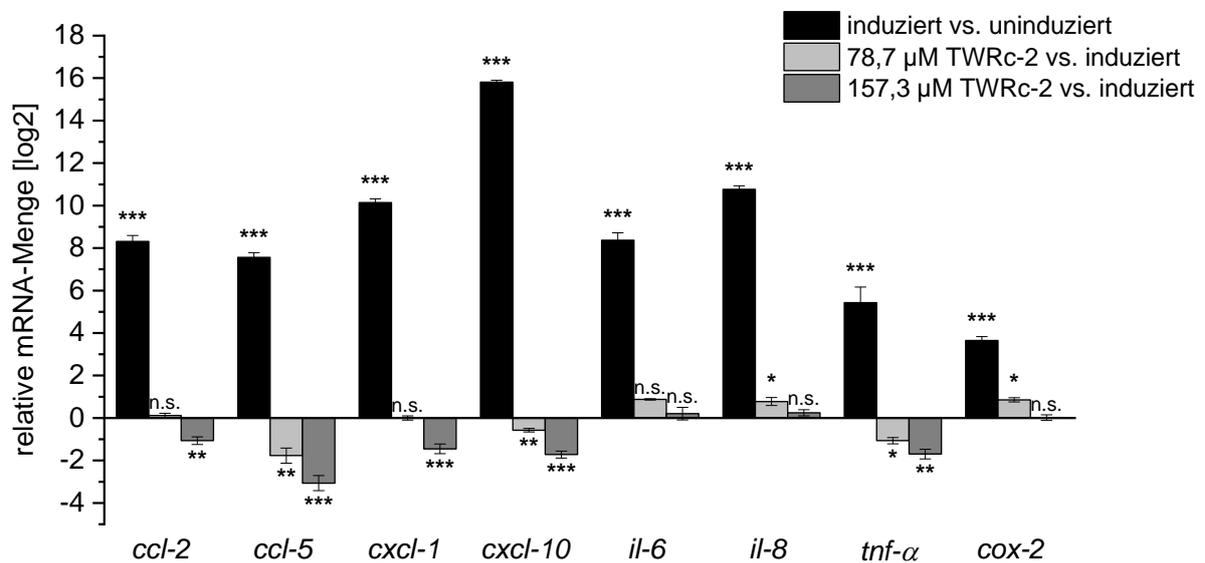


Abbildung 32: Wirkung von TWRc-2 auf die relative mRNA-Expression proinflammatorischer Gene. Die 7-stündige Induktion von BEAS-2B-Zellen mit CM (10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β) erfolgte nach einstündiger Vorbehandlung mit $78,7 \mu\text{M}$ und $157,3 \mu\text{M}$ TWRc-2. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der induzierten gegen die uninduzierte BEAS-2B-Zellen, bzw. von TWRc-1 behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben. Als Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) verwendet. (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; Varianzanalyse: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$ in Bezug auf Referenz)

Die CM-induzierte Steigerung der Transkriptmenge in Abbildung 32 zeigt eine nahezu identische Verteilung mit Abbildung 31. *cxcl-10* mit Faktor $5,7 \times 10^4$ und *cox-2* mit Faktor 12,5 gegenüber der nicht-induzierten Kontrolle zeigten die stärkste, bzw. schwächste Änderung gegenüber der nicht-induzierten Kontrolle. Bezüglich des Transkriptlevels unter Einfluss von

157,3 μM TWRc-2 zeigt sich eine signifikante Herabregulierung bei *ccl-5* (8-fach), *cxcl-10* (3-fach), *cxcl-1* (2-fach) und *ccl-2* (2-fach), sowie des Zytokins *tnf- α* (3-fach). Die niedrigere Konzentration von 78,7 μM führte bei *ccl-5* zur größten Inhibition der Transkriptmenge (3-fach), *tnf- α* konnte um den Faktor 2 und *cxcl-10* um 50 % transkriptionell gehemmt werden. Auf die mRNA-Expression von *il-6* und *il-8*, sowie *cox-2* nach Behandlung mit TWRc-2 konnte kein inhibitorischer Einfluss festgestellt werden.

3.3.3.5 Effekt von TWRc-1 und TWRc-2 auf die Transkription anti-apoptotischer Gene

Neben dem Effekt auf die Transkription proinflammatorischer Gene, wurden auch Gene mit Einfluss auf die Proliferation und Apoptose untersucht. So wurde neben dem pro-proliferativen Gen *cyclin d1* auch die mRNA-Expression der beiden „Inhibitor of apoptosis protein“ (IAP)-Gene *xiap* und *survivin* betrachtet. Chronische Atemwegserkrankungen wie *Asthma bronchiale* sind gekennzeichnet von einer erhöhten Persistenz eosinophiler Granulozyten in den Lungen asthmatischer Patienten, deren Vorkommen auch auf Inhibition von apoptotischen Prozessen zurückzuführen ist (Walsh, 2013). XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) inhibiert die Einleitung der Apoptose durch direkte Bindung der Caspasen 3, 7 und 9 (Zumbrägel *et al.*, 2017) und Survivin inhibiert die Apoptose durch Bindung von Caspase-9 und reguliert die Zellteilung (Mita, Mita, Nawrocki, & Giles, 2008). Der Effekt von TWRc-1 und TWRc-2 auf die anti-apoptotischen Gentranskriptionen ist in der nachfolgenden Abbildung 33 dargestellt. Die Expression des pro-proliferativen Gens *cyclin d1* wurde durch Stimulation mit CM um den Faktor 32, die Transkription des anti-apoptotischen Gens *xiap* um den Faktor 2,7 gesteigert. *Survivin* zeigte sich transkriptionell unbeeinflusst vom Stimulus. Eine signifikante Auswirkung auf anti-apoptotische und Zellzyklus-regulierende Gene konnten für beide Isolate nicht nachgewiesen werden.

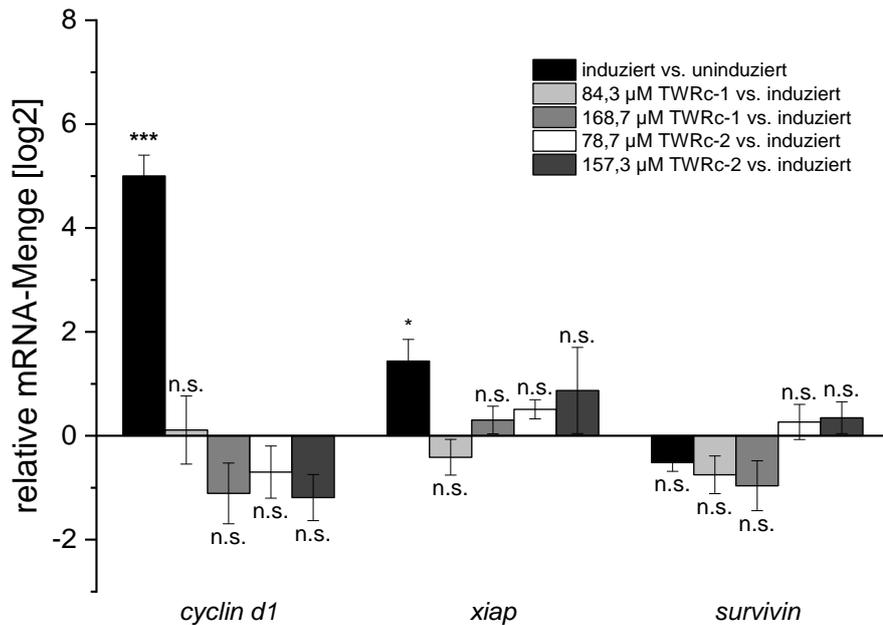


Abbildung 33: Wirkung von TWRc-1 und TWRc-2 auf die relative mRNA-Expression anti-apoptotischer Gene. Die 7-stündige Induktion von BEAS-2B-Zellen mit CM (10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β) erfolgte nach einstündiger Vorbehandlung mit entsprechenden Konzentrationen der Reinsubstanzen. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der induzierten gegen die uninduzierte BEAS-2B-Zellen, bzw. Substanz-behandelten, induzierten Zellen gegen unbehandelte, induzierte Zellen angegeben. Als Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) verwendet. (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; Varianzanalyse: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,001 = ***$ in Bezug auf Referenz)

3.3.3.6 Effekt von TWRc-1 und TWRc-2 auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine

Beide *R. cordifolia*-Isolate hemmen auf transkriptioneller Ebene die Zytokine *ccl-2*, *ccl-5*, *cxcl-10* und *tnf- α* . Um zu überprüfen, ob sich dieses Ergebnis auch auf die translationale Ebene übertragen lässt, wurde die Sekretion dieser proinflammatorischen Signalmoleküle von BEAS-2B-Zellen untersucht. Hierfür wurden BEAS-2B-Zellen in Medium ZM1 24 h inkubiert, danach für weitere 24 h in Medium ZM1b reduziert. Die Applikation zweier Konzentrationen der *R. cordifolia*-Isolate, sowie die Induktion mit 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β erfolgte für 24 h. Der Zellüberstand wurde mittels TCA-Fällung und anschließender Aceton-Waschung nach 2.2.3.7.4 präzipitiert und in SDS-Puffer (P14) resuspendiert. Gleiche Mengen an Protein wurden jeweils durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und nachfolgend mit spezifischen Primärantikörpern inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte mittels spezifischen HRP-konjugierten

Sekundärantikörpern. Die relative Proteinexpression und deren densitometrische Auswertungen sind in Abbildung 34 dargestellt.

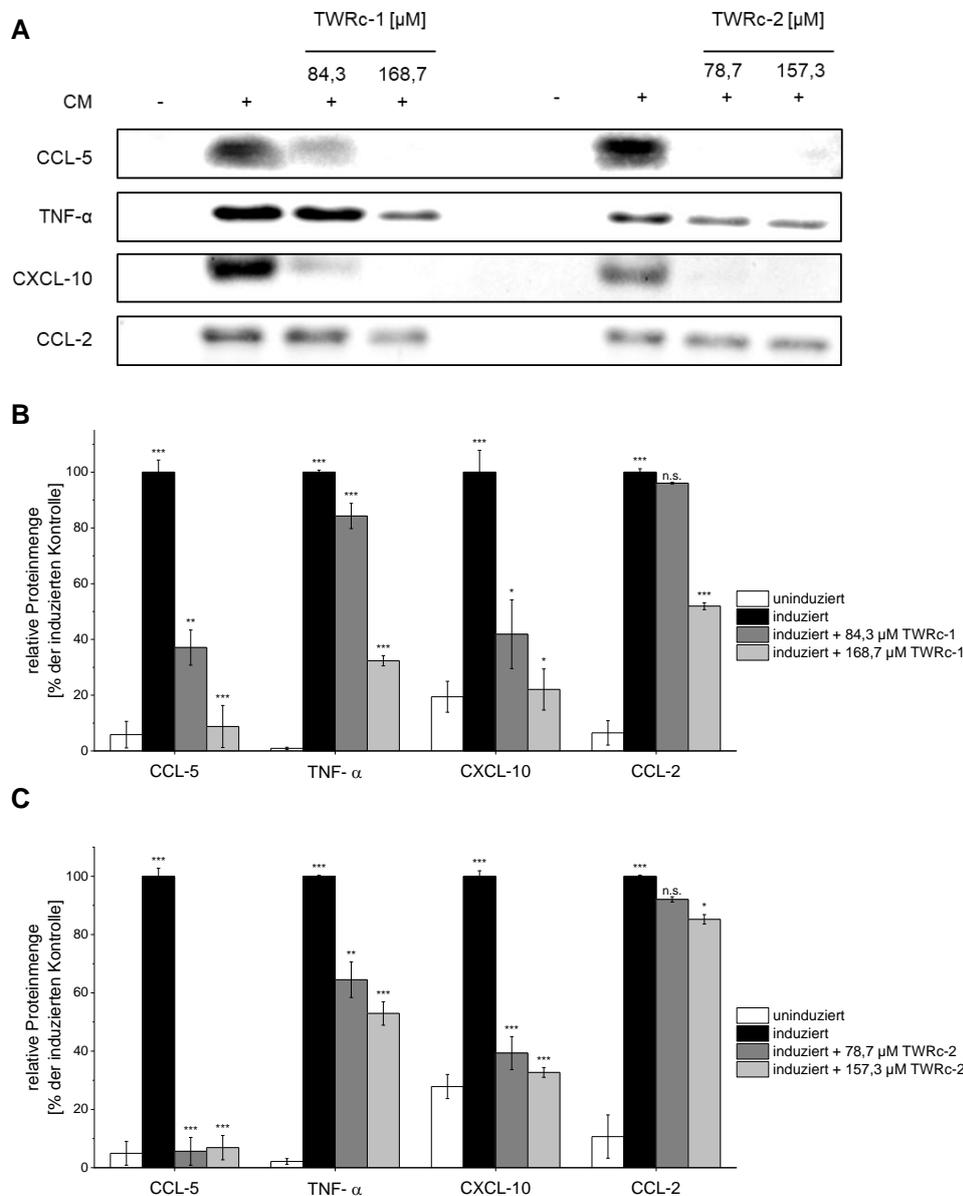


Abbildung 34: Expression sekretorischer Proteine aus dem Medium von BEAS-2B-Zellen nach Applikation von TWRc-1 und TWRc-2 und Stimulation mit CM (10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β). A: Immunoblot sekretierter Proteine aus dem Zellüberstand von BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit TWRc-1, bzw. TWRc-2, sowie Stimulation mit CM. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Immunoblot aus drei biologischen Replikaten. B und C: Densitometrische Auswertung der drei biologischen Replikate des Zellüberstandes nach Behandlung mit TWRc-1 (B) und TWRc-2 (C). (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen Replikaten; Varianzanalysen erfolgten gegen die

jeweilige Kontrolle: K+ vs. K-, Behandlung vs. K+: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Die Analyse der sekretierten Proteine aus Abbildung 34 zeigte eine signifikante Zunahme durch die Stimulation mit CM. Die Behandlung mit TWRc-1 führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion aller untersuchten Zytokinmengen. Hierbei konnte die Expression von RANTES (CCL-5) um 90 %, TNF- α um 68 %, CXCL-10 um 78 % und CCL-2 um 48 % gegenüber der unbehandelten Referenzprobe gehemmt werden. Die Behandlung mit TWRc-2 reduzierte die CCL-5-Sekretion nahezu auf uninduziertes Level, wohingegen die relative Proteinmenge von CCL-2 lediglich um 14 % gesenkt wurde. Die Inhibition in Bezug auf die Zytokine TNF- α und CXCL-10 erreichte mit 47 % und 67 % nicht den Einfluss von TWRc-1. Die Analyse der Proteinsekretion deckt sich mit der Inhibition durch beide Verbindungen auf transkriptioneller Ebene (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 32). Der geringe Einfluss von TWRc-2 auf die CCL-2 Sekretion korreliert mit der um lediglich Faktor 2 geminderten mRNA-Expression. Generell konnten beide *R. cordifolia*-Isolate die Expression proinflammatorischer chemotaktischer Zytokine sowohl auf transkriptioneller wie auch auf Proteinebene signifikant reduzieren.

3.4 Isolation von TWEh-1 aus *Eurotium herbariorum*

Im Rahmen eigener Vorarbeiten wurde eine Substanz mit potentieller inhibitorischer Wirkung auf die IL-4 induzierte STAT6-Signaltransduktion aus *Eurotium herbariorum* isoliert. Davon ausgehend sollte die Wirkung von TWEh-1 weiter beschrieben und der Wirkmechanismus aufgeklärt werden.

3.4.1 Der Produzentenstamm *Eurotium herbariorum*

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Pilzstamm *Eurotium herbariorum* (*E. herbariorum*) wurde freundlicherweise von der „Asthma and Allergy Research Group“ der Universität München, unter der Leitung von Frau Prof. Erika von Mutius zur Verfügung gestellt. Bei dem Ascomyceten *E. herbariorum* handelt es sich um die teleomorphe Form von *Aspergillus glaucus*. Auf Festmedium bildet der Ascomycet ein junges weißliches und im Zentrum gelblich-bräunliches Luftmycel aus, wobei das Substratmycel braun erscheint. Mikroskopische Untersuchungen zeigten hyaline, septierte und stielartige Hyphen, an deren Ende die Bildung kleiner gelblicher Cleistothecien erfolgte. In Submerskultur bildet *E. herbariorum* ein kugeliges, im Durchmesser 0,1 bis 1 cm, erscheinendes Mycel aus.

3.4.2 Fermentation von *E. herbariorum*

Die Fermentation von *E. herbariorum* wurde, wie in Vorarbeiten beschrieben, zur Gewinnung der Substanz TWEh-4b durchgeführt (Walter, 2015). Massenspektrometrische Untersuchungen zur Reinheit zeigten im weiteren Verlauf jedoch, dass es sich hierbei um ein Gemisch, bestehend aus vier Substanzen mit identischem Molekulargewicht von 402 Da handelte. Aus diesem Gemisch konnte die abundanteste Substanz, in dieser Arbeit als TWEh-1 beschrieben, isoliert werden. Mit einer Fermentation im 20 l-Maßstab mit Medium M1, bei 2 l/min Luftzufuhr und 120 rpm konnte hierbei lediglich eine Ausbeute im Rahmen von 55-166 µg/l erreicht werden. Medienversuche (Daten nicht gezeigt) in Schüttelkolben mit jeweils 2,5 l Nährmedium (Medien M1 bis M5) dienten zur Optimierung der Fermentation, wobei die Fermentation in Medium M5 die größte Ausbeute von 670 µg/l lieferte. Die Ausbeute ließ sich durch Fermentation im 20 l-Maßstab nicht bestätigen, weshalb nachfolgend die Fermentation im 2,5 l-Maßstab in Medium M5 bei Raumtemperatur und 120 rpm durchgeführt wurde. Ein optimaler Fermentationsverlauf hiervon ist in Abbildung 35 dargestellt.

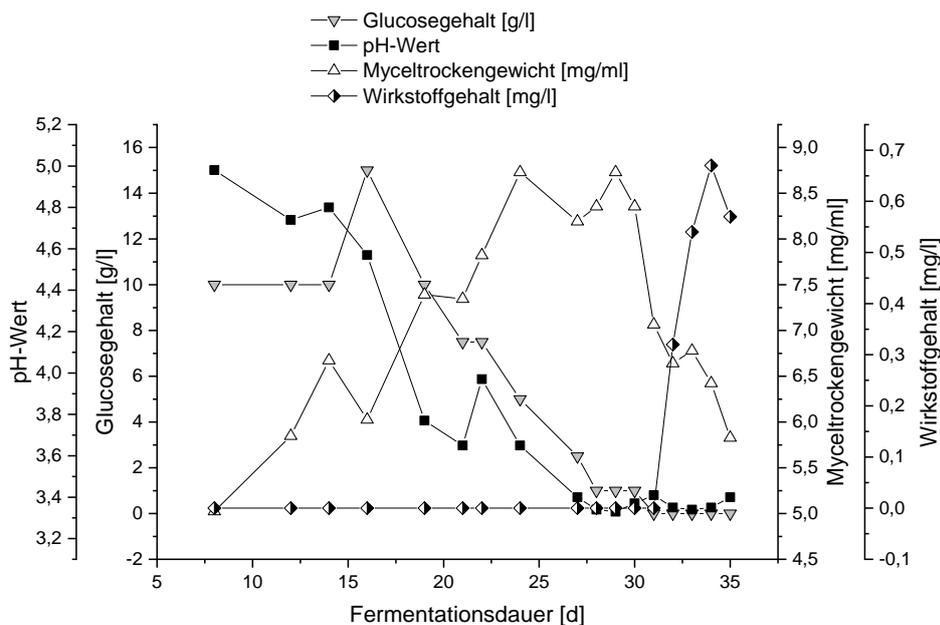


Abbildung 35: Fermentationsverlauf von *E. herbariorum* im 2,5 l-Maßstab im Medium M5 bei 120 rpm und RT. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Glucosekonzentration, pH-Wert, Myceltrockengewicht und Wirkstoffkonzentration.

Aufgrund der langen Fermentationsdauer von 35 Tagen begann die Aufzeichnung der Parameter erst an Tag 8. Die Glucosekonzentration lag hier noch bei 10 g/l, stieg an Tag 16 auf 15 g/l an, um nachfolgend stetig abzunehmen. An Tag 31 war die freie Glucose im Medium erschöpft. Relativ zeitgleich begann der Pilz mit dem Abbau der Biomasse, was anhand des

sinkenden Myceltrockengewichtes ab Tag 30 deutlich wird. Der pH-Wert sank nahezu kontinuierlich von 5,0 an Tag 8 bis auf ein Minimum von 3,33 an Tag 29 um bis Abschluss der Fermentation wieder leicht auf 3,4 anzusteigen. Die Wirkstoffproduktion konnte erst an Tag 32 nachgewiesen werden, als der Pilz aufgrund fehlender Glucose im Medium Biomasse abbaute, erreichte an Tag 34 seinen Höhepunkt mit 670 µg/l, und nahm an Tag 35 wieder ab.

3.4.3 Extraktion und Reindarstellung von TWEh-1

Nach der Trennung des Mycels vom Kulturfiltrat mittels Vakuumfiltration wurden ausgehend von vier Kolben mit 2,5 l Kulturmedium M5 8 l Kulturbrühe mit Ethylacetat extrahiert. Die nachfolgenden Aufreinigungsschritte und letztendliche Reindarstellung sind in Abbildung 36 aufgeführt und resultierten in 5,3 mg TWEh-1.

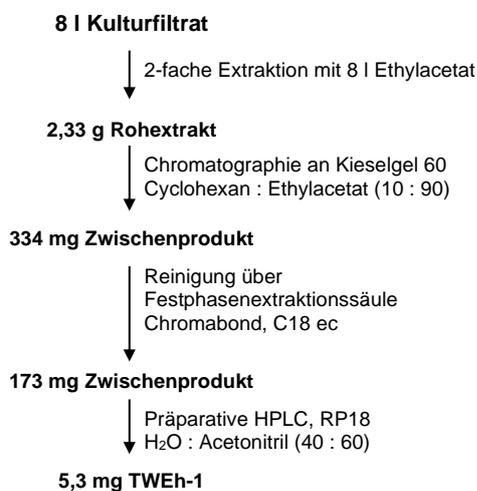


Abbildung 36: Extraktionsschema zur Reindarstellung von TWEh-1.

3.4.3.1 Physikalisch-chemische Analyse von TWEh-1

Die Verbindung bildet ungelöst ein gelb-bräunliches Pulver. Als Lösungsmittel eignen sich polar-protische Lösungsmittel wie Methanol oder Ethanol, wobei die Lösung je nach Konzentration gelblich bis braun erscheint. Im Gradient G1 beträgt die Retentionszeit 12,16 min und das UV-Vis-Spektrum kennzeichnet sich durch ein Maximum bei 210 nm, sowie weitere lokale Maxima bei 270 und 430 nm (Abbildung 37, A, B). Durch massenspektrometrische Analyse mittels negativer Ionisierung konnte ein Molekulargewicht von 402,3 g/mol bestimmt werden. Durch NMR-Spektroskopie (AG Opatz, JGU Mainz) konnte eine vorläufige Struktur mit der Summenformel $C_{20}H_{18}O_9$ ermittelt werden, wobei die stereochemische Struktur der O-glykosidisch gebundenen Furanose bislang nicht aufgeklärt werden konnte (Abbildung 37, C, D). Strukturell handelt es sich um ein Anthrachinonderivat mit einer am C6-Atom O-glykosidisch verknüpften Furanose.

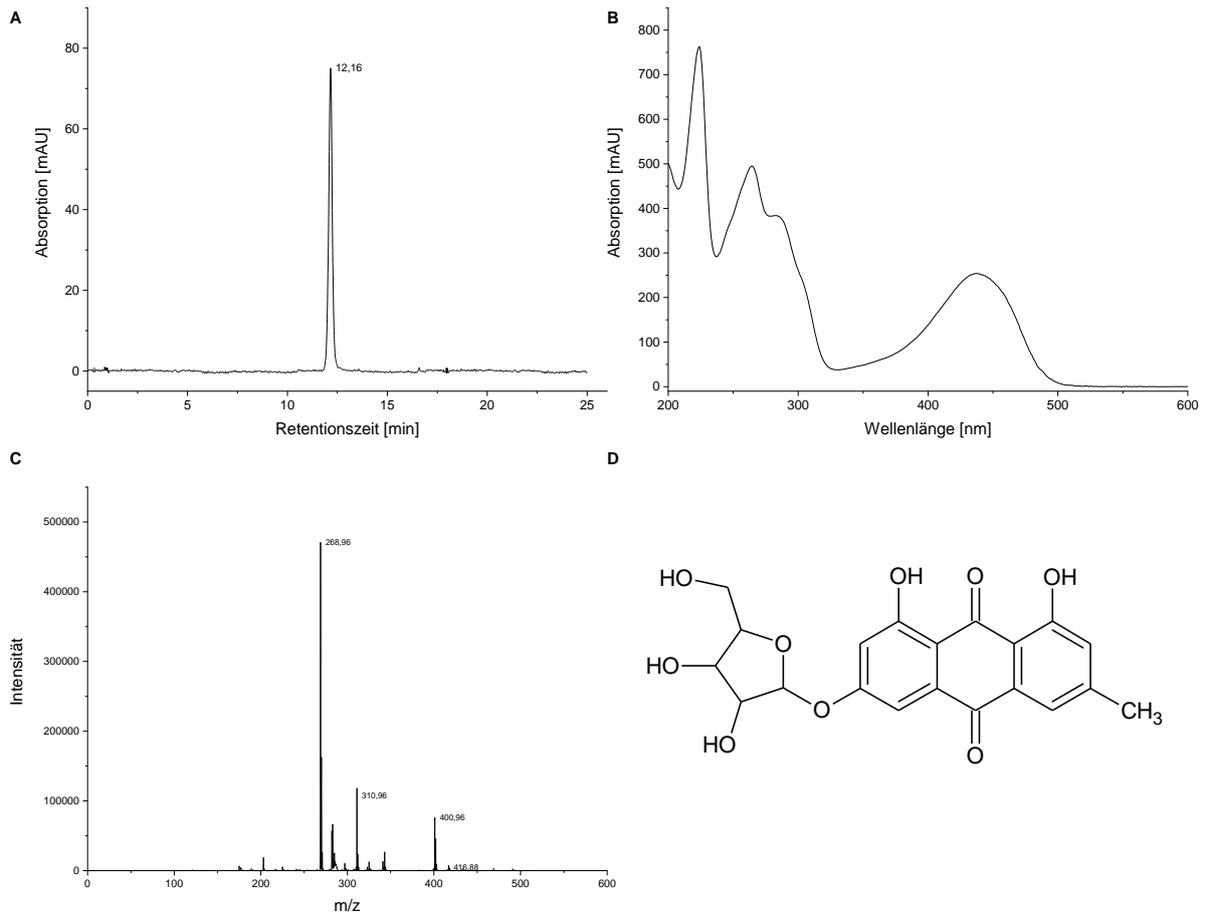


Abbildung 37: Chromatogramm im Gradient G1 (A), UV-Vis-Spektrum (B), Massenspektrum mit negativer Ionisierung (C) und vorläufige Struktur (D) von TWEh-1.

3.4.4 Biologische Charakterisierung von TWEh-1

3.4.4.1 Wirkung von TWEh-1 auf verschiedene Reporterassays in BEAS-2B-Zellen

Initial wurde die Ausgangssubstanz TWEh-4b aus den Vorarbeiten im phänotypischen Screening als Inhibitor der IL-4 induzierten STAT6-Signaltransduktion isoliert (Walter, 2015). Zunächst wurde die Wirkung der hieraus isolierten Reinsubstanz TWEh-1 auf diese, im Kontext von Asthma maßgebliche, Signaltransduktion untersucht. Asthmatische Patienten weisen eine erhöhte Anzahl TH2-polarisierter T-Zellen auf, welche durch Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 die IgE-Produktion von B-Zellen bedingen, und somit an der Entstehung der allergischen Entzündungsreaktion von atopischem Asthma entscheidend beteiligt sind (P. J. Barnes, 2011). Neben der STAT6-vermittelten Signaltransduktion wurde ebenso der Effekt von TWEh-1 auf weitere JAK-STAT-Signaltransduktionen durch STAT1 und STAT2 untersucht (Abbildung 38, A). Neben diesen

JAK-STAT vermittelten Signalwegen wurde außerdem die Wirkung auf weitere inflammatorische Signalwege, wie die durch TGF- β induzierte SMAD2/3-, sowie die TNF- α induzierte NF- κ B-Signaltransduktion untersucht, welche im Zusammenhang mit Asthma die Expression proinflammatorischer und pro-fibrotischer Gene induzieren (Peter J. Barnes & Adcock, 1997; Halwani, Al-Muhsen, Al-Jahdali, & Hamid, 2011) (Abbildung 38, B). Zu den Genen, die einer Regulation durch NF- κ B unterliegen, zählen auch die Chemokine CXCL-10 (IP-10) und CXCL-8 (IL-8). In der Bronchiallavage asthmatischer Patienten konnten diese Chemokine vermehrt nachgewiesen werden (Miotto *et al.*, 2001; Ordonez, Shaughnessy, Matthay, & Fahy, 2000). Die Promotoraktivität dieser Chemokine wurde ebenfalls im Reportersystem unter dem Einfluss von TWEh-1 untersucht.

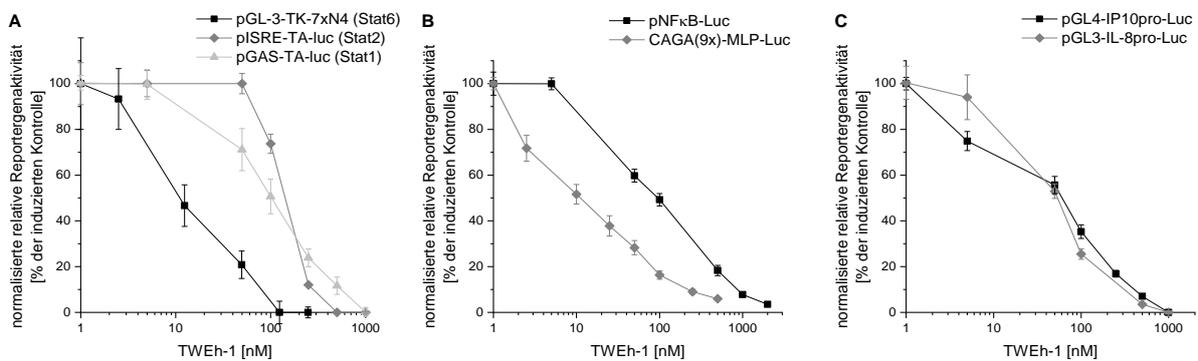


Abbildung 38: Effekt von TWEh-1 auf die Reporteraktivität inflammatorischer Signalwege. A: Einfluss auf die IL-4 (10 ng/ml) induzierte STAT6-, IFN- γ (10 ng/ml) induzierte STAT1- und INF- α (10 ng/ml) induzierte STAT2-Signaltransduktion. B: Einfluss auf die TGF- β (5 ng/ml) induzierte SMAD2/3- und TNF- α (10 ng/ml) induzierte NF- κ B-Signaltransduktion. C: Effekt auf die durch TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (10 ng/ml) und IL1- β (5 ng/ml) induzierten Promotoraktivitäten von *ip-10* und *il-8*. Zur internen Normalisierung wurde jeweils der konstitutiv aktive Kontrollvektor pRL-EGFP Co-transfiziert. Die Expression der *Firefly*-Luciferase wurde gegen die Expression der *Renilla*-Luciferase des Kontrollvektors normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten ($p \leq 0,001$).

Die STAT1-, 2- und 6-vermittelten Signaltransduktionen konnten durch Applikation von TWEh-1 im unteren nanomolaren Bereich mit IC_{50} -Werten von 16 nM ($\pm 8,51$ nM) für STAT6, 109 nM ($\pm 5,78$ nM) für STAT1 und 150 nM ($\pm 4,28$ nM) für STAT2 inhibiert werden (Abbildung 38, A). Ebenso konnte die Signaltransduktion durch NF- κ B ($IC_{50} = 90 \pm 3,93$ nM), sowie die Promotoraktivität der NF- κ B-Zielgene *ip-10* ($IC_{50} = 64 \pm 6,12$ nM) und *il-8* ($IC_{50} = 54 \pm 3,72$ nM) durch TWEh-1 in einem ähnlichen Konzentrationsbereich gehemmt werden. Für die pro-fibrotische SMAD2/3-vermittelte Signalübertragung konnte eine IC_{50} durch TWEh-1 von 21 nM ($\pm 2,8$ nM) ermittelt werden (Abbildung 38, B, C).

3.4.4.2 Untersuchung auf zytotoxische Effekte

Obgleich weder mikroskopische Beobachtungen, noch die Beeinflussung des konstitutiv aktiven Reportergens pRL-EF1 α einen etwaigen zytotoxischen Effekt durch TWEh-1 vermuten ließen, wurden nachfolgend die Zellviabilität, sowie der Einfluss auf die Apoptose, bzw. Nekrose nach Applikation von TWEh-1 untersucht.

3.4.4.2.1 Einfluss von TWEh-1 auf die Zellviabilität mittels mitochondrialer Enzymaktivität

Um sicher zu stellen, dass die Wirkung von TWEh-1 nicht in einer Reduktion der Zellviabilität begründet ist, wurde der Einfluss auf die metabolische Aktivität mittels eines XTT-Assays (vgl.: 2.2.3.6.2) untersucht. Die Applikation der Testkonzentrationen erfolgte für 24 h und 48 h, nachdem BEAS-2B-Zellen in einer definierten Zellzahl bereits 24 h bebrütet wurden (vgl.: 2.2.3.6.1). Zur Ermittlung der Zellviabilität wurde die Absorption behandelter Zellen gegen unbehandelte Zellen aufgetragen. Die Konzentrationen, als auch die Inkubationszeiten wurden den Reporterassays entsprechend gewählt.

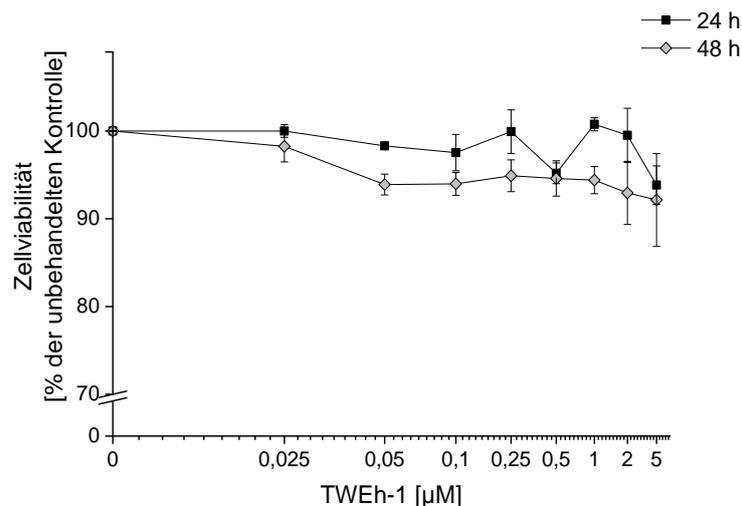


Abbildung 39: Relative Zellviabilität von BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von TWEh-1. BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an TWEh-1 behandelt und die Zellviabilität mittels XTT-Assay quantitativ bestimmt. (Dargestellt ist der MW \pm SEM von jeweils drei biologischen zu je zwei technischen Replikaten; p = nicht signifikant vs. unbehandelt)

Wie aus Abbildung 39 ersichtlich wird, haben Konzentrationen bis 5 μ M weder nach 24 h, noch nach 48 h einen größeren Effekt als eine Reduktion von 10 % der Zellviabilität. Ein signifikanter Einfluss zur Minderung der Zellviabilität kann nicht beobachtet werden.

3.4.4.2.2 Untersuchung der Zytotoxizität von TWEh-1 mittels Durchflusszytometrie

Um zytotoxische Effekte von TWEh-1 zu untersuchen wurde eine Doppelfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) durchgeführt. PI eignet sich, um die Membranintegrität von Zellen zu überprüfen. Intakte oder früh-apoptotische Zellen kann PI aufgrund der Membranundurchlässigkeit nicht passieren, wohingegen in spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen PI in die Zelle eindringen kann und dort in die DNA interkaliert (Rieger, Nelson, Konowalchuk, & Barreda, 2011). Annexin-V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Bindungsaffinität zu Phosphatidylserin, welches unter normalen Umständen im cytoplasmatischen Monolayer der Zellmembran verortet ist. In frühen Apoptose-Stadien kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite, wo es exponiert als Signal zur Phagozytose durch Makrophagen dient (Lecoeur, Prévost, & Gougeon, 2001).

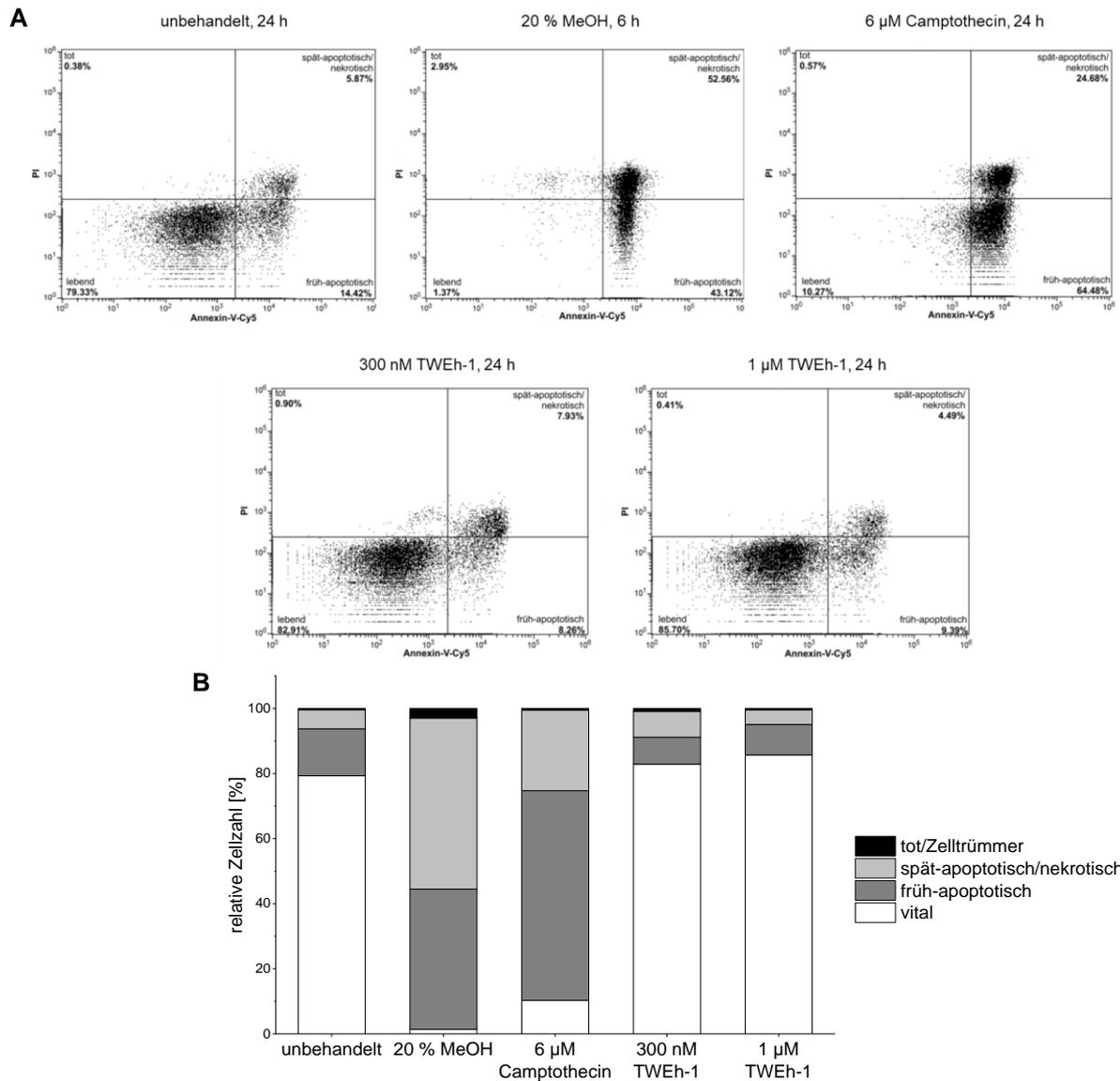


Abbildung 40: Einfluss von TWEh-1 auf die Apoptose-/Nekrose-Induktion mittels Durchflusszytometrie. BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h mit 300 nm und 1 µM TWEh-1 inkubiert. Ansätze mit 6 µM Camptothecin und 20 % (v/v) MeOH (6 h) dienten als Kontrollen der Apoptose bzw. Nekrose-Induktion. Es wurden jeweils 2 x 10⁴ Ereignisse gemessen. A: Darstellung der gemessenen Ereignisse mittels Dot-Blots in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlung. B: Relative prozentuale Verteilung der Zellen in den Quadranten abhängig von der Behandlung.

Durch die Behandlung mit 20 % Methanol (MeOH) stieg die Anzahl früh-apoptotischer und nekrotischer Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 28,7 %, bzw. 46,7 %. Die Inkubation mit 6 µM Camptothecin hatte einen Anstieg früh-apoptotischer Zellen von 50,1 %, sowie eine Zunahme nekrotischer Zellen von 18,8 % zur Folge. Die Applikation beider Konzentrationen an TWEh-1 hatte auf die Zellen hinsichtlich eines verstärkten früh-

apoptotischen Phänotyps keinerlei Einfluss. Ebenso wurden spät-apoptotische/nekrotische Zellen infolge einer Behandlung mit 1 μ M TWEh-1 nicht verstärkt, wobei die applizierte Konzentration von 300 nM TWEh-1 lediglich eine Steigerung dieser Ausprägung von 2,1 % zur Folge hatte.

3.4.4.3 Einfluss von TWEh-1 auf die Transkription und Proteinexpression von Eotaxinen

Weder eine Beeinträchtigung der Zellviabilität, noch apoptotische oder nekrotische Effekte wurden nach Behandlung mit TWEh-1 bei BEAS-2B-Zellen festgestellt. Zur Bestätigung der im phänotypischen Screening im nanomolaren Bereich inhibitorischen Wirkung von TWEh-1 auf verschiedenste inflammatorisch relevante Signalkaskaden, wurde nachfolgend der Einfluss auf die Zielgene *eotaxin-1* und *eotaxin-3* als direkte Targets der IL-4 induzierten STAT6-Signaltransduktion untersucht. Im phänotypischen Screening konnte diese Signaltransduktionskaskade mit einem IC₅₀ von 16 nM am stärksten beeinflusst werden. Eotaxine werden unter anderem von Bronchialepithelzellen als Antwort auf die TH2-Zell-vermittelte Produktion von IL-4 und IL-13 sezerniert. Sie vermitteln hierbei ein chemotaktisches Signal zur Rekrutierung von Eosinophilen, deren peribronchiale Akkumulation ein charakteristisches Merkmal von *Asthma bronchiale* darstellt (Komiya *et al.*, 2003). Die Expression dieser beiden Eotaxine ist sowohl Zelllinien-, als auch Stimulus-abhängig, was bereits durch Komiya *et al.* (2003) und Lilly *et al.* (1997) gezeigt wurde. So konnte eine Co-Stimulation mit IL-4 und TNF- α gegenüber einer alleinigen Stimulation das Expressionslevel der Chemokine in beiden Zelllinien erhöhen (Komiya *et al.*, 2003). Die Ermittlung der Induktionsfähigkeit in Abhängigkeit der Zelllinie wurde auch in Bezug auf die in 3.5.2 dargestellte Charakterisierung von Cyclonerodiol durchgeführt.

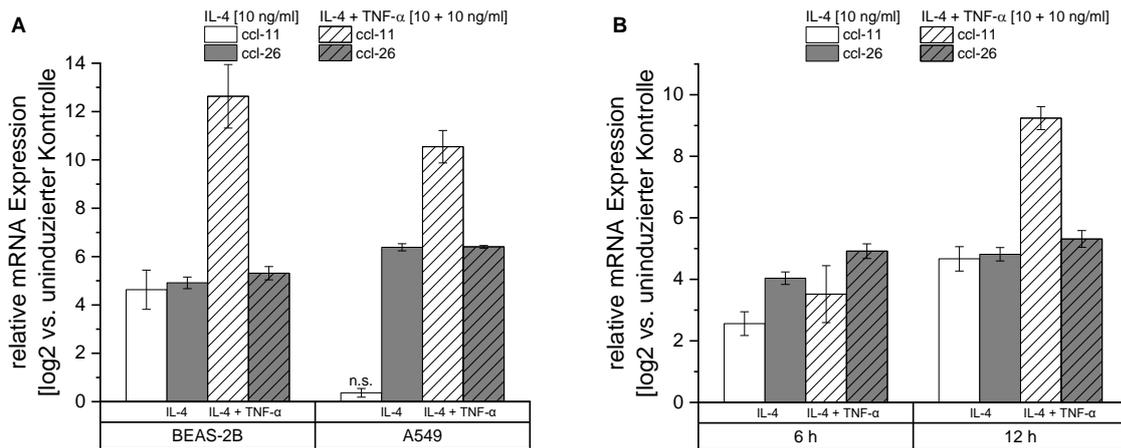


Abbildung 41: Transkriptionslevel von *eotaxin-1* und *eotaxin-3* in Abhängigkeit der Bronchialepithel-Zelllinie und des Stimulus und der Induktionszeit. A: mRNA-Level von *ccl-11* und *ccl-26* in Abhängigkeit der Bronchialepithelzelllinien BEAS-2B und A549 nach 12-stündiger alleiniger Induktion mit 10 ng/ml IL-4 und in Kombination mit 10 ng/ml TNF- α . B: mRNA-Level von *ccl-11* und *ccl-26* in BEAS-2B-Zellen 6 und 12 h nach Induktion mit 10 ng/ml IL-4 oder in Kombination mit 10 ng/ml TNF- α . Als Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) verwendet. (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; Varianzanalyse: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,001 = ***$ in Bezug auf Referenz)

Aus Abbildung 41 (A) wird ersichtlich, dass durch eine Co-Stimulation mit TNF- α die Expression von *ccl-26* in BEAS-2B-Zellen von Faktor 30 auf Faktor 40 gegenüber der alleinigen Stimulation gesteigert werden konnte. In Bezug auf *ccl-11* gestaltet sich der induktive Effekt einer Co-Stimulation hierbei mit Faktor 6342 gegenüber 25 wesentlich stärker. In A549-Zellen konnte die transkriptionelle Aktivität von *ccl-11* durch alleinige Stimulation mit IL-4 nicht signifikant induziert werden, wohingegen die Co-Stimulation mit TNF- α eine 1493-fache Erhöhung der Expression bedingte. Im Falle der *ccl-26* Expression ergaben sich in A549-Zellen keine Unterschiede durch zusätzliche Verwendung von TNF- α als Induktor, die mRNA-Expression wurde jeweils um den Faktor 84 verstärkt. Bezüglich der Zeit-abhängigen Induktion beider Gene in BEAS-2B-Zellen in Abbildung 41 (B) erscheint eine 12-stündige Induktionsdauer aufgrund des in allen Fällen höheren Expressionslevels gegenüber einer 6-stündigen Induktion sinnvoller, wobei sich auch hier die Unterschiede der Transkriptlevel bei *eotaxin-1* (IL-4: 19-fach; IL-4 + TNF- α : 593-fach) stärker beeinflusst zeigten als dies bei *eotaxin-3* (IL-4: 12-fach; IL-4 + TNF- α : 10-fach) der Fall war.

Um nachfolgend zu erörtern, inwieweit TWEh-1 Einfluss auf die Transkription und Proteinexpression von Eotaxin-1/3 nimmt, wurde zunächst die *in vitro* mRNA- und

Proteinexpression der Bronchialepithel-Zelllinie BEAS-2B bei alleiniger Stimulation mit IL-4 und Co-Stimulation mit TNF- α untersucht.

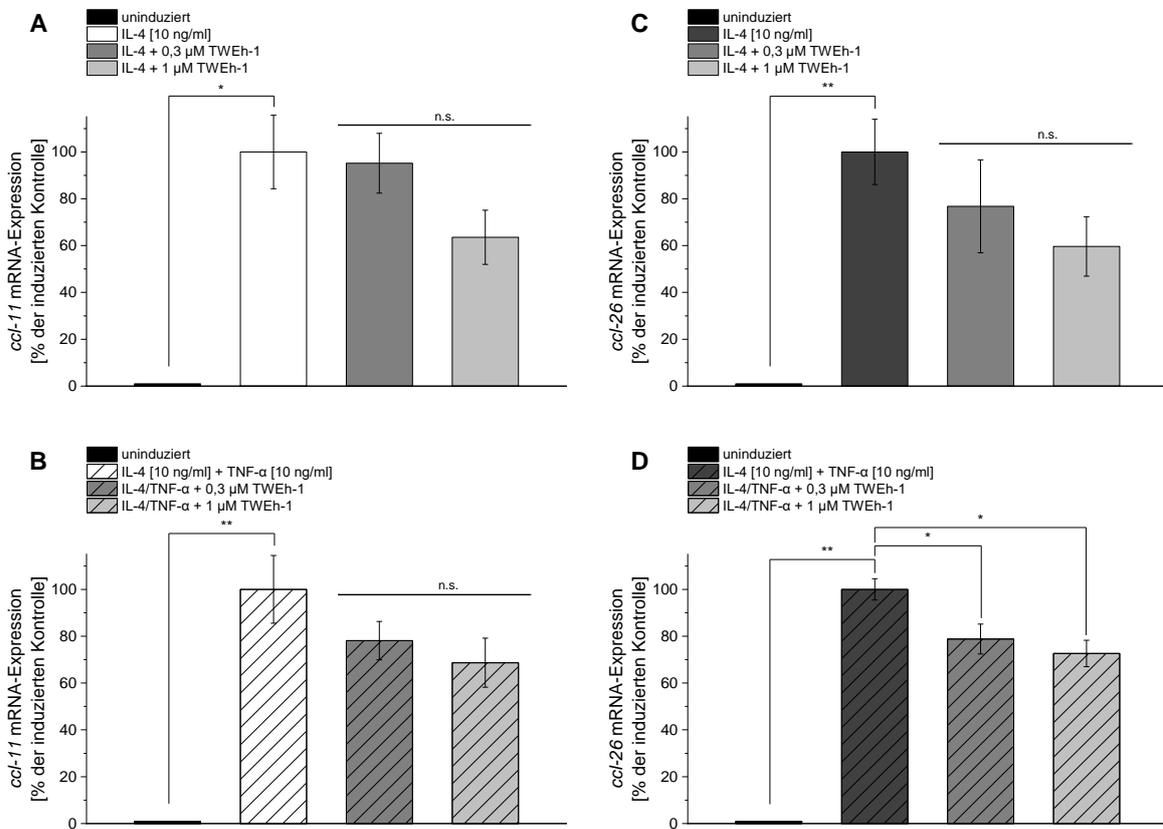


Abbildung 42: Einfluss von TWEh-1 auf die transkriptionelle Aktivität von *ccl-11* und *ccl-26*. Die 12-stündige Induktion von BEAS-2B-Zellen mit 10 ng/ml IL-4 (A, C), bzw. in Kombination mit 10 ng/ml TNF- α (B, D), erfolgte nach einstündiger Vorbehandlung mit 1 μ M TWEh-1. Dargestellt ist die relative mRNA-Menge von *ccl-11* (A, B), bzw. *ccl-26* (C, D) der behandelten, induzierten Zellen gegen induzierte Zellen in Prozent (\pm SEM aus drei biologischen zu je zwei technischen Replikaten; Varianzanalyse: n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$). Als Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) verwendet.

Die mRNA-Expression von *eotaxin-1* unter dem Einfluss von TWEh-1 blieb, unabhängig vom Stimulus, unbeeinflusst (Abbildung 42, A, B). Ebenso konnte die IL-4 induzierte mRNA-Expression von *eotaxin-3* nicht signifikant durch TWEh-1 reduziert werden (Abbildung 42, C). Im Falle des durch TNF- α Co-stimulierten IL-4-induzierten Transkriptlevels von *eotaxin-3* zeigte sich ein signifikanter dosisabhängiger, wenngleich schwacher, inhibitorischer Effekt von 28 % nach Applikation von 1 μ M TWEh-1 gegenüber der induzierten Kontrolle (Abbildung 42, D). Nachfolgend wurde auch das Proteinlevel der beiden Eotaxine nach 24-stündiger Induktion

und Inkubation mit TWEh-1 untersucht. Aus Abbildung 43 wird deutlich, dass beide Eotaxine durch die Induktionen in ihrer Expression verstärkt wurden, wobei das Expressionslevel jeweils durch Co-Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α erhöht werden konnte. Dies korreliert mit dem auf mRNA-Ebene festgestellten Effekt der Expressions-steigernden Wirkung einer Co-Induktion mit dem proinflammatorischen Stimulus TNF- α , insbesondere in Bezug auf Eotaxin-1 (vgl. Abbildung 41, A). Eine Inhibition der Proteinmenge beider Chemokine durch TWEh-1 konnte nicht festgestellt werden.

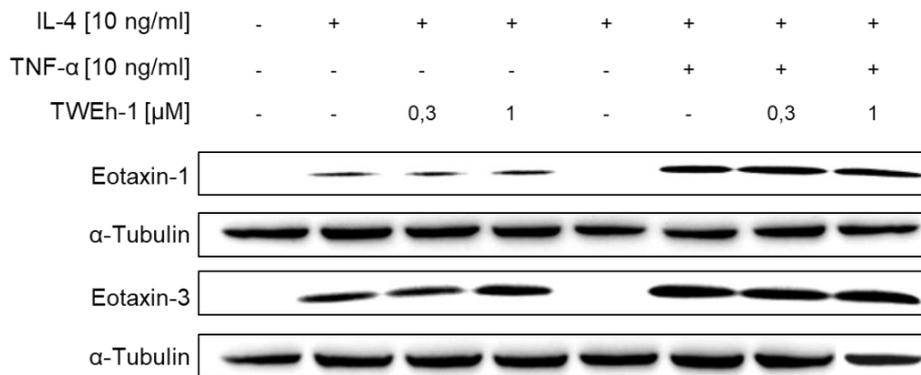


Abbildung 43: Einfluss von TWEh-1 auf die Proteinexpression von Eotaxin-1 und Eotaxin-3. BEAS-2B-Zellen wurden 1 h mit 0,3 μ M, bzw. 1 μ M TWEh-1 vorinkubiert und nachfolgend weitere 24 h mit 10 ng/ml IL-4, bzw. in Kombination mit 10 ng/ml TNF- α induziert. Gesamtproteinlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mittels spezifischer Antikörper die Proteine detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus drei biologischen Replikaten.

3.4.4.4 Einfluss von TWEh-1 auf die epithelial-mesenchymale Transition

Neben anderen proinflammatorischen Signalwegen, die durch TWEh-1 im phänotypischen Screening gehemmt wurden, zeigte die Verbindung auch eine starke inhibitorische Wirkung auf die durch TGF- β induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion. Im Kontext einer asthmatischen Erkrankung spielt diese Signalkaskade eine entscheidende Rolle in der Ausprägung pathophysiologischer Veränderungen infolge von strukturellen Veränderungen des Atemgewebes, die unter dem Begriff *airway remodeling* zusammengefasst werden. Diese strukturellen Veränderungen beinhalten unter anderem einen Verlust der epithelialen Integrität in deren Folge es zu einer Verdickung der Basalmembran und Ausprägung einer subepithelialen Fibrose kommt (Halwani *et al.*, 2011). Der physiologische Prozess, der Epithelzellen hin zu einem invasiven fibroblastischen Phänotyp verändert, wird als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet, als deren maßgeblicher Induktor das profibrotische Zytokin TGF- β gilt (Doerner & Zuraw, 2009). Auch hinsichtlich der EMT bewirkt laut

Literatur eine Co-Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α eine induzierende Wirkung auf die Ausprägung der EMT in BEAS-2B-Zellen (Kamitani *et al.*, 2011). Nachfolgend wurden zunächst auf transkriptioneller Ebene verschiedene Marker der EMT nach alleiniger Stimulation mit TGF- β und Co-Stimulation mit TNF- α zu verschiedenen Zeitpunkten (7 h, 24 h und 48 h) mit und ohne Einfluss von TWEh-1 untersucht (Abbildung 44). Hierfür wurden BEAS-2B-Zellen in Serum-reduziertem Medium ZM1b, je nach Zeitpunkt der Lyse mit verschiedenen Zellzahlen (7 h: 1×10^5 ; 24 h: 5×10^4 ; 48 h: $2,5 \times 10^4$), ausgesät. Die Extraktion der RNA und Erstellung der cDNA erfolgte wie in 2.2.3.13.3 beschrieben.

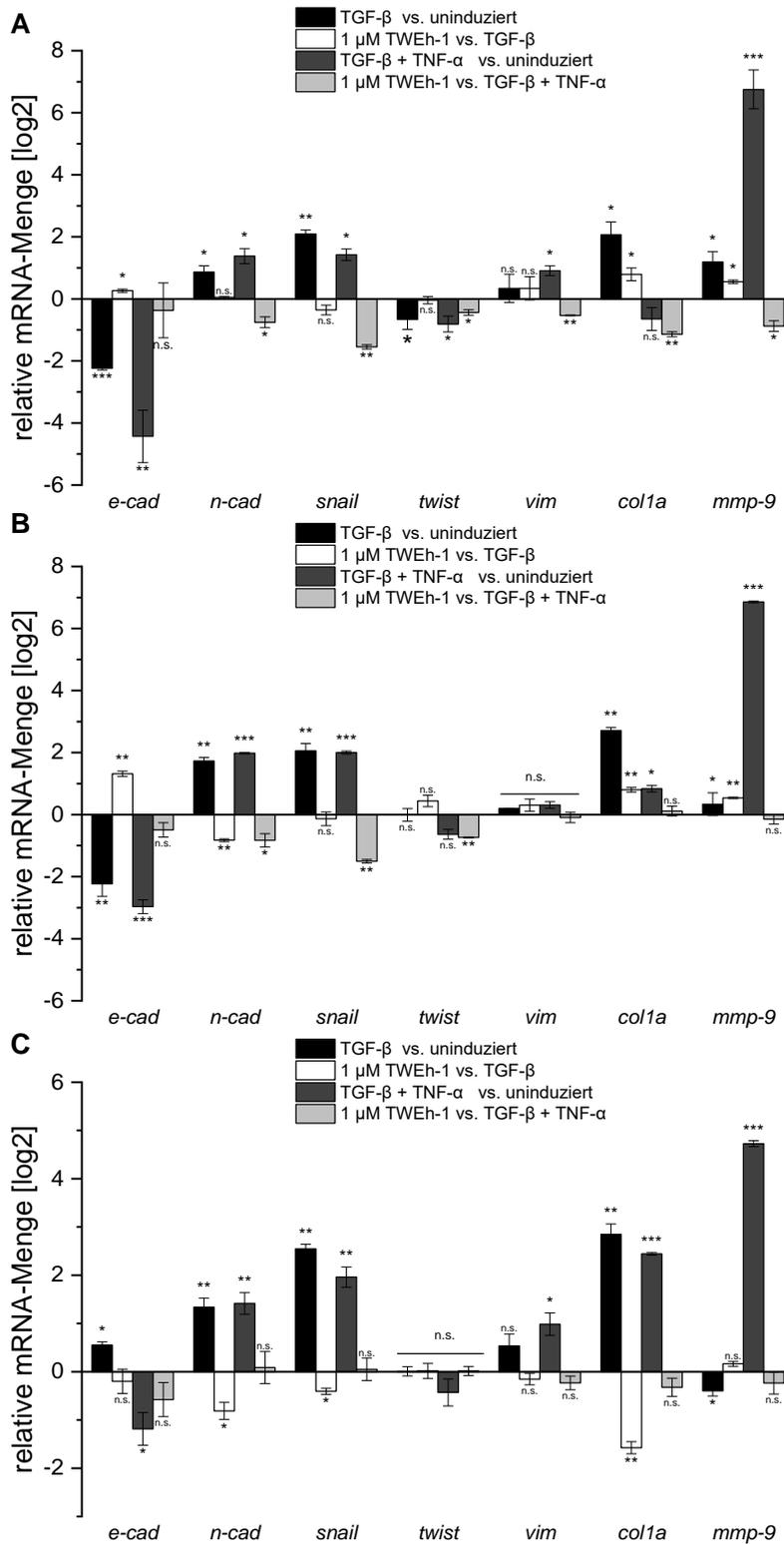


Abbildung 44: Einfluss von TWEh-1 auf die Transkription EMT-assoziiierter Markergene in BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden 1 h mit 1 μM TWEh-1 vorinkubiert und weitere 7 h (A), 24 h (B) und 48 h (C) mit 5 ng/ml TGF-β, bzw. zusätzlich mit 10 ng/ml TNF-α stimuliert. Die relative mRNA-Menge wurde als Quotient [log2] der induzierten gegen nicht-induzierte Zellen, bzw. behandelte, induzierte gegen

unbehandelte, induzierte Zellen angegeben. Als endogene Kontrolle wurde jeweils die mRNA-Expression der *gapdh* genutzt. (Mittelwert +/- SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; n.s. = nicht signifikant, $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$)

Die Co-Stimulation mit TNF- α hatte lediglich im Falle von *e-cadherin*, *n-cadherin* und *mmp-9* eine EMT-steigernde Wirkung, wobei besonders *mmp-9* durch die Co-Stimulation bereits nach 7 h eine um Faktor 26 höhere mRNA-Expression aufwies, wohingegen durch TGF- β allein keine Steigerung der *mmp-9*-mRNA über den Faktor 1,5 hinaus möglich war. Über alle Inkubationszeiträume hinweg zeigten lediglich der mesenchymale Marker *n-cadherin*, sowie der für EMT essentielle Transkriptionsfaktor *snail* auf transkriptioneller Ebene eine Zunahme, wobei sich *n-cadherin* durch die Co-Stimulation und *snail* durch alleinige Stimulation mit TGF- β stärker induzierbar zeigte. Der zur Repression des epithelialen Phänotyps beitragende Transkriptionsfaktor *twist* konnte nicht, der Mesenchym-Zellmarker *vimentin* (*vim*) lediglich durch Co-Stimulation nach 7 und 48 h signifikant induziert werden (Abbildung 44). Die mRNA-Expression des Proteins Kollagen Typ1, Bestandteil der ECM, wird an allen Zeitpunkten, mit Ausnahme der Co-Stimulation nach 48 h, induziert. Die Abnahme des epithelialen Markers *e-cadherin* erfolgte Co-stimuliert bereits nach 7 h, wohingegen die alleinige Stimulation mit TGF- β eine Abnahme erst nach 24 h Inkubation bedingte. Eine Behandlung mit TWEh-1 hatte nur einen 2,5-fach mRNA-steigernden Effekt in Bezug auf die TGF- β -induzierte Expression nach 24 h. Eine signifikante Beeinflussung durch TWEh-1 nach 7 h zeigten die mRNA-Expressionen von *n-cad*, *snail* und *col1a*, jedoch nur nach alleiniger Stimulation mit TGF- β . Die mRNA-Expression von *n-cad*, *snail* und *twist* wurden nach Co-Stimulation auch nach 24 h und 48 h gehemmt. Nach 48-stündiger Co-Stimulation zeigten auch *twist*, *col1a* und *mmp-9* eine leichte Reduktion infolge der Behandlung mit TWEh-1. Insgesamt fällt der inhibierende Einfluss von TWEh-1 auf die Transkription mesenchymaler Markergene bei *n-cad* (1,8-fach), *snail* (2,9-fach), *twist* (1,8-fach), *vim* (1,4-fach), *col1a* (3-fach) und *mmp-9* (1,8-fach) relativ gering, im Vergleich zu der im nanomolaren Bereich befindlichen Wirkung auf die TGF- β -induzierte SMAD2/3-Reportergenaktivität, aus.

Neben verschiedener EMT-assoziiierter mRNAs wurde auch die Proteinexpression unter dem Einfluss von TWEh-1 beleuchtet. Hierbei wurden die Zeitpunkte 24 h und 48 h nach bereits beschriebener Induktion gewählt und die Proteine nach 2.2.3.7.1 isoliert. Gleiche Mengen an Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (vgl.: 2.2.3.7.7). Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen die EMT-Markerproteine N-Cadherin, Snail und Twist. Außerdem wurde die Proteinexpression von Slug, eines neben Snail und Twist weiteren EMT-induzierenden

Transkriptionsfaktors, untersucht. Der Versuch den epithelialen Marker E-Cadherin zu detektieren konnte auf Proteinebene zu keinem Zeitpunkt gewährleistet werden.

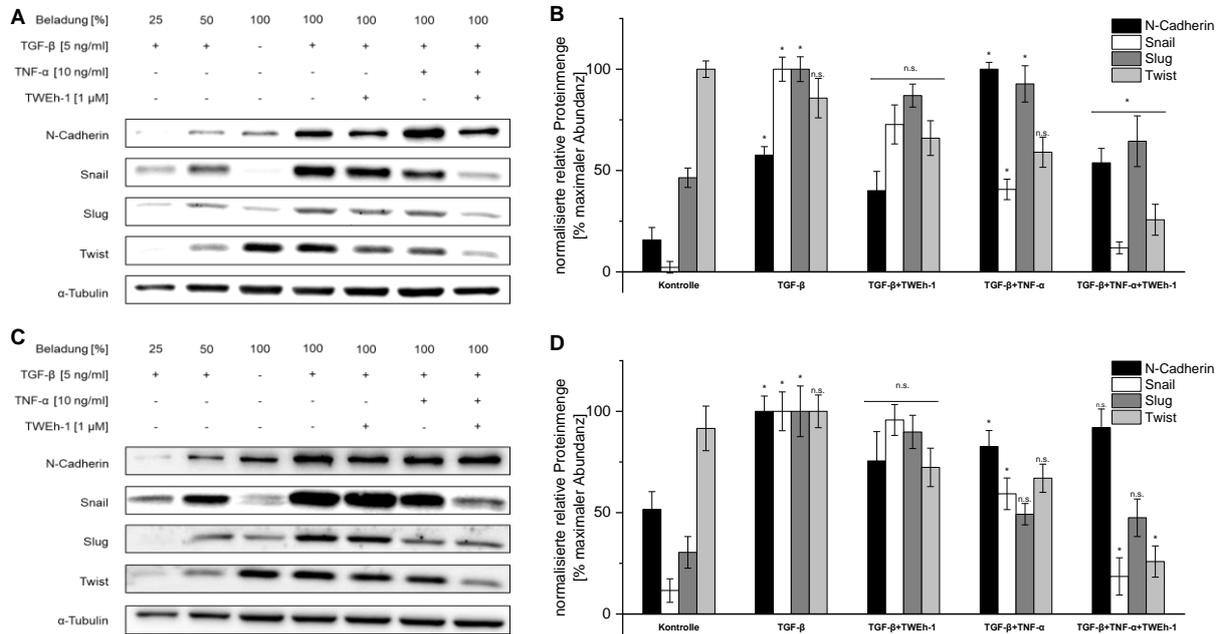


Abbildung 45: Einfluss von TWEh-1 auf EMT-Markerproteine. BEAS-2B-Zellen wurden 1 h mit 1 μ M TWEh-1 vorinkubiert und für weitere 24 h (A, B) und 48 h (C, D) mit 5 ng/ml TGF- β , bzw. zusätzlich mit 10 ng/ml TNF- α stimuliert.

Nach 24-stündiger Induktion mit TGF- β und in Kombination mit TNF- α zeigten der mesenchymale Marker N-Cadherin, sowie die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug eine deutliche Zunahme in ihrer Expression, wobei durch Co-Stimulation einzig N-Cadherin in seiner Expression um 42 % verstärkt wurde. Snail und Slug zeigten monoinduziert eine um 59 % bzw. 7 % höhere Proteinabundanz. Nach 48 h Induktionszeit wurden diese Proteine durch Induktion mit TGF- β in ihrer Expression verstärkt, wohingegen durch Co-Stimulation lediglich N-Cadherin und Snail ein gegenüber der Negativkontrolle signifikant gesteigertes Proteinlevel auswiesen. Die Co-Stimulation bewirkte hier eine Abschwächung der induktiven Wirkung von 17 % (N-Cadherin), bzw. 40 % (Snail). Twist konnte zu keinem Zeitpunkt durch eine der Induktionsformen in seiner Proteinexpression verstärkt werden. Ein signifikanter Einfluss von TWEh-1 auf die TGF- β induzierte Proteinexpression konnte zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden. Nach 24 h zeigten alle durch Co-Stimulation induzierten Proteine eine Abschwächung ihrer Abundanz infolge der Behandlung mit TWEh-1 (Abbildung 45, A, B). N-Cadherin wurde um 46 %, Snail um 70 %, Slug um 30 % und Twist um 56 % gegenüber der induzierten Kontrolle inhibiert. Diese Inhibition konnte im Falle von Snail (69 %) und Twist (61 %) nach 48

h aufrechterhalten werden, wohingegen sich N-Cadherin und Slug nicht mehr beeinflusst zeigten (Abbildung 45, C, D).

3.4.4.5 Analyse des Einflusses von TWEh-1 auf die Angiogenese mittels *Tube Formation Assay*

Neben einer zentralen Rolle in der Tumorprogression, ist die Angiogenese auch an der Manifestierung chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie *Asthma bronchiale* und deren pathologischer Ausprägung in Form einer Lungenfibrose entscheidend beteiligt (Voelkel, Douglas, & Nicolls, 2007). Hierbei spielt die Angiogenese bei der Umgestaltung, dem *Airway remodeling*, infolge des deregulierten pro-entzündlichen und pro-fibrotischen Milieus eine tragende Rolle (Wilson & Wynn, 2009). Matrigel, gewonnen aus der murinen Sarkom-Zelllinie Engelbreth-Holm-Swarm, ähnelt in seiner Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Basalmembran und fördert Zellmorphogenese, Zelldifferenzierung und Tumorwachstum. Unter anderem enthält es Wachstumsfaktoren mit pro-angiogener Wirkung wie TGF- β (Kleinman & Martin, 2005). TWEh-1 zeigte inhibitorische Effekte auf die, durch den pro-angiogenen Faktor TGF- β induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion, wenngleich dieser Einfluss hinsichtlich der EMT bei weitem nicht im eingesetzten Konzentrationsbereich bestätigt werden konnte (vgl.: 3.4.4.4). Um einen etwaigen anti-angiogenen, bzw. anti-invasiven Einfluss von TWEh-1 zu untersuchen, wurden BEAS-2B-Zellen, welche sich in Vorversuchen als geeignet zur Ausbildung röhrenartiger Strukturen erwiesen, auf Matrigel ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen fixiert und mittels Giemsa (vgl. 2.2.3.6.1) gefärbt.

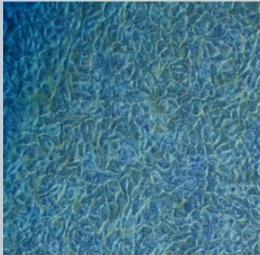
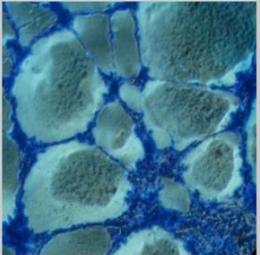
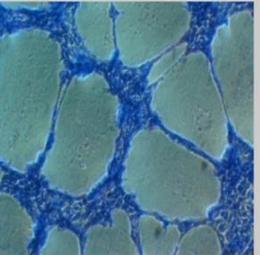
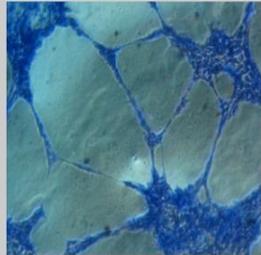
Negativkontrolle	Matrigel-Kontrolle	TWEh-1 [1 μ M]	TWEh-1 [5 μ M]
			
Verzweigungspunkte	Verzweigungspunkte	Verzweigungspunkte	Verzweigungspunkte
0 ± 0 [MW ± SEM]	18,3 ± 1,84 [MW ± SEM]	19 ± 1,1 [MW ± SEM]	18,3 ± 1,39 [MW ± SEM]

Abbildung 46: Einfluss von TWEh-1 auf die Angiogenese im *Tube Formation Assay*. BEAS-2B-Zellen wurden auf Matrigel mit TWEh-1 (1 μ M und 5 μ M) und ohne Behandlung (Matrigel-Kontrolle) für 24 h inkubiert und anschließend mittels Giemsa-Färbung visualisiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz

ohne Matrigel. Die Auszählung erfolgte pro Vertiefung einer 24-Lochplatte (Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus zwei biologischen Replikaten mit je drei technischen Replikaten).

Die Inkubation der BEAS-2B-Zellen auf Matrigel aus Abbildung 46 induzierte eine Ausbildung röhrenförmiger Zellstrukturen, wohingegen in der Negativkontrolle ohne Matrigel eine gleichmäßige Zellverteilung ohne Migration beobachtet werden konnte. Keine der beiden applizierten Konzentrationen an TWEh-1 führte zu einer Reduktion der Netzstrukturen und ihrer Verzweigungspunkte.

3.4.4.6 Einfluss von TWEh-1 auf die SEAP-Reporteraktivität

Der inhibitorische Effekt im unteren nanomolaren Bereich von TWEh-1 auf verschiedene inflammatorisch relevante Signaltransduktionen in Reporterassays konnte hinsichtlich der Zielgene *eotaxin-1* und *eotaxin-3* der STAT6- und NF- κ B-Signaltransduktionen sowohl transkriptionell, als auch auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Einzig die Co-stimulierte (IL-4 + TNF- α) mRNA-Expression von *eotaxin-3* konnte durch Applikation von 1 μ M TWEh-1 leicht reduziert werden (Abbildung 42, D). Auch auf die TGF- β induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion übte TWEh-1 im entsprechenden Reporter eine inhibierende Wirkung mit einer IC₅₀ von 20 nM aus. Dies konnte bei der Untersuchung der durch TGF- β induzierten EMT nicht in diesem Maße bestätigt werden, wenngleich hier inhibitorische Effekte sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene festgestellt werden konnten (vgl. 3.4.4.4). Aufgrund dieser Diskrepanz wurde nun ein alternatives Reporterensystem verwendet, um einen Einfluss der Verbindung auf die Expression des Reporters selbst zu untersuchen. Hierzu fand der Vektor pTK/SEAP(7xN4) Verwendung, welcher äquivalent zu pGL3-TK-7xN4 eine 7-fache Bindestelle für das STAT6-Homodimer beinhaltet, die zusammen mit einem HSV-TK-Promotor die Expression des Reporters kontrolliert. Als Reporter dieses Vektors fungiert die Sekretorische Alkalische Phosphatase (SEAP) anstelle der *Firefly*-Luciferase (Gerhard Erkel *et al.*, 1996). Ebenso wurde der Vektor pGE3-NF1 genutzt, bei dem die Expression der SEAP unter der Kontrolle eines Oligomers (5 x) der NF- κ B-Konsensussequenz downstream eines HSV-TK-Promotors steht. Dieser Vektor ist annähernd äquivalent zu pNF- κ B-Luc, bei dem die Expression der *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle von vier Kopien der NF- κ B-Konsensussequenz und einem minimalen HSV-TK-Promotor steht. BEAS-2B-Zellen wurden mit jeweils mit den SEAP-Reporterplasmiden und im Falle von pTK/SEAP(7xN4) zusätzlich mit dem Expressionsvektor TOPO/STAT6 transfiziert. Zur Normalisierung wurde jeweils der konstitutiv aktive Kontrollvektor pRL-EF1 α Co-transfiziert. 24 Stunden nach Induktion mit 10 ng/ml IL-4 (pTK/SEAP(7xN4)), bzw. 10 ng/ml TNF- α (pGE3-NF1) und Applikation der

Verbindung wurde die SEAP-Aktivität, wie in 2.2.3.5.2 beschrieben, bestimmt, und gegen die Aktivität des Kontrollvektors pRL-EF1 α normalisiert aufgetragen (Abbildung 47).

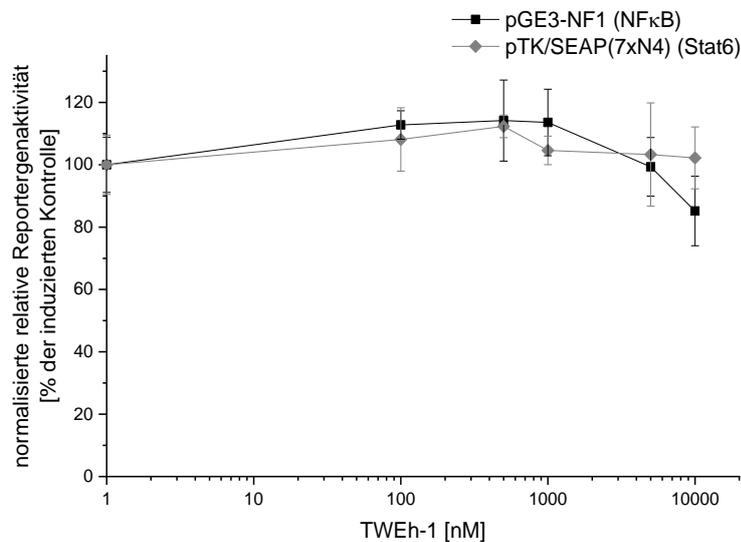


Abbildung 47: Einfluss von TWEh-1 auf die SEAP-Aktivität der Plasmide pGE3-NF1 und pTK/SEAP(7xN4). BEAS-2B-Zellen wurden mit dem Reporter-genkonstrukt pGE3-NF1, bzw. pTK/SEAP(7xN4) und TOPO/STAT6 transient transfiziert. Zur internen Normalisierung wurde der konstitutiv aktive Kontrollvektor pRL-EF1 α Co-transfiziert. Die Applikation von verschiedenen Konzentrationen TWEh-1 sowie die Induktion mit 10 ng/ml IL-4 (STAT6), bzw. 10 ng/ml TNF- α (NF- κ B) erfolgte für 24 h. Die SEAP-Expression wurde gegen die Expression der *Renilla*-Luciferase des Kontrollvektors normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten (p = nicht signifikant vs. induziert).

Aus Abbildung 47 ist zu entnehmen, dass TWEh-1 keinen signifikant inhibierenden Einfluss auf die SEAP-Aktivität der Vektoren pGE3-NF1 und pTK/SEAP(7xN4) ausübt.

3.4.4.7 Effekt von TWEh-1 auf die Luciferase-Lumineszenz

Aufgrund der guten Induzierbarkeit mit Faktor 140 gegenüber uninduzierten BEAS-2B-Zellen des Vektors (CAGA)_{9x}-MLP-Luc durch TGF- β , wurde dieser Vektor erneut genutzt um eine Versuchsreihe mit Applikation von TWEh-1 durchzuführen. Hierbei wurden jeweils BEAS-2B-Zellen mit dem Plasmid transient transfiziert und nach bekanntem Muster (vgl. 2.2.3.5.1) die Luciferaseaktivität unter Einfluss von TWEh-1 bestimmt (Abbildung 48, A). In der Behandlung der Zellen besteht zwischen den Reporter-genassays und der Analyse von mRNA- und Proteinexpression der Unterschied in einer einstündigen Vorbehandlung der Zellen zum Zweck der Transkriptions- und Translationsanalyse. Aus diesem Grund wurden die Zellen für die Reporter-genaktivitätsbestimmung nun ebenso vergleichend behandelt, um einen etwaigen Abbau der Verbindung vor der Zellstimulation auszuschließen (Abbildung 48, B). Der dritte

Ansatz bestand in der Applikation der Substanz nachdem die Zellen wie in 2.2.3.5 beschrieben mit 1 x Passive Lysis Buffer lysiert wurden (Abbildung 48, C). Die Applikation erfolgte hierbei 10 Minuten vor der Bestimmung der Luciferaseaktivität. Da hier ein Verdampfen des Lösungsmittels, wie üblicherweise, nicht gewährleistet werden konnte, wurde die Lumineszenz relativ zu einer Vehikelkontrolle mit äquivalentem Volumen Ethanol (2,5 µl) ermittelt.

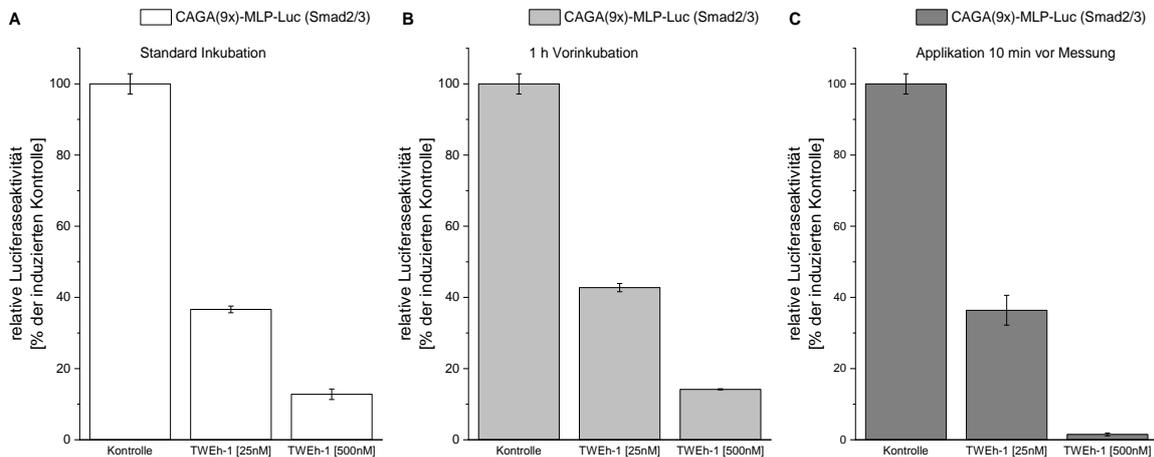


Abbildung 48: Vergleichender Effekt von TWEh-1 auf die Luciferaseaktivität des Vektors (CAGA)_{9x}-MLP-Luc unter Standardbedingungen (A), unter Prä-Inkubationsbedingungen (B) und unter Post-Inkubationsbedingungen (C). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten ($p \leq 0,001$).

Eine einstündige Vorbehandlung mit TWEh-1 hatte hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung keinen veränderten Effekt auf die Luciferaseaktivität des Vektors (CAGA)_{9x}-MLP-Luc (Abbildung 48, A, B). Die Luciferaseaktivität wurde jeweils durch Applikation von 500 nM TWEh-1 um 86 % gegenüber der induzierten Kontrolle vermindert. Die gleiche Menge an applizierter Verbindung auf bereits lysierte induzierte Zellen hatte einen reduzierenden Einfluss auf die gemessene Luciferaseaktivität von 98 %, was belegt, dass der inhibierende Einfluss nicht in einer Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion begründet liegt, sondern vielmehr auf einen inhibierenden Einfluss auf die Luciferasereaktion selbst zurückzuführen ist (Abbildung 48, C).

Zur Bestätigung des inhibitorischen Einflusses auf die Luciferaseaktivität wurde außerdem eine rekombinante Luciferase aus *Photinus pyralis* (Promega, Mannheim) anstelle einer induzierten Reporter-abhängigen Luciferase aus dem Zellextrakt genutzt. 20 µl gepufferter rekombinanter Luciferase (20 nM Luciferase, 50 mM HEPES pH 7,2, 80 mM KCl, 0,5 µM BSA) wurden in eine weiße 96-Well Mikrotiterplatte überführt. Die Applikation der Testsubstanz erfolgte gelöst in EtOH mit maximalem Volumen von 2,5 µl, welches entsprechend in der

Vehikel-Kontrolle angepasst wurde. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen der applizierten Menge im Reporterassay (2,5, 25, 250, 500 nM), sind aber in Abbildung 45 in der angepassten Molarität des Endvolumens beschriftet. Die Zugabe des Substrates und Ermittlung der Luciferaseaktivität folgte entsprechend dem Standardprotokoll mittels Injektors (vgl. 2.2.3.5.1).

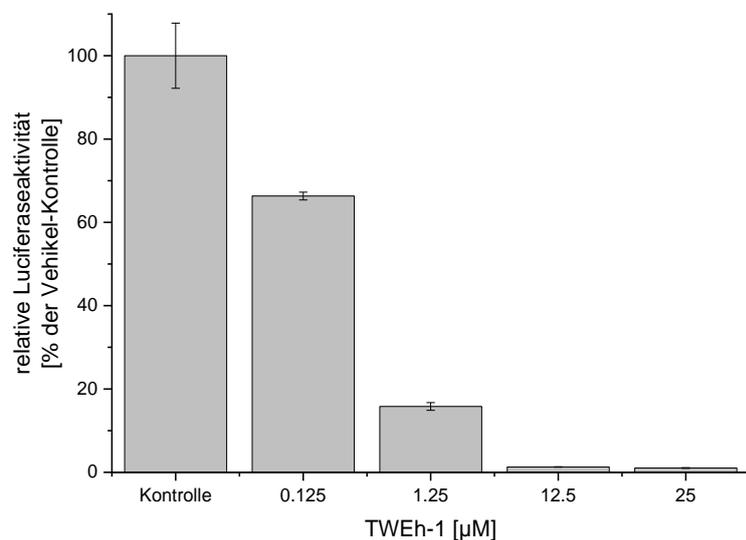


Abbildung 49: Wirkung von TWEh-1 auf die Luciferaseaktivität. 10 nM rekombinante Luciferase wurde eingesetzt um 20 µl des Luciferase-Substrates (Luciferase 1000 Assay System, Promega, Madison, USA) umzusetzen. Dargestellt ist die relative Aktivität der Lumineszenz in Abhängigkeit applizierter Konzentrationen an TWEh-1 gegenüber der Vehikel-Kontrolle. Der Graph beinhaltet die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten ($p \leq 0,001$).

Die Lumineszenz der rekombinanten Luciferase konnte relativ zur Pufferkontrolle 4770-fach gesteigert werden. Die Vehikel-Kontrolle bewirkte eine Abnahme dieser Lumineszenz um 36 % (Daten nicht aufgeführt). Aus Abbildung 49 wird ersichtlich, dass TWEh-1 dosisabhängig die Aktivität der Luciferase aus *Photinus pyralis* gegenüber der Vehikel-Kontrolle inhibiert. Bereits eine Applikation mit 1,25 µM TWEh-1, was im Reporterassay einer Konzentration von 25 nM entsprach, resultierte in einer 84%-igen Inhibition der Luciferasereaktion.

Arbeitsgruppen-interne Analysen von strukturell verwandten Derivaten von TWEh-1, dem Aglykon Emodin, dem Emodin-8-O-β-D-Glycosid und Chrysophanol zeigten hinsichtlich der Luciferaseaktivität der STAT6-abhängigen, sowie der NF-κB-abhängigen Signaltransduktion keine inhibitorischen Effekte bis zum Konzentrationsbereich von 620 nM (Stier, 2016). Der Einfluss dieser Verbindungen auf die Lumineszenz der rekombinanten Luciferase wurde ebenfalls bis zu einer Konzentration von 50 µM getestet. Eine Inhibition der Luciferaseaktivität konnte bei keinem der beschriebenen Derivate beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.5 Biologische Charakterisierung von Cyclonerodiol

Das Sesquiterpen Cyclonerodiol wurde bereits durch Dr. Kristina Rudolph aus dem Ascomyeten *Fusarium sp.* isoliert, und in einem Screening als selektiver Inhibitor des IL-4 induzierten STAT6-Signalweg ($IC_{50} = 9,7 \mu\text{M}$) beschrieben (Langhanki, Rudolph, Erkel, & Opatz, 2014a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterführend zu den Arbeiten von Rudolph (2015) der Einfluss von Cyclonerodiol auf die mRNA- und Proteinexpression von Eotaxin-3 anhand der humanen alveolaren Typ II Epithelzelllinie A549 untersucht.

3.5.1 Isolation von Cyclonerodiol aus *Fusarium sp.*

Die Fermentation von *Fusarium sp.* zur Reindarstellung von Cyclonerodiol erfolgte nach Langhanki *et al.* (2014) in einem Fermenter vom Typ C-6 (Biolafitte, Paris, Frankreich) im 20 l-Maßstab in Medium M3 (3 l Luft/min, 120 rpm). Die Extraktion und Reindarstellung resultierten in einer Ausbeute von 2,1 mg. Das cyclopentanoide Sesquiterpen mit einem Molekulargewicht von 240,38 g/mol besitzt die Summenformel $C_{15}H_{28}O_2$, deren Struktur in Abbildung 50 dargestellt ist.

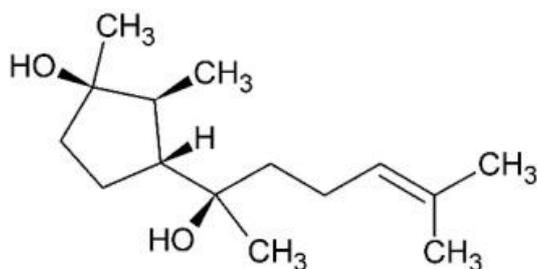


Abbildung 50: Strukturformel von Cyclonerodiol

3.5.2 Einfluss von Cyclonerodiol auf die mRNA- und Proteinexpression von Eotaxin-3

Die Reifung naiver CD4-T-Zellen zu T-Helfer-Typ-2 Lymphozyten, deren übermäßige Ausprägung die Entstehung von allergischem Asthma durch TH2-spezifische Zytokin-Sekretion und damit einhergehendem inflammatorischen Milieu bedingt, ist stark von der STAT6-abhängigen Signaltransduktion abhängig (Krishnamurthy & Kaplan, 2016). Die TH2-Zell-bedingte Produktion von IL-4 und IL-13 induziert außerdem die STAT6-abhängige Expression von Chemokinen in der Lunge, welche nachfolgend die Migration eosinophiler Granulozyten initiiert, deren Akkumulation als entscheidender Faktor für atopisches Asthma angesehen wird (Q. Yuan *et al.*, 2006). Die Bedeutung von Eotaxinen spiegelt sich in signifikant erhöhten mRNA- und Proteinleveln aus Bronchialbiopsien im Vergleich zu nicht-asthmatischen Kontrollpersonen und einer Akkumulation, insbesondere von Eotaxin-3, im

Sputum nach Allergenbelastung wider (Berkman, Ohnona, Chung, & Breuer, 2001). Durch Rudolph (2015) konnte bereits ein inhibitorischer Einfluss von Cyclonerodiol auf die IL-4-induzierte, STAT6-abhängige Expression von Eotaxin-1 auf mRNA- und Proteinlevel gezeigt werden.

Zusätzlich zu IL-4, welches die frühe Phase der asthmatischen Reaktion einleitet, wurde die Expression von Eotaxin-3 mit IL-13 Co-stimuliert. Neben der Induktion der frühen Phase fungiert IL-13 als Effektor-Molekül auch in der späten Phase der asthmatischen Reaktion, welche der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus der Asthma-Reaktion dient (Oh *et al.*, 2010). Die Erstellung der Proteinlysate und der cDNA aus Gesamtzelllysat erfolgte wie in 2.2.3.13.3 beschrieben. Für die Analyse des Einflusses von Cyclonerodiol auf die mRNA-Expression wurden A549-Zellen 1 h mit dem Wirkstoff vorinkubiert und für weitere 7 h mit je 10 ng/ml IL-4 und IL-13 stimuliert. Die Transkriptionsanalyse erfolgte durch qRT-PCR und dem mathematischen Modell nach Pfaffl (vgl.: 2.2.3.13.5). Die Proteinexpression wurde äquivalent nach 24 h Inkubation untersucht.

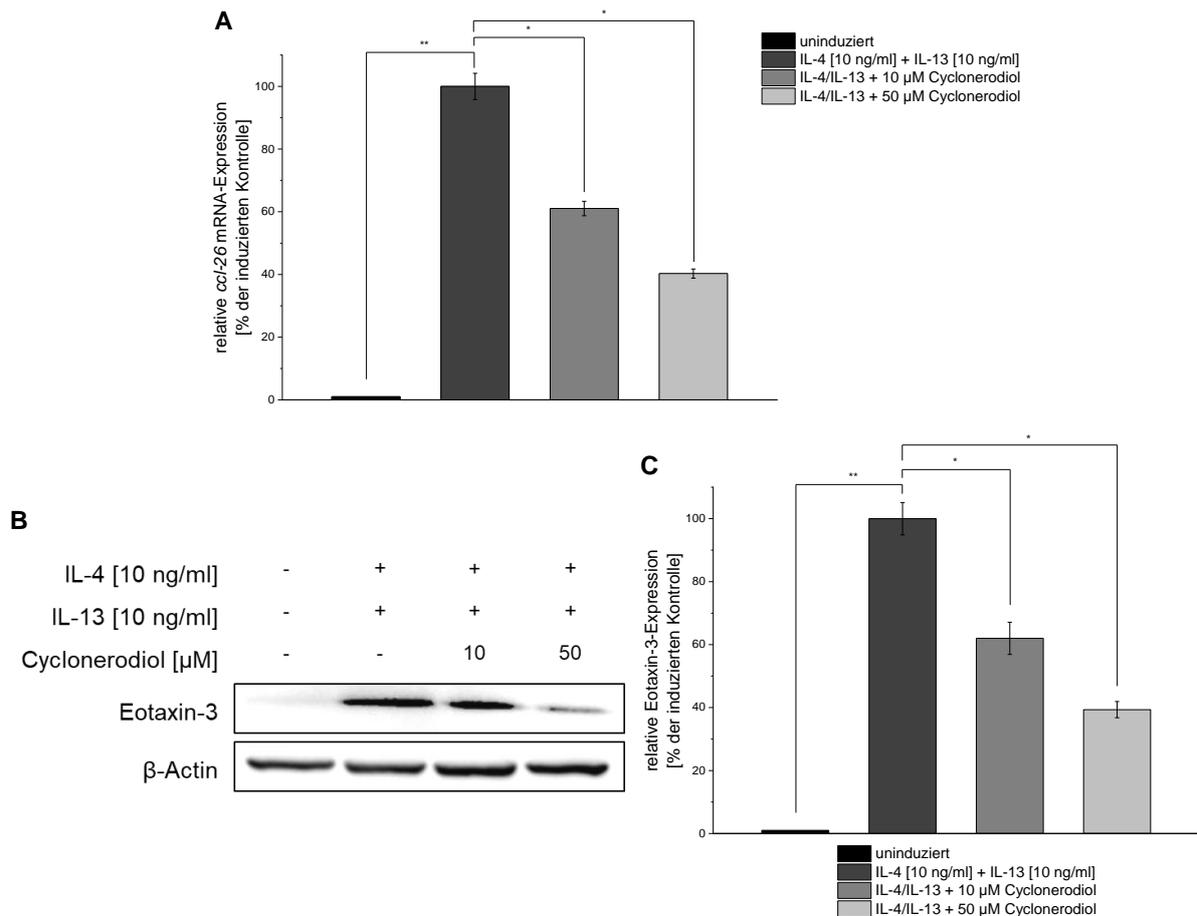


Abbildung 51: Einfluss von Cyclonerodiol auf die IL-4/13-induzierte Eotaxin-3 mRNA- und Protein-Expression in A549-Zellen. A549-Zellen wurden vor Versuchsbeginn 1 h mit 10 und 50 µM Cyclonerodiol vorbehandelt, und anschließend für weitere 7 h (mRNA), bzw. 24 h (Protein) mit 10 ng/ml IL-4 und IL-13 induziert. A: Dargestellt ist die relative mRNA-Menge der induzierten Substanz-behandelten, gegen induzierte unbehandelte Zellen in Prozent. Als Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) verwendet. (Mittelwert \pm SEM aus drei biologischen mit jeweils zwei technischen Replikaten; Varianzanalyse: $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$ in Bezug auf Referenz). B: Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit entsprechenden Antikörpern. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild aus drei biologischen Replikaten. C: Densitometrische Auswertung der drei biologischen Replikate, dargestellt als Mittelwert \pm SEM (**: $p \leq 0,01$ vs. uninduziert; *: $p \leq 0,05$ vs. induziert).

Die mRNA-Menge von *eotaxin-3* konnte durch Behandlung mit 50 µM Cyclonerodiol auf 40 % relativ zur IL-4/IL-13-induzierten Kontrolle gesenkt werden (Abbildung 51, A). Um diese Daten zu bestätigen, wurde die Proteinexpression von Eotaxin-3 nach 24 h unter gleicher Behandlung und Stimulus analysiert. Abbildung 51 (B) sowie die densitometrische Auswertung

(Abbildung 51, C) belegen, dass die Expression von Eotaxin-3 auf Proteinebene dosisabhängig ebenfalls um 60 % durch 50 μ M Cyclonerodiol reprimiert wurde.

3.5.3 Einfluss von Cyclonerodiol auf die Bindung von STAT6 an den endogenen *eotaxin-3* Promotor

Die Ergebnisse der mRNA- und Protein-Repression von Eotaxin-3 durch Cyclonerodiol ließen einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des *ccl26*-Gens vermuten. Unter diesem Eindruck wurde die Bindung des transkriptionellen Regulators STAT6 an den endogenen *eotaxin-3*-Promotor unter dem Einfluss des Wirkstoffes untersucht. Die Erstellung der Proteinlysate erfolgte wie in 2.2.3.12.1 beschrieben. Nachfolgend wurde gebundenes Chromatin mit Antikörpern gegen STAT6 mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) präzipitiert und die relative Expression der -110 bis +85 Sequenz des *eotaxin-3*-Promotors gegenüber einer nicht-spezifischen IgG-Isotypen-Kontrolle mittels qRT-PCR ermittelt. Gleichzeitig wurde die DNA, präzipitiert mit Antikörpern gegen aktiviertes, acetyliertes Histon H3, hinsichtlich der Expression des humanen, konstitutiv aktiven *gapdh*-Promotors zur Kontrolle unspezifischer Effekte untersucht.

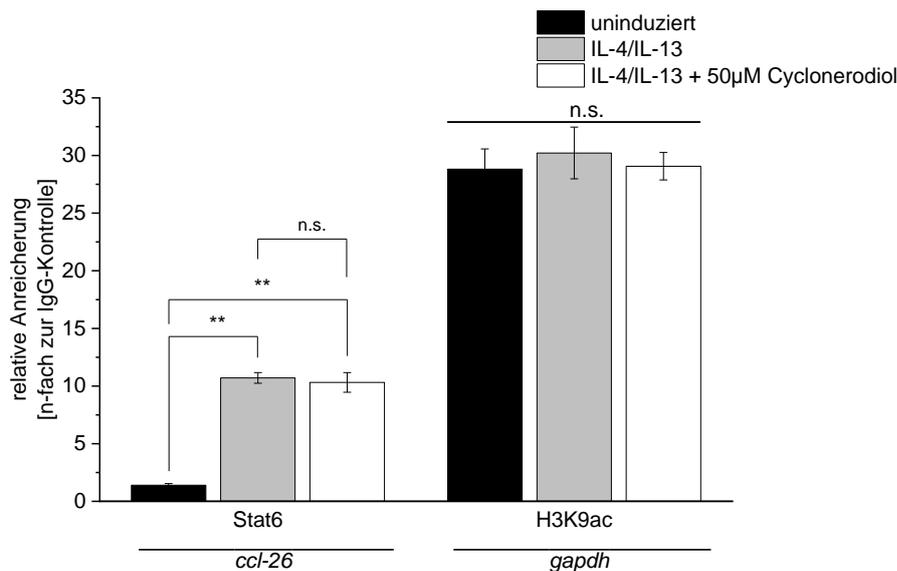


Abbildung 52: Effekt von Cyclonerodiol auf die Bindung von STAT6 an den endogenen *eotaxin-3*-Promotor. Nach 1-stündiger Vorbehandlung mit 50 μ M Cyclonerodiol wurden A549-Zellen 45 min mit 10 ng/ml IL-4 und IL-13 induziert. Die ChIP erfolgte mit Antikörpern gegen STAT6, H3K9ac und unspezifischem IgG. Die qRT-PCR-Analyse des präzipitierten Chromatins erfolgte mit Primern zur Amplifikation spezifischer Promotorregionen von *ccl-26* und *gapdh*. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm

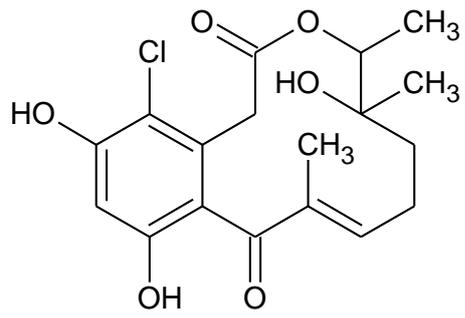
SEM aus drei biologischen zu je zwei technischen Replikaten der relativen Anreicherung dieser Sequenzen gegenüber der IgG-Kontrolle (n.s. = nicht signifikant, ** = $p \leq 0,01$)

Die in Abbildung 52 dargestellte Stimulation mit IL-4/13 resultierte in einer 10-fachen Steigerung der Bindung von STAT6 an den *eotaxin-3*-Promotor. Die Vorbehandlung mit 50 μ M Cyclonerodiol hatte keinen Einfluss auf die Bindung des Transkriptionsfaktors STAT6 an diese Promotorregion. Ebenso wurde die Bindung von acetyliertem (K9) Histon 3 an den konstitutiv aktiven Promotor von *gapdh* durch Cyclonerodiol nicht beeinflusst.

3.6 Einfluss verschiedener Derivatisierungen von Oxacyclododecindion auf die antiinflammatorische Aktivität

Oxacyclododecindion (Oxa) wurde bereits als potenter Inhibitor der IL-4-abhängigen STAT6-Signaltransduktion ($IC_{50} = 54-67$ nM) isoliert und beschrieben (Gerhard Erkel *et al.*, 2008). Weitere Untersuchungen bezüglich des Potentials des Naturstoffs, isoliert aus dem Deuteromyceten *Exserohilum rostratum*, offenbarten auch Wirkungen auf beispielsweise die pro-fibrotische TGF- β -induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion mit IC_{50} Werten von 190 bis 217 nM (K. Rudolph *et al.*, 2013). Im Rahmen der Totalsynthese durch die AG Opatz (Institut für Organische Chemie, Uni Mainz), welche kürzlich erfolgreich abgeschlossen werden konnte (Seipp *et al.*, 2024), wurden verschiedene Derivate, ausgehend von der Grundstruktur des Naturstoffes erzeugt (Abbildung 53). Um die Struktur-Wirkungsbeziehung, sowie den Einfluss der Halogenierung von Oxa am C-4- bzw. C-6-Atom näher zu untersuchen, wurden diese, durch die AG Opatz zur Verfügung gestellten Derivate, auf ihre inhibitorische Wirkung der TGF- β -induzierten SMAD2/3-Signaltransduktion, sowie der IL-4-induzierten STAT6-Signalkaskade untersucht. Um den Einfluss auf die TGF- β -induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion zu untersuchen wurden HepG2-Zellen mit dem Reporter-genkonstrukt (CAGA)_{9x}-MLP-luc transient transfiziert, 24 h mit 5 ng/ml TGF- β induziert und mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen inkubiert (vgl. 2.2.3.5). Zur Untersuchung der IL-4 abhängigen STAT6-Signalkaskade wurden der Reporter-genvektor pGL3-TK-7xN₄ und der Expressionsvektor TOPO/STAT6 genutzt. Zur Normalisierung wurde jeweils der Vektor pRL-EF1- α Co-transfiziert. 24 h nach Wirkstoffapplikation erfolgte die Bestimmung der Reporter-genaktivität, welche auf die konstitutiv aktive pRL-EF1- α -Aktivität normalisiert wurde. Die Auswertung erfolgte unter Ermittlung der IC_{50} - bzw. IC_{90} -Werte anhand eines nicht-linearen Dosis-Wirkungs-Fittings.

A



B

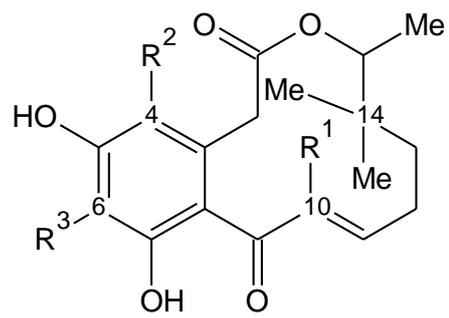


Abbildung 53: Strukturformel des Naturstoffs Oxacyclododecindion (A) und Grundstruktur der Derivatisierung (B)

Tabelle 6: Wirkung verschiedener Derivate von Oxacyclododecindion auf die SMAD2/3- und STAT6-abhängige Signaltransduktion. HepG2-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden (CAGA)_{9x}-MLP-Luc (SMAD2/3), bzw. pGL3-TK-7xN4 und TOPO/STAT6 (STAT6) transient transfiziert. Die Wirkstoffbehandlung und die Induktion mit 5 ng/ml TGF- β (SMAD2/3), bzw. 10 ng/ml IL-4 (STAT6) erfolgten für 24 h. Die Aktivität des experimentellen Reportergens wurde gegen die Expression des Co-transfizierten Kontrollvektors pRL-EF1 α normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der mittels nicht-linearem Fitting erzeugten IC₅₀ und IC₉₀ aus drei biologischen zu je drei technischen Replikaten.

Substituierung	Name Summenformel Molekulargewicht	(CAGA) _{9x} -MLP-Luc		pGL3-TK-7xN4	
		IC ₅₀ \pm SEM [nM]	IC ₉₀ \pm SEM [nM]	IC ₅₀ \pm SEM [nM]	IC ₉₀ \pm SEM [nM]
[1] R ¹ = Me	(\pm)-4-Dechloro-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion C ₁₉ H ₂₄ O ₅ MW: 332,39 g/mol	87,85 \pm 29,75	328,82 \pm 46,93	263,24 \pm 19,55	740,37 \pm 62,88
[2] R ¹ = Me R ² = Cl	(\pm)-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion C ₁₉ H ₂₃ ClO ₅ MW: 366,84 g/mol	29,36 \pm 10,63	82,19 \pm 22,41	73,06 \pm 14,53	243,7 \pm 46,07
[3] R ¹ = Et R ² = Cl	(\pm)-10-Ethyl-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion C ₂₀ H ₂₅ ClO ₅ MW: 380,86 g/mol	519,88 \pm 12,05	2672,9 \pm 8,11	105,13 \pm 24,18	348,68 \pm 22,29
[4] R ¹ = Me R ² = Br	(\pm)-4-Brom-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion C ₁₉ H ₂₃ BrO ₅ MW: 411,29 g/mol	380,6 \pm 27,79	731,84 \pm 21,83	177 \pm 5,15	308,91 \pm 3,55
[5] R ¹ = Me R ² = F	(\pm)-4-Fluor-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion C ₁₉ H ₂₃ FO ₅ MW: 350,38 g/mol	1264,3 \pm 12,5	3128 \pm 8,5	441,81 \pm 29,28	1474,1 \pm 10,16
[6] R ¹ = Me R ² = Br R ³ = Br	(\pm)-4,6-Dibrom-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion C ₁₉ H ₂₂ Br ₂ O ₅ MW: 490,18 g/mol	851,01 \pm 9,94	>6123	378,68 \pm 11,99	1333,9 \pm 5,84

[7]	(±)-6-Chlor-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion	4623 ±	>7476	1017 ±	5587 ±
R ¹ = Me		12,14		17,42	13,83
R ² = Cl	C ₁₉ H ₂₂ Cl ₂ O ₅				
R ³ = Cl	MW: 401,28 g/mol				

Der Einfluss auf die TGF- β -induzierte SMAD2/3-, und die IL-4-induzierte STAT6-Signaltransduktion verschiedener Derivatisierungen der in Abbildung 53 (B) dargestellten Grundstruktur ist in Tabelle 6 durch jeweils ermittelte IC₅₀-/IC₉₀-Werte angegeben. Die Methylierung anstelle der Hydroxy-Gruppe am C-14-Atom gegenüber dem Naturstoff zeigte bei beiden Signaltransduktionen die größte inhibitorische Wirkung. Im Vergleich zu den obig beschriebenen Literaturwerten des Naturstoffs, zeigte dieses Derivat mit IC₅₀-Werten von 29 nM (SMAD2/3), bzw. 82 nM (STAT6) einen vergleichsweise größeren inhibitorischen Effekt. Die Substituierung mit einer Ethyl-Gruppe am C-10-Atom hatte gegenüber der Methylgruppe an gleicher Stelle keine vorteilhafte Wirkung. Besonders stark vermindert mit Faktor 17 (IC₅₀) ist hierbei die Aktivität auf SMAD2/3, wohingegen die STAT6-inhibierende Wirkung lediglich um 43 % (IC₅₀) abnimmt. Die Chlorierung am C-4-Atom ist für die Wirkung mitentscheidend, da das unchlorierte Derivat hier verminderte Wirksamkeit aufweist. Die Veränderung der Art der Halogenierung hin zu bromiertem, bzw. fluoriertem C-4-Atom zeigt keine Aktivitätssteigerung, wobei sich die Brom-Substituierung hier der durch Fluor überlegen darstellt. Eine zusätzliche Halogenierung am C-6-Atom mit Brom oder Chlor schwächt die Aktivität weiter ab, wobei die doppelte Chlorierung bei beiden Signaltransduktionen die schwächste Wirkung aufweist.

3.6.1 Funktionalisierung von (±)-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion für *Target-Pulldown*-Studien

Die Aufklärung der Wirkungsweise, bzw. eines zellulären *Targets* von Oxa blieb bis dato unzureichend. Vorarbeiten von A.-K. Rudolph (2015) konnten bezüglich der TGF- β induzierten Signalweiterleitung im nicht-kanonischen Signalweg eine Hemmung der Phosphorylierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen, wie der MAP-Kinasen p38 und JNK, sowie der vorgeschalteten Kinasen MKK3/6 und TAK1 durch Oxa belegen. Rohr (2018) konnte ebenso einen inhibitorischen Einfluss auf vorgeschaltete Kinasen wie p38 oder TAK1 des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B, nachweisen. Um die Identifikation von Zielproteinen von (±)-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion (DM-Oxa, Abbildung 54, A), als potentestem, chemisch synthetisierbarem Derivat, nachfolgend gewährleisten zu können, wurden zunächst funktionelle Gruppen durch die AG Opatz an DM-Oxa angefügt. Der initiale Ansatz hierbei war, ein funktionalisiertes Derivat zu applizieren, welches intrazellulär das

Zielprotein bindet, und nach Zellaufschluss das Derivat mit potentiellen Interaktionspartnern mittels einer kupferfreien Azid-Alkin-Klick-Cycloaddition an ein Säulenmaterial zu binden und zu eluieren (Lutz, 2008). Alle Arbeiten zur Funktionalisierung wurden durch Nina Vierengel von der Arbeitsgruppe Opatz durchgeführt (Weber *et al.*, 2020). So wurde zum einen an die C-15-Methylgruppe von DM-Oxa eine Alkin-Gruppe angefügt. Diese Verbindung wird nachfolgend als DM-Oxa-Alkin bezeichnet (vgl. Abbildung 54, B). Durch diese Alkin-Gruppe bestand die Möglichkeit bei entsprechendem Reaktionspartner mit Azid-Gruppe eine Azid-Alkin-Klick-Cycloaddition durchzuführen. Um den physikalischen Abstand mit der reaktiven Gruppe zu erhöhen, und die Interaktion mit Zielproteinen nicht sterisch zu beeinflussen, wurde überdies mittels Azid-Alkin-Klick-Cycloaddition der Polyethylenglycol (PEG)-Spacer Azid-PEG(4)-Azid angefügt. Die resultierende Verbindung wird nachfolgend als Linker-DM-Oxa bezeichnet (Abbildung 54, C). Um den Einfluss der Funktionalisierungen zu testen, wurde mittels transienter Transfektion die Auswirkung auf die SMAD2/3-Signaltransduktion in HepG2-Zellen untersucht. Für DM-Oxa-Alkin konnte eine um Faktor 13 ($IC_{50} = 478 \pm 13,4$ nM) und für Linker-DM-Oxa eine um Faktor 222 ($IC_{50} = 7780 \pm 31,6$ nM) verminderte Aktivität gegenüber DM-Oxa ($IC_{50} = 35 \pm 8,2$ nM) auf die SMAD2/3-Signaltransduktion in HepG2-Zellen ermittelt werden (Abbildung 54, D).

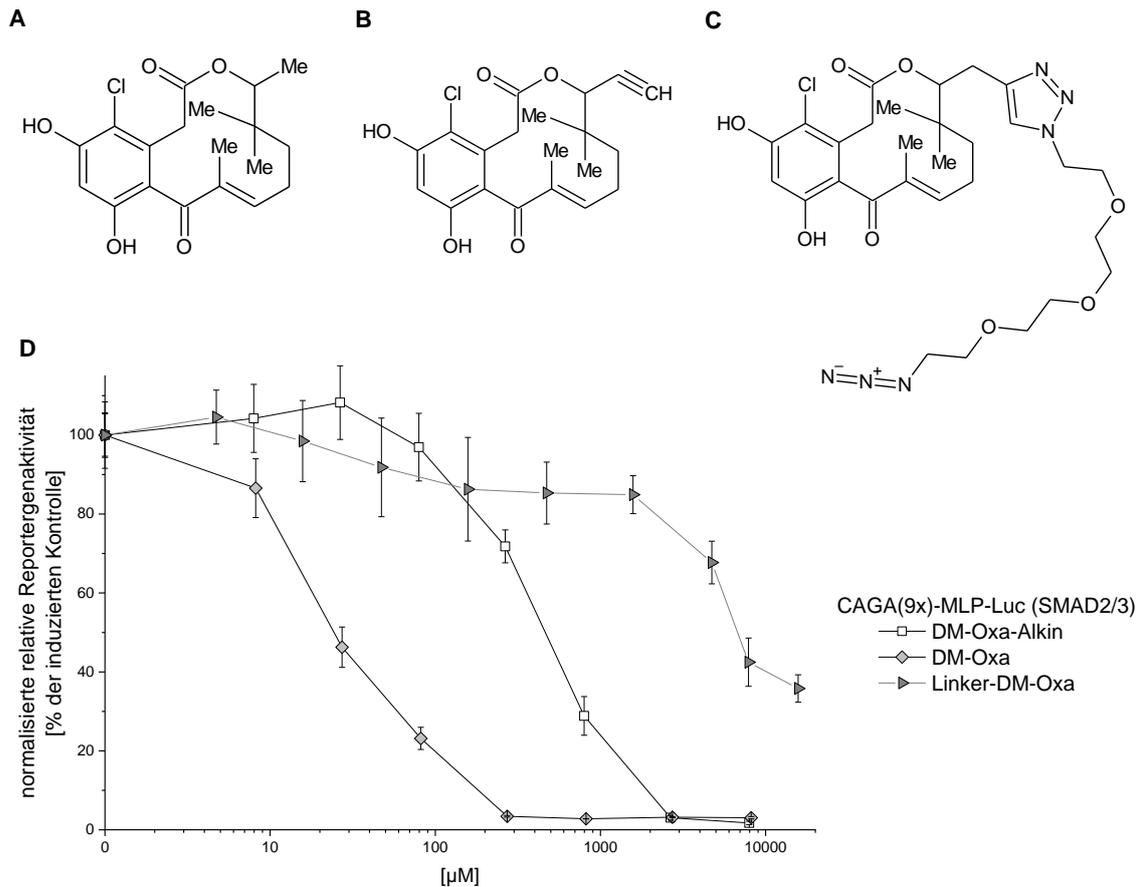


Abbildung 54: Einfluss von DM-Oxa-Alkin (B) und Linker-DM-Oxa (C) im Vergleich mit DM-Oxa (A) auf die TGF- β -induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion. BEAS-2B-Zellen wurden mit dem Reporter-genkonstrukt CAGA_{9x}-MLP-Luc transient transfiziert. Zur internen Normalisierung wurde der konstitutiv aktive Kontrollvektor pRL-EF1 α Co-transfiziert. Die Applikation verschiedener Konzentrationen an DM-Oxa, DM-Oxa-Alkin und Linker-DM-Oxa, sowie die Induktion mit 5 ng/ml TGF- β erfolgte für 24 h. Die Expression der *Firefly*-Luciferase wurde gegen die Expression der *Renilla*-Luciferase des Kontrollvektors normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten ($p \leq 0,001$).

Aufgrund der stark verminderten Aktivität der Verbindungen auf die SMAD2/3-Signaltransduktion wurde der Ansatz die Bindung *in vivo* durchzuführen verworfen. Die Verbindung Linker-DM-Oxa wurde abschließend an mit BCN-NHS-Ester funktionalisierte CarboxyLink-BeadsTM gebunden (Abbildung 55), um diese Beads mit nativem Proteinlysatz zu inkubieren und potentielle Interaktionspartner so *in vitro* zu koppeln und zu eluieren.

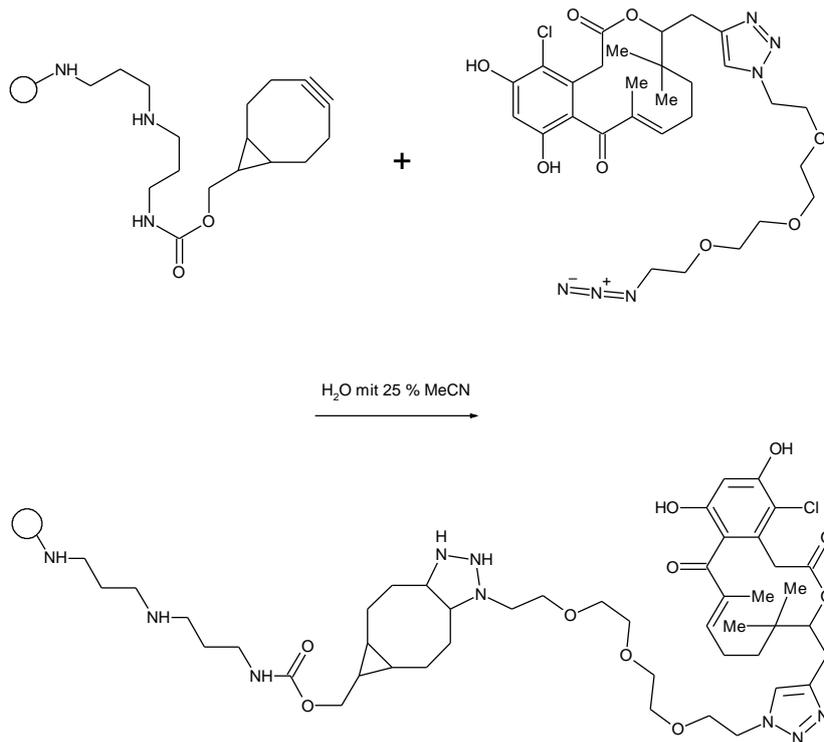


Abbildung 55: Funktionalisierung von Linker-DM-Oxa an CarboxyLink-Beads™ mit BCN-NHS-Ester.

3.6.2 DM-Oxa-Bead-Pulldown-Assay

In eigenen Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass DM-Oxa hinsichtlich der TGF- β -induzierten SMAD2/3-Signaltransduktion einen inhibitorischen Effekt mit einem IC_{50} -Wert von 29 nM in HepG2-Zellen ausübt (vgl. Tabelle 6). Darüber hinaus konnte dieser Effekt auch bezüglich der Zelllinie BEAS-2B von Stier (2019) bestätigt werden, wobei auch die durch CM induzierte Promotoraktivität von *ip-10* und *il-8* mit IC_{50} -Werten von 55 nM und 46 nM beeinflusst wurde. Um nun die Frage potentieller Interaktionspartner von DM-Oxa in Abhängigkeit des Stimulus zu erörtern, wurden Proteinextrakte von BEAS-2B-Zellen nach 2.2.3.7.3 hergestellt, die 45 Minuten mit TGF- β (5 ng/ml) bzw. CM (10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ , 5 ng/ml IL1- β) induziert wurden, sowie, vergleichsweise unstimulierte Proteinlysate erstellt. Für das DM-Oxa-Bead-Pulldown-Experiment wurden pro Ansatz 100 μ g Protein der jeweiligen Proben eingesetzt. Als Kontrolle diente jeweils eine Präinkubation aller Proben mit den in Abbildung 55 aufgeführten CarboxyLink-Beads™ mit BCN-NHS-Ester, welche nachfolgend als Kontroll-Beads bezeichnet werden. Die Vorbehandlung mit DM-Oxa diente einer weiteren Kontrolle, indem hier eine Abreicherung potentieller Interaktionspartner erreicht wurde.

3.6.2.1 Visualisierung des DM-Oxa-Bead-Pulldown-Experiment

Um zu überprüfen, inwieweit sich die Proteine nach dem *Pulldown* in den Proben verteilen, wurden 10 % Prozent des Gesamt-Eluats über eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Färbung des Gels wurde, wie in 2.2.3.10.1 beschrieben mit Colloidal Coomassie über Nacht durchgeführt, und die anschließende Visualisierung erfolgte in einer Analysekammer (FUSION FX7 advanced, Vilber Lourmat, Eberhardzell). Nachfolgend dargestellt sind exemplarisch die gefärbten Proteine eines biologischen Replikates des DM-Oxa-Bead-Pulldown-Experiments.

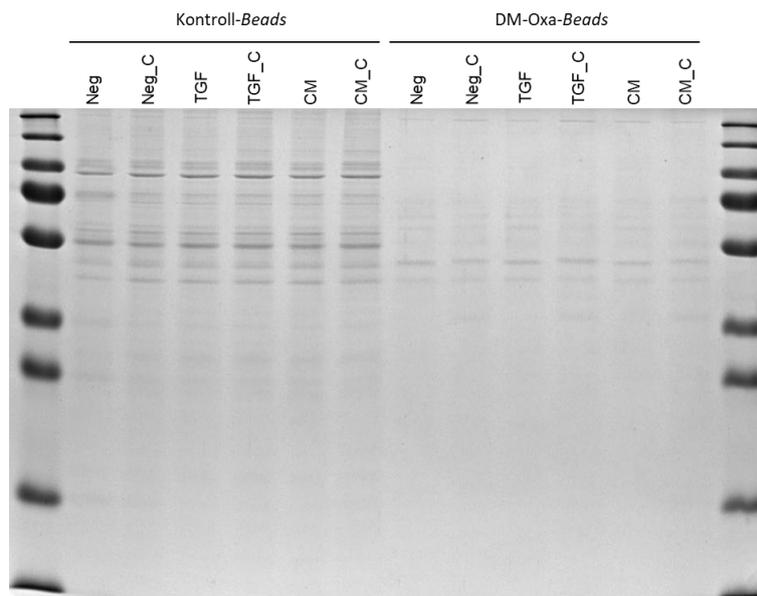


Abbildung 56: Visualisierung des DM-Oxa-Bead-Pulldowns nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Färbung durch Colloidal Coomassie. Dargestellt ist die Proteinverteilung von jeweils 10 % der eluierten Proteinmengen an Kontroll-Beads vergleichend mit DM-Oxa-Beads. Bei den Proben handelt es sich um unstimulierte Lysate (Neg), mit 5 ng/ml TGF- β stimulierte (TGF) und mit 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β stimulierte (CM) Lysate. Proben, die kompetitiv mit 50-fachem Überschuss an DM-Oxa präinkubiert wurden, sind jeweils in der *Lane* rechts daneben aufgeführt (_C).

3.6.2.2 Massenspektrometrische Untersuchung des DM-Oxa-Bead-Pulldown-Experiments

Die Probenvorbereitung der eluierten Proteine erfolgte wie in 2.2.3.10 beschrieben. Die MS-Analyse wurde mit den in 2.2.3.11 aufgeführten Parametern durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte wie unter 2.2.3.14 beschrieben. Als Grundlage zur Berechnung dienten die LFQ-Werte, wobei der Vergleich der Daten ungepaart erfolgte. Zur Normalisierung wurde das Verhältnis der Gesamt-LFQs der Kontroll-Bead-Proben genutzt.

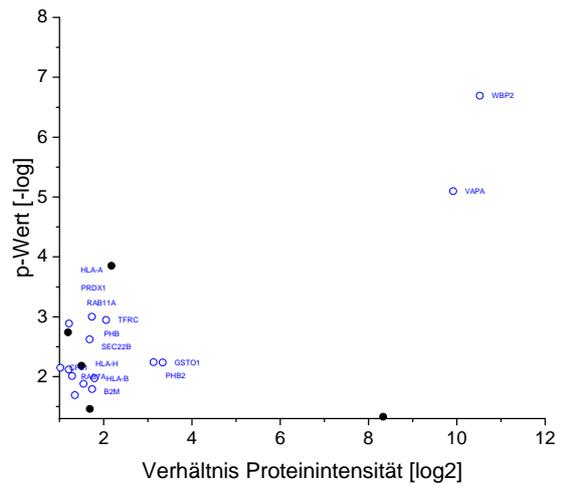
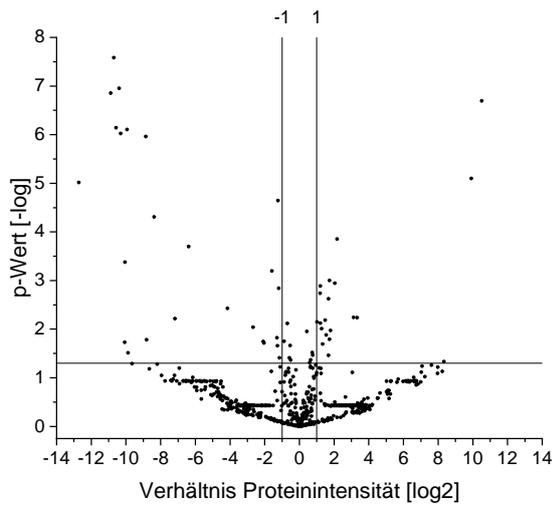
Zur Ermittlung der Induktions-spezifisch gebundenen Proteine, wurden die in folgender Tabelle 7 aufgeführten Kriterien berücksichtigt.

Tabelle 7: Kriterien zur Ermittlung spezifisch gebundener Proteine an DM-Oxa-Beads infolge der Stimulation.

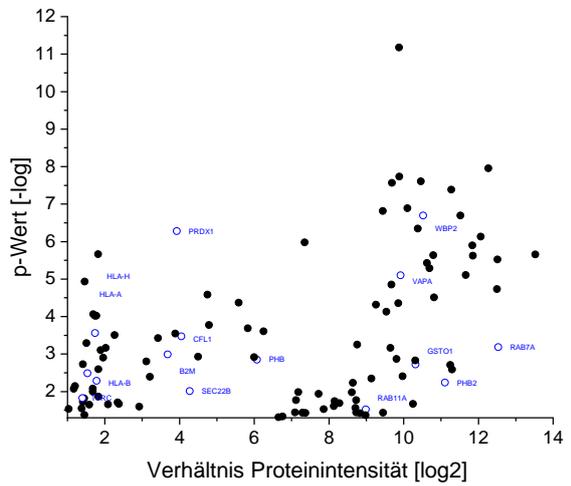
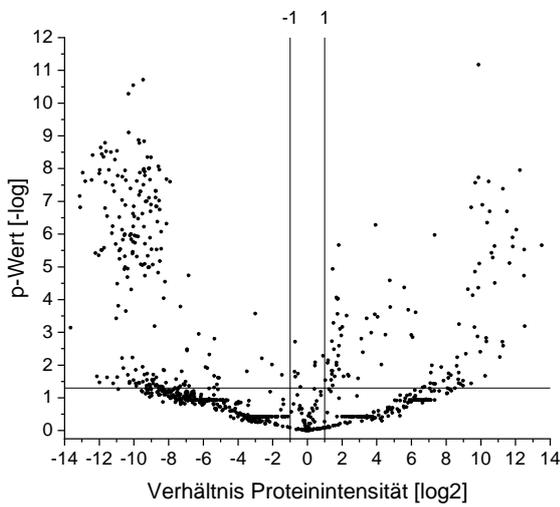
Kriterium		Signifikanzniveau
A	Angereicherte Bindung induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads im Vergleich zur Bindung induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads bei Konkurrenz mit 50-fachem Überschuss an DM-Oxa	$p \leq 0,05$; Änderung ≥ 2
B	Angereicherte Bindung induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads im Vergleich zur Bindung induzierter Proteine an Kontroll-Beads	$p \leq 0,05$; Änderung ≥ 2
C	Angereicherte Bindung induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads im Vergleich zur Bindung nicht-induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads	$p \leq 0,05$; Änderung ≥ 2

Die Abbildung 57 zeigt die Kriterien-spezifische (Tabelle 7) Verteilung der mit TGF- β stimulierten, an Oxa-Beads gebundenen Proteine.

A) TGF- β -induzierte DM-Oxa-Beads vs. TGF- β -induzierte DM-Oxa-Beads mit Konkurrenz



B) TGF- β -induzierte DM-Oxa-Beads gg. TGF- β -induzierte Kontroll-Beads



C) TGF- β -induzierte DM-Oxa-Beads gg. uninduzierte DM-Oxa-Beads

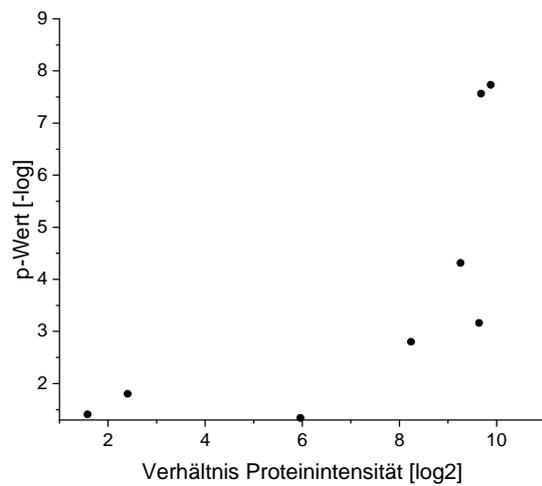
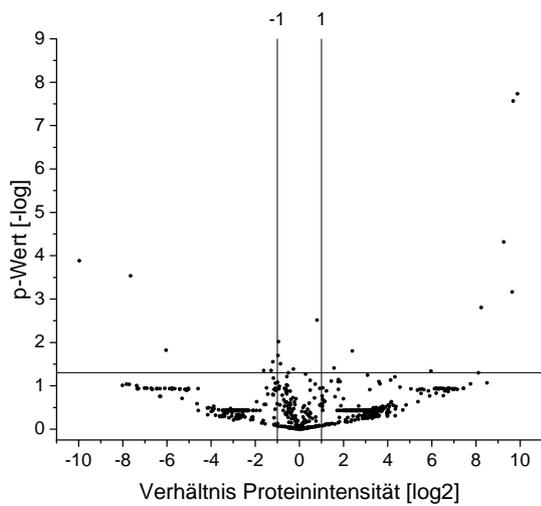


Abbildung 57: *Pulldown* TGF- β -induziert abhängiger Proteine an DM-Oxa-Beads. Dargestellt ist jeweils im linken Graph die Gesamtproteinverteilung, im rechten Graph der Ausschnitt signifikanter Proteine ($p \leq 0,05$; $\text{ratio} \geq 2$), wobei die relativen Änderungen (\log_2) von Proteinen an DM-Oxa-Beads stimuliert vs. DM-Oxa-Beads stimuliert mit Konkurrenz (A), an DM-Oxa-Beads stimuliert vs. Kontroll-Beads stimuliert (B) und DM-Oxa-Beads stimuliert vs. DM-Oxa-Beads unstimuliert (C) angegeben sind ($n=3$).

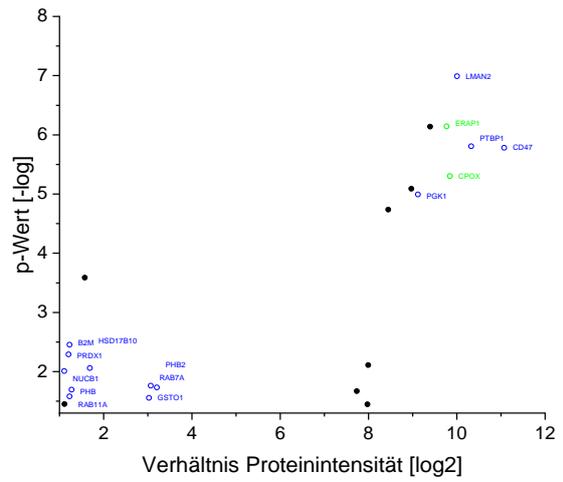
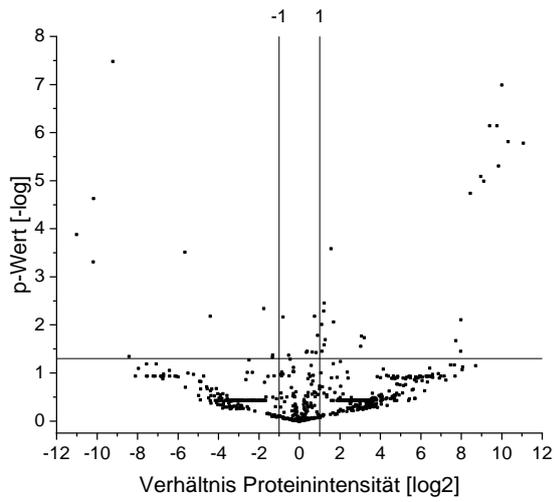
Von TGF- β induzierten Proteinen an DM-Oxa-Beads konnten gegenüber der Konkurrenz mit 50-fachem Überschuss an DM-Oxa 20 Proteine detektiert werden, die mit einem p -Wert kleiner 0,05 mindestens zweifach erhöht waren (Abbildung 57, A). Der *Pulldown*-Vergleich TGF- β -induziert an DM-Oxa-Beads zu Kontroll-Beads lieferte 108 Proteine mit beschriebenem Signifikanzniveau (Abbildung 57, B). 15 Proteine erfüllten beide Bedingungen und wurden blau markiert und mit entsprechenden Gennamen beschriftet. Die Auflistung der Proteine mit entsprechender Markierung befindet sich im Anhang (Ergänzende Tabelle 1 und Ergänzende Tabelle 2). Der Vergleich TGF- β stimulierter gegen unstimulierte Proteine an DM-Oxa-Beads lieferte acht Proteine (Abbildung 57, C), welche jedoch keine der anderen Kriterien erfüllten.

Die Kriterien-spezifische (Tabelle 7) Verteilung der mit CM stimulierten, an DM-Oxa-Beads gebundenen Proteine ist nachfolgend in Abbildung 58 dargestellt. An DM-Oxa-Beads konnten mit CM induzierte Proteine gegenüber der konkurrierenden Präinkubation mit 50-fachem Überschuss DM-Oxa 23 Proteine ($p \leq 0,05$; $\text{ratio} \geq 2$) detektiert werden (Abbildung 58, A). Im Vergleich CM-induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads gegenüber Kontroll-Beads wurden 112 Proteine erfasst (Abbildung 58, B). 19 Proteine konnten CM-induziert gegenüber Nichtinduktion an DM-Oxa-Beads relativ angereichert beschrieben werden (Abbildung 58, C). Die Bedingungen A und B erfüllten 15 Proteine (blau markiert), wobei aus diesen 15 Proteinen darüber hinaus auch zwei Proteine Bedingung C erfüllten (grün markiert) (Anhang: Ergänzende Tabelle 3 Ergänzende Tabelle 4 Ergänzende Tabelle 5). Bei diesen Proteinen handelt es sich zum einen um die im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Aminopeptidase ERAP-1. Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Spaltung von Ektodomänen von Zytokinrezeptoren, der Antigenprozessierung und -präsentation für MHC-Klasse-I-Moleküle, der Blutdruckregulierung sowie der Angiogenese (Goto, Nakamura, Ogawa, Hattori, & Tsujimoto, 2019). Auch eine auf einen inflammatorischen Stimulus mit LPS und IFN- γ folgende Sekretion durch Makrophagen von ERAP-1 konnte bereits beobachtet werden (Goto, Ogawa, Nakamura, Hattori, & Tsujimoto, 2014).

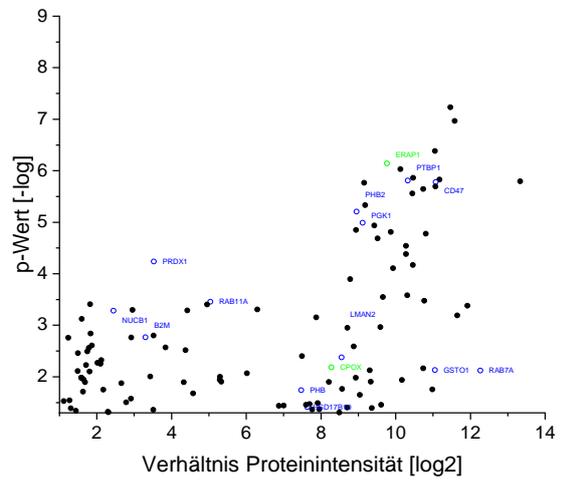
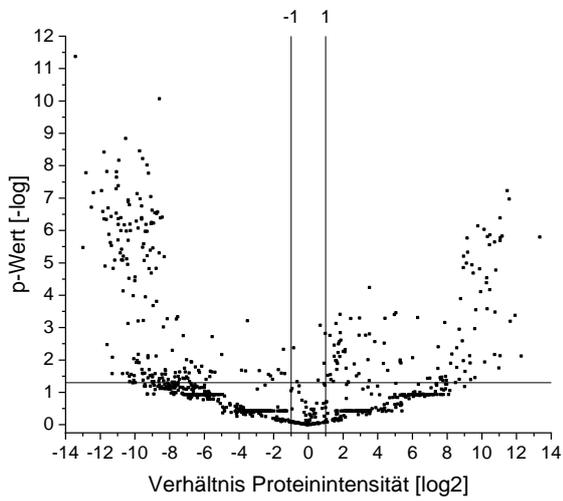
Das zweite Protein, welches alle Kriterien der CM-spezifischen Bindung an DM-Oxa-Beads aufweist, ist die in der Mitochondrienmembran lokalisierte Coproporphyrinogen-Oxidase (CPOX). Gegenüber ERAP-1 ist CPOX in allen drei Parametern weniger stark angereichert

und vor allem in Bezug auf durch CM-induzierten Proteine an DM-Oxa-Beads im Vergleich zu nicht induzierten Proteinen erfüllt CPOX das Signifikanzniveau mit einer 2,4-fachen Erhöhung bei einem p-Wert von 0,04 nur knapp. CPOX ist das sechste Enzym im Häm-Biosyntheseweg, das zwei aufeinanderfolgende oxidative Decarboxylierungen von Propionateinheiten auf Coproporphyrinogen-III katalysiert, die Protoporphyrinogen-IX über das Monovinyl-Zwischenprodukt Harderoporphyrinogen bilden (Stephenson *et al.*, 2007).

A) CM-induzierte DM-Oxa-Beads gg. CM-induzierte DM-Oxa-Beads mit Konkurrenz



B) CM-induzierte DM-Oxa-Beads gg. CM-induzierte Kontroll-Beads



C) CM-induzierte DM-Oxa-Beads gg. uninduzierte DM-Oxa-Beads

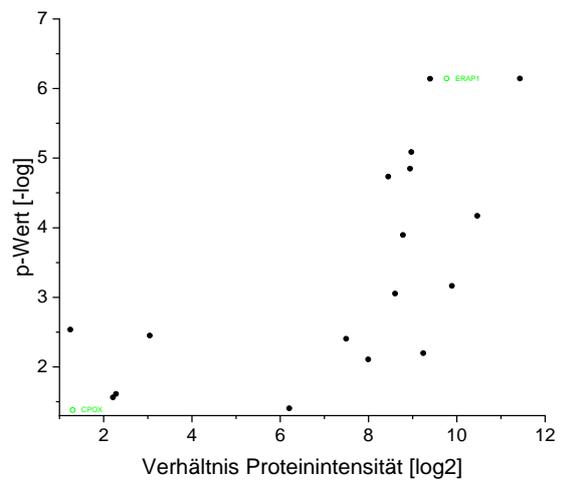
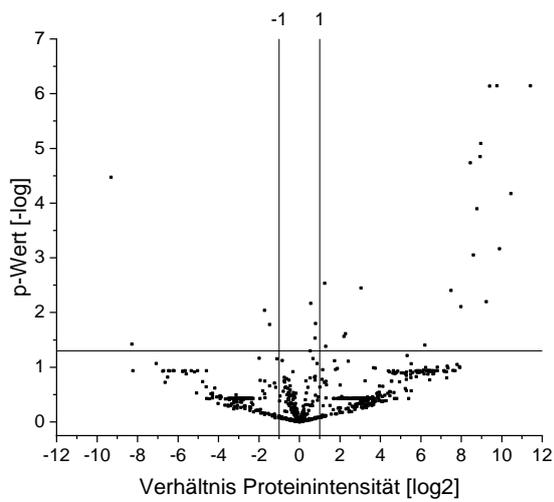


Abbildung 58: *Pulldown* CM-induziert abhängiger Proteine an DM-Oxa-Beads. Dargestellt ist jeweils im linken Graph die Gesamtproteinverteilung, im rechten Graph der Ausschnitt signifikanter Proteine ($p \leq 0,05$; $\text{ratio} \geq 2$), wobei die relativen Änderungen (\log_2) von Proteinen an DM-Oxa-Beads stimuliert vs. DM-Oxa-Beads stimuliert mit Konkurrenz (A), an DM-Oxa-Beads stimuliert vs. Kontroll-Beads stimuliert (B) und DM-Oxa-Beads stimuliert vs. DM-Oxa-Beads unstimuliert (C) angegeben sind ($n=3$).

Die Signaltransduktion kann jedoch auch beeinflusst sein, wenn der potentielle Interaktionspartner nicht Stimulations-abhängig modifiziert wurde. Berücksichtigt man diese Hypothese, welche in 4.5.4.1 näher erörtert wird, wären weiterhin die Kriterien A und B evident, jedoch könnten nun zusätzlich unstimulierte Proteine an DM-Oxa-Beads im Vergleich zur Bindung uninduzierter Proteine an Oxa-Beads bei Konkurrenz mit 50-fachem Überschuss an DM-Oxa (Kriterium A), sowie uninduzierte Proteine an DM-Oxa-Beads gegenüber uninduzierten Proteinen an Kontroll-Beads (Kriterium B) mit in die Betrachtung einbezogen werden. Bei dieser Betrachtungsweise erfüllten vier Proteine die Kriterien mit einem Signifikanzniveau eines p-Wertes kleiner 0,05 und einer mindestens 2-fachen Anreicherung zur Vergleichsprobe, welche in Abbildung 59 dargestellt sind.

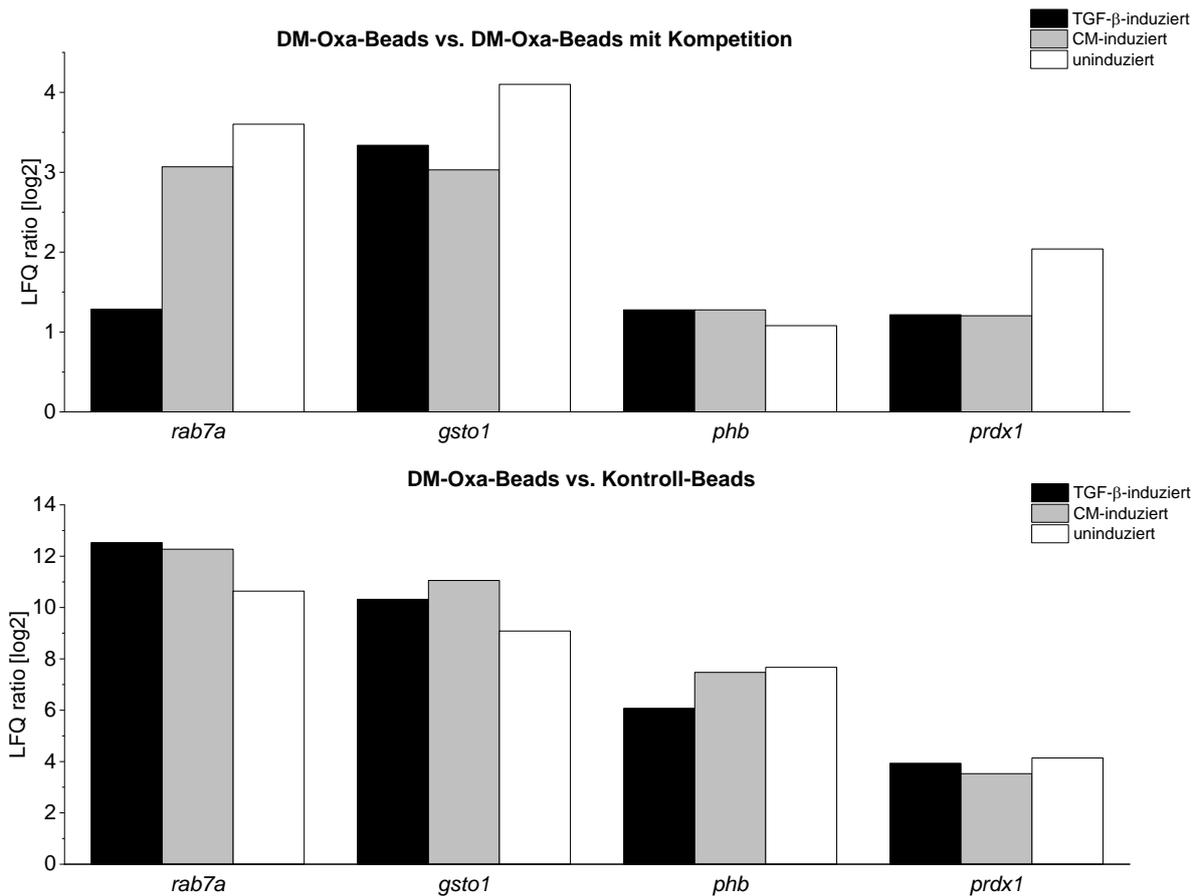


Abbildung 59: Relative Änderung angereicherter Proteine an DM-Oxa-Beads gegenüber DM-Oxa-Beads mit Konkurrenz durch Präinkubation mit 50-fachem Überschuss bzw. an DM-Oxa-Beads gegenüber Kontroll-Beads. Dargestellt sind die gemittelten relativen Änderungsraten der LFQs von Proteinen mit einer wenigstens zweifach erhöhten Anreicherung bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ gegenüber der jeweiligen Referenzprobe.

Dabei handelt es sich um die GTPase *Ras-related protein* Rab-7a, die Glutathion-S-Transferase GSTO-1, das pleiotrope Protein Prohibitin und das antioxidative Enzym Peroxiredoxin-1. Die jeweilige molekulare Funktion sowie die zelluläre Lokalisation sind in der nachfolgenden Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Signifikant angereicherte Proteine an DM-Oxa-Beads aus Abbildung 59 mit annotiertem Proteinnamen, Gennamen, molekularer Funktion und zellulärer Komponente.

Proteinname	Gename	Molekulare Funktion	Zelluläre Komponente
Ras-related in brain 7A	<i>rab7a</i>	GDP-Bindung; GTP-Bindung; GTPase Aktivität; Retromer Komplex Bildung	Lysosomenmembran; Endolysosomenmembran; Phagosomenmembran
Glutathione S-transferase omega-1	<i>gst01</i>	Glutathion-Transferase/Reduktase Aktivität; Oxidoreduktaseaktivität; Methylarsonatreduktaseaktivität	Cytosol
Prohibitin	<i>phb</i>	Komplement-Komponente C3a/b-Bindung; Enzym-, Histondeacetylase-Bindung; Bindung regulatorischer DNA-Regionen; C-terminale Protein-Bindung; Bindung Proteinase-aktivierter Rezeptoren	Nucleus; Innere Mitochondrienmembran
Peroxiredoxin-1	<i>prdx1</i>	Cadherin-Bindung; Peroxidase/Thioredoxin Peroxidase-Aktivität; RNA-Bindung	Cytoplasma, Melanosom

4 Diskussion

4.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen stehen für ein breites Spektrum akuter und chronischer Erkrankungen, bei denen Neuronen und Gliazellen im Gehirn und Rückenmark verloren gehen. In akuten Fällen, zum Beispiel als Reaktion auf einen ischämischen Schlaganfall oder eine Rückenmarksverletzung, sterben verschiedene Arten von Neuronen und Gliazellen innerhalb eines begrenzten Hirnareals innerhalb eines kurzen Zeitraums ab. In chronischen Fällen kommt es entweder zu einem selektiven Verlust einer bestimmten Zellpopulation, wie z.B. Dopamin- (DA) Neuronen bei der PD und Motoneuronen bei der ALS, oder zu einer weit verbreiteten Degeneration vieler Neuronentypen, wie sie bei der AD auftritt, über einen Zeitraum von mehreren Jahren (Lindvall & Kokaia, 2010). Die Problematik hierbei besteht im Falle von AD im Verlust von Neuronen, welche kognitive Fähigkeiten betreffen und sich durch eine Stammzelltransplantation nicht korrigieren lassen. Differiert hierzu muss die Möglichkeit angesehen werden, bestimmte Neuronen-Typen wie dopaminerge und Motoneuronen zu ersetzen, welche die motorische Funktion wieder herstellen können.

Die PD, ursprünglich beschrieben von James Parkinson im Jahr 1817, gehört zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. Im Jahr 2016 waren weltweit mehr als sechs Millionen Menschen von Morbus Parkinson betroffen waren, und es wird erwartet, dass diese Zahl in dem Maße zunimmt, wie die Bevölkerung altert (Obeso *et al.*, 2017). Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch motorische Symptome, einschließlich Bradykinesie, Rigidity und Tremor, und einer Fülle von nicht-motorischen Störungen. Zu den charakteristischen pathologischen Veränderungen gehören intraneuronale und intraaxonale α -Synuclein-positive Einschlüsse (Lewy-Körperchen und Lewy Neuriten) und durch den Verlust von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* und andere Hirnregionen verringert sich die Dopaminkonzentration im Striatum was die klassischen motorischen Symptome verursacht (E. K. Tan *et al.*, 2020).

4.1.1 Stand der Therapiemöglichkeiten

Für viele neurodegenerative Krankheiten fehlen noch immer wirksame Behandlungsmöglichkeiten, was auch der Tatsache geschuldet ist, dass die hohe Misserfolgsrate klinischer Studien für diese Krankheiten zum Rückzug von Investitionen der großen pharmazeutischen Unternehmen geführt hat (Myszczyńska *et al.*, 2020). Mit der Alterung der Weltbevölkerung nimmt die Häufigkeit von neurodegenerativen Erkrankungen zu.

Bis zum Jahr 2050 werden schätzungsweise 22 % der Weltbevölkerung über 60 Jahre alt sein. Das Alter stellt den Hauptrisikofaktor für die meisten neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Motoneuron-Erkrankungen (MND) dar, und stellt die Welt vor eine beispiellose wirtschaftliche Herausforderung (Myszczyńska *et al.*, 2020). Im Jahr 2016 betragen die Gesamtkosten für die Betreuung von Menschen mit Alzheimer geschätzte 946 Milliarden US-Dollar, was einer Verdreifachung der geschätzten Ausgaben im Jahr 2000 entspricht (Junfang Xu, Zhang, Qiu, & Cheng, 2017). Es wird erwartet, dass diese Kosten steigen werden, da die Zahl der Menschen mit Alzheimer bis 2050 wahrscheinlich 115 Millionen weltweit erreichen wird (Junfang Xu *et al.*, 2017). Diese Schätzungen erfordern Veränderungen in der Art und Weise, wie Menschen diagnostiziert und behandelt werden, und unterstreichen den dringenden Bedarf an wirksamen Therapeutika. Lediglich fünf Medikamente sind zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit zugelassen, darunter vier Cholinesterasehemmer und ein N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptorantagonist, was die Dringlichkeit neuartiger Behandlungsmethoden belegt. Im Zeitraum von 2002 bis 2012 wurden mehr als 400 klinische Studien zu potenziellen Behandlungen von AD durchgeführt, aber nur der NMDA Rezeptorantagonist Memantin zur symptomatischen Behandlung, wurde zugelassen (Cummings, Morstorf, & Zhong, 2014). In den letzten 20 Jahren haben 50 klinische Studien mit Medikamenten für MND wie ALS keine positiven Ergebnisse gezeigt (Myszczyńska *et al.*, 2020). Mit dem Natriumkanal-Blocker Riluzol und dem Lactam Edaravone sind nur zwei Medikamente zur Behandlung von MND zugelassen, wobei beide nur eine bescheidene Verbesserung des Überlebens und der Funktionsfähigkeit der Patienten gezeigt haben und in Bezug auf Edaravone der Wirkmechanismus unbekannt ist (Mitsumoto, Brooks, & Silani, 2014).

Neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Erkrankung oder die Parkinson-Erkrankung zeichnen sich durch chronisch-fortschreitende Verläufe und der zunehmenden Fehlfunktion bis hin zur endgültigen Degeneration von Nervenzellen im Gehirn und Rückenmark aus. Als Folge hieraus ergeben sich Störungen der Bewegungskoordination und/oder eine Einschränkung der geistigen Funktionsfähigkeit in deren Verlauf oftmals eine Behinderung oder der Tod resultiert. Die Behandlung dieser Erkrankungen, auch aufgrund der hohen Heterogenität, war in der Vergangenheit oftmals nur symptomatisch. In den letzten Dekaden wurden immer weitere molekulare und genetische Fortschritte in der Erforschung der komplexen Entstehungsmechanismen aufgezeigt, welche eine ursächliche Therapie derartiger Erkrankungen in absehbarer Zeit möglich erscheinen lässt. Bereits angewandte genetische Therapiemöglichkeiten bieten Antisense Oligonukleotide (ASO). Zur Behandlung der Spinalen Muskelatrophie (SMA) wurde kürzlich das ASO-Medikament Nusinersen in einer

Phase 1b/2a-Studie erfolgreich erprobt, wobei die Nusinersen-Behandlung über drei Jahre zu motorischen Funktionsverbesserungen und einer Stabilisierung der Krankheitsaktivität gegenüber dem natürlichen Krankheitsverlauf führte (Darras *et al.*, 2019). SMA wird durch homozygote Deletionen oder Mutationen im Gen für das Überlebensmotorneuron 1 (*SMN1*) verursacht, die zu einer verminderten Expression des funktionellen SMN-Proteins in voller Länge und zu einer Degeneration der Motorneuronen des Rückenmarks und des Hirnstamms führen (Hua *et al.*, 2010). Das paraloge *SMN2*-Gen kodiert ebenfalls für das SMN-Protein, produziert aber aufgrund des aberranten Spleißens nur sehr wenig funktionelles SMN-Protein. Nusinersen modifiziert dieses Spleißen der *SMN2*-Prä-mRNA, was zu erhöhten Proteinspiegeln von SMN von vollständiger Länge führt (Darras *et al.*, 2019). Inzwischen wurde Nusinersen nacheinander sowohl von der US Food and Drug Administration (FDA) als auch von der European Medical Agency (EMA) als erste krankheitsmodifizierende Behandlung für Kinder und Erwachsene mit SMA zugelassen (C. Hu & Li, 2020).

Nach der Entdeckung von iPSCs wurden Ansätze für zellbasierte Therapien und die Entwicklung von Medikamenten in den letzten zehn Jahren in Richtung dieser Ziele gemacht. Verbesserungen der Reprogrammierungsmethoden haben die Effizienz der iPSC-Gewinnung und die Qualität der verwendeten iPSC-Linien erhöht. Ein weiterer Schritt in Richtung einer autologen iPSC-basierten Therapie ist das *Gene Editing* mittels CRISPR-Cas9-Technologie auf iPSCs angewandt, um die Reparatur von krankheitsverursachenden genetischen Läsionen zu ermöglichen (Rowe & Daley, 2019).

Die Forschung über die Biologie adulter und induzierter NSCs sowie NSC-basierte Therapien für Erkrankungen des ZNS hat die Erwartung geweckt, dass diese Zellen zur Behandlung von Verletzungen oder Störungen des ZNS eingesetzt werden können. Da die endogene Neurogenese nur in begrenzten Regionen wie z.B. dem *Gyrus dentatus* im Hippocampus und der SVZ stattfindet und mit fortschreitender Krankheit stetig versagt, hat sich das Interesse entwickelt, die aus somatischen Zellen umgewandelten iNSCs zur Behandlung von Beeinträchtigungen des ZNS einzusetzen. Um die Grenzen der viralen Reprogrammierung von iNSCs zu überwinden, wurden bioaktive kleine Moleküle erforscht, die die Effizienz der iNSC-Reprogrammierung erhöhen oder sogar Transkriptionsfaktoren ersetzen sollen, wodurch die iNSCs für die klinische Anwendung leichter zugänglich werden (Tian *et al.*, 2018).

Von wenigen Ausnahmen abgesehen, ist eine weit verbreitete autologe Zelltherapie auf der Basis von iPSC jedoch nach wie vor unerreichbar. Die Optimierung der Transplantation und der gerichteten Differenzierung sowie die Verbesserung der Effizienz und Skalierbarkeit bei der Erzeugung von Zellen in klinischer Qualität werden das Ziel einer autologen Therapie in

verschiedenen Organsystemen weiter vorantreiben. Aus Patienten stammende iPSCs wurden im Rahmen verschiedener Arzneimittelscreening- und Validierungsstudien verwendet. Derzeit werden eine Handvoll Arzneimittelkandidaten, die in iPSC-basierten Systemen identifiziert wurden, in Studien am Menschen untersucht (Takahashi & Yamanaka, 2016).

Stammzellbasierte Ansätze könnten therapeutisch zur Wiederherstellung der Funktion bei neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden, indem verloren gegangene Nervenzellen oder Gliazellen durch Transplantation von Stammzellen ersetzt werden, die *in vitro* in verschiedenen Reifestadien reprogrammiert (iPSC) und vordifferenziert (iNSC) wurden. Neben diesen Mechanismen könnten transplantierte Stammzellen und ihre Derivate eine funktionelle Verbesserung bewirken, indem sie therapeutische Moleküle freisetzen, die neuroprotektiv sind oder Entzündungen modulieren (Lindvall & Kokaia, 2010).

4.2 P19 Zellen als Modellsystem der Pluripotenz und neuronaler Differenzierung

Embryonale Karzinomzellen wie die P19-Zelllinie sind pluripotente Krebsstammzellen, die aus pluripotenten Keimzelltumoren, so genannten Teratokarzinomen, gewonnen werden (Michael W. McBurney & Rogers, 1982). Diese wurden als bösartige Gegenstücke zu ESCs beschrieben und gelten als gutes Modell zur Untersuchung der Differenzierung von Stammzellen und zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, als pluripotente Zelllinie durch verschiedene Stimuli in Zelltypen aller drei Keimblätter ausdifferenziert werden zu können (M. W. McBurney, 1993). P19-Zellen können sowohl undifferenziert, als auch differenziert zu jedem Zelltyp der drei Keimblätter kultiviert werden. Die Stimulation mit RA induziert die neuronale Differenzierung, wobei die Differenzierung im Allgemeinen eine gemischte Population differenzierter Zellen, bestehend aus Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten bildet, welche in der Lage sind, neurophysiologisch funktionelle Netzwerke zu bilden (M. W. McBurney, 1993; Monzo *et al.*, 2012a).

Die Induktion von P19-Zellen mit RA wurde mit dem Ziel durchgeführt, die neuronale Differenzierung der Zellen und somit den Verlust der pluripotenten *Stemness* zu verfolgen, um nachfolgend den Einfluss von niedermolekularen Wirkstoffen isolierter und derivatisierter Lactone auf den pluripotenten Status der Zellen zu untersuchen. Hierfür wurden zunächst die morphologischen Veränderungen, sowie der zeitliche Expressionsverlauf sowohl neuronaler, als auch pluripotenter Marker der P19-Zellen über einen Zeitraum von bis zu zwölf Tagen nach initialer Induktion mit 1 μ M RA untersucht. Die Zellen wurden zunächst, wie unter 2.2.3.3 beschrieben kultiviert und am Versuchstag auf eine Zellzahl auf 1×10^5 Zellen/ml in DMEM-

Medium mit 10 % FKS und 1 % Antibiotika-Lösung eingestellt, und in sterile Petrischalen (*bacterial grade*) überführt. Zu diesen Ansätzen wurde nun der neuronale Induktor RA in einer Konzentration von 1 μ M appliziert.

An der Regulation der P19-Zelldifferenzierung sind zwei Schlüsselemente maßgebend beteiligt. Dies ist einerseits die Art des chemischen Induktors, und andererseits die Zellaggregation während der Behandlung mit dem Induktor. Eine Exposition von aggregierten P19-Zellen gegenüber Dimethylsulfoxid beispielsweise führt zu einer Differenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten und Zellen des Skelettmuskels, wohingegen die Stimulation mit RA die neuronale Differenzierung einer gemischten Zellpopulation, bestehend aus Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten, induziert (M. W. McBurney *et al.*, 1982; Monzo *et al.*, 2012a). Die all-trans-Isoform der RA ist der aktive Metabolit von Retinol (Vitamin A), einem essentiellen Mikronährstoff für das Wachstum und die embryonale Entwicklung von Wirbeltieren (Zile, 2001). RA wirkt durch Bindung an das Heterodimer aus RAR und RXR. Diese nuklearen Rezeptoren binden an *cis*-wirkende RAREs in der regulatorischen Region ihrer Zielgene. Nach kanonischen Modellen werden die RAR:RXR-Rezeptoren in Abwesenheit von Liganden durch den nuklearen Rezeptor-Co-Repressor Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor (SMRT) und Histon-Deacetylase 3 (HDAC3) gebunden und halten die Zielgene unterdrückt. Die Ligandenbindung führt zu einer strukturellen Veränderung, die den Austausch dieser Co-Repressoren gegen Co-Aktivatoren, wie die Histon-Acetyltransferase p300, einleitet (Simandi *et al.*, 2016).

Die Aussaat von P19-Zellen erfolgte in Petrischalen (*bacterial grade*) als Suspensionskultur, was die Adhäsion weitestgehend verhinderte und die Aggregation der Zellen zu sogenannten EBs förderte. Bei einer nicht-adhärenenten Kultivierung von ESC-Zellen formieren sich diese spontan zu dreidimensionalen Aggregaten, die Aspekte der Zelldifferenzierung während der frühen Embryogenese rekapitulieren (Höpfl, Gassmann, & Desbaillets, 2004). Diese EBs konnten sowohl in RA-induzierten, als auch uninduzierten Suspensionskulturen beobachtet werden (Abb.: Abbildung 6, Tag 2). Die Notwendigkeit einer Zellaggregation zur Induktion der Neurogenese wird unterstützt durch die Tatsache, dass in P19-Monolayerkulturen unter RA-Einfluss die Bildung endodermaler und mesodermaler Zellderivate induziert wird (Bain *et al.*, 1994; Mummery, Feijen, Moolenaar, den Brink, & De Laat, 1986), wobei sich inzwischen auch Methoden der Differenzierung als Monolayerkultur in Serum-reduziertem Medium etabliert haben (Monzo *et al.*, 2012a). Eine Aggregation von P19-Zellen ohne Stimulus wiederum führt nicht zu einer Differenzierung, was die Notwendigkeit der chemischen Induktion unterstreicht (C. Wang *et al.*, 2006). P19-Zellen wurden nach initialem Stimulus mit 1 μ M RA für vier Tage

in einer Suspensionskultur in Petrischalen kultiviert, bevor an Tag 4 die Aussaat als Adhäsionskultur erfolgte, welche durchgängig in Serum-haltigem Medium durchgeführt wurde. Hierfür wurde ein leicht abgewandelter Differenzierungsansatz nach McBurney *et al.* (1988) gewählt, wobei DMEM-Medium anstelle von α -MEM bei einer durchgängigen Supplementation mit 10 % FKS genutzt wurde. Die konventionelle Methode beinhaltete in den Tagen der Kultivierung als Suspensionskultur (d0 bis d4) die Applikation von lediglich 5 % FKS. Die Induktion der Neurogenese von P19-Zellen unter fortwährender Verwendung von Serum konnte auch in einem ebenso vereinfachten Protokoll durch Leszczyński *et al.* (2019) gewährleistet werden. Die Ausbringung der P19-Zellen nach Vereinzelnung durch Trypsinierung als Adhäsionskultur an Tag 4 erfolgte auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen, welche durch in Gelatine vorhandener Arginylglycylasparaginsäure-Sequenzen (RGDs) eine hohe Effektivität für die Zelladhäsion besitzen (S. C. Wu *et al.*, 2011). Die morphologischen Veränderungen infolge der RA-Behandlung aus Abbildung 6 belegen, dass nach sieben Tagen in der RA-stimulierten P19-Kultur erste Veränderungen anhand Neuriten-ähnlicher Verzweigungen zwischen dichten mehrzelligen Clustern festgestellt werden konnten, welche in der uninduzierten Kultur nicht nachweisbar waren. Nach zwölf Tagen nahm die Anzahl und auch die Ausprägung dieser expandierenden interzellulären Verbindungen Neuriten-ähnlicher Strukturen zu, wobei in der uninduzierten Kultur keinerlei derartig geformter struktureller Verbindungen zu erkennen war. Die morphologischen Veränderungen anhand dieser Neuriten-ähnlicher Ausprägungen infolge des initialen Stimulus mit 1 μ M RA wurde nun auch hinsichtlich der molekularen Markerausprägung untersucht.

4.2.1 Neuronale Induktion von P19-Zellen auf transkriptioneller und translationaler Ebene

Untersucht wurde einerseits die mRNA-Expression von Genen und deren Proteinexpression, die nach Stimulation mit RA infolge der neuronalen Differenzierung vermehrt exprimiert werden sollten. Als Markergene hierfür dienten *β -3-tubulin*, *ncam* und *nestin*.

Mikrotubuli sind hochdynamische Strukturen, die kontinuierlich Aufbau- und Demontagezyklen durchlaufen. Neuronale Mikrotubuli erfordern jedoch eine Stabilisierung gegen Demontage. Dies wird bei der Differenzierung durch die Regulation auf der Expressions- und post-translationalen Ebene bestimmter Tubuline und Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (MAPs) erreicht. Der früheste Indikator, welcher für die umfangreiche mikrotubuläre Reorganisation der neuronalen Differenzierung erforderlich ist, ist die Expression des Neuronen-spezifischen Klasse-III β -Tubulins (Fanarraga, Avila, & Zabala, 1999). Das Mikrotubuli-Element β -3-Tubulin ist ausschließlich auf Neuronen lokalisiert, was es als neuronalen Marker klassifiziert, und ist

dort an Prozessen wie Neuro- und Synaptogenese, sowie Axonführung und -aufrechterhaltung beteiligt (Nakayama *et al.*, 2014). Die Expression von β -3-Tubulin korreliert mit den frühesten Phasen der neuronalen Differenzierung und sowohl die verstärkte Expression, als auch die post-translationale Prozessierung des Klasse-III-Tubulins wird als essentiell für die neuronale Differenzierung angesehen (Fanarraga *et al.*, 1999; Laferrière & Brown, 1996).

Die mRNA-Expression von *β -3-tubulin* steigt ab dem zweiten Tag bis Tag 7 kontinuierlich an und erreicht dort ihr mRNA-Expressionsmaximum mit Faktor 64 gegenüber der uninduzierten Kontrolle des gleichen Tages. An Tag 12 erreicht die mRNA-Expression lediglich ein knapp 17-fach erhöhtes Niveau gegenüber der Kontrolle (Abbildung 7, A). Ein ähnlicher Verlauf der mRNA-Expression von *β -3-tubulin* konnte bereits durch Laferrière & Brown (1996) beobachtet werden, wo die Induktion mit RA lediglich 24 Stunden erfolgte, die weitere Differenzierung jedoch mit definiertem Medium durchgeführt wurde. Bis Tag 7 steigt die mRNA-Menge von P19-Zellen nach RA-Induktion, um an Tag 12 lediglich das Niveau von Tag 3 zu erreichen. In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass die Transkriptmenge von *β -3-tubulin* in der beschriebenen Differenzierung nach 48 h erkennbar bis Tag 7 ansteigt um nach zwölf Tagen auf das bereits an Tag 4 vorhandene Level zu sinken.

Auf Proteinebene konnte während der gesamten zwölf Tage andauernden Versuchsreihe keinerlei β -3-Tubulin in den uninduzierten Kulturen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit RA hatte eine erste nachweisbare Proteinexpression nach sieben Tagen zur Folge, welche sich an Tag 12 der Differenzierung verstärkte. Diese Proteinexpression korreliert mit den mikroskopischen Aufnahmen an Tag 7 und 12 aus Abbildung 6, wobei erste Neuriten-ähnliche Ausläufer nach sieben Tagen beobachtet werden konnten, die sich in ihrer Ausprägung nach zwölf Tagen verstärkt zeigten. Auch die Immunofluoreszenz-Aufnahme aus Abbildung 9 belegt beispielhaft die neuronale Expansion nach zwölf Tagen RA-induzierter P19-Zellen.

Auf mRNA-Ebene wurde als weiteres Markergen der neuronalen Differenzierung die Expression des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls 1 (*ncam*) untersucht. Als Oberflächenprotein auf Neuronen und Glia-Zellen vermittelt es Zell-Zell-Kontakte, ist am Neuritenwachstum und der Synaptogenese beteiligt, und unterstützt die synaptische Plastizität (Kleene *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014). Als membrangebundenes Glykoprotein ist NCAM im gesamten ZNS exprimiert. Die Zell-Zell-Adhäsion wird durch Interaktionen von extrazellulären Domänen vermittelt, wobei eine große Anzahl von Sialinsäuremonomeren an eine extrazelluläre Immunglobulindomäne angelagert wird, was zur Bildung eines großen hydratisierten Polyanions, bezeichnet als Polysialinsäure (PSA), führt (Murray *et al.*, 2016). Ein Knockout von NCAM führt überdies zu einer reduzierten Anzahl der Synapsen (Yang *et al.*, 2014). Eine

Induktion von NCAM in der P19-Zelllinie infolge des neuronalen Stimulus mit RA wurde durch Pacherník *et al.* (2007) und Husmann *et al.* (1989) bereits beschrieben, wobei die NCAM-Protein-Expression nach zwei bis vier Tagen nur leicht, und an den Tagen 6-8 stärker nachgewiesen werden konnte. Auf mRNA-Ebene, in Abbildung 7 (A) verdeutlicht, kann dieses Expressionsprofil durch die Zunahme bis auf eine 9,4-fache Induktion an Tag 7 bestätigt werden, wobei sich an Tag 12 das Niveau nur noch geringfügig erhöhte, was durch weiter proliferierende Zellen nicht-neuronalen Schicksals bedingt sein könnte.

Das Intermediärfilamentprotein Nestin wird während der neuronalen Entwicklung in einem Zeitraum der Multipotenz der Zellen exprimiert. Diese multipotenten Zellen werden als Neurale Stammzellen definiert, deren Zellschicksal auf die Differenzierung aller Zellarten des ZNS festgelegt ist (Martínez-Cerdeño & Noctor, 2018). Die Expression von Nestin wird während der terminalen Differenzierung dieser Vorläuferzellen zu Zelltypen des ZNS wie Neuronen, Gliazellen oder Oligodendrozyten ersetzt durch Neurofilamentproteine wie β -3-Tubulin, weshalb Nestin als Markerprotein neuronaler Vorläuferzellen charakterisiert wird (Dahlstrand *et al.*, 1995). Nestin wird auch von NPSCs des ENS exprimiert und ist somit Bestandteil der Aufrechterhaltung des lebenslangen Pools dieser autologen Stammzellquelle (Hagl *et al.*, 2013). Ein für das ZNS spezifischer Enhancer in der 3'-Region des zweiten Introns des *nestin*-Gens steuert die Nestin-Expression während der neuralen Differenzierung von P19-Zellen (Z. G. Jin *et al.*, 2006). Die HRE-, Sox- und POU-*cis*-Elemente in diesem Enhancer sind wichtig für die Expression des *nestin*-Gens in NPCs *in vitro* und *in vivo*. Verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren die *nestin*-Genexpression während der neuralen Differenzierung von P19-Zellen und der Entwicklung des ZNS. Sox-2 und SF1 vermitteln möglicherweise die basale Nestin-Expression in undifferenzierten P19-Zellen, während Sox-2, Brn1 und Brn2 rekrutiert werden, um die Nestin-Expression in P19-NPCs aufrechtzuerhalten (Z. Jin *et al.*, 2009). Hinsichtlich der Transkriptmenge von *nestin* infolge der neuronalen Induktion durch RA kann ein Ansteigen der mRNA-Expression auf Faktor 40 an Tag 4 beobachtet werden, welches nachfolgend an Tag 7 seinen Peak mit einer 64-fachen Induktion erreicht, um an Tag 12 auf in etwa gleiches Niveau wie an Tag 4 zu sinken (vgl. Abbildung 7, A). Die infolge der neuronalen Ausdifferenzierung spezifische Regulation der Ausprägung von Nestin als Marker neuronaler Vorläuferzellen spiegelt sich in diesem Expressionsverlauf wider, wengleich Peak und Abnahme des Transkriptes in früheren Experimenten eine etwas abweichende Expression erfuhren. Bereits Bian *et al.* (1999) konnten per RT-PCR zeigen, dass Nestin während der RA-induzierten Differenzierung von P19-Neuronen vorübergehend exprimiert wurde und der Peak der mRNA-Menge an Tag 4 erreicht wurde. Jin *et al.* (2009) beobachteten in undifferenzierten P19-Zellen sehr geringe Mengen der *nestin*-mRNA, welche

nach der RA-Induktion hochreguliert wurde, mit einem Expressionspeak an Tag 5. Mit fortschreitender neuronaler Differenzierung sank die *nestin*-mRNA-Expression auf das Basalniveau an Tag 13 (Z. Jin *et al.*, 2009).

Der erhebliche Rückgang der mRNA-Expression von β -3-tubulin an Tag 12 gegenüber Tag 7, einhergehend mit dem zeitlich verzögerten, schwachen Rückgang der *nestin*-mRNA, könnte in der weitergehenden Proliferation nicht terminal neuronal ausdifferenzierter Zellen begründet liegen. Im Gegensatz zu post-mitotischen Zellen wie Neuronen nehmen diese mit der Zeit einen Teil der Zellpopulation ein und verringern die Zahl post-mitotischer Zellen an der Gesamtzahl, was bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen festgestellt wurde (Monzo *et al.*, 2012a; Nakayama *et al.*, 2014). Dem entgegen könnte der Zusatz von Cytarabin (Arac) wirken, einem Isomer des Nukleosids Cytidin, welches nach Phosphorylierung anstelle von Cytidintriphosphat in die DNA eingebaut wird und zytotoxisch auf den Zellzyklus wirkt. Eine verbesserte Überlebensrate post-mitotischer, neuronaler Zellen durch Zugabe von Arac an den Tagen 4 bis 6 der Neurogenese steigerte die Expression neuronaler Zellen und inhibierte die Proliferation nicht-neuronaler Zellen (Nakayama *et al.*, 2014). Neben Arac nutzten Nakayama *et al.* (2014) bis Tag 4 der Monolayer-Differenzierung eine Supplementation mit FGF8, einem Mitglied der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren (FGF) welches überexprimiert die neuronale Differenzierung induziert und in Kombination mit dem γ -Secretase-Inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) als Repressor des Notch-Signalweges und Enhancer der Neurogenese fungiert (Crawford & Roelink, 2007; C. Wang *et al.*, 2006). Auch die undefinierte Zusammensetzung des Serums und die hohe Chargen-Variation im Serum kann zu experimentellen Inkonsistenzen in Bezug auf die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der kultivierten Zellen führen. Pachernik *et al.* (2005) stellten einen inhibierenden Effekt von Serum-haltigem Medium auf die morphologische Ausprägung expandierender Neuriten und die Ausprägung der neuronalen Marker β -3-Tubulin und NCAM fest, wobei die Aktivität des RARE-Elements durch Serum-haltiges Medium unbeeinflusst blieb. Die meisten der gängigen Protokolle beinhalten die neurale Induktion von P19-Zellen durch RA-Behandlung während der EB-Bildung in einem serumhaltigen Medium, gefolgt von einer Ausplattierung ohne exogene RA in einem serumfreien Medium, das definierte Supplemente wie N2, B27 oder BioGro2 enthält (Inberg, Bogoch, Bledi, & Linial, 2007; Popova, Karlsson, & Jacobsson, 2017; Y. Xu, Pang, Lu, Shan, & Zhang, 2016). Darüber hinaus können in Monolayer-basierten Differenzierungsprotokollen von P19-Zellen sowohl die RA-abhängige neuronale Induktion als auch die anschließende RA-freie Kultur unter serumfreien Bedingungen durch Supplemente wie ITS erreicht werden (Jeong *et al.*, 2014). Ziel der Untersuchung war jedoch nicht eine möglichst vollständige

neuronale Differenzierung zu erreichen, sondern den Einfluss der Lactone und deren Derivate auf den pluripotenten Zellcharakter während einer neuronalen Induktion zu untersuchen, weshalb solche Supplementationen nicht in Betracht gezogen wurden.

4.2.2 Expression *Stemness*-erhaltender Faktoren neuronal induzierter P19-Zellen

Korrelierend zur Untersuchung von Markergenen für die neuronale Induktion, wurde die transkriptionelle und translationale Expression der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren Oct-4, Nanog und Lin-28 untersucht.

Die transkriptionelle Aktivität von *oct-4* sinkt nach initialem RA-Stimulus stetig bis auf ein 91-erniedrigtes Niveau an Tag 7. An Tag 12 erreicht die Oct-4-mRNA-Expression eine reduzierte Erniedrigung um den Faktor 83 (vgl. Abbildung 7, B). Auf Proteinebene konnten Oct-4 und Lin-28 als Markerproteine für Pluripotenz in der Startkultur an Tag 0 als auch nach 12 h (Tag 0,5) ohne reduzierenden Einfluss des RA-Stimulus nachgewiesen werden. Für die Dauer der Versuchsreihe von zwölf Tagen wurden beide Proteine konstant in nicht-induzierten Proben exprimiert, was die fortwährende Pluripotenz der jeweiligen P19-Zellchargen belegt (Abbildung 8). Eine verringerte Proteinexpression von Oct-4 konnte bereits 24 h nach dem initialen RA-Stimulus beobachtet werden. Nach 48 h konnte keinerlei Oct-4 mehr nachgewiesen werden.

Die Herunterregulation von Oct-4 wurde als abhängig von der Behandlung der RA beschrieben, da differenzierte P19 EC-Zellen nach der Aggregation in Gegenwart von DMSO, oder durch LIF-Deprivation differenzierte ES-Zellen, weiterhin Oct-4 mRNA exprimieren (J Schoorlemmer *et al.*, 1994). Schoorlemmer *et al.*, (1995) konnten ebenfalls einen raschen Rückgang der *oct-4*-mRNA-Expression innerhalb von 48 Stunden nach RA-induzierter Differenzierung von P19 EC-Zellen, sowie eine Expressionsabnahme von Oct-4 innerhalb von 16 Stunden, welche nach 32 Stunden nicht mehr nachweisbar war, beobachten. Die Abnahme des Oct-4-Proteins in P19-Zellen übersteigt leicht die Unterdrückung der *oct-4*-mRNA, was darauf hindeutet, dass zusätzliche post-transkriptionelle Mechanismen an der Unterdrückung von Oct-4 während der RA-induzierten Differenzierung von P19-EC-Zellen beteiligt sind.

Nanog wird neben Oct-4 und Sox-2 als maßgeblicher Transkriptionsfaktor zum Erhalt der Pluripotenz angesehen, dessen Verlust ein Differenzierungsmerkmal darstellt und eine Deletion embryonale Letalität bedeutet (Chambers *et al.*, 2007; Mitsui *et al.*, 2003). Die transkriptionelle Expression von *nanog* sinkt bereits nach 24 h 3,6-fach kontinuierlich bis Tag 12 (Faktor 26) der neuronalen Differenzierung (vgl. Abbildung 7, B). Nanog wird in pluripotenten Zellen in hohem Maße exprimiert und wird während der Differenzierung rasch

abgebaut. Eine drastische Abnahme der mRNA- und Proteinkonzentration von Nanog in P19-Zellen innerhalb eines Zeitraumes von drei bis sechs Tagen nach Differenzierung mit RA wurde bereits mehrfach beschrieben (T. Chen *et al.*, 2014; H. Li, Fan, Sun, Jiang, & Gong, 2013). Die Expression von Nanog ist ebenso wie die Expression von Oct-4 und Sox-2 abhängig von der Bindung des Oct-4-Sox-2-Heterodimers an ein *cis*-regulatorisches Element im Promotor von Nanog (Rodda *et al.*, 2005).

In Bezug auf diese Arbeit wurde die Expressionsanalyse von Sox-2 aufgrund der homogenen Expression in sowohl pluripotenten, als auch RA-induzierten P19-Zellen und damit einhergehendem nicht-identifizierbarem Einfluss biologisch aktiver Lactone nicht vollumfänglich erörtert (Daten nicht gezeigt). Thomson *et al.* (2011) beobachteten bei murinen ES-Zellen nach Zugabe von RA die Oct-4- und Sox-2-Proteinspiegel. 14 Stunden nach der RA-Zugabe war die mittlere Konzentration des Sox-2-Proteins um 5 % gesunken, während Oct-4 um 56 % abgenommen hatte. Nach 18 Stunden erreichte der Sox-2-Proteinspiegel 100 % des ursprünglichen Niveaus, während Oct-4 um 64 % gesunken war. Auch in Bezug auf die in dieser Arbeit durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen von Sox-2 über einen längeren Zeitraum bestätigte sich das Bild einer gleichbleibend hohen Transkript-Expression infolge der RA-Induktion (Daten nicht gezeigt). Als Methode zur entsprechenden Überprüfung des Einflusses auf die Ausbildung des transkriptionsregulierenden Oct-4-Sox-2-Heterodimers könnte FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) dienen. Mistri *et al.* (2018) untersuchten die Bildung des Sox-2- und Oct-4-Heterodimerkomplexes mit dem Nanog-Sox/Oct-Motiv in Lösung unter Verwendung von Kernextrakten aus transfizierten CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*), wobei die Sox-2-Oct-4-Komplexbildung abhängig von der Gegenwart von DNA war.

Die transkriptionelle Aktivität von *lin-28* erfährt infolge des initialen RA-Stimulus eine stetige Erniedrigung bis Tag 7 (38-fach), welche sich nach zwölf Tagen, ähnlich dem Verlauf der *oct-4*-mRNA-Expression, mit Faktor 20 weniger erniedrigt zeigt. Diese Tatsache könnte in Zusammenhang stehen mit dem Rückgang der mRNA-Expression des neuronalen Markers β -*3-tubulin* an Tag 12 gegenüber Tag 7 infolge der vermehrten Proliferation nicht terminal neuronal ausdifferenzierter Zellen. Die Proteinmenge von Lin-28 zeigte eine erste Abnahme 48 h nach der neuronalen Induktion, verstärkte sich nach vier Tagen und konnte im Vergleich zur uninduzierten Probe des gleichen Zeitpunktes an den Tagen 7 und 12 nicht mehr nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 8). Verglichen mit der Proteinabnahme von Oct-4 zeigt sich die Abnahme von Lin-28 etwas zeitverzögert, was sich mit der Markerausprägung von Balzer *et al.* (2010) in P19-Zellen deckt, wo Lin-28 drei Tage nach Beginn der RA-Behandlung

herunterreguliert wurde und nach fünf Tagen unter dem Detektionsniveau blieb. Oct-4 wurde bereits nach 24 h in seiner Expression gemindert und konnte nach drei Tagen nicht mehr nachgewiesen werden.

4.3 Effekt bioaktiver Lactone auf die *Stemness* neuronal induzierter P19-Zellen

Die relative *oct-4* Promotoraktivität wurde durch das transient transfizierte Plasmid pDB2-Oct-4 in P19-Zellen untersucht. Hierbei handelt es sich um einen Reportergenvektor, bei dem die Expression des eGFP unter der Kontrolle des murinen *oct-4*-Promotors (-2170 bis +7 nt) steht. Der Vektor beinhaltet die regulatorischen Regionen von *oct-4*, welche sich aus vier konservierten Regionen CR1, CR2, CR3 und CR4 zusammen setzen, wobei CR1 im proximalen Promotor, CR2 im proximalen Enhancer und CR3 sowie CR4 im distalen Enhancer lokalisiert sind (Nordhoff *et al.*, 2001) (vgl. Abbildung 3).

Die Ermittlung der Reportergenaktivität erfolgte nach 48 h, da die Proteinexpression zu diesem Zeitpunkt unter das Detektionsniveau sank, und auch die Transkriptmenge von *oct-4* 6-fach durch RA-Applikation erniedrigt wurde (Abbildung 7/Abbildung 8). Eine Applikation von 1 μ M RA resultierte in einer, relativ zur unbehandelten Positivkontrolle, 55 % verminderten Fluoreszenz (Abbildung 12, B). Die gleichzeitige Behandlung mit den Makrolactonen Gal, S-Curv und Et-Oxa bedingte eine Zunahme der Oct-4-Promotoraktivität zwischen 34 % bei Et-Oxa und 49 % bei S-Curv (Abbildung 13). Auch im Falle von Dhc zeigte sich eine Erhöhung der Promotoraktivität, wobei jedoch das erforderliche Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass die Applikation der Makrolactone die RA-abhängige Abnahme der Oct-4-Promotoraktivität nachweislich vermindern kann, und somit einen Pluripotenz-fördernden Effekt ausüben.

Ein Einfluss der Lactone signifikanter Art auf die *oct-4*-Promotoraktivität konnte bei RA-unbehandelten Zellen nicht festgestellt werden, weswegen davon auszugehen ist, dass deren positiver Einfluss auf einer verminderten repressiven RA-Wirkung auf den Promotor beruht.

In RA-behandelten P19-Embryonalkarzinomzellen unterliegt der *oct-4*-Promotor einer negativen Regulierung durch RA. Die hierfür verantwortlichen regulatorischen Regionen von *oct-4* bilden mehrere unabhängige RA-regulative Elemente. Die Expression von Oct4 in embryonalen Stammzellen wird zum einen durch den *upstream* gelegenen stammzellspezifischen proximalen Enhancer (PE) gesteuert, der durch die RA induzierte Differenzierung mittels eines indirekten Mechanismus ohne Bindung von RARs deaktiviert wird. Die RA-induzierte Unterdrückung von Oct-4 unterliegt hierbei einer Region innerhalb des

PE, die als *RA-repressible Enhancer 1* (RARE1) bezeichnet wird, weil sie die Expression in Abwesenheit von RA fördert, während sie bei RA-Behandlung die Unterdrückung von Oct-4 vermittelt. Diese Region enthält zwei Response-Elemente (RARE-1a, RARE-1b), die für die Vermittlung sowohl von Enhancer- als auch von Repressor-Aktivitäten wichtig sind. RARE-1a ähnelt dem GC-reichen Sp-1-Bindungsmotiv und kann möglicherweise das RA-Signal durch eine Protein-Protein-Interaktion vermitteln. RARE-1b ist in Abwesenheit von RA unbesetzt, was darauf hindeutet, dass es sich um eine Repressor-Bindungsstelle handelt (Pikarsky, Sharir, Ben-Shushan, & Bergman, 1994). Als weiteres regulatorisches Element fungiert ein zweites RA-responsives Element (RARE 2) innerhalb des Oct-4 PP. Dieses RARE ähnelt dem klassischen HRE-Bindungsmotiv (A/G)GGTCA und befindet sich ebenfalls neben einer Sp-1-Stelle (Wagner & Cooney, 2013). Dieser CR1-Bindungskomplex im PP umfasst verschiedene nukleare Rezeptoren, wobei RA-induzierte RAR:RXR-Heterodimere, GCNF, und COUP-TFs die Transkription reprimieren, während TLX, Esrrb, Liganden-unabhängige RARs, LRH-1 und SF-1 das *oct-4*-Gen aktivieren (Y. Q. Li, 2017) (vgl. Abbildung 3).

Ohne RA-Induktion interagieren Liganden-unabhängige RARs mit den Kernrezeptoren Lrh1 und Esrrb (*estrogen-related receptor β*) sowie mit den Co-Aktivatoren CBP/p300, Pcaf (*p300/CBP-associated factor*) und SRC1/TIF2 (*steroid receptor coactivator*) und binden an das DR0-Element innerhalb der CR1-Region des *oct-4*-Promotors, um dessen Aktivierungsstatus in den ESCs zu stabilisieren oder aufrechtzuerhalten (Y. Q. Li, 2017). Nach der RA-induzierten Differenzierung binden RA-stimulierte RARs an die kanonischen Elemente (DR1, DR2). Die RA-induzierte Zunahme der Expression von Coup-TFs und GCNF verdrängt die RAR:RXR-Heterodimere und induziert die transkriptionelle Unterdrückung der Oct-4-Expression (Chatagnon *et al.*, 2015) (vgl. Abbildung 3).

Auch der nukleare Rezeptor TR2 (*testis receptor 2*) bindet an das HRE innerhalb der CR1, um, abhängig von seiner SUMOylierung an Lys-238, das *oct-4*-Gen in P19-EC-Stammzellkulturen zu aktivieren oder zu unterdrücken, und so die Proliferation zu regulieren. In RA-behandelten P19-Zellen phosphorylieren die aktivierten ERKs den TR2, der durch die nachfolgende SUMOylierung zu einem Repressor von *oct-4* wird, wodurch das Differenzierungsprogramm als Reaktion auf all-trans-RA erleichtert wird (Gupta *et al.*, 2008).

Um den Einfluss der Makrolactone näher zu betrachten, wurde nachfolgend ihr Einfluss auf Pluripotenz-erhaltende, als auch an der neuronalen Differenzierung beteiligter Markergene untersucht. Hierbei wurde bei den pluripotenten Markern Oct-4, Nanog und Lin-28 neben ihrer transkriptionellen Aktivität, auch die Proteinexpression von Oct-4 und Lin-28 analysiert. Im Falle der neuronalen Marker β -3-tubulin, Ncam und Nestin wurde angesichts der bereits in Teil

3.1.3 beobachteten schwachen Expression innerhalb des sieben Tage andauernden Versuchsaufbaus nur die transkriptionelle Aktivität untersucht. Die Zellen wurden äquivalent dem Versuchsteil 3.1 der neuronalen Differenzierung für sieben Tage unterworfen, um an den Tagen 4 und 7 die relative Transkriptmenge und Proteinexpression zu bestimmen (vgl. 3.2.3.1 und 3.2.3.2).

Dhc hatte hierbei den schwächsten Effekt, sowohl auf die Steigerung pluripotenter, als auch auf die Abnahme neuraler Marker auf transkriptioneller Ebene. Einzig eine 5,3-fache Abnahme des β -3-tubulin-Transkripts nach sieben Tagen, sowie eine leichte Steigerung der *oct-4*-mRNA-Menge nach vier Tagen konnte beobachtet werden. Ebenso konnte auf Proteinebene keine positive Wirkung auf die Oct-4- und Lin-28 Expressionen durch Applikation mit Dhc festgestellt werden, was die initiale Analyse einer nicht signifikanten Wirkung auf die *oct-4*-Promotoraktivität weiter bestätigt.

Die drei weiteren Makrolactone S-Curv, Gal und Et-Oxa konnten hinsichtlich der RA-induzierten Repression die transkriptionelle Expression von Oct-4 sowohl nach vier, als auch nach sieben Tagen steigern, wobei Et-Oxa hier den stärksten Effekt zeigte (Abbildung 14 und Abbildung 16).

Bei Betrachtung der Proteinexpression von Oct-4 zeigt sich nach vier Tagen ein mit der mRNA-Steigerung konsistentes Bild, da durch alle drei Lactone diese Expression hochreguliert wurde (Abbildung 19). Darüber hinaus konnte die Applikation von 300 nM Et-Oxa als einzige Testsubstanz die Proteinexpression von Oct-4 nach sieben Tagen trotz RA-Behandlung im Detektionsniveau aufrechterhalten (Abbildung 21).

Die Tatsache, dass Oct-4 als alleiniger Reprogrammierungsfaktor von Meyer *et al.* (2009) genutzt wurde um humane NSCs in ein pluripotentes Stadium zu überführen unterstreicht die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die Pluripotenz. Eine ektopische Expression von Oct-4 allein war ausreichend, um aus Vorläuferzellen, die bereits andere für die Herstellung von iPSCs erforderliche Gene exprimierten, oder aus somatischen Zellen, die mit chemischen Verbindungen behandelt wurden, iPSCs zu generieren (J. B. Kim *et al.*, 2009; S. Zhu *et al.*, 2010). Die molekularen Mechanismen der Oct-4-Reprogrammierung umfassen die Induktion des Übergangs von Mesenchym zu Epithel und die Überwindung epigenetischer Barrieren (Y. Q. Li, 2017). Das Niveau der Oct-4-Expression ist dabei entscheidend für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und die Differenzierung (Niwa *et al.*, 2000). Eine Überexpression von Oct-4 in ESCs wird mit einer Differenzierung in Richtung primitiven Endoderms und Mesoderms in Verbindung gebracht, während ESCs und iPSCs mit

niedrigeren als den normalen Oct-4-Spiegeln im Grundzustand nicht in der Lage sind, die Epiblastendifferenzierung voranzutreiben.

Die mRNA-Expression von *nanog* konnte durch S-Curv und Gal nach vier Tagen der RA-Induktion signifikant erhöht werden, ein Effekt, der nach sieben Tagen nicht mehr festzustellen war. In unstimulierten P19-Zellen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine Herunterregulation von Nanog durch S-Curv und Et-Oxa, was auch den nicht zu beobachtenden positiven Effekt der Verbindungen auf die RA-behandelte Expression von Nanog erklären könnte. Angesichts des noch an Tag 4 resultierenden positiven Effekts von S-Curv auf die durch RA-reprimierte mRNA-Expression mit einer 6,6-fachen Steigerung ist diese Auswirkung nicht den Erwartungen entsprechend. Jedoch zeigt Nanog in embryonalen Stammzellen der Maus eine fluktuierende Expression, wobei eine vorübergehende Herunterregulierung von Nanog die Zellen zwar zur Differenzierung prädisponiert, jedoch hierdurch nicht in ihrem Zellschicksal festlegt (Chambers *et al.*, 2007). Chambers *et al.* (2007) belegten, dass embryonale Stammzellen, obwohl zur Differenzierung neigend, sich in permanenter Abwesenheit von Nanog unbegrenzt selbst erneuern können.

Obwohl Nanog nicht in der Liste der ursprünglichen Reprogrammierungsfaktoren aufgeführt ist, wurde gezeigt, dass es für teilweise reprogrammierte prä-iPSCs erforderlich ist, um Pluripotenz im Grundzustand zu erreichen. Innerhalb des Pluripotenz-Netzwerks vermittelt Nanog den Übergang zum pluripotenten Grundzustand sowohl bei der Embryonalentwicklung als auch bei der Reprogrammierung somatischer Zellen (Silva *et al.*, 2009). Die Kernkomponenten des Pluripotenz-Schaltkreises werden von Oct-4, Nanog und Sox-2 gebildet, und die Nanog-Expression wird direkt von Oct-4 und Sox-2 reguliert. Innerhalb des proximalen *nanog*-Promotors wurde ein zusammengesetztes *cis*-regulatorisches Sox-Oct-Element identifiziert, das für die pluripotente Transkription von *nanog* notwendig ist (Rodda *et al.*, 2005). Das Oct-4-Sox-2-Heterodimer aktiviert so die Expression von *nanog* durch direkte Bindung an den Promotor.

Nanog wiederum reguliert positiv die Expression von Oct-4, Sox-2 und Nanog selbst (Y. H. Loh *et al.*, 2006). Nanog ist ein Hauptregulator für die Oct-4-Expression und wirkt durch direkte Bindung an eine Stelle (-990 bis -1010 bp relativ zur TSS) innerhalb der CR2-Region des *oct-4*-Enhancers (Y.-Q. Li, 2010) (vgl. Abbildung 3). In der CR2-Region organisiert Nanog als Kernfaktor einen Transkriptionsfaktorkomplex. Dieser Komplex umfasst die Transkriptionsfaktoren Nanog und Esrrb, die *chromatin remodelers* Tet1 (*ten-eleven-translokation 1*) und Nspc1 (*nervous-system-polycomb 1*) sowie die Signalmoleküle β -Catenin und Bcl3 (*B cell leukemia/lymphoma 3*). Der Nanog-zentrierte Komplex aktiviert die Oct-4-

Expression, indem er die offene Chromatinstruktur neu modelliert und auf Aktivierungssignale antwortet (Y. Q. Li, 2017).

Die Bedeutung von Nanog und Lin-28 als Pluripotenzfaktoren wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Yu *et al.* (2007) bei Reprogrammierungsversuchen humaner somatischer Zellen die Yamanaka-Faktoren Klf4 und *c-myc* erfolgreich durch *nanog* und *lin-28* ersetzen konnte. Et-Oxa offenbarte hinsichtlich der mRNA von *lin-28* einen positiven Effekt nach vier Tagen, welcher sich an Tag 7 durch eine 4-fache Steigerung des *lin-28*-Transkripts verstärkte (Abbildung 14 und Abbildung 16). Die steigernde Wirkung von Et-Oxa auf die RA-reprimierte mRNA-Expression von *lin-28* koinzidiert mit einer jeweiligen Steigerung der Proteinexpression um 37 % an Tag 4, und vermehrt an Tag 7 um 76 % (Abbildung 19 und Abbildung 21). Auch durch Gal konnte nach vier Tagen eine um 40 % erhöhte Lin-28 Proteinexpression nachgewiesen werden, was sich nach sieben Tagen mangels fehlender Signifikanz nicht bestätigte und sich auch nicht mit der relativ unveränderten mRNA-Menge dieser Zeitpunkte deckt. Lin-28 steuert post-transkriptionell als RNA-bindendes Protein (RBP) die Embryonalentwicklung. Es unterstützt die Proliferations- und Stoffwechselkapazitäten von PSCs, fördert die Umprogrammierung zur Pluripotenz und erleichtert den Übergang von naiver zu grundlegender Pluripotenz. Die Wirkung von Lin-28 beruht zum Einen auf einer Inhibition der Biogenese der für die neuronale Differenzierung wichtigen Familie der let-7-microRNA (Tsanov *et al.*, 2017). Im Falle der neuronalen Differenzierung wird die *lin-28*-3' UTR durch let-7 miRNAs gebunden und so die Expression von Lin-28 reprimiert, was im Folgenden (4.3.4) noch näher erörtert wird (Y. Huang, 2012). Zum Anderen moduliert Lin-28 auch post-translational die Regulation von Oct-4 sowie weiterer am Zellzyklus beteiligter Faktoren (Bingsen *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2009). Nach der Transkription von Oct-4 rekrutiert Lin-28 die RNA-Helikase A, um die Translation der mRNA von zu fördern (Qiu *et al.*, 2009).

Der positive Einfluss auf die Pluripotenzmarker durch die drei Makrolactone spiegelt sich auch durch eine transkriptionelle Repression nach sieben Tagen der neuronalen Marker wider. Die Behandlung mit Et-Oxa, S-Curv und Gal erniedrigte die Markergene *β -3-tubulin* und *nestin* in ihrer mRNA-Ausprägung, wobei lediglich Gal keinen signifikant hemmenden Effekt auf die mRNA von *ncam* ausübte (Abbildung 17). NCAM wurden Funktionen an den Reparaturmechanismen und an den Remyelinisierungsprozessen, den Schlüsselfragen der MS-Pathologie, zugeschrieben und in diesem Zusammenhang ein erhöhter Plasmaspiegel von löslichem NCAM bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen nachgewiesen (Ziliotto *et al.*, 2019). Darüber hinaus gilt NCAM neben dem *Amyloid Precursor Protein* (APP) und Amyloid- β (A β) aufgrund erhöhter Serum-Level in Alzheimer-Patienten als Biomarker (K.

Chen, Gao, Bai, & Yuan, 2018). Die durch die Lactone an Tag 4 vorübergehend vermehrte Transkriptmenge von *ncam* ist konträr zum Rückgang der mRNA an Tag 7, wobei berücksichtigt werden muss, dass *ncam* nach zwei bis vier Tagen nur schwach, und erst im weiteren Verlauf der neuronalen Differenzierung an den Tagen 6-8 vermehrt induziert wird (Husmann *et al.*, 1989; Jiří Pacherník *et al.*, 2007). Ein weiterer Grund könnte in der schwach ausgeprägten, durch RA lediglich 2-fach erhöhten mRNA-Expression begründet sein, welche als Vergleich dient. Die neuronale Differenzierung aus Abbildung 7 hatte nach vier Tagen eine um den Faktor 4,2 erhöhte Transkriptmenge zur Folge, was für eine generelle Variabilität in der Markerausprägung je nach Versuchsreihe spricht. Die geringfügige Induktion der ohnehin schwach ausgeprägten Transkription bedingt somit für den weiteren Verlauf womöglich keine pro-differenzierende Wirkung.

4.3.1 Verbesserung der Pluripotenz durch niedermolekulare Substanzen

ESC werden aus embryonalen Blastozysten mit Selbsterneuerung und multidirektionaler Differenzierung gewonnen. Seit der Etablierung der ersten embryonalen Stammzelllinie der Maus durch Kaufman & Evans im Jahr 1981 ist die Erforschung von ESCs ein wichtiges Thema in der regenerativen Medizin und Studien zur Regulierung der Selbsterneuerung der ESCs sind daher ein wichtiger Aspekt geworden. Nachdem anfänglich Stammzellen auf Feeder-Zellen, bestehend aus bestrahlten oder chemisch behandelten embryonalen Fibroblasten der Maus (MEF) kultiviert wurden, konnte später die Verwendung von konditioniertem Kulturmedium (CM) mit Kulturmediumsüberstand von MEF-Zellen zur Aufrechterhaltung von ESCs genutzt werden. Studien zu den Mechanismen, die an der Erhaltung von ESC beteiligt sind haben nachfolgend verschiedene Zytokine (wie LIF) und Signalwege aufgedeckt, die bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wurden kleine molekulare Regulatoren und die entsprechenden Signalwegproteine, die zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ESCs verwendet werden, unter experimentellen Kulturbedingungen identifiziert (G. Chen *et al.*, 2020). Gegenwärtig werden eine Reihe von niedermolekularen Verbindungen, darunter die Inhibitoren von GSK-3 β und MEK (2i; CHIR99021 3 μ M und PD0325901 3 μ M) als wichtige Zusatzstoffe in ESC-Medien verwendet (Q. L. Ying *et al.*, 2008). Der selektive Inhibitor des GSK-3 β -Gerüsts, CHIR99021, spielt eine Rolle bei der Verbesserung der Zellwachstumsrate und hemmt die Differenzierung von ESCs in Nervenzellen, was ihn als Ersatz für die Verwendung von exogenem Sox-2 als Transkriptionsfaktor nutzbar machte (W. Li, Zhou, *et al.*, 2009). In Abwesenheit von Wnt bilden eine Reihe von Proteinen, darunter AXIN, Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3), Caseinkinase α (CKI α) und β -Catenin, einen Komplex, in dem β -Catenin durch CKI α und GSK-3 phosphoryliert wird und so den Proteasom-vermittelten proteolytischen Abbau von β -Catenin

initiiert (D. Wu & Pan, 2010). Hinsichtlich des kanonischen Wnt-Signalweges belegten bereits Sato *et al.* (2004), dass dessen Aktivierung ausreicht, um die Selbsterneuerung sowohl von hESCs als auch von mESCs aufrechtzuerhalten und die Expression der pluripotenten Transkriptionsfaktoren Oct-3/4, Rex-1 und Nanog zu unterstützen (Sato, Meijer, Skaltsounis, Greengard, & Brivanlou, 2004b). Neben einer Inhibition der MAPK/ERK-Signaltransduktion durch niedermolekulare Verbindungen wie Pluripotin und PD0325901 konnte auch eine Inhibition von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (GFRs) nachweislich zu einer Verbesserung der *Stemness* durch Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands von embryonalen Stammzellen beitragen. Beispiele hierfür bilden die Inhibitoren von GF-Rezeptoren AG1478 und SU5402. Ersterer fungiert als EGFR-Inhibitor, wodurch die MAPK-Phosphorylierungskaskade durch Inhibition der ERK-Phosphorylierung unterbunden und eine Proliferation von Stammzellen gefördert wird (J. S. Heo, Lee, & Han, 2006). SU5402 inhibiert ATP-kompetitiv die Tyrosin-Kinase-Aktivität des FGF-Rezeptors, wodurch eine Differenzierung von ESCs unterdrückt wird (Q. L. Ying *et al.*, 2008). Die Arbeitsgruppe von G. Chen *et al.* (2014) untersuchte den Einfluss weiterer Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und konnte belegen, dass eine Inhibition der VEGF-Signalübertragung mit Sunitinib, einem Krebsmedikament und Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)-Inhibitor, mESCs in undifferenzierten Zustand halten konnte, ohne dass eine Feeder-Zellschicht oder LIF benötigt werden. Dies konnte auch für weitere Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie beispielsweise Dovitinib bestätigt werden (G. Chen *et al.*, 2014).

Die Arbeitsgruppe um Takahashi & Yamanaka (2006) schleusten mit Hilfe retroviraler ektopischer Expression vier Transkriptionsfaktoren (Oct-4, Sox-2, Klf4 und c-Myc, OSKM) in MEF ein und reprogrammierten MEF-Zellen erfolgreich in Zellen mit ESC-Eigenschaften. Diese iPSCs lösen die ethischen Probleme in der Stammzellenforschung und besitzen große Anwendungsperspektiven. Allerdings kann eine Integration virenvermittelnder Gene in die chromosomale DNA zu einer Aktivierung von Proto-Onkogenen und damit zum Krebsrisiko führen und auch die bereits angeführte Induktionseffizienz von iPSC muss weiter verbessert werden.

Eine Erzeugung von iPSCs ohne die potenziell mutagen wirkenden Proto-Onkogene *klf4* und *c-myc* sowie die Verwendung nicht-integrativer Methoden wie retro- und lentiviraler Transgen-Expression veranlasste die Forschung zur Suche nach Faktoren, welche die Pluripotenz induzieren können. Niedermolekulare Verbindungen konnten hierbei bereits durch diverse Arbeitsgruppen erfolgreich zur Induktion von iPSCs identifiziert werden. Neben ihrem Einsatz in der Reprogrammierung der Pluripotenz somatischer Zellen bieten solche Verbindungen auch Nutzen hinsichtlich der Verbesserung der Expansionsfähigkeit isolierter adulter

Stammzellen um nachfolgend genügend Zellmaterial zur Zelltransplantation zur Verfügung zu haben. Spätestens seit den ersten experimentellen Arbeiten von Huangfu *et al.* (2008) wurden epigenetische Modifikationen als mögliche Barrieren für die Reprogrammierung angesehen, welche die Etablierung eines pluripotenten Transkriptionsnetzwerks unterdrücken könnten. Mehrere niedermolekulare Verbindungen mit Einfluss auf epigenetische Modifikationen wurden im Anschluss an die Arbeit von Huangfu *et al.* (2008) als effektive Faktoren für eine Zellreprogrammierung in Betracht gezogen. In dieser Studie zeigte sich, dass der Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitor VPA die Effizienz der Reprogrammierung stark verbesserte und sogar den Einsatz des Onkogens *c-myc* ersetzen konnte. In der gleichen Studie zeigte auch der DNA-Methyltransferase Inhibitor 5-Azacytidine ähnliche positive Effekte auf die Reprogrammierungsrate von embryonalen Mäusefibroblasten. Auch für die Verwendung des H3K4-Demethylierungsinhibitor Tranylcypromin (Parnate) konnte eine Aktivierung der endogenen Oct-4-Expression durch eine verstärkte Histon-H3-Dimethyl-K4-Methylierung am *oct-4*-Promotor nach Behandlung von P19-Zellen mit Tranylcypromin gezeigt werden (M. G. Lee, Wynder, Schmidt, McCafferty, & Shiekhattar, 2006; W. Li, Zhou, *et al.*, 2009).

Das Potential dieser niedermolekularen Verbindungen wurde auch von Y. Li *et al.* (2011) belegt. Die Kombination der vier Moleküle VPA, Tranylcypromin, CHIR99021 und dem TGF-beta-Rezeptor-Kinase-Inhibitor 616452 (RepSox) (VC6T) erwies sich als ausreichend, um die Reprogrammierung in Kombination mit einem einzigen Transkriptionsfaktor, Oct-4, zu induzieren und damit Sox-2, Klf4 und c-Myc zu ersetzen. Darüber hinaus zeigten die resultierenden Oct-4-iPSCs ein Differenzierungspotenzial in Zelltypen aller drei Keimschichten und eine Keimbahnübertragung in chimären Mäusen (Y. Li *et al.*, 2011). Im Jahr 2013 fanden Hou *et al.* nach dem Screening von 10.000 Verbindungen eine Kombination, welche auch den verbliebenen Transkriptionsfaktor Oct-4 ersetzen konnte. Durch eine Wirkstoffkombination von VC6T mit dem cAMP-Agonisten Forskolin und dem Histon Methyltransferase EZH2 Inhibitor DZNep (VPA, CHIR99021, RepSox, Forskolin, Tranylcypromin, DZNep) konnte eine erfolgreiche somatische Zellreprogrammierung ohne Zugabe von exogenen Transkriptionsfaktoren induziert werden. Dieser Durchbruch löste das große wissenschaftliche Problem, alle Transkriptionsfaktoren durch eine Verbindung zu ersetzen, und leistete einen bedeutenden Beitrag zur Forschung im Bereich der regenerativen Medizin.

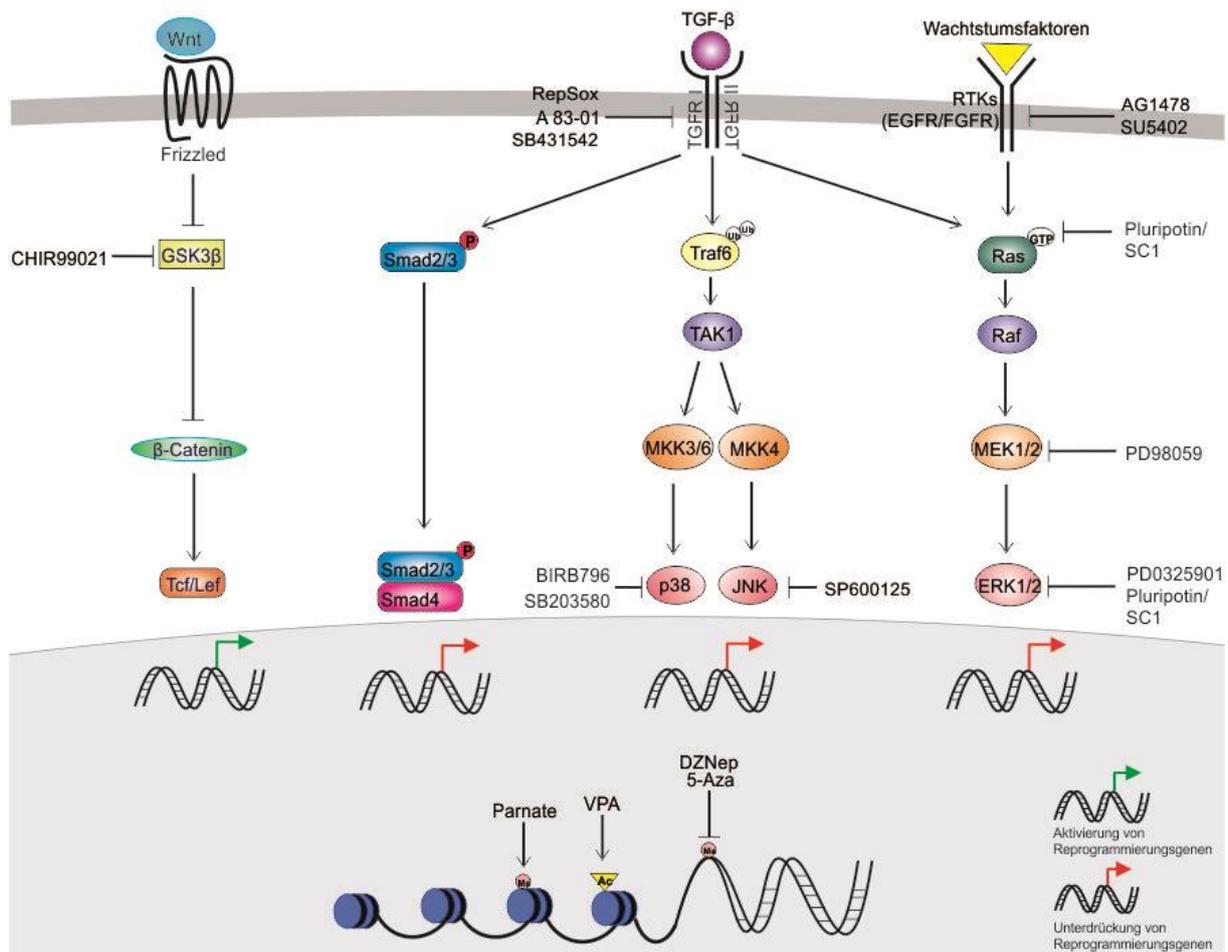


Abbildung 60: Niedermolekulare Verbindungen mit Einfluss auf die Erhaltung der *Stemness* oder Induktion bzw. Verbesserung der Reprogrammierung somatischer Zellen. Vereinfachtes Schema von Zellsignalwegen (TGF- β , MAPK/ERK, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), Wnt/ β -Catenin) und epigenetischen Veränderungen (DNA-Methylierung, Histon-Acetylierung und Histon-Methylierung), und der jeweiligen Wirkung niedermolekularer Aktivatoren/Inhibitoren zur Verbesserung der Pluripotenz und Reprogrammierung. Nach Chen *et al.* (2020), Liu *et al.* (2016) und Zhang *et al.* (2012)

Aus Maus- oder Humanzellen gewonnene iPSCs bieten einen präzisen Weg für die Modellierung von Krankheiten und Zelltherapien und induzierte pluripotente Stammzellen, insbesondere neurale Stammzellen, könnten bei Rückenmarksverletzungen, der Parkinson Krankheit und bei Organtransplantationen eingesetzt werden (Parmar, Grealish, & Henchcliffe, 2020; Tian *et al.*, 2018). Die Induktion pluripotenter Stammzellen von Patienten und Patienten mit Erbkrankheiten und degenerativen Erkrankungen, die sich zu Geweben oder Organen für eine transplantierbare Behandlung differenzieren lassen, bietet einen neuen Weg zur Untersuchung von Gewebefunktionen und zum Screening neuer Arzneimittel. Die Entdeckung weiterer niedermolekularer Wirkstoffe, die die Reprogrammierung fördern, Zellzustände manipulieren, einschließlich pluripotenter Reprogrammierung, gerichteter Differenzierung und

Linienreprogrammierung, sowie die Aufklärung ihres Wirkmechanismus könnten dazu beitragen, die Effizienz und die Sicherheit zu verbessern (G. Chen *et al.*, 2020).

4.3.2 Potentielle Targets der Makrolactone

Das TGF- β -Signal stellt ein attraktives Modell dar, um zu untersuchen, wie Wechselwirkungen zwischen nachgeschalteten Zielen und Reprogrammierungsfaktoren synergistisch wirken, um die Reprogrammierung zu verbessern. Die Identifizierung solcher Signalwege, beteiligter Induktoren und Inhibitoren könnten das Verständnis der Reprogrammierung auf molekularer Ebene unterstützen und zur Entdeckung neuartiger Targets führen, die die Reprogrammierung erleichtern und von therapeutischem Wert sind (Maherali & Hochedlinger, 2009).

Eine Inhibition der TGF- β -Rezeptor-Kinase ALK-5 durch spezifische Inhibitoren hat sich in verschiedenen Studien als förderlich für die somatische Zellreprogrammierung von mESCs und hESCs erwiesen. Maherali & Hochedlinger (2009) zeigten, dass die Hemmung der TGF- β -Rezeptor-I-Kinase sowohl die Effizienz als auch die Kinetik der Reprogrammierung von MEFs in einer dosisabhängigen Weise erhöht, während die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs diese Reprogrammierung blockiert. Der ALK 4/5/7-Inhibitor SB-431542 konnte hier bei der Reprogrammierung von MEFs c-Myc oder Sox-2 ersetzen (Maherali & Hochedlinger, 2009). Darüber hinaus diente der ALK-5-Inhibitor E-616452 (RepSox) zur Reprogrammierung um Sox-2 zu ersetzen und der ALK-5 Inhibitor A-83-01 erwies sich als nützlich hinsichtlich der Reprogrammierung humaner Fibroblasten und um die Selbsterneuerung von iPSCs der Ratte zu unterstützen (Ichida *et al.*, 2009; Y. Zhang *et al.*, 2012).

Delta ist ein wichtiger Transmembranligand für den Notch-Rezeptor, der zahlreiche Entscheidungen über das Zellschicksal vermittelt. Das Notch-Signal ist bei undifferenzierten hESCs nicht aktiv und für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von hESCs nicht erforderlich (Noggle, Weiler, & Condie, 2006). Zellen, die in Gegenwart des konstitutiven Notch-Signals differenziert werden, nehmen ausschließlich ein neuronales Zellschicksal an. Nach dem Entzug von Selbsterneuerungsfaktoren wie LIF und BMP4 für mESCs richtete das aktive Notch-Signal die Zelldifferenzierung auf ein neuroektodermales Schicksal aus (Lowell, Benchoua, Heavey, & Smith, 2006). In NSCs der Maus wurde der intrazellulären Domäne von Delta like Protein 1 (Dl1IC), welche aus der Zellmembran durch Proteolyse in den Zellkern wandert, eine spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren des TGF- β /Activin-Signalweges SMAD2, SMAD3 und SMAD4 nachgewiesen, was die SMAD-abhängige Transkription steigerte. Eine Überexpression von Dl1IC in P19-Zellen induzierte Nervenzellen. Diese Induktion konnte durch den spezifischen ALK-5 (TGF- β -R1) Inhibitor SB431542, blockiert werden, welcher normalerweise nachfolgend die Phosphorylierung von SMAD2/3 bedingt.

Dies belegt, dass eine Inhibition des SMAD2/3-abhängigen Signaltransduktion einen inhibierenden Einfluss auf die Induktion von Neuronen hat. (Hiratochi *et al.*, 2007).

Die Pilzlactone (S)-Curvularin, Dehydrocurvularin, Galiellalacton und die Ausgangsstruktur für Et-Oxa Oxacyclododecindion inhibierten die TGF- β -induzierte Aktivierung eines SMAD2/3-abhängigen Transkriptionsreporters in HepG2-Zellen in dosisabhängiger Weise ohne einen cytotoxischen Einfluss auszuüben. Die Wirkung beruhte dabei zwar nicht auf der durch die vorgeschaltete Typ-I-Rezeptorkinase ALK5 bedingte Aktivierung von SMAD2/3 durch Serinphosphorylierung, weswegen eine Wirkung downstream der TGF- β -induzierten ALK-5-Aktivierung angenommen werden muss. (S)-Curv, Dhc, Gal und die Ausgangsstruktur für Et-Oxa Oxa hemmten jedoch die Bindung der aktivierten SMAD2/3-Transkriptionsfaktoren an die DNA bis auf das nicht-induzierte Grundniveau und hemmten die zellulären Wirkungen von TGF- β , einschließlich der Aktivierung von Reportergenen und der Expression von TGF- β -induzierten Genen in HepG2- und MDA-MB-231-Zellen (K. Rudolph *et al.*, 2013). Ein inhibierender Einfluss auf die SMAD2/3- abhängige Signaltransduktion konnte in dieser Arbeit auch für das von Oxacyclodocindion-abgeleitete Derivat Et-Oxa nachgewiesen (vgl. Tabelle 6).

TGF- β gilt auch als Hauptinduktor der physiologischen Prozesse der EMT, der Induktion eines invasiven pro-fibrotischen Phänotyps (Doerner & Zuraw, 2009). Der Vorgang der EMT durch die TGF- β -Signalübertragung ist ebenso ein wichtiges Merkmal der Embryonalentwicklung (L. Xie *et al.*, 2004). TGF- β induziert die EMT durch kanonische SMAD-, nicht-kanonische Ras-MEK-ERK-MAP-Kinase- und Rho-Signale (Jian Xu, Lamouille, & Derynck, 2009). Der umgekehrte Prozess, der mesenchymal-epitheliale Übergang (MET), ist ein entscheidendes frühes Ereignis bei der Reprogrammierung zur Pluripotenz. Niedermolekulare Verbindungen, die die TGF- β -Signalübertragung oder ihre nachgeschalteten Effektoren blockieren, können den Prozess der MET erleichtern und die Reprogrammierung verbessern.

Fibroblasten, deren Entstehung durch die EMT induziert ist, können über exogene Transkriptionsfaktoren in iPSCs umgewandelt werden. Die Generierung von iPSCs aus Mäusefibroblasten erfordert einen mesenchymalen zu epithelialen Übergang, der durch die Unterdrückung von pro-EMT-Signalen aus dem Kulturmedium und die Aktivierung eines epithelialen Programms innerhalb der Zellen gesteuert wird. Auf der Transkriptionsebene unterdrückt Sox-2/Oct-4 den EMT-Vermittler Snail, c-Myc hemmt die Rezeptoren TGF- β 1 und 2, und Klf4 induziert epitheliale Gene wie *e-cadherin*. Die Blockierung von MET beeinträchtigt die Reprogrammierung von Fibroblasten, während eine Blockade der EMT in Epithelzellen, die mit Serum kultiviert werden, iPSCs ohne Klf4 und c-Myc erzeugen kann (R. Li *et al.*, 2010).

Inhibitoren von TGF- β -Rezeptoren verstärken die Reprogrammierung und können Sox-2 bei der Reprogrammierung von MEFs ersetzen (Ichida *et al.*, 2009; Maherali & Hochedlinger, 2009). SB431542, PD0325901 und Thiazovivin, Inhibitoren von ALK-5, MEK bzw. Rho-ROCK konnten in humanen Fibroblasten nicht nur die Effizienz der Reprogrammierung erheblich steigern, sondern auch die Geschwindigkeit der Reprogrammierung beschleunigen, teilweise durch die Derepression des epithelialen Phänotyps (T. Lin *et al.*, 2009).

Die Lactone S-Curv, Dhc und Gal, sowie die Ausgangsstruktur von Et-Oxa Oxa zeigten einen inhibierenden Einfluss auf von TGF- β induzierte pro-fibrotische, an der EMT beteiligter Gene wie *angiopoietin-like 4*, *mmp-2*, *tgf- β* und, mit Ausnahme von S-Curv, auch *pdgf* (K. Rudolph *et al.*, 2013).

Nicht-kanonische, nicht-SMAD-vermittelte TGF- β -Kaskaden können TGF- β -aktivierte Kinasen 1 (TAK-1) aktivieren und über Wege wirken, die durch verschiedene Mitogen aktivierte Proteinkinasen, MAPKs (MKK/Jun/p38), Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (Akt) oder Rho-ähnliche GTPasen, sowie weitere Signalwege wie NF- κ B und Notch aktiviert werden (Gordeeva, 2019). Die Bindung von TGF- β an ALK-5 induziert eine Auto-Ubiquitinierung der E3 Ubiquitin Ligase TRAF6 (TNF *receptor-associated factor 6*). Dadurch bedingt werden TAK1 zusammen mit TGF- β *activated kinase binding protein* (TAB1) rekrutiert und aktiviert um nachfolgend mehrere *mitogen-activated protein kinase kinases* (MKKs/MAP2-Kinasen) zu aktivieren, welche wiederum die *mitogen activated protein* (MAP)-Kinasen wie die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38 phosphorylieren (Gui, Sun, Shimokado, & Muragaki, 2012; Yamashita *et al.*, 2008).

Vorarbeiten zur Wirkungsweise der Grundstruktur von Et-Oxa Oxa von A.-K. Rudolph (2015) konnten bezüglich der TGF- β induzierten Signalweiterleitung im nicht-kanonischen Signalweg eine Hemmung der Phosphorylierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen, wie der MAP-Kinasen p38 und JNK, sowie der vorgeschalteten Kinasen MKK3/6 und TAK1 durch Oxa belegen.

Eine Inhibition der MAP-Kinase p38 könnte ein mögliches Target zumindest für das von der Ausgangsstruktur Oxa abgeleitete Et-Oxa darstellen. Das BMP4-Signal unterstützt murine ESCs in einem undifferenzierten Zustand zu halten (Q.-L. Ying *et al.*, 2003). Qi *et al.* (2004) berichteten, dass die Wirkung von BMP-4 (für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von ESCs notwendig) durch die Hemmung sowohl der ERK als auch der MAPK p38 erreicht wird. Die Wirkung von BMP4 auf die Selbsterneuerung von ESCs konnte durch spezifische Inhibitoren von ERK (PD98059) und der p38 MAPK (SB203580) imitiert werden.

Eine Inhibition von Mitgliedern der MAP-Kinase-Signaltransduktion erwies sich in mehreren Studien als effektiv hinsichtlich einer *Stemness*-verbessernden und erhaltenden Wirkung. SC1, sowie das Analogon Pluripotin üben eine duale Rolle hinsichtlich ihres *Stemness*-erweiternden Potentials aus. Die Moleküle inhibieren effektiv ERK1/2, was zu einer verminderten Differenzierung embryonaler Stammzellen führt. Gleichzeitig hemmt SC1 RasGAP, wodurch die Umwandlung von RasGTP gestoppt wird. Die Akkumulation und Kombination von RasGTP und p110 aktiviert den p13k-Akt-Signalweg, der eine förderliche Umgebung für die Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen schafft (S. Chen *et al.*, 2006). Als interner Regulator der Pluripotenz und Differenzierung ist ERK - ein intrazellulärer Signalvermittler der MAPK, an Wachstum und Differenzierung verschiedener Zelltypen beteiligt (Q. L. Ying *et al.*, 2008). Der Inhibitor des MAP-Kinase-Signalweges PD0325901 verhindert spezifisch die Aktivierung von ERK durch Inhibition des MAPK/ERK-Signals und wird in Kombination mit dem GSK-3 β -Inhibitor CHIR99021 zur Erhaltung der Selbsterneuerung von ESCs als Medienzusatz *in vitro* eingesetzt (Q. L. Ying *et al.*, 2008). Die Verwendung eines ALK5-Inhibitors in Verbindung mit GSK3 β - und MEK-Inhibitoren erleichtert überdies die Vermehrung von humaner und Ratten-iPSCs und unterstützt einen mausartigen ESC-ähnlichen Phänotyp (W. Li, Wei, *et al.*, 2009). Yuan *et al.* (2019) entwickelten ein Medium mit zwei Proteinfaktoren (LIF und FGF2) und einer Kombination von Kinase-Inhibitoren, um lentiviral-reprogrammierte Schweine-iPSCs in einen naiven Zustand zu überführen. Zusätzlich zu FGF2 und LIF enthielt dieses Medium Inhibitoren von p38 (BIRB796), JNK (SP600125), ALK-5 (A-83-01), ERK1/2 (PD0325901), GSK3 β (CHIR99021) und BMP (LDN193189).

Neben des, bereits zuvor beschriebenen, Einflusses auf die Promotoraktivität ist auch die post-translationale Modifikation von Oct-4 wichtig, um seine Funktion zu regulieren. Proteinkinase A und/oder MAPK (ERK2) phosphorylieren Oct-4 am hochkonservierten Ser229 (Maus) oder Ser236 (Mensch) innerhalb der POU-DNA-bindenden Homöodomäne (Brumbaugh *et al.*, 2012). Die Phosphorylierung an diesem Serinrest hindert sterisch sowohl die DNA-Bindung als auch den Aufbau des Homodimers und somit die transkriptionelle Aktivität von Oct-4. Darüber hinaus wird Oct-4 durch ERK1/2 an Ser111 phosphoryliert, was zu einer Abnahme der nuklearen Akkumulation führt und den Abbau von Oct-4 fördert (Spelat, Ferro, & Curcio, 2012). Eine Ubiquitinierung durch E3-Ligasen verringert die Transkriptionsaktivität und fördert den Abbau von Oct-4, wohingegen eine Sumoylierung, die Stabilität, DNA-Bindung und Transaktivierungsfunktionen erhöht (Cho *et al.*, 2018).

In RA-behandelten P19-Zellen phosphorylieren die aktivierten ERKs TR2, der dann zu einem Repressor von Oct-4 wird (Di Masi *et al.*, 2015). Die Applikation von RA führt zu einer Komplexbildung der ERK2 mit ihrer vorgeschalteten Kinase MEK. Die aktivierte ERK2

phosphoryliert Threonin-210 (Thr-210) von TR2 und stimuliert dessen anschließende SUMOylierung um mit dem Co-Repressor RIP140 als Repressor für sein Zielgen Oct-4 zu wirken (Gupta *et al.*, 2008).

Die Aktivierung der MAP2-Kinasen erfolgt bei TGF- β -Stimulation durch die MAP3-Kinase TAK1, die sich selbst nach einer Konformationsänderung an Serin-192 sowie Threoninresten (Thr184 und Thr187) autophosphoryliert. Auch für TAK1 konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Serin-Tyrosin-Threonin-Phosphorylierung durch Oxa nachgewiesen werden (A.-K. Rudolph, 2015).

Auch NF- κ B wird über TAK1 sowie PI3K aktiviert, indem die Phosphorylierungskaskade über die Proteinkinase AKT zum zytoplasmatischen Inhibitor von NF- κ B, I κ B führt. Die Phosphorylierung von I κ B leitet den Proteasomabhängigen Abbau ein und ermöglicht es NF- κ B, in den Zellkern zu gelangen und die NF- κ B-abhängige Genexpression zu regulieren (Armstrong *et al.*, 2006). Eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität wurde in Verbindung gesetzt mit Stammzellpluripotenz. Kim *et al.* (2008) berichteten über die Hochregulierung von NF- κ B bei der Differenzierung von ESCs der Maus. Darüber hinaus induzieren hohe Spiegel an NF- κ B die Differenzierung von ESCs durch die Aktivierung von Linien-spezifischen Programmen. NF- κ B bindet an die WR-Transaktivierungsdomäne von Nanog, was zu einer Unterdrückung der Transkriptionsaktivität von Nanog führt (Torres & Watt, 2008). Pharmakologische Inhibitoren der Proteinkinase C (PKCi) regulieren die NF- κ B-Aktivität durch Hemmung von PKC ζ . In differenzierten Zellen werden NF- κ B-verwandte Gene aktiviert, wohingegen PKCi die Aktivierung dieser Gene hemmt und die Selbsterneuerung von Stammzellen fördert (G. Chen *et al.*, 2020; Dutta *et al.*, 2011).

(S)-Curv und Dhc wurden neben ihres inhibierenden Einflusses auf die TGF- β -induzierte Signaltransduktion auch als NF- κ B-hemmende Metaboliten beschrieben (Aly *et al.*, 2011). Gal verhindert die Bindung von NF- κ B an die DNA, beeinflusst jedoch weder die Phosphorylierung und den Abbau des NF- κ B-inhibitorischen Proteins I κ B α noch die Phosphorylierung und Acetylierung der NF- κ B p65-Untereinheit. Gal verhindert jedoch durch Bindung von p65 die Assoziation mit dem Importin α 3, das die nukleare Translokation dieses Transkriptionsfaktors beeinträchtigt (Pérez *et al.*, 2014).

Die Inhibierung der Aktivierung von TAK1 liefert zwar eine Erklärung für die Wirkung der Ausgangsstruktur für Et-Oxa Oxa auf den NF- κ B- sowie MAPK-Signalweg, jedoch konnte bislang der Effekt auf den kanonischen SMAD-vermittelten TGF- β -Signalweg nicht erörtert werden, was hier ebenso für die anderen aktiven Metaboliten (S)-Curv, Dhc und Gal gilt.

Analysen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen belegten, dass die TGF- β -induzierbare SMAD2/3-Reporterexpression durch Oxa mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich gehemmt wurde. Das verwandte gesättigte makrozyklische Lacton (S)-Curv zeigte sich hier 200-mal weniger aktiv, und Dhc, dem ebenfalls das Chlor an C-4 und die Methylgruppe an C-10 fehlt, war etwa 20-mal weniger aktiv. Vor allem das Vorhandensein der 10,11-Doppelbindung im Lactonring, die Methylgruppe an C-10, sowie die Chlorierung an C-4 scheinen wichtige Strukturmerkmale für die Aktivität auf die SMAD2/3-abhängige Signaltransduktion zu sein, wohingegen die Hydroxy-Gruppe an Stelle C-14 einen eher geringen Einfluss ausübt (Richter, Sandjo, Liermann, Opatz, & Erkel, 2015). Die Wirkung der Lactone auf die gesteigerte Expression der *Stemness*-Marker kann somit nur bedingt auf eine Inhibition der TGF- β -Signaltransduktion zurückzuführen sein, könnte aber in Kombination mit Modulationen von Signaltransduktionen oder der Epigenetik vorstellbar sein. Angesichts der geringen applizierten Menge an Et-Oxa mit 300 nm im Vergleich zur IC_{50} im TGF- β -induzierten SMAD2/3-Signalweg erscheint eine Korrelation zur Wirkung auf an der TGF-Signalisierung beteiligte MAPKs zunächst schwierig (vgl. Tabelle 6). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass für die Erstellung der IC_{50} die Expressionsanalyse der Bindung aktivierter SMADs an die entsprechende Konsensus-Sequenz des Vektors verantwortlich war, insofern hier lediglich der kanonische TGF- β -Signalweg auf seine Expression hin untersucht wurde. Zum anderen ist auch die entsprechende Zelllinie entscheidend in der Ausprägung der Wirkung der Verbindungen. Hatte im Falle von Oxa und DM-Oxa in HepG2-Zellen die Applikation im Wirkungsbereich keinerlei Einfluss auf die Viabilität der Zellen, konnte hier, wie in Abbildung 11 ersichtlich, eine relativ geringe LD_{50} bei den beiden Verbindungen festgestellt werden.

4.3.3 Generelle Unterschiede der beteiligten Signalwege je nach Organismus

Insgesamt muss bei Betrachtung und Bewertung der Ergebnisse auch berücksichtigt werden, dass murine Faktoren der *Stemness* und Differenzierung nicht immer in den humanen Part übersetzt werden können. Im Gegensatz zu seiner Pluripotenz-fördernden Wirkung in Maus-ESCs induziert beispielsweise BMP4 die Differenzierung der humanen ESCs in Richtung Trophektoderm, während das Activin-Signal die Pluripotenz der hESCs aufrechterhält (W. Li, Wei, *et al.*, 2009). Die Selbsterneuerung von naiven pluripotenten Stammzellen, wie mESCs als *in vitro* Prototyp, erfordert die Aktivität des LIF/JAK/STAT3-Signalwegs in Kooperation mit den TGF/BMP- und PI3K/Akt-Signalwegen, während der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4 (FGF4) durch Aktivierung von ERK den Verlust der Selbsterneuerung und die Linien-spezifischen Differenzierung initiiert (Armstrong *et al.*, 2006; Burdon, Smith, & Savatier, 2002; Kunath *et al.*, 2007). Unterschieden hierzu wird die Aufrechterhaltung der *Stemness* in

sogenannten primed pluripotenten Stammzellen. ESCs werden aus Mäuseembryonen vor der Implantation in die Gebärmutter gewonnen. Nach der Implantation erfährt der Epiblast eine Ausdehnung und Morphogenese und Kulturen dieses Epiblasten lassen in Gegenwart von FGF und Aktivin kontinuierliche Zelllinien entstehen, die als EpiSCs bezeichnet werden (Brons *et al.*, 2007) Diese Epiblasten-Stammzellen der Maus (mEpiSCs), als auch humane ESCs, werden als primed pluripotent angesehen, wo die Selbsterneuerung durch die Signalwege FGF2/PI3K/Akt und TGF/ActivinA/Nodal gewährleistet werden, während der LIF/JAK/STAT3-Signalweg entbehrlich ist (Dahéron *et al.*, 2004; Gordeeva, 2019).

Auch der JAK/STAT-Signalweg kann unterschiedliche Rollen bei der Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustands einnehmen. Die *in-vitro*-Kultur von mESC kann durch die LIF-aktivierte Tyrosinphosphorylierung von STAT3 Pluripotenz erhalten. Im Gegensatz dazu führt LIF nicht zur Förderung der Pluripotenz von hESCs in Abwesenheit von Feederzellen, und STAT1, 3 und 5 sind nicht phosphoryliert in pluripotenten hESCs. Korrelierend hierzu reicht LIF nicht aus, um die um die Pluripotenz der hESC-Kultur zu erhalten. Dieser scheinbare Widerspruch zwischen murinen und humanen ESCs legt nahe, dass die Wege, die die Pluripotenz in den zwei Arten erhalten, unterschiedlich sind (Dreesen & Brivanlou, 2007). Gal zeigt hinsichtlich der Pluripotenzsignatur infolge des neuralen Stimulus eine förderliche Wirkung, was zunächst seiner Wirkung als Inhibitor der STAT3-Signaltransduktion widerspricht, welche zur Selbsterneuerung von mESCs benötigt wird (Ng & Surani, 2011). P19 Zellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung in serumhaltigem Medium ohne LIF oder Feeder-Zellschicht und die Hemmung der STAT3-Aktivierung mit einem Janus-Kinase-Inhibitor zeigt kaum eine Beeinträchtigung der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands. Dies deutet darauf hin, dass die Selbsterneuerung in P19-Zellen in Gegenwart von FKS ohne Aktivierung des LIF/JAK/STAT3-Signalwegs, bzw. durch alternative Signalwege oder Faktoren aufrecht erhalten wird, und entsprechend Gal seinen Effekt unabhängig der STAT3-Signalkaskade offenbart (Kawazoe *et al.*, 2009).

In Studien mit hESCs und hiPSCs ist eine Aktivierung des Wnt-Signalweges durch CHIR99021 förderlich für die neuronale Differenzierung und führt zu einer verminderten Zellproliferation, wohingegen bei Modellen, die auf Nagetieren basieren, dies jedoch uneinheitlich war (W. Li *et al.*, 2011; Telias & Ben-Yosef, 2021). Einerseits berichten Studien, dass CHIR99021 in aus Ratten gewonnenen ESCs und in MEFs die neuronale Differenzierung ähnlich wie in den humanen Modellen fördert, während andere Studien zu dem Schluss kommen, dass CHIR in murinen ESCs die neuronale Differenzierung hemmt und die Mechanismen zur Erhaltung der Pluripotenz verstärkt (Cheng *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2013; Y. Wu *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2012). Diese Diskrepanz zwischen *In-vitro*-Plattformen beim Menschen und bei Mäusen unterstreicht

die Bedeutung der Verwendung von humanen Modellen in der Neuroentwicklungsforschung und beim *In-vitro*-Wirkstoffscreening.

4.3.4 Effekt bioaktiver Lactone auf die Expression neuronal regulierender miRNAs

Eine einzelne miRNA kann mehrere hundert Targets haben und ebenso kann ein Gen Zielstellen für verschiedene miRNAs haben, die die Herunterregulierung durch mehrere miRNAs synergistisch beeinflussen (Peter, 2010). Bisher wurden mehr als tausend microRNAs im menschlichen Genom identifiziert, und ihre ständig steigende Zahl verdeutlicht das Potenzial der miRNAs als wichtige Akteure der Genregulation. miRNAs spielen eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des Gehirns und dessen physiologischen Funktionen und über 50 % der humanen miRNAs werden im ZNS exprimiert (Shao *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurden anormale Expressionen von miRNAs mit verschiedenen Pathologien einschließlich Tumoren oder der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Huntington oder ALS in Verbindung gebracht, was ihre Funktion zum normalen Zellwachstum, bei der Entwicklung und der Funktion und Regeneration von Neuronen unterstreicht (T.-Y. Ha, 2011; Sun, Crabtree, & Yoo, 2013).

Auf die RA-induzierte P19-Zelldifferenzierung folgt die Unterdrückung von Pluripotenzgenen wie beispielsweise Oct-4 (Jon Schoorlemmer *et al.*, 1995). Es gibt zahlreiche Publikationen, welche die Bedeutung unterstreichen, dass die Unterdrückung von Pluripotenzgenen während der Differenzierung in großem Maße durch Modifikationen der Epigenetik reguliert wird, wie beispielsweise durch DNA-Methylierung bestimmter Promotorregionen, Histonmodifikationen und insbesondere durch die Beteiligung von miRNAs (Berdasco & Esteller, 2011; Heurtier *et al.*, 2019; Tay *et al.*, 2008).

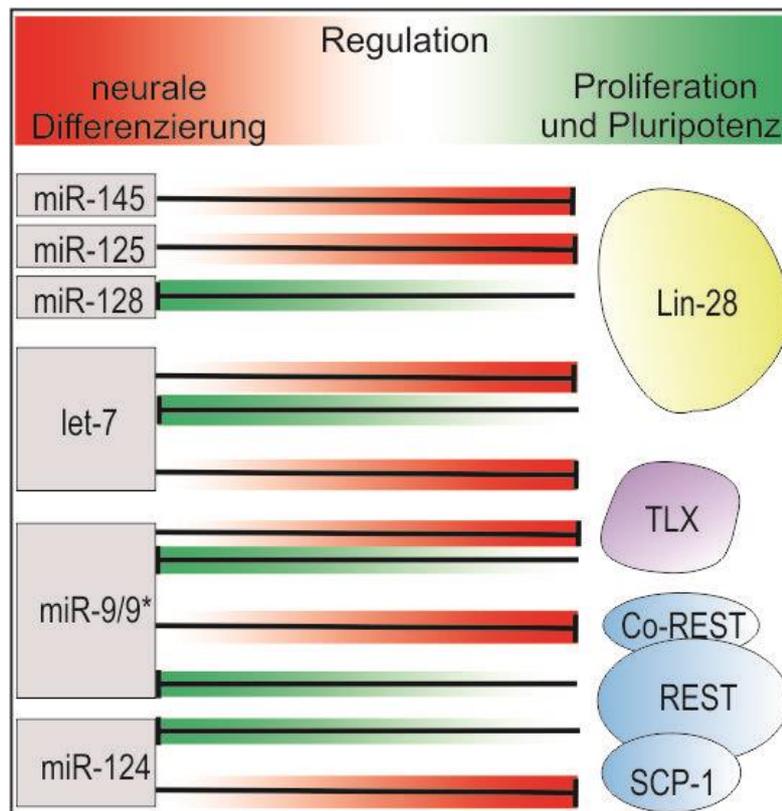


Abbildung 61: Regulation der Neurogenese und Pluripotenz durch miRNAs. Während der Differenzierung neuraler Stammzellen wird Lin-28 durch mehrere miRNAs herunterreguliert. Eine Repression durch die let-7-Familie von miRNAs und die miR-125 erfährt die Lin-28 mRNA durch Bindung ihrer 3'UTR. Ebenso wird Lin-28 durch miR-145 direkt herunterreguliert. Eine negative Rückkopplung besteht hingegen in undifferenzierten Zellen bei Mitgliedern der let-7-miRNA-Familie, deren Biogenese durch stark exprimiertes Lin-28 blockiert wird. Ebenso wird durch Lin-28 die Prozessierung der miR-128 durch Konkurrenz mit der Endonuklease Dicer inhibiert. Die Expression von miR-124 und miR-9/9* wird durch den neurogenen Repressor REST und seine Co-Faktoren SCP1 und Co-REST kontrolliert. In NSCs wird der transkriptionelle Repressor neuronaler Gene REST stark exprimiert und hemmt die Expression der miRs-9 und -124. Darüber hinaus wird miR-9/9* durch den Pluripotenz-fördernden Kernrezeptor TLX unterdrückt. Während der neuronalen Differenzierung werden miR-124 und miR-9/9* hochreguliert und verstärken ihre eigene Expression, indem sie sich gegen ihre negativen Regulatoren richten. miR-9 bildet autoregulatorische Schleifen mit dem let-7-Ziel TLX und miR-9* reguliert Co-REST. miR-124 hemmt während der neuronalen Differenzierung infolge einer negativen Rückkopplung die Aktivität von SCP1, dem weiteren Co-Faktor von REST. Nach Morgado *et al.* (2016), Rybak *et al.* (2008), Shenoy & Blelloch (2014), Stappert *et al.* (2015)

Die in Abbildung 61 dargestellten neuronal regulatorischen miRNAs wurden in ihrer Expression mit oder ohne neuronalen Stimulus 1 μM RA, und bei Applikation der Lactone Dhc, S-Curv, Gal und Et-Oxa nach vier und sieben Tagen untersucht (Abbildung 22/Abbildung 23).

Durch initiale Stimulation mit 1 μM RA konnten nach vier Tagen alle miRNAs, bis auf miR-128, in ihrer relativen Expression signifikant gesteigert werden, wobei miR-9 mit Faktor 18,1 die größte und let-7e mit Faktor 2 die geringste Änderung erfuhren (Abbildung 22, B). Die Induktion mit RA hatte nach sieben Tagen eine signifikante Expressionssteigerung aller miRNAs zur Folge (Abbildung 23, B). Die miR-128 wurde mit Faktor 2,7 am schwächsten, die let-7a miRNA mit Faktor 187 am stärksten beeinflusst.

miRNAs spielen, wie bereits erwähnt, auch hinsichtlich der post-transkriptionellen Regulation der Oct-4-Expression eine entscheidende Rolle. Die 3'-untranslatierte Region der humanen Oct-4-mRNA wird während der ESC-Differenzierung direkt durch die miR-145 gebunden und damit die Translation von Oct-4 inhibiert. Neben Oct-4 vermittelt die miR-145 auch die Repression der Translation der Transkriptionsfaktoren Sox-2 und Klf-4 durch Bindung an die jeweilige 3'UTR. Im Pluripotenzstadium wird der Promotor von miR-145 durch Oct-4 gebunden und gehemmt, was eine doppelt negative Rückkopplungsschleife für die Oct-4- und miRNA-Expression bedeutet (N. Xu *et al.*, 2009). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Interaktion der miR-145 mit dem *oct-4*-Promotor human-spezifisch ist, die Interaktion mit den 3'UTRs von *sox-2* und *klf-4* jedoch auch für Mäuse und Ratten gilt (N. Xu *et al.*, 2009). Die miR-145-Expression steigt nach der Induktion muriner NSC und bleibt während des Prozesses der Differenzierung erhöht. Eine Herunterregulation der miR-145 verringert neuronale Marker wie β -3-Tubulin, NeuN und MAP2. Auch die direkte Regulation von Lin-28 und Sox-2 durch miR-145, welche wiederum let-7b-Transkripte erhöhte, wurde beschrieben (Morgado *et al.*, 2016).

Alle getesteten Lactone konnten die Expression der miR-145 nach vier Tagen neuraler Induktion signifikant reduzieren, wobei Et-Oxa den weitaus stärksten Effekt mit einer 21-fachen Hemmung unter das uninduzierte Niveau bedingte. Im Falle von Gal und Et-Oxa konnte nach vier Tagen eine erhöhte Proteinexpression von Lin-28 nachgewiesen werden, welche neben einer reduzierten Inhibition durch let-7miRNA-Transkripte, auch durch die reduzierte Expression der miR-145 bedingt sein könnte (Abbildung 19). Morgado *et al.* (2016) wiesen in murinen NSCs einen um 40 % erhöhten Lin-28-Proteinspiegel nach einer Herunterregulierung von miR-145 nach. In Arbeitsgruppen-internen Vorversuchen konnten S-Curv und der Naturstoff Oxa als Ausgangsstruktur von Et-Oxa in einem zellulären Modell inflammatorischer Erkrankungen ebenfalls die Expression der miR-145 inhibieren, was sich mit den hier gezeigten Ergebnissen deckt. Nach sieben Tagen konnte der inhibierende Effekt allerdings durch keine der applizierten Verbindungen aufrechterhalten werden, jedoch könnte die verminderte miR-145-Menge nach vier Tagen mitverantwortlich für die Reduktion des

neuronalen Markers β -3-Tubulin aller Lactone auf Transkriptionsebene nach sieben Tagen sein.

Zu den weiteren miRNAs, die eine wesentliche Rolle bei der neuronalen Differenzierung spielen, gehören die let-7-miRNAs, die miR-124 und die miR-9. Die Familie der let-7 miRs zeigt die höchste Expression in NSCs und Neuralen Vorläuferzellen und nimmt eine wesentliche Rolle bei der neuronalen Differenzierung ein (Åkerblom & Jakobsson, 2014). So induziert eine Überexpression von let-7a die Bildung von Neuronen in NSCs, und eine Hemmung der let-7a-Aktivität resultiert in der Proliferation von Nestin-positiven Vorläuferzellen (Schwamborn *et al.*, 2009). Ebenso wird durch Überexpression der let-7b die Proliferation neuraler Stammzellen verringert und die neurale Differenzierung begünstigt, während ein Antisense-Knockdown die Proliferation von NSCs verstärkt. Diese Effekte resultieren aus einer Bindung von let-7b an die 3`UTR des Kerntranskriptionsfaktors TLX, einem Repressor neuraler Genexpression, und des Zellzyklusregulators Cyclin D1 (Shenoy & Blelloch, 2014; Zhao *et al.*, 2010). TLX ist ein mit dem Retinsäure-Rezeptor RXR verwandter Kernrezeptor und wurde als Vermittler für die Proliferation und Pluripotenz von neuralen Vorläuferzellen bei Hypoxie identifiziert. Die frühe Embryogenese findet unter hypoxischen Bedingungen statt, und die Induktion von HIF (*Hypoxia- Inducible Factor*) für die Oct-4-Expression im frühen Embryo ist mitentscheidend. TLX wird an den Oct-4-Promotor (PP) rekrutiert, wodurch die Gentranskription verstärkt und die Progenitorproliferation und Pluripotenz gefördert wird (vgl. Abbildung 3). Die Rekrutierung von TLX am Kernpromotor korreliert mit der aktiven H3K9-Acetylierung und der verstärkten Rekrutierung von RNA-Polymerase II (Y. Q. Li, 2017). Auch für let-7d wurde eine vorzeitige neuronale Differenzierung und Reduktion der Selbsterneuerung von NSCs infolge einer Überexpression nachgewiesen. Ähnlich wie im Falle von let-7b konnte die Expression von TLX durch Überexpression von let-7d reduziert werden, wobei ebenfalls eine Bindestelle für let-7d in der 3`UTR von TLX hierfür verantwortlich scheint (Zhao, Sun, Ye, Li, & Shi, 2013). Auch für die weiteren Mitglieder der let-7-miRNA-Familie wurden Funktionen nachgewiesen, die die Proliferation neuraler Stammzellen hemmen und die neuronale Differenzierung und Migration fördern (Pasquinelli, 2012; Roush & Slack, 2008; Zhao *et al.*, 2013). Während der neuronalen Differenzierung akkumuliert ausgereifte let-7-miRNA und reprimiert die Expression des *Stemness*-erhaltenden Faktors Lin-28 durch die Bindung an dessen 3`UTR (Y. Huang, 2012). Darüber hinaus unterdrücken erhöhte Konzentrationen ausgereifter let-7 miRNAs Expressionen an der Selbsterneuerung beteiligter Gene, wie den Proto-Onkogenen *c-myc* und *ras*, Faktoren der Zellzyklusprogression wie Cyclin D1 und, wie erwähnt, Lin-28 selbst, was eine positive Rückkopplung darstellt. In undifferenzierten Zellen hingegen wird Lin-28 stark exprimiert und blockiert, wie in Abbildung

62 dargestellt, die Biogenese der let-7 miRNA. Lin-28 verhindert durch Bindung der pri- oder prä-let-7-miRNAs die Prozessierung durch Drosha oder Dicer, und somit die Ausreifung der entsprechenden let-7-Vorläufer (Ustianenko *et al.*, 2018). Darüber hinaus rekrutiert Lin-28 die nicht-kanonischen Poly-A-Polymerasen TUT4 (terminal uridyl transferase 4/Zcchc11) und TUT7 zu prä-let-7 und fördert deren Oligo-Uridylierung am 3'-Ende. Oligo-uridyliertes prä-let-7 kann nicht von Dicer prozessiert werden und dient daher als Signal für den Abbau durch die zelluläre 3'-5'-Exoribonuklease Dis312 (Mayr & Heinemann, 2013).

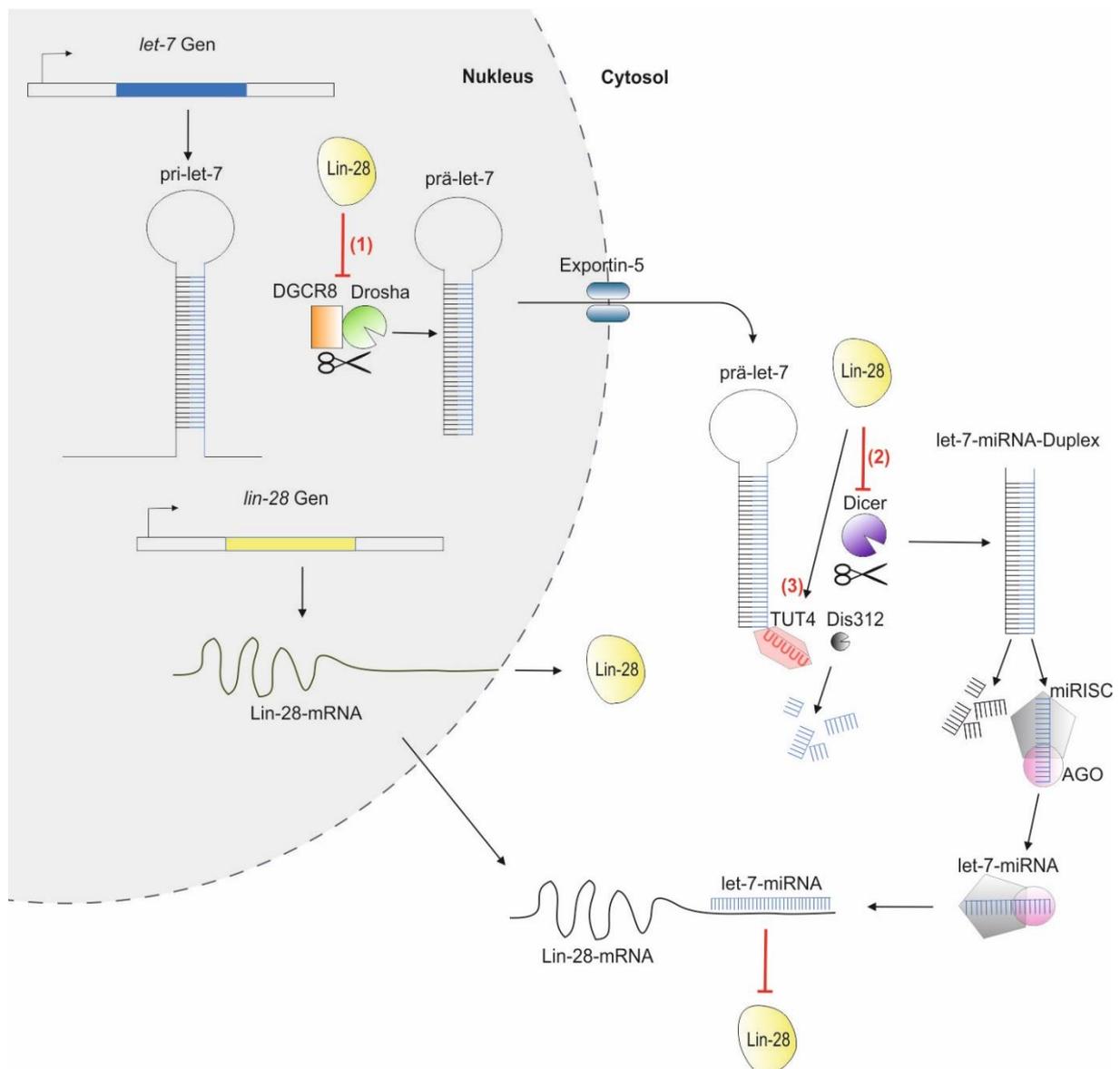


Abbildung 62: Regulation der let-7-miRNA-Biogenese durch Lin-28. Das primäre let-7-miRNA-Transkript (pri-let-7-miRNA) wird durch den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus dem RNA-bindenden Protein (RBP) DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) und der RNA-

Endonuklease Drosha, im Kern zur Vorläufer-miRNA (prä-miRNA) prozessiert. Die prä-let-7-miRNA wird durch Exportin-5 in das Cytoplasma exportiert, wo sie durch die Endonuklease Dicer zu einem miRNA-Duplex weiterverarbeitet wird. Anschließend wird der *guide strand* des reifen miRNA-Duplexes in die Argonaute (AGO)-Proteinfamilie geladen, um einen miRNA-induzierten Silencing-Komplex (miRISC) zu bilden, wobei der *passenger strand* degradiert wird. Ausgereifte let-7-miRNA bindet die 3'UTR von Lin-28, reprimiert deren Translation und fördert so die neuronale Differenzierung. Die Inhibition der Biogenese von let-7 durch Lin-28 wird an mehreren Ebenen reguliert: Einerseits blockiert Lin-28 durch Bindung der pri-miRNA die Prozessierung durch den Mikroprozessorkomplex um Drosha und DGCR8 (1). Außerdem inhibiert Lin-28 durch Bindung der prä-miRNA die Weiterverarbeitung durch Dicer (2) und rekrutiert die Uridyl-Transferasen TUT4/TUT7, was zu einer Oligo-Uridylierung und dem Abbau durch die Exoribonuklease Dis312 führt (3). Modifiziert nach (Mayr & Heinemann, 2013; O'Brien *et al.*, 2018).

Hinsichtlich der Auswirkung der Lactone auf die Expression der Mitglieder der let-7-Familie konnte nach vier Tagen durch Dhc keine, durch S-Curv lediglich let-7a und durch Gal let-7a und c signifikant reduziert werden. Durch Et-Oxa konnten zum gleichen Zeitpunkt alle Mitglieder der let-7-Familie bis auf uninduziertes Niveau oder sogar darunter in ihrer Expression inhibiert werden (Abbildung 22, B). Nach sieben Tagen konnten durch alle getesteten Lactone die Expressionen von fünf der sechs let-7-miRNAs signifikant reduziert werden (Abbildung 23, B). Lediglich die Expression der let-7e, welche allerdings generell infolge des neuralen Stimulus am schwächsten induziert wurde, konnte nicht signifikant reduziert werden. Hinsichtlich der Proteinexpression von Lin-28 deckt sich dieses Ergebnis vor allem in Bezug auf den Effekt durch Applikation von Et-Oxa. Nach vier Tagen zeigte sich dort eine um 37 % erhöhte Expression von Lin-28 gegenüber RA-stimulierten Zellen, welche auch nach sieben Tagen mit einer relativen Steigerung der Proteinexpression von 76 % konsistent erhalten blieb (Abbildung 19Abbildung 21). Da Et-Oxa wie beschrieben erheblichen Einfluss auf alle let-7-miRNA-Transkripte ausübte, lässt sich schlussfolgern, dass diese geringere Expression eine verringerte Inhibition der Translation des Lin-28-Transkripts bedingte. Ebenso kann aufgrund des Mechanismus der positiven Rückkopplung argumentiert werden, dass die durch alle Lactone, wenn auch nur im Falle von Gal und Et-Oxa signifikant, gesteigerte Proteinexpression von Lin-28 an Tag 4 eine reduzierte Ausreifung der let-7-Transkripte bedingt wurde. Insbesondere für Dhc, S-Curv und Gal könnte dies zutreffend sein, da die let-7-miRNA-Transkripte nach vier Tagen weniger stark gehemmt wurden als nach sieben Tagen. Dem würde jedoch die Wirkung von S-Curv auf Mitglieder der let-7-Familie in einem Arbeitsgruppen-internen inflammatorischen MM6-Zell-Modell widersprechen, welches eine Reduktion des let-7-Expressionmusters zur Folge hatte, wobei dies einerseits aufgrund der 70 %-ig höheren applizierten Konzentration, und andererseits durch variierende Wirkungen einer Substanz auf

zelluläre Vorgänge, abhängig von der genutzten Zelllinie, bedingt sein könnte (Baillif, Wichard, Méndez-Lucio, & Rouquié, 2020).

Die miR-124 und miR-9/9* sind in komplexe Regelkreise eingebunden, die ein neuronales Genexpressionsprogramm aktivieren (Coolen, Katz, & Bally-Cuif, 2013). Viele neuronale Gene werden in nicht-neuronalen Zellen aktiv durch ein konserviertes 23-bp-Repressorelement (RE1) unterdrückt, das mit einem Zink-Finger-Protein interagiert, das als RE1-Silencing-Transkriptionsfaktor (REST) bekannt ist (Conaco, Otto, Han, & Mandel, 2006). Der REST-Komplex hemmt als globaler Repressor die Expression neuronaler Gene in nichtneuronalen Zellen (Conaco *et al.*, 2006). REST und seine Co-Faktoren SCP1 (*small C-terminal domain phosphatase 1*) und Co-REST wirken in einem Chromatin-gebundenen Proteinkomplex, der Histon-Modifikatoren rekrutiert, um die Expression neuronaler Gene in neuronalen Stammzellen und Vorläuferzellen zu unterdrücken (Ballas & Mandel, 2005). Die miRNAs miR-9 und miR-124 werden im gesamten Nervensystem in hohen Konzentrationen exprimiert und ihre Expression unterliegt der Kontrolle durch den neurogenen Repressor REST und seinen Co-Faktoren SCP1 und Co-REST (Stappert *et al.*, 2015). In NSCs wird der transkriptionelle Repressor REST stark exprimiert und inhibiert die Expression der miRs-9 und -124, wohingegen während der Differenzierung Teile des REST-Komplexes durch miR-9 und miR-124 negativ post-translational beeinflusst werden (Shenoy & Blelloch, 2014). Während der neuronalen Differenzierung wird der Komplex abgebaut, wodurch die Expression neuronaler Gene ermöglicht wird. Die miRNAs miR-124 und miR-9/9* werden hochreguliert und verstärken ihre eigene Expression, indem sie sich gegen ihre negativen Regulatoren richten. So bildet miR-9 beispielsweise autoregulatorische Schleifen mit dem Notch-Effektor Hes-1 und dem let-7-Ziel TLX, und miR-9*, was sich vom 3'-Strang der miR-9-Gene ableitet, reguliert Co-REST (Stappert *et al.*, 2015). Die erhöhte Expression der miR-124 während der neuronalen Differenzierung hemmt infolge einer negativen Rückkopplung die Aktivität des Co-Faktors SCP1 (Viswanathan & Daley, 2010). Ebenso wird miR-124 von RA induziert, um die Expression von Pluripotenz-bezogenem Hes-1 während der neuronalen Differenzierung von P19-Zellen zu unterdrücken (Z. Xie *et al.*, 2010). Außerdem führt die forcierte Expression von miR-124 und miR-9/9* zu einem Wechsel der epigenetischen Regulatoren. Während des Übergangs neuraler Vorläuferzellen zu Neuronen kommt es auch zu einem Austausch von Untereinheiten innerhalb des *Switch/Sucrose non fermentable* (Swi/Snf) Chromatinumbaukomplexes. Die Untereinheit *BRG1- and BRM-associated factor 53a* (BAF53a) ist für die Proliferation von NPCs erforderlich, wird aber während der Differenzierung durch die neuronale BAF53b-Untereinheit ersetzt, welche die Expression Neuronenspezifischer Gene steuert (Ruggieri *et al.*, 2014). MiR-124 und miR-9* begünstigen den

Wechsel von BAF53a zu BAF53b im BAF-Chromatinumbaukomplex, was zur Induktion des dendritischen Wachstums führt (Stappert *et al.*, 2015). Einen ähnlichen Effekt übt miR-124 auf das mRNA-bindende und Splicing-regulierende Protein PTBP1 aus. MiR-124 ermöglicht die Expression des neuronal angereicherten Homologs PTBP2, was ein Neuronen-spezifisches prä-mRNA-Spleißmuster induziert (Stappert *et al.*, 2015).

Beide miRNAs konnten durch alle Lactone nach sieben Tagen, und durch Et-Oxa und Gal nach vier Tagen erheblich in ihrer Expression reduziert werden (Abbildung 22Abbildung 23). Die miRNAs zeigten zudem infolge der Applikation aller Lactone nach sieben Tagen ihre stärkste Herabregulation, im Falle von Dhc und Gal sogar unter ihr uninduziertes Niveau. Die Modulation, bzw. Inhibition der miRs-9 und -124 durch die Lactone könnte hinsichtlich anwendungsbezogener Transplantationen oder Expansionen von NSCs durch gesteigerte Proliferation und Verzögerung der terminalen neuronalen Differenzierung Potential aufweisen. Delaloy & Gao (2010) zeigten, dass durch einen Knockdown der miRNA-9 die NSCs einen migrierenden Phänotyp annahmen, und die Differenzierung in vollständig funktionsfähige Neuronen verzögert wurde, ähnlich der Wirkung des Antisense-Knockdowns der bereits erwähnten let-7b oder einer Überexpression der Kerntranskriptionsfaktors TLX. Bei Transplantation neuronaler Vorläuferzellen ohne miRNA-9-Aktivität in ein Apoplex-Mausmodell zeigten diese eine erhöhte Neigung in verletzte Bereiche zu wandern, was belegt, dass die Manipulation der miR-9 und ihrer Targets eine Verbesserung der klinischen Anwendung von NSCs in der Stammzelltherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen bedeuten könnte (Ruggieri *et al.*, 2014; W. Zhu *et al.*, 2008). Weiterhin zeigten humane Fibroblasten, die miR-9/9*-124 exprimierten, eine Verringerung der Proliferation, wiesen eine Neuronen-ähnliche Morphologie auf und exprimierten mit MAP2 einen Marker für post-mitotische Neuronen. Diese Konversion zu post-mitotischen Neuronen war zurückzuführen auf die Synergie zwischen miR-9/9* und miR-124, da die separate Expression der miRNAs keine erfolgreiche Umwandlung zur Folge hatte (Yoo *et al.*, 2011).

Neben der Familie der let-7-miRNAs weist auch die miR-125 eine aufgrund der neuralen Differenzierung angereicherte Expression auf, und ist aufgrund dessen in embryonalen Stammzellen und Embryokarzinomzellen induziert. Zusammen mit let-7-miRs reguliert die miR-125 die Bildung von Synapsen und dendritische Morphogenese (Shenoy & Blelloch, 2014). Eine weitere Gemeinsamkeit mit der let-7 Familie stellt außerdem die 3' UTR-abhängige Repression der Lin-28 Expression dar (Rybak *et al.*, 2008). Eine signifikante Hemmung der miR-125 konnte lediglich nach vier Tagen der neuralen Differenzierung durch 300 nM Et-Oxa erreicht werden. Bei der neuralen Differenzierung fördert miR-125 aktiv die Umwandlung

humaner pluripotenter Zellen in Sox-1-positive neuronale Vorläuferzellen und unterdrückt alternative Nicht-neurale Zellschicksale, was in Teilen mit einer Abreicherung des an der Pluripotenz beteiligten Co-Faktors SMAD4 in Verbindung gebracht wird (Boissart, Nissan, Giraud-Triboult, Peschanski, & Benchoua, 2012).

Die miR-128 ist eine der am häufigsten vorkommenden und am stärksten angereicherten miRNAs im adulten Gehirn von Maus und Mensch und konnte bereits durch Sempere *et al.* (2004) angereichert in P19-Zellen nach Induktion mit RA identifiziert werden. Die miR-128 steuert die motorische Aktivität, indem sie die Expression verschiedener Ionenkanäle und Signalbestandteile des ERK2-Netzwerks unterdrückt, welche für die Regulation der neuronalen Erregbarkeit zuständig sind (C. L. Tan *et al.*, 2013). Eine Verringerung der miR-128-Expression führte in post-natalen Neuronen zu erhöhter motorischer Aktivität und tödlicher Epilepsie, wohingegen die Überexpression die neuronale Erregbarkeit und motorische Aktivität reduziert. Therapeutisches Potential offenbart dies durch eine Milderung motorischer Anomalien bei Mäusen, die mit der Parkinson-Krankheit und Krampfanfällen einhergehen (Brennan & Henshall, 2020). Die miR-128 wurde von den untersuchten miRNAs durch RA am schwächsten induziert, wobei nach vier Tagen keine und nach sieben Tagen lediglich eine 2,7-fache Anreicherung gegenüber nicht RA-induzierten Zellen beobachtet werden konnte. Eine signifikante Hemmung konnte durch Et-Oxa nach vier Tagen und durch Gal nach sieben Tagen festgestellt werden, was in Zusammenhang stehen könnte mit einer vermehrten Expression von Lin-28 durch diese beiden Lactone (Abbildung 19Abbildung 21). Ebenso wie die Ausreifung der let-7-Transkripte, wird auch die Prozessierung der miR-128 durch Lin-28 mittels Konkurrenz mit der Endonuklease Dicer inhibiert (Breving & Esquela-Kerscher, 2010).

Zusammenfassend betrachtet hatte Et-Oxa den stärksten inhibierenden Effekt auf die Expression der untersuchten neuronal assoziierten miRNAs. Nach vier Tagen konnten alle miRNAs signifikant reduziert werden, mit Ausnahme von zwei sogar unter das uninduzierte Niveau, und nach sieben Tagen noch immer sieben der elf untersuchten miRNAs. Die Applikation von 5 μ M Gal resultierte in einer Inhibition von fünf miRNAs nach vier Tagen und acht miRNAs nach sieben Tagen der neuronalen Differenzierung. Gal übte außerdem als einzige Verbindung einen inhibierenden Effekt in RA-unbehandelten P19-Zellen auf das miR-145-Transkript aus, was korrelierend in einer gesteigerten Proteinexpression von Lin-28 nach sieben Tagen in ebenfalls RA-unbehandelten Zellen resultiert (Abbildung 20). Die weiteren Lactone Dhc und S-Curv bedingten hinsichtlich des miRNA-Expressionsmusters lediglich die Hemmung zweier miRNAs nach vier und sieben Tagen, wobei Dhc eine deutliche Repression der miR-9 und -124 bedingte, welche hinsichtlich der Expression von Oct-4 und Lin-28

aufgrund keiner spezifischen Wechselwirkung mit diesen *Stemness*-assoziierten Proteinen ohne signifikanten Einfluss blieb. Für S-Curv konnte auf Proteinebene eine Steigerung der Oct-4 Expression nachgewiesen werden, welche sich nach sieben Tagen nicht bestätigte. Diese *Stemness*-erhaltende Wirkung scheint weniger in Zusammenhang mit einer translationalen Regulation durch die analysierten miRNAs zu stehen, sondern resultiert eher als Folge der transkriptionellen Zunahme von Oct-4 und Nanog.

miRNAs sind an der gezielten Genexpression beteiligt und wirken als Schlüsselregulatoren bei verschiedenen neuroprotektiven Mechanismen und Veränderungen in miRNA-Expressionsmustern, assoziiert mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Huntington und ALS. Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch eine langsame Entwicklung mit einer langen asymptomatischen Phase aus, weswegen schwerwiegende Pathologien erst spät im Krankheitsverlauf diagnostiziert werden und miRNA-Expressionsprofile als diagnostische Biomarker dienen könnten (E. K. Tan *et al.*, 2020). Eine Modulation bestimmter miRNAs in ihrer Ausprägung und ihrem Expressionsprofil während des Krankheitsverlaufs könnte Sie als therapeutisches Ziel entgegen dem Fortschreiten neurodegenerativer Erkrankungen auszeichnen (Brennan & Henshall, 2020).

Die Bedeutung einer Modulation von miRNAs wurde bereits auch in Reprogrammierungsstrategien durch eine erfolgreiche, c-Myc-freie und nicht integrative Herstellung von iPSCs eines SMA-Patienten über einen episomalen iPSC-Reprogrammierungsvektor unterstrichen. Das Proto-Onkogen *c-myc* konnte hier durch den hsa-miR302-367-Cluster ersetzt werden (Zhou *et al.*, 2017).

4.4 Ausblick und Therapieansätze

Ein zukünftiger Ansatz könnte beispielsweise die Nutzung enterischer NSPCs aus Biopsien oder aus dem Appendix für die Transplantation bei neurodegenerativen Erkrankungen sein. Enterische NSPCs wurden bereits erfolgreich in einen Hirschsprung-erkrankten Darm transplantiert. Aus Biopsien oder der Appendix kann jedoch nur eine begrenzte Menge an NSPCs isoliert werden. Eine Inkubation mit den Lactonen *in vitro* könnte dann enterische NSPCs zu einer Expansion vor der autologen Transplantation anregen, indem, wie in 3.2.3 beschrieben, die Expression von Oct-4 und Lin-28 trotz neuronaler Induktion erhalten bleibt und die isolierten Zellen ihren Pluripotenzstatus somit aufrechterhalten können. Dies könnte die Menge des zu transplantierenden Materials erweitern. Darüber hinaus bleibt noch die Frage nach der Qualität der autologen Stammzellquelle, beziehungsweise der Beeinflussung dieser durch die neurologische Dysfunktion. Dies wäre der zweite Ansatzpunkt einer Kultivierung und Expansion der isolierten neuronalen Stammzellen. Neuroinflammatorische

Signale auf die intrinsische Stammzellpopulation könnten durch die antiinflammatorische Aktivität der Lactone abgeschwächt werden. Zum einen sollte der Grad der Beeinflussung durch die neurodegenerative Erkrankung betrachtet werden, sowie der Einfluss des antiinflammatorischen Potentials der Lactone auf die Stammzellnische untersucht werden. Somit könnte einerseits eine Verbesserung der Expansionsfähigkeit autolog isolierter Stammzellen erreicht und andererseits deren Qualität positiv beeinflusst werden (Schuster *et al.*, 2014).

Niedermolekulare Wirkstoffe, wie die untersuchten Lactone haben Vorteile, weil sie zelldurchlässig, nicht immunogen, kostengünstig, leicht synthetisierbar und standardisierbar sind. Außerdem sind ihre Auswirkungen auf die Hemmung und Aktivierung der Funktion bestimmter Proteine oft reversibel und können durch Variation der Konzentrationen fein abgestimmt werden. Die Identifizierung von Molekülkombinationen, die die Reprogrammierung von somatischen Zellen der Maus in Richtung pluripotenter Zellen vorantreiben konnte bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen erfolgreich belegt werden (Hou *et al.*, 2013; Y. Li *et al.*, 2011; K. Liu *et al.*, 2016). Der Einfluss auf die Expressionserhöhung der pluripotenten Marker Oct-4 und Lin-28, durch in erster Linie Et-Oxa, sollte durch weitere Untersuchungen hinsichtlich der Modulation der Signalwege, welche zur Expression *Stemness*-erhaltender Faktoren wie Oct-4 und Lin-28 beitragen, näher beleuchtet werden. Zukünftige Untersuchungen zu den beobachteten inhibitorischen Effekte durch die Lactone sollten außerdem beinhalten, inwieweit die Pluripotenz-fördernden Effekte auf der Inhibition der untersuchten miRNAs zurückzuführen sind, indem beispielsweise durch Vektorbasierte Überexpressionen der miRNAs Klarheit über den post-translationalen Einfluss der Lactone erlangt wird.

4.5 Einfluss pflanzlicher und pilzlicher Naturstoffe auf inflammatorische Prozesse zur Pathogenese von Asthma

4.5.1 TWEh-1

4.5.1.1 Einfluss von TWEh-1 auf Reporter-gen-Aktivitäten

Für TWEh-1 konnte im phänotypischen Screening auf verschiedenste inflammatorisch relevante Signalkaskaden bei BEAS-2B-Zellen eine Inhibition im nanomolaren Bereich festgestellt werden (vgl.: 3.4.4.1.). Dabei konnte weder eine Beeinträchtigung der Zellviabilität, noch apoptotische oder nekrotische Effekte nach Behandlung mit TWEh-1 festgestellt werden (vgl.: 3.4.4.2), und auch die Expression der Luciferase aus *Renilla reniformis*, unter der Kontrolle des humanen Elongationsfaktor 1 α Promotors als interne Kontrolle der

Reporterassays blieb weitestgehend unbeeinflusst. Eine mit Signifikanz bestätigte Wirkung zeigte die Behandlung mit TWEh-1 nur auf die Ausprägung EMT-relevanter Marker, welche im weiteren Verlauf noch näher bewertet wird (4.5.1.2).

Zur Untersuchung des Einflusses der Verbindung auf die Expression des Reportergens selbst wurde die SEAP anstelle der *Firefly*-Luciferase genutzt, um mittels der Vektoren pTK/SEAP(7xN4) und pGE3-NF1 die Expression der SEAP unter der Kontrolle der STAT6-, bzw. NF- κ B-Konsensussequenzen zu ermitteln, wobei TWEh-1 bei Konzentrationen bis 10 μ M keinen signifikant inhibierenden Einfluss auf die SEAP-Aktivität der Vektoren zeigte (Abbildung 47). Ein etwaiger Abbau der Verbindung TWEh-1 vor der Zellstimulation konnte durch den Ansatz einer einstündigen Vorbehandlung der Zellen äquivalent zur Analyse von mRNA- und Proteinexpressions-Analysen nicht bestätigt werden (Abbildung 48, B). Die Applikation von TWEh-1 nach der Zellyse und zehn Minuten vor Bestimmung der Luciferase-Aktivität hatte einen reduzierenden Einfluss auf die gemessene Luciferaseaktivität von 98 %, was auf einen inhibierenden Einfluss auf die Luciferasereaktion selbst hindeutet (Abbildung 48, C). Dies konnte in einem weiteren Experiment mittels Nutzung einer rekombinanten Luciferase aus *Photinus pyralis* bestätigt werden, wobei eine Applikation mit 1,25 μ M TWEh-1, was im Reporterassay einer Konzentration von 25 nM entsprach, in einer 85 %-igen Inhibition der Luciferasereaktion resultierte (Abbildung 49).

Das Reportersystem der *Firefly Luciferase* aus *Photinus pyralis* (FLuc) findet häufig Verwendung in der Molekularbiologie und in Hochdurchsatz-Screenings zur Untersuchung der biologischen Aktivität und Toxizität von Verbindungen (Auld & Inglese, 2018). Das FLuc-Enzym katalysiert die Oxidation von Luciferin (D-LH2) zur Erzeugung von Oxyluciferin und Licht durch die intermediäre Bildung eines LH2-adenylierten Addukts aus ATP. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass mehrere Klassen von Verbindungen als Inhibitoren dieser enzymatischen Reaktion wirken (Auld & Inglese, 2018; Thorne, Inglese, & Auld, 2010; Thorne *et al.*, 2012). In einem titrationsbasierten Screening der PubChem-Bibliothek gegen FLuc wurden über 360 000 IC₅₀-Werte anhand eines FLuc-Enzymtests unter Verwendung von KM-Werten (Michaelis-Menten-Konstante) von D-Luciferin und ATP ermittelt. Bei 12 % dieser Bibliothek wurde eine FLuc-hemmende Aktivität mit erkennbarer Struktur-Wirkungsbeziehung festgestellt, wobei viele auch eine einstellige nanomolare Potenz erreichten (Thorne *et al.*, 2012). Gemeinsame Chemotypen beinhalteten Benzothiazole, Benzoxazole, Benzimidazole, Oxadiazole, Hydrazine und Benzoesäuren. Zu den häufigsten Ringstrukturen, die in FLuc-Hemmern gefunden wurden, zählten fünfgliedrige Ringe wie sie von Thiazol, Imidazol, Thiophen, Pyrazol, Pyrrol, aber auch durch Furan aufgewiesen werden. Insbesondere Furan

ist hierbei als unter FLuc-Inhibitoren verbreitete Ringstruktur interessant, da TWEh-1 eine O-glykosidisch verknüpfte Furanose beinhaltet.

Der *mode of action* der Inhibition von Luciferase-Inhibitoren kann ein kompetitiver Effekt mit dem Substrat Luciferin (D-LH2) darstellen wie z. B. durch Benzothiazole, während andere, ebenfalls diesem Chemotyp zugehörig, mit D-LH2 nicht kompetitiv sind (Thorne *et al.*, 2012). Obwohl zahlreiche Verbindungen keine offensichtliche strukturelle Ähnlichkeit mit dem D-LH2-Substrat aufweisen, können diese dennoch an die Luciferin-Bindungstasche innerhalb des aktiven Zentrums von FLuc binden (Auld *et al.*, 2008). Paradoxerweise erhöhen auch viele FLuc-Inhibitoren in FLuc-basierten Repotergen-Assays die Halbwertszeit des ektopisch exprimierten FLuc-Enzyms, was auf eine Liganden-basierte Stabilisierung des Enzyms in Zellen zurückzuführen ist, die zu einem Anstieg der Luciferase-Aktivität führt (Auld & Inglese, 2018). FLuc-Inhibitoren wirken darüber hinaus durch eine Reihe von *mode of inhibitions*, bei denen Chemotypen sowohl mit D-LH2 als auch mit ATP, oder nur mit ATP konkurrieren, wie beispielsweise Hydrazine oder Chinolin-Strukturen. Auch durch nicht-kompetitive Mechanismen (z. B. Resveratrol) oder durch die Bildung von Multisubstrat-Addukt-Inhibitoren, bei der das Enzym die Bildung seines eigenen Inhibitors katalysiert, entfalten FLuc-Inhibitoren ihre Wirkung (Thorne *et al.*, 2010). Um die Art der Hemmung festzustellen, sollte in weiterführenden Untersuchungen der Einfluss der Verbindung TWEh-1 auf das Reportersystem bei verschiedenen ATP- und Luciferin-Substratkonzentrationen gemessen werden. Luciferin-Antagonisten zeigen bei Erhöhung der Luciferin-Konzentration eine Aufhebung ihrer Inhibition, während eine Erhöhung der ATP-Konzentration eher auf eine kompetitive Wirkung mit ATP schließen lässt (Auld *et al.*, 2008).

Bestimmte FLuc-Inhibitoren sind auch als Proteinkinase-Inhibitoren (PKIs) zu finden und Verbindungen, die über eine Interaktion mit der ATP-Bindungsstelle hemmen, bilden die häufigste Art von PKIs (Kenda *et al.*, 2021). Aus einer Bibliothek von 367 PKIs wurden zehn Verbindungen als aktiv ($IC_{50} < 1 \mu M$) gegen FLuc identifiziert. FLuc-Inhibitoren beinhalten auch Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie VEGFR-2- und GSK β -Inhibitoren. Dies unterstreicht die Notwendigkeit orthogonaler Assays, um die relevante *On-Target*-Aktivität von der hemmenden Aktivität von FLuc zu unterscheiden (Auld & Inglese, 2018). Diese Assays zielen darauf ab, die exakte Biologie des primären Assays nachzubilden, unterscheiden sich jedoch dadurch, dass eine einzelne Komponente geändert wird, z. B. die Nachweismethode, die von der Zielbiologie unabhängig sein sollte (Auld & Inglese, 2018). Ein weiterer Ansatz die Aktivität phänotypischer Screenings zu bestätigen, bilden sekundäre Assays wie beispielsweise Western-Analysen, welche allerdings naturgemäß oft einen geringen Durchsatz haben.

4.5.1.1.1 TWEh-1 und strukturell verwandte Anthrachinone

Für Struktur-ähnliche Anthrachinon-Derivate von TWEh-1 konnten bereits mehrfach antiinflammatorische Wirkungen beschrieben werden. Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone), ein Anthrachinon-Derivat, wurde aus verschiedenen Pilzen und Pflanzen isoliert, bspw. aus dem Rhizom von *Rheum palmatum*. Es bildet ein Aglycon von TWEh-1 mit einer Hydroxylgruppe in der C3-Stellung und einem Methylsubstituenten an C5 (Yim, Lee, Lee, & Lee, 1999). Emodin hemmte die TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung, den I κ B-Abbau, die nukleare Translokation von p65 sowie die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B (Aggarwal & Shishodia, 2006; Folmer, Jaspars, Dicato, & Diederich, 2008; Lu *et al.*, 2013). Des Weiteren unterdrückte Emodin die Invasivität humaner Krebszellen durch Herunterregulation der MMP-9-Expression infolge einer Hemmung der AP1- und NF- κ B-Signalwege, sowie dosisabhängig die Phosphorylierungen verschiedener MAPKs, wie ERK1/2, p38, SAPK und JNK (Q. Huang, Shen, & Ong, 2004; Lu *et al.*, 2013). Das strukturell ebenfalls am C6-Atom O-glykosidisch verknüpfte Anthrachinon-Derivat Emodin-6-O- β -D-Glycosid hemmte die Freisetzung von HMGB1, die Produktion TNF- α und die Aktivierung von NF- κ B in menschlichen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVECs) (W. Lee, Ku, Kim, & Bae, 2013). Chrysophanol inhibierte die Expressionsrate von TNF- α , IL-6 und COX-2 durch Suppression der Degradation von I κ B- α und somit einer verminderten Aktivierung von NF- κ B (S.-J. Kim *et al.*, 2010). Diese Studien belegen antiinflammatorische Wirkungen TWEh-1-strukturnaher Verbindungen, wenngleich der Konzentrationsbereich der Aktivität mit 5-40 μ M weit oberhalb der hier durchgeführten Experimente mit TWEh-1 lag. Auch bei dem in dieser Arbeit aus *R. cordifolia* isolierte TWRc-2, welches als Rubiadin identifiziert wurde, handelt es sich um ein Anthrachinon, dessen inflammatorische Wirkung im noch höher angesiedelten mikromolaren Bereich liegt. Eine Erhöhung der zu testenden Konzentration von TWEh-1 wäre somit für die Zukunft ein entsprechender Ansatz, wobei die Ausbeute, die lange Fermentationsdauer und die schwierige Reindarstellung dies innerhalb dieser Arbeit nicht ermöglichten (vgl.: 3.4).

Auch Arbeitsgruppen-intern wurden weitere, zu TWEh-1 strukturell ähnliche Anthrachinone wie Emodin, Emodin-8-O- β -D-Glycosid und Chrysophanol, untersucht. Jedoch konnten hierbei durch B. Stier im Rahmen ihrer Bachelorarbeit bei diesen Verbindungen bis zum Konzentrationsbereich von 620 nM keine Hemmungen der STAT6- und NF- κ B-abhängigen Signaltransduktionen in Luciferaseabhängigen Reportergensystemen nachgewiesen werden.

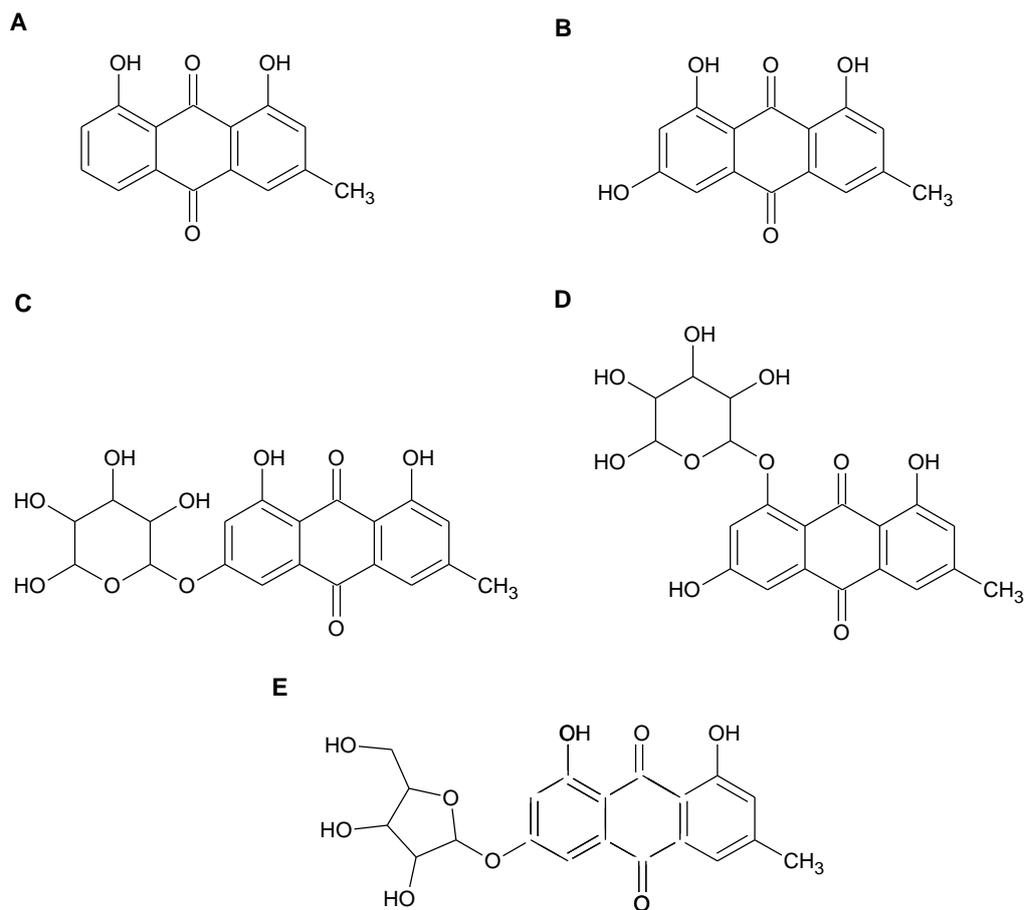


Abbildung 63: Strukturen TWEh-1-ähnlicher Anthrachinone. A: Chrysophanol; B: Emodin; C: Emodin-6-O-β-D-Glycosid; D: Emodin-8-O-β-D-Glycosid; E: TWEh-1.

Emodin inhibiert die Casein Kinase II (CK2) durch kompetitive Hemmung an der ATP-Bindestelle. CK2 kann Akt aktivieren, indem es Ser129 phosphoryliert, das sich in der Linker-Region zwischen der N-terminalen Pleckstrin-Homologie-Domäne und der katalytischen Domäne befindet (Freudlsperger *et al.*, 2011). Der zugrunde liegende Hemmmechanismus von Emodin ist auf seine Fähigkeit zurückzuführen, an die ATP-Bindungsstelle der Kinase zu binden, da Emodin auch andere Ser/Thr-Kinasen hemmen kann. Die Ergebnisse deuten eindeutig darauf hin, dass Emodin die CK2-Aktivität hemmt, indem es mit ATP um die Bindung an die katalytische Stelle konkurriert (Yim *et al.*, 1999). Anthrachinone wurden auch für die Reinigung von Proteinen durch Affinitätstechniken verwendet, die ihre Nukleotid-spezifische Ligandenfähigkeit nutzen, wodurch sie mit ATP-, ADP- und NAD-Bindungsstellen von Enzymen wie Dehydrogenasen, Kinasen und ATPasen interagieren. (De Moliner *et al.*, 2003)

In diesem Zusammenhang ist auch wichtig zu erwähnen, dass Emodin die CK2-Aktivität stärker hemmt als andere untersuchte Anthrachinon-Derivate wie Aloe-Emodin, Rhein und

1,8-Dihydroxyanthracendion. Die Struktur- und Funktionsbeziehung dieser Derivate deutet darauf hin, dass eine sperrige Gruppe an R1 für die hemmende Aktivität erforderlich zu sein scheint, da diese in 1,8-Dihydroxyanthracendion, welches nur eine minimale hemmende Aktivität aufweist, durch Wasserstoff ersetzt ist (Yim *et al.*, 1999). TWEh-1 besitzt mit der Furanose eine eben solche sperrige Gruppe (Yim *et al.*, 1999). Man könnte davon ausgehen, dass Emodin auch eventuell kompetitiv die ATP-Bindestelle von D-Luciferin inhibiert, und so auch einen inhibierenden Einfluss auf die Luciferase-Aktivität wie TWEh-1 ausübt. Dies kann jedoch durch die Versuchsanordnung zur Überprüfung zur CK2-Aktivität weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Aktivität der CK2 wurde mit einem Casein-Kinase-Assay-Kit (Sigma-Aldrich Co.) in Kombination mit dem PKLight HTS-Proteinkinase-Assay-Kit (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, MA, USA) bestimmt. Das Casein-Kinase-II-Substrat α -Casein wird dabei mit einem ATP-haltigen Reaktionspuffer inkubiert und die die Luciferase-Biolumineszenz aus der Reaktion mit dem verbleibenden ATP gemessen. Das Biolumineszenz-Signal dabei ist umgekehrt proportional zur Aktivität der Kinase, d. h. ein höherer Wert deutet auf eine größere Menge an verbleibendem ATP und eine geringere Aktivität der CK2 hin (K.-Y. Lin & Uen, 2010). Dies spricht für eine Luciferase-Reaktion, welche nicht durch Emodin beeinträchtigt wird.

Ein Einfluss auf die Lumineszenz der rekombinanten Luciferase wie bei TWEh-1 von Emodin, Emodin-8-O- β -D-Glycosid und Chrysophanol konnte im Rahmen dieser Arbeit bis zu einer Konzentration von 50 μ M ebenfalls nicht beobachtet werden, was auf die Furanose als aktives Zentrum der Luciferase-Inhibition schließen lässt.

4.5.1.2 Einfluss von TWEh-1 auf die EMT

Wenngleich die Hemmung von TWEh-1 im phänotypischen Screening auf die durch TGF- β induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion in großen Teilen wohl auf der beschriebenen Inhibition des Reportersystems beruht, können Wirkungen der Verbindung auf TGF- β -abhängige Genexpressionen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. In Abschnitt 3.4.4.4 wurde der Einfluss von TWEh-1 auf Marker des physiologischen Prozesses der Epithelial-mesenchymalen Transition, welche unter dem maßgeblichen Einfluss von TGF- β Epithelzellen hin zu einem invasiven fibroblastischen Phänotyp verändern, untersucht. Im Rahmen einer chronischen TGF- β -Stimulation durch Eosinophile und andere Leukozyten, durchlaufen Epithelzellen eine dramatische zelluläre Umwandlung hin zu einem mesenchymalen Phänotyp, welche als EMT bezeichnet wird (Naber, Drabsch, Snaar-Jagalska, ten Dijke, & van Laar, 2013). Diese führt zum Verlust der Barrierefunktion der Schleimhaut, zum Erwerb

mesenchymaler Eigenschaften und erhöhter Motilität sowie zur Sekretion fibrotischer Proteine, die für den *Remodeling*-Phänotyp charakteristisch sind (Ijaz *et al.*, 2014).

Die TGF- β -induzierte EMT wird durch die Anwesenheit des proinflammatorischen Zytokins TNF- α verstärkt (Doerner & Zuraw, 2009). TNF- α aktiviert Schlüsselkomponenten des nicht-kanonischen TGF- β -Signalweges wie die nachgeschaltete Ras-GTPase, sowie die MAPKs p38 und JNK. Darüber hinaus steuert TNF- α mit NF- κ B einen Hauptregulator der Atemwegsentzündung und wichtigen Faktor des zentralen EMT-Programms (Ijaz *et al.*, 2014). In Studien zur krebsassoziierten (Typ III) EMT ist NF- κ B für die durch Wachstumsfaktoren induzierte Snail-Expression erforderlich, indem es durch direkte Bindung des Promotors die Expression des *snail*-Gens induziert (H.-J. Kim *et al.*, 2007). In ähnlicher Weise wird die durch TNF- α induzierte Expression von Twist1 durch NF- κ B vermittelt (C. W. Li *et al.*, 2012).

Die Co-Stimulation mit TNF- α zusätzlich zu TGF- β hatte nur teilweise EMT-fördernden Effekt. Auf mRNA-Ebene konnte zu allen Zeitpunkten (7, 12 und 24 h) eine stärkere Abnahme des epithelialen Markers E-Cadherin (mRNA) bei gleichzeitig stärkerer Zunahme von N-Cadherin beobachtet werden (Abbildung 44). Auf Proteinebene wurde lediglich N-Cadherin nach 24 h durch Co-Induktion mit TNF- α hochreguliert, was sich nach 48 h nicht bestätigte (Abbildung 45). Die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und Twist hingegen wiesen eine höhere Expression infolge der Mono-Induktion mit TGF- β auf. Eine massive Steigerung durch Co-Stimulation konnte lediglich bei der Expression der *mmp-9*-mRNA über alle Inkubationszeiträume hinweg beobachtet werden. Durch Schwingshackl *et al.* (1999) konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von TNF- α zu Eosinophilen, kultiviert von Patienten mit atopischem Asthma, einen 95 %-igen Anstieg der MMP-9-Aktivität bedingte. Im Zuge der EMT kommt es auch zu einer verstärkten Expression von Proteasen wie den Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP2 und MMP9), die den Abbau von Proteinen der ECM verstärken und die Invasion ermöglichen. MMPs greifen zusätzlich einige Transmembranproteine an, was beispielsweise zur Freisetzung der extrazellulären Domäne von E-Cadherin führt und damit zum Verlust von *adherens junctions* beiträgt. Der induktive Einfluss von TNF- α zusätzlich zu TGF- β kann jedoch nicht immer in gleichem Maße durch *in-vitro*-Experimente nachgewiesen werden. Beispielsweise zeigten BEAS-2B-Zellen, die 48 Stunden lang mit TGF- β behandelt wurden, eine verringerte Expression der E-Cadherin-mRNA, welche Co-stimuliert mit TNF- α jedoch nicht weiter reduziert wurde, was im Gegensatz zur Untersuchung aus Abbildung 44 steht, wo auch eine gleichzeitig gesteigerte transkriptionelle Aktivität von N-Cadherin beobachtet werden konnte (Kamitani *et al.*, 2011). Die mRNA-Expression von Vimentin zeigte in der Studie von Kamitani *et al.* (2011) einen nicht signifikanten Anstieg der Expression der Vimentin-

mRNA durch TGF- β , welche durch die Co-Stimulation verstärkt wurde, was auch die Versuchsreihe aus Abbildung 44 zeigt.

Der Einfluss von TWEh-1 auf die mRNA-Expression der Cadherine fällt hinsichtlich der drei untersuchten Zeitpunkte nicht kohärent aus. In Bezug auf die Co-stimulierte Expression der N-Cadherin-mRNA zeigte sich nach 7 und 24 h eine Abnahme infolge der Applikation von 1 μ M TWEh-1, welche auch auf Proteinebene nach 24 h mit einer Abnahme der Proteinmenge um 46 % verbunden war, jeweils nach 48-stündigem Inkubationszeitraum jedoch nicht bestätigt werden konnte. Jedoch zeigte TWEh-1 einen hemmenden Einfluss auf die Co-stimulierte transkriptionelle Aktivität von Snail und Twist nach 7 und 24 Stunden. Dies konnte durch die ebenso stimulierte und im Bereich von 50-70 % inhibierte Proteinexpression dieser beiden Transkriptionsfaktoren bestätigt werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass TWEh-1 in erster Linie einen inhibierenden Einfluss auf die durch TNF- α Co-stimulierten Expressionen der EMT-Marker ausübt, was im Falle von N-Cadherin und der beiden Transkriptionsfaktoren Snail und Twist auch auf Proteinebene verifiziert werden konnte. Dies lässt vermuten, dass der inhibierende Effekt von TWEh-1 weniger auf TGF- β -induzierte Ausprägung der Marker zurückzuführen ist als vielmehr auf die TNF- α -abhängige Induktion der EMT-Faktoren. Tatsächlich ist die Expression der Transkriptionsfaktoren Snail und Twist neben TGF- β auch von einem Stimulus mit TNF- α abhängig. Die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug sind Zinkfingerproteine der Snail-Familie und binden Elemente vom Typ E2-Box (CAGGTG/CACCTG) ihrer Zielgene. Indem sie an E-Boxen im *e-cadherin*-Promotor binden, sind in der Lage, die E-Cadherin-Expression herunter zu regulieren (Naber *et al.*, 2013). Im kanonischen Weg wird die Snail-Expression durch die TGF- β -Stimulation über SMAD3/4 hochreguliert. Der Snail-SMAD3/4-Komplex bindet dann an die regulatorischen Promotorregionen von *e-cadherin*, was zu dessen Unterdrückung führt (Ijaz *et al.*, 2014). Die Herabregulierung von E-Cadherin ist ein Kennzeichen der EMT, um die Destabilisierung der *adherens junctions* zu verstärken (C. W. Li *et al.*, 2012). Studien zur Untersuchung des EMT Typs III in Tumorzellen konnten nachweisen, dass NF- κ B den humanen *snail*-Promotor bindet und seine Aktivität erhöht (Barbera *et al.*, 2004). Erhöhte Snail-Spiegel konnten durch die Blockierung von NF- κ B teilweise erniedrigt werden (H.-J. Kim *et al.*, 2007). Wie bei Snail wird durch die Twist-Expression die epitheliale Genexpression herunterreguliert und die mesenchymale Genexpression aktiviert. In Tumorzellen unterdrückt Twist die Expression von E-Cadherin und induziert die Expression von N-Cadherin unabhängig von Snail (Lamouille *et al.*, 2014). Ähnlich wie im Falle von Snail beinhaltet der *twist1*-Promotor eine funktionelle NF- κ B-Bindungsstelle, und eine Überexpression von p65

konnte die transkriptionelle Hochregulierung von Twist1 zusammen mit EMT in Brustepithelzellen induzieren, was auf eine Beteiligung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs hindeutet (C. W. Li *et al.*, 2012). Die mRNA- und Proteinexpression war dabei abhängig von einer Induktion mit TNF- α . Der transkriptionelle Repressor Twist wird von den MAPKs p38, JNK und ERK phosphoryliert, was es vor dem Ubiquitin-vermittelten Abbau schützt und somit seinen Kernimport und seine Funktionen fördert (Lamouille *et al.*, 2014). TNF- α , wie auch TGF- β im nicht-kanonischen Signalweg, aktivieren diese MAPKs und unterstützen so die Stabilität von Twist (Ijaz *et al.*, 2014).

Die Transkriptionsfaktoren weisen unterschiedliche Expressionsprofile auf, kontrollieren häufig die Expression anderer Faktoren und kooperieren funktionell bei Zielgenen, und ihr Beitrag zur EMT hängt stark von dem jeweiligen Zell- oder Gewebetyp ab (Lamouille *et al.*, 2014). Auch die Tatsache, dass an der EMT neben dem TGF- β -induzierten kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg mehrere andere Signalwege wie Notch, Wnt/ β -Catenin und Wachstumsfaktor-induzierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalwege beteiligt sind, unterstreicht die Heterogenität und Variabilität in der Ausprägung der EMT (Das *et al.*, 2019). Das derzeitige Verständnis des Zusammenspiels dieser Signalwege und der Zusammenstellung der wichtigsten Transkriptionsfaktoren muss noch weiter erforscht werden. Der Umfang der strukturellen Veränderungen der Atemwege bei Asthmatikern im Zuge der EMT korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung, einer verminderten Lungenfunktion und der Refraktärität gegenüber einer Kortikosteroidtherapie, was die Bedeutung alternativer Behandlungsoptionen unterstreicht (Kamitani *et al.*, 2011). Ob TWEh-1 hierbei als Leitstruktur dienen kann, darf, obgleich des Einflusses auf die charakteristischen EMT-Marker Snail, Twist und N-Cadherin, aufgrund der nicht einheitlichen Ergebnisse bezweifelt werden. Insbesondere die Tatsache, dass die Verbindung keinen Einfluss auf die Expression der SEAP unter der Kontrolle eines Oligomers der NF- κ B-Konsensussequenz hat, lässt Zweifel an der Wirksamkeit in Bezug auf diese Signalkaskade (vgl. Abbildung 47). Dennoch zeigen Ergebnisse von Emodin, dem Aglykon von TWEh-1 bei der Untersuchung des EMT Typs III in Plattenepithelkarzinomzellen eine Hemmung der Twist- Expression und Hochregulierung der mRNA- und Proteinexpression von E-Cadherin durch Inhibition der Bindung von Twist an den *e-cadherin*-Promotor. Die Twist-induzierte EMT wurde dabei durch Hemmung der β -Catenin- und Akt-Signalwege gehemmt (Way *et al.*, 2014). Die enge strukturelle Verwandtschaft von TWEh-1 und Emodin, verbunden mit den eben genannten Ergebnissen, lässt die Wirksamkeit von TWEh-1 in Bezug auf die EMT wieder glaubwürdiger erscheinen, wenngleich weitere Untersuchungen zur Verifizierung von Nöten sind.

4.5.2 Antiinflammatorische Eigenschaften von *R. cordifolia*

R. cordifolia ist reich an mehr als 100 Verbindungen, darunter hauptsächlich Anthrachinone, Naphthochinone, Anthrachinonglykoside, Naphthochinonglykoside, bicyclische Hexapeptide, Triterpenoide und Polysaccharide (Natarajan *et al.*, 2019; Rao, Rao, Pushpangadan, & Shirwaikar, 2006). Eine Reihe von Untersuchungen hat ergeben, dass *R. cordifolia* zahlreiche pharmakologische Wirkungen hat, darunter entzündungshemmende, tumorhemmende, antioxidative, antibakterielle, thrombozytenaggregationshemmende, nephrotoxizitätshemmende, urolithiasishemmende, hepatoprotektive und neuroprotektive Wirkungen (Divakar, Pawar, Chandrasekhar, Dighe, & Divakar, 2010; Do, Hwang, Kim, Na, & Jeong, 2013; Gong *et al.*, 2017; Joy, Nair, & others, 2008; Luo *et al.*, 2022; Rawal, Muddeshwar, & Biswas, 2004). Die entzündungshemmende Wirkung von *R. cordifolia* wurde bereits 1983 an Carrageen-induzierten Pfoten-Ödemen der Ratte untersucht. Die wässrigen Extrakte der Pflanze zeigten eine signifikante entzündungshemmende Wirkung bei einer Dosis von 10 und 20 ml/kg. Die Aktivität war vergleichbar mit der des nichtsteroidalem Antirheumatikums Phenylbutazon (100 mg/kg) (S. S. Antarkar, Chinwalla, Bhatt, & others, 1983). Patel *et al.* (2010) untersuchten ebenfalls die analgetische und entzündungshemmende Wirkung des methanolischen Extrakts aus der Wurzel von *Rubia cordifolia* bei Ratten. *Rubia cordifolia* Extrakte (100-300 mg/kg, *per os* (p.o.)) wurden auf ihre entzündungshemmende Aktivität durch Carrageen-induzierte Pfoten-Ödeme und auf ihre analgetische Aktivität mittels des Tail-Flick-Tests untersucht. *R. cordifolia* (100-300 mg/kg, p.o.) zeigte eine signifikante Verringerung des durch Carrageen verursachten Pfoten-Ödems und eine signifikante Verlängerung der Reaktionszeit im Tail-Flick-Test, wenngleich die antiinflammatorische und analgetische Wirkung nicht an die Vergleichsmedikation mit Diclofenac-Natriumsalz heranreichte. In einem Indomethacin-induzierten Enterocolitis-Rattenmodell konnte nach der Behandlung mit dem hydroalkoholischen Wurzelextrakt von *R. cordifolia* (300 mg/kg und 600 mg/kg Körpergewicht) an elf aufeinanderfolgenden Tagen eine geringere Intensität der Läsionen und der Entzündungsreaktion sowohl im Ileum- als auch im Dickdarmgewebe beobachtet werden, was bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen von Nutzen sein könnte (Pawar, Anap, Ghodasara, & Kuchekar, 2011). Jedoch konnte in der Studie weder die antiinflammatorische Wirkung spezifischen Verbindungen des Extraktes zugeordnet werden, noch der *mode of action* geklärt werden und auch eine Kontrollgruppe fehlte bei der Studie, weshalb diesbezüglich weitere Forschungen von Nöten sind. In einer weiteren Studie untersuchten Gong *et al.* (2017) die entzündungshemmende Wirkung des wässrigen Extraktes der oberirdischen Pflanzenteile von *R. cordifolia* anhand eines Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-induzierten Dickdarmentzündungsmodells bei Ratten. Die orale Behandlung mit dem

Extrakt oder dem Positivmedikament Dexamethason (0,3 mg/kg Körpergewicht) verringerte die makroskopische Schadensfläche und reduzierte den Gehalt an Malondialdehyd (MDA) und die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β im Dickdarmgewebe im Vergleich zur Modellratte. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Extrakte aus *R. cordifolia* und ein Teil seiner Verbindungen in verschiedenen Modellen eine entzündungshemmende Wirkung haben, wobei der Mechanismus zur Regulierung von Entzündungen noch unklar ist. Weitere Forschungsarbeiten und klinische Studien sind in Zukunft erforderlich, um einerseits die potentielle antiinflammatorische Wirkung einzelnen Verbindungen zuzuordnen, wie auch deren entzündungshemmende Wirkung und den Wirkmechanismus zu erörtern.

4.5.2.1 Wirkung der *R. cordifolia*-Isolate auf proinflammatorische und pro-fibrotische Signalwege

Die Aufreinigung der *R. cordifolia*-Isolate wurde hinsichtlich eines inhibierenden Einflusses auf die durch TGF- β induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion durchgeführt. Diese Signaltransduktion spielt bei verschiedenen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Angiogenese eine Rolle, und spielt im Kontext einer asthmatischen Erkrankung eine entscheidende Rolle in der Ausprägung pathophysiologischer Veränderungen infolge von strukturellen Veränderungen des Atemgewebes, die unter dem Begriff *airway remodeling* zusammengefasst werden (B. C. Willis & Borok, 2007).

Diese strukturellen Veränderungen infolge einer persistierenden Inflammation beinhalten unter anderem einen Verlust der epithelialen Integrität in deren Folge es zu einer Verdickung der Basalmembran und Ausprägung einer subepithelialen Fibrose kommt (Halwani *et al.*, 2011). Der physiologische Prozess, der Epithelzellen hin zu einem invasiven fibroblastischen Phänotyp verändert, wird als EMT bezeichnet, dessen maßgebliche Induktion durch das pro-fibrotische Zytokin TGF- β initiiert wird (Doerner & Zuraw, 2009). Die durch TGF- β induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion in BEAS-2B-Zellen wurde durch TWRC-1 mit einer IC₅₀ von 82 μ M (\pm 3,01 μ M) gehemmt. Für TWRC-2 konnte eine stärkere Inhibition von SMAD2/3 mit einer IC₅₀ von 62 μ M (\pm 6,53 μ M) festgestellt werden (Abbildung 27).

Die Entstehung und Ausprägung des inflammatorischen Milieus von allergischem Asthma ist eng assoziiert mit der Reifung naiver CD4-T-Zellen zu T-Helfer-Typ-2 Lymphozyten und deren TH2-spezifischer Zytokin-Sekretion (Krishnamurthy & Kaplan, 2016). Asthmatische Patienten weisen eine erhöhte Anzahl TH2-polarisierter T-Zellen auf, welche durch Sekretion der STAT6-abhängigen proinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 die IgE-Produktion von B-Zellen auslösen, und so an der Entstehung der allergischen Entzündungsreaktion von

atopischem Asthma entscheidend beteiligt sind (P. J. Barnes, 2011). In Bezug auf die durch IL-4 induzierte STAT6-Signaltransduktion konnte für TWRc-2 mit einer IC_{50} von $63 \mu\text{M}$ ($\pm 5,54 \mu\text{M}$) eine nahezu identische Inhibition dieses Signalweges wie auch bei der TGF- β abhängigen SMAD2/3-Signalkaskade festgestellt werden. Eine Behandlung mit TWRc-1 erwies sich hingegen mit einer IC_{50} von $126 \mu\text{M}$ ($\pm 5,31 \mu\text{M}$) auf das STAT6-Reportergen als weniger potent (Abbildung 28). Neben der STAT6-vermittelten Signaltransduktion wurde ebenso der Effekt beider *R. cordifolia*-Isolate auf die TNF- α induzierte NF- κ B-Signaltransduktion untersucht, welche im Zusammenhang mit Asthma die Expression einer Vielzahl proinflammatorischer Gene induziert (Peter J. Barnes & Adcock, 1997; Halwani *et al.*, 2011). Während durch TWRc-2 dieser Signalweg nahezu unbeeinflusst blieb, lediglich die Höchstkonzentration von $157,3 \mu\text{M}$ bedingte eine Inhibition von 16 %, zeigte TWRc-1 eine inhibitorische Aktivität im Rahmen der des STAT6-Signalweges mit einer IC_{50} von $128 \mu\text{M}$ ($\pm 3,23 \mu\text{M}$) (Abbildung 29, A). Zu den Genen, die einer direkten Regulation durch NF- κ B unterliegen, zählt auch das Chemokin CXCL-10 (IP-10). In der Bronchiallavage asthmatischer Patienten konnte dieses vermehrt nachgewiesen werden (Miotto *et al.*, 2001; Ordonez *et al.*, 2000). Die Promotoraktivität von *ip-10* wurde ebenfalls im Reportersystem unter dem Einfluss der *R. cordifolia*-Isolate untersucht. TWRc-1 inhibierte die *ip-10*-Promotoraktivität (Abbildung 29, B) mit einer IC_{50} von $88 \mu\text{M}$ ($\pm 2,69 \mu\text{M}$). Für TWRc-2 konnte eine Reduktion der Reporterogenaktivität des *ip-10*-Promotors mit einer IC_{50} von $94 \mu\text{M}$ ($\pm 3,79 \mu\text{M}$) ermittelt werden (Abbildung 29, B). Untersuchungen hinsichtlich einer etwaigen cytotoxischen, anti-apoptotischen oder Zellzyklus-beeinflussenden Wirkung konnten für TWRc-1 und TWRc-2 nicht festgestellt werden (Abbildung 30 Abbildung 33).

4.5.2.2 Wirkung von TWRc-1 und TWRc-2 auf die Transkription und Expression von Entzündungsmediatoren

Aufgrund der Betrachtung der inhibitorischen Wirkung beider *R. cordifolia*-Isolate auf die *ip10*-Promotoraktivität, wurde nachfolgend der Einfluss auf die Transkription von *cxcl-10* sowie weiterer Mediatoren der Inflammation unter dem gleichen Stimulus der Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β untersucht. Infektionen mit Atemwegsviren (z. B. Rhinovirus, Respiratorisches Synzytial-Virus (RSV) und Influenza) und typischen (z. B. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) sowie atypischen (z. B. *Chlamydia pneumoniae* und *Mycoplasma pneumoniae*) Bakterien fördern die Entstehung und Pathogenese chronischer Atemwegserkrankungen wie Asthma und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung. Die frühe Immunreaktion hierbei wird hauptsächlich durch die Zytokine IL-1 und TNF- α vermittelt. IL-1 β und TNF- α können innerhalb von Stunden nach einer Infektion in der epithelialen Umgebung nachgewiesen werden (Hallstrand *et al.*, 2014). IL-1 β und TNF- α induzieren dabei die

Expression von Chemokinen in Epithelzellen. TNF- α stimuliert die Expression der C-C-Motiv-Chemokin-Liganden CCL2, CCL4, CCL5, CCL11 und CCL20 und Epithelzellen der Atemwege sezernieren bei Stimulation durch IL-1 β CCL5 und CCL20 (Ishmael, 2011; Post *et al.*, 2015). IL-1 β kann außerdem die Expression von CCL3 und CCL4 in Epithelzellen der Atemwege durch Aktivierung von NF- κ B induzieren, was darüber hinaus auch die Transkription des für CCL2 kodierenden Gens induziert, da dessen Promotor eine NF- κ B-Bindungsstelle enthält (C. Liu *et al.*, 2018).

Auch eine starke Th1/IFN- γ -Reaktion wird typischerweise bei Infektionen durch Bakterien und Viren ausgelöst, wie beispielsweise durch Infektionen mit Atemwegsviren, für welche Menschen mit chronischen Atemwegserkrankungen auch anfälliger sind und Exazerbation zur Folge haben können (Hallstrand *et al.*, 2014). Nach ihrer Entstehung in den lungengängigen Lymphknoten, müssen die Th1-Zellen zum Infektionsort rekrutiert werden, was insbesondere durch die chemotaktische Wirkung von CXCL10 auf Th1-Zellen erreicht wird (Gauthier *et al.*, 2017). Sauty *et al.* (1999) konnten belegen, dass IL-1 β und TNF- α synergistisch mit IFN- γ bei der Induktion von IP-10 wirken. Dieser Effekt konnte auch in dieser Arbeit mit einer annähernd 10⁵-fachen Induktion der mRNA-Expression bei dem CXC-Chemokin *ip-10* beobachtet werden (Abbildung 31Abbildung 32). Epithelzellen der Bronchien bilden die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen der Atemwege. Eine Virusinfektion induziert die Produktion von CXCL10 in bronchialen Epithelzellen, woraufhin IP-10 zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen über den CXCR3 Rezeptor rekrutiert und aktiviert (Spurrell, Wiehler, Zaheer, Sanders, & Proud, 2005). Aktivierte zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen lysieren nachfolgend durch Granzyme infizierte bronchiale Epithelzellen, wodurch die Virusreplikation gehemmt wird. IP-10 ist somit ein wichtiger Entzündungsmediator gegen virale Infektionen im Epithel der Atemwege, wird in den bronchialen alveolären Lavagen von Asthmapatienten stark exprimiert und ist in Bronchialbiopsien von Patienten mit COPD hochreguliert. Daher dient IP-10 auch als Serum-Biomarker für Rhinovirus-induziertes Asthma und Rhinovirus-induzierte Exazerbation der COPD (Quint *et al.*, 2010; Wark *et al.*, 2007). Der IP-10-Spiegel bei Patienten, infiziert mit humanen Rhinoviren, korreliert mit Symptomschwere, dem Virustiter und der Anzahl der Lymphozyten in den Sekreten der Atemwege (Spurrell *et al.*, 2005).

Durch beide *R. cordifolia*-Isolate konnte die induzierte mRNA-Expression von *cxcl-10* reduziert werden, wobei bei der jeweilig größten applizierten Konzentration eine 2-fache (TWRc-1) bzw. 3-fache (TWRc-2) Hemmung erreicht wurde (Abbildung 31Abbildung 32). Korrelierend hierzu konnte auch eine deutliche Expressionsreduktion auf Proteinebene beobachtet werden,

welche hier bei TWRC-1 mit 78 % etwas stärker ausfiel als im Falle von TWRC-2 mit 67 % (Abbildung 34).

Studien haben gezeigt, dass die Zahl der Th1-Zellen, die IFN- γ produzieren, bei etwa 50 % der Patienten mit schwerem Asthma, ebenso wie in einem Mausmodell erhöht ist, und dieser erhöhte IFN- γ -Spiegel mit einer Hyperreaktivität der Atemwege und einem vermindertem Ansprechen auf Kortikosteroide in Verbindung steht (Raundhal *et al.*, 2015). Glukokortikoide gelten als potente Inhibitoren der Chemokin-Expression. Die Behandlung von A549, BEAS-2B und NHBE (normale menschliche Bronchialepithelzellen), die durch IFN- γ , IFN- γ /TNF- α und IFN- γ /IL-1 β stimuliert wurden, mit 10 mM Dexamethason war jedoch mit keiner oder nur einer schwachen Hemmung der IP-10-Expression verbunden, im Gegensatz zu einer deutlichen Hemmung der IL-8 mRNA-Expression (Sauty *et al.*, 1999). Auch Fenwick *et al.* (2015) konnten belegen, dass Dexamethason mit Konzentrationen bis 100 μ M die durch TNF- α und IFN- γ Co-stimulierte Expression von CXCL-10 in BEAS-2B-Zellen nicht zu inhibieren vermochte und somit eine Hemmung durch die beschriebenen *R. cordifolia*-Isolate einen alternativen entzündungshemmenden Ansatz für Glukokortikosteroid-resistente Erkrankungen *in vitro* darstellen könnte.

Neben CXCL-10 wurde auch der Einfluss der *R. cordifolia*-Isolate auf die transkriptionelle und Proteinexpression der CC-Chemokine CCL-2 (MCP-1; Monozyten-Chemoattraktives Protein-1) und CCL-5 (RANTES; *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*) untersucht. RANTES ist ein wichtiges Chemokin, das an der Rekrutierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Lunge beteiligt ist, und wird mit Th1-Reaktionen und eosinophilen Erkrankungen, wie z. B. allergischem Asthma in Verbindung gebracht, die durch Th2-Zellen ausgelöst werden (Luster, 1998). Es vermittelt die Chemotaxis von Eosinophilen, Lymphozyten, Neurotrophen und Monozyten und verschiedene andere proinflammatorische Vorgänge wie Integrinaktivierung, Biosynthese von Lipidmediatoren und Degranulation. *In vivo* wird RANTES in der Lunge von Asthmapatienten konstitutiv exprimiert, und in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit Asthma werden erhöhte Konzentrationen nachgewiesen (Koya *et al.*, 2006). Während einer Asthmaexazerbation kommt es zu einer Akkumulation von Eosinophilen und aktivierten Typ 2 CD4⁺ T-Helfer-Lymphozyten, die IL-5, ein Eosinophilen-regulierendes Zytokin, produzieren. Die Rekrutierung von Eosinophilen in die verschiedenen Gewebe wird neben IL-5 durch Chemokine wie Eotaxin über den Rezeptor für C-C-Chemokine 3, CCR3, auf Eosinophilen vermittelt. CCR3 gehört zur Familie 1 der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (N. Li *et al.*, 2021). RANTES kann ebenfalls CCR3 aktivieren und wirkt chemotaktisch für T-Zellen, Eosinophile und Basophile an Entzündungsherden.

Infektionen mit Atemwegsviren oder eine IFN- γ -Behandlung bewirken eine Induktion der Sekretion von RANTES durch Epithelzellen.

Asthmaexazerbationen, ein Ziel bei therapeutischen Strategien, werden am häufigsten durch virale Atemwegsinfektionen wie humanen Rhinoviren (HRV) ausgelöst, deren Infektion eine Inflammation infolge der Rekrutierung von Monozyten bedingt. Die Zunahme der Masse der glatten Bronchialmuskulatur (BSM) bei Asthma, ein Kennzeichen des bronchialen Umbaus, steht in Zusammenhang mit der Rate der Exazerbationen. In einem Co-Kulturmodell bronchialer Epithelzellen mit glatten Bronchialmuskulaturzellen konnten Allard *et al.* (2020) zeigen, dass die HRV-induzierte Monozytenmigration mit asthmatischen BSM im Vergleich zu Kontroll-BSM deutlich erhöht war. Das Monozyten-Migrations-Chemokin CCL2 war jedoch an dieser erhöhten Migration im Gegensatz zu CCL5 nicht beteiligt, was durch eine Verringerung der Monozyten-Migration durch einen anti-CCL-5-Antikörper belegt werden konnte. Dies belegt die Bedeutung von CCL5 in der Bronchialimmunologie und eine Hemmung der CCL5-abhängigen chemotaktischen Wirkung könnte somit Möglichkeiten für die Prävention und Behandlung von Asthmaexazerbationen eröffnen. Die CCL-5-Proteinsekretion wurde durch die Behandlung mit TWRc-2 auf uninduziertes Level und durch die Behandlung mit TWRc-1 um 90 % gesenkt (Abbildung 34). Dies deckt sich mit der Beobachtung der transkriptionellen Ausprägung der *cc1-5*-mRNA, welche durch 157,3 μ M TWRc-2 8-fach und durch 168,7 μ M TWRc-1 5-fach reduziert wurde (Abbildung 31, Abbildung 32). Hinsichtlich des Einflusses beider Isolate auf die mRNA- und Proteinexpression von CCL-2 stellt sich Inhibitionsfähigkeit diverser dar. Durch die Höchstapplikation von 157,3 μ M TWRc-2 konnte die mRNA von CCL-2 lediglich 2-fach und die sekretierte Proteinmenge von CCL-2 nur um 14 % gesenkt werden. Im Gegensatz hierzu bedingten 168,7 μ M TWRc-1 eine 6-fache Reduktion der mRNA sowie kongruent eine 48 %-ige Minderung des sekretierten CCL-2-Proteins im Vergleich zur induzierten Kontrolle. Eine Erklärung hierfür könnte die Untersuchung des Einflusses von TWRc-2 auf die Reporterogenaktivität von NF- κ B liefern, welche weitgehend unbeeinflusst blieb und in der Höchstkonzentration von 157,3 μ M lediglich eine Inhibition von 16 % bedingte. TWRc-1 inhibierte diese Signaltransduktion mit einer IC_{50} von 128 μ M (vgl. Abbildung 29). Die CCL2-Expression wird hauptsächlich auf der Ebene der Transkriptionsinitiierung reguliert. Zwei 5'-flankierende Regionen des humanen *mcp-1*-Gens, ein distaler Enhancer und ein proximaler Promotor, sind an der Transkriptionsregulation beteiligt, wobei die proximale Promotorregion eine GC-Box mit einer NF- κ B-Bindestelle und der distale Enhancer zwei NF- κ B-Bindungsstellen enthält. Die verstärkte Bindung von Transkriptionsfaktoren an diese NF- κ B- und AP-1-Elemente im *cc12*-Promotor ist verantwortlich für die aktive Transkriptions-Expression von CCL2 bei einer Lungenfibrose (X. Deng *et al.*, 2013). Eine erhöhte Expression

von CCL2 wurde in asthmatischen Bronchien bereits 1994 von Sousa *et al.* festgestellt. MCP-1 ist eines der C-C-Chemokine, die spontan von den Bronchialepithelzellen produziert wird und verantwortlich für die Rekrutierung von Entzündungszellen und der Pathogenese von allergischem Asthma ist. Erhöhte Genexpression und Proteinkonzentration von MCP-1 wurden in Bronchialgewebe und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) von Asthmapatienten festgestellt (Ip, Wong, & Lam, 2006). MCP-1 vermittelt die Aktivierung und Rekrutierung von Monozyten, Mastzellen, Basophilen, Eosinophilen und T-Helfer-Typ-2-Lymphozyten (Th2) aus dem vaskulären in den bronchoalveolären Raum durch die Expression von CCR2 auf deren Zelloberflächen (Romagnani, 2002). Gonzalo *et al.* (1998) haben gezeigt, dass Antikörper gegen MCP-1 die die Anzahl der Entzündungszellen in der BALF und die AHR in einem Mausmodell für Asthma drastisch reduzieren, was darauf hindeutet, dass MCP-1 direkt die Entwicklung von AHR bei allergischem Asthma vermittelt. Eine Blockierung der CCL2-CCR2-Achse durch Neutralisierung von CCR2 reduzierte überdies die Antigen-induzierte bronchiale Hyperreaktivität sowie die Ansammlung von Makrophagen und Eosinophilen in der bronchoalveolären Lavage asthmatischer Affen, was die chemotaktische Funktion von CCL2 unterstreicht (Mellado, de Ana, Gómez, Martinez-A, & Rodriguez-Frade, 2008).

Obwohl Asthma klassischerweise mit Eosinophilie und Th2-Zytokinen assoziiert ist, zeigen einige Asthmapatienten einen neutrophil-prädominanten Phänotyp ohne offensichtliche Th2-Zytokine. CXCL8 und CXCL10 haben eine starke chemotaktische Wirkung auf Neutrophile und beide Chemokine sind bei Asthma-Phänotypen mit vermehrten Eosinophilen und Neutrophilen in den Atemwegen erhöht (Takaku *et al.*, 2011). Darüber hinaus können CXCL8 (IL-8), CXCL1 und CXCL5 an den CXCR2 spezifischen Oberflächenrezeptor CXCR2 auf Neutrophilen binden. CXCL1, das von ansässigen Makrophagen und/oder Epithelzellen produziert wird, vermittelt die Rekrutierung von Neutrophilen an Entzündungsherde durch Bindung und Aktivierung des CXCR2, einem Mitglied der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Sawant *et al.*, 2015). Die transkriptionelle Aktivität der mRNA von *cxcl-1* konnte durch beide getesteten Höchstkonzentration der *R. cordifolia*-Isolate um den Faktor 3 (TWRc-1), bzw. Faktor 2 (TWRc-2) reduziert werden (Abbildung 31Abbildung 32).

Des Weiteren wurde ergänzend auch ein Bestandteil des gesetzten Stimulus, das proinflammatorische Zytokin TNF- α in seiner transkriptionellen Aktivität und Sekretion unter dem Einfluss der pflanzlichen Verbindungen untersucht. Durch TWRc-1 konnte eine konzentrationsabhängig gesteigerte Inhibition der mRNA um den Faktor 7 gewährleistet werden und auch TWRc-2 verminderte die transkriptionelle Aktivität von TNF- α um den Faktor 3 (Abbildung 31 undAbbildung 32). Diese Ergebnisse konnten auf Proteinebene mit 68 %-iger,

bzw. 47 %-iger Reduktion der Sekretion von TNF- α bestätigt werden (Abbildung 34). TNF- α wird in verschiedenen Zellen der asthmatischen Atemwege exprimiert, darunter Makrophagen, Mastzellen, T-Zellen, Epithelzellen und Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur. Inhalierendes TNF- α induziert die AHR und eine durch Neutrophile vermittelte Atemwegsentzündung (Peter J. Barnes, 2009). Die transkriptionelle Aktivierung des *tnf- α* -Gens in verschiedenen Zelltypen erfolgt durch die Interaktion mehrerer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, ATF2/c-Jun und NF-AT mit dem Promotor (G. Erkel, Wisser, & Anke, 2007). Zu den Genen, die durch NF- κ B induziert werden, gehören die Gene für die proinflammatorischen Zytokine *il-1 β* , *tnf- α* und *gm-csf* sowie die Chemokine *il-8*, *mip-1 α* , *mcp-1*, *rantes* und *eotaxin*, die weitgehend für die Rekrutierung von Entzündungszellen in Entzündungsherde verantwortlich sind (Brightling, Berry, & Amrani, 2008). Produkte von Genen, die durch NF- κ B reguliert werden, verursachen auch dessen Aktivierung. Mehrere dieser Genprodukte wie TNF- α oder auch IL-1 β aktivieren direkt den NF- κ B-Signalweg, was zu einer positiven Rückkopplung führt, die eine Verstärkung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bedingt (P. J. Barnes & Adcock, 1998). Eine Co-Stimulation mit TNF- α bewirkt außerdem eine induzierende Wirkung auf die Ausprägung der EMT und somit der pathologischen Umgestaltung infolge einer subepithelialen Fibrose in BEAS-2B-Zellen (Kamitani *et al.*, 2011).

Die Blockierung von TNF- α mit Etanercept, einem Fusionsprotein, welches aus löslichem TNFR besteht und an die Fc-Komponente von humanem IgG1 gebunden ist, reduzierte zwar die AHR und verbesserte die Lungenfunktion bei Patienten mit refraktärem Asthma und die Blockierung von TNF- α mit Infliximab, einem chimären Antikörper, spezifisch für humanes TNF- α , reduzierte die Exazerbationen bei Patienten mit mittelschwerem Asthma, jedoch scheint das therapeutische Potential einer alleinigen Inhibition von TNF- α bei Asthma limitiert (Peter J. Barnes, 2009). Eine gezielte Behandlung von TNF- α ist bei einigen Entzündungskrankheiten, wie rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen oder Psoriasis äußerst wirksam, hat sich jedoch bei anderen Krankheiten, bei denen eine Wirksamkeit erwartet wurde, als weniger nützlich erwiesen. TNF- α -Hemmer wie Infliximab, Golimumab oder Etanercept werden heute weniger als potenzielle neue Medikamente für die Behandlung von Asthma und COPD angesehen, da ihre Wirksamkeit auf eine relativ kleine Untergruppe von Patienten mit schwerem Asthma begrenzt ist, die möglicherweise durch eine erhöhte TNF-Achse definiert ist, jedoch bei COPD unwirksam sind (Matera, Calzetta, & Cazzola, 2010).

4.5.2.3 Antiinflammatorische Wirkung von TWRc-1, TWRc-2 (Rubiadin) und strukturell verwandter Naturstoffe und Derivate

Die Methanolextraktion getrockneter Wurzeln von *R. cordifolia* lieferte die, in dieser Form unbekanntes ungesättigte Hydroxyfettsäure 6-Hydroxy-7-,9-octadecadienoic-acid (TWRc-1) (vgl.:3.3.2.1). Die Omega-9-Fettsäure zeigte inhibierende Wirkung auf die pro-fibrotische Signaltransduktionen SMAD2/3, die proinflammatorischen Signaltransduktionen STAT6 und NF- κ B, sowie die Promotoraktivität des Chemokins IP-10 im Wirkungsbereich der IC_{50} von 82 μ M bis 128 μ M. Darüber hinaus konnte sowohl die mRNA-Aktivität, als auch die Proteinsekretion der Chemokine CCL-2, CCL-5 und CXCL-10, sowie des proinflammatorischen Zytokins TNF- α signifikant durch 169 μ M TWRc-1 reduziert werden.

Natürlich vorkommende Oxylipine, die als oxidierte Metaboliten langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren bekannt sind, spielen in Tieren und Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Zellsignalisierung und der Abwehr von Angriffen durch Mikroben oder Krankheitserreger (Mosblech, Feussner, & Heilmann, 2009). Fettsäuren sind als Selbstverteidigungsmittel des Organismus bekannt und besitzen verschiedene biologische Aktivitäten, einschließlich der Entzündungshemmung. Die Hydroxyl-Octadecadiensäuren (HODEs) sind die wichtigsten Reaktionsprodukte der Oxygenierung von Linolsäure durch das 15-LOX-Enzym, darunter 9-Hydroxy-Octadecadiensäure (9-HODE) und 13-Hydroxy-Octadecadiensäure (13-HODE) ((S)-Coriolinsäure) (Zhen Li *et al.*, 2016) (Abbildung 64, a, b, c).

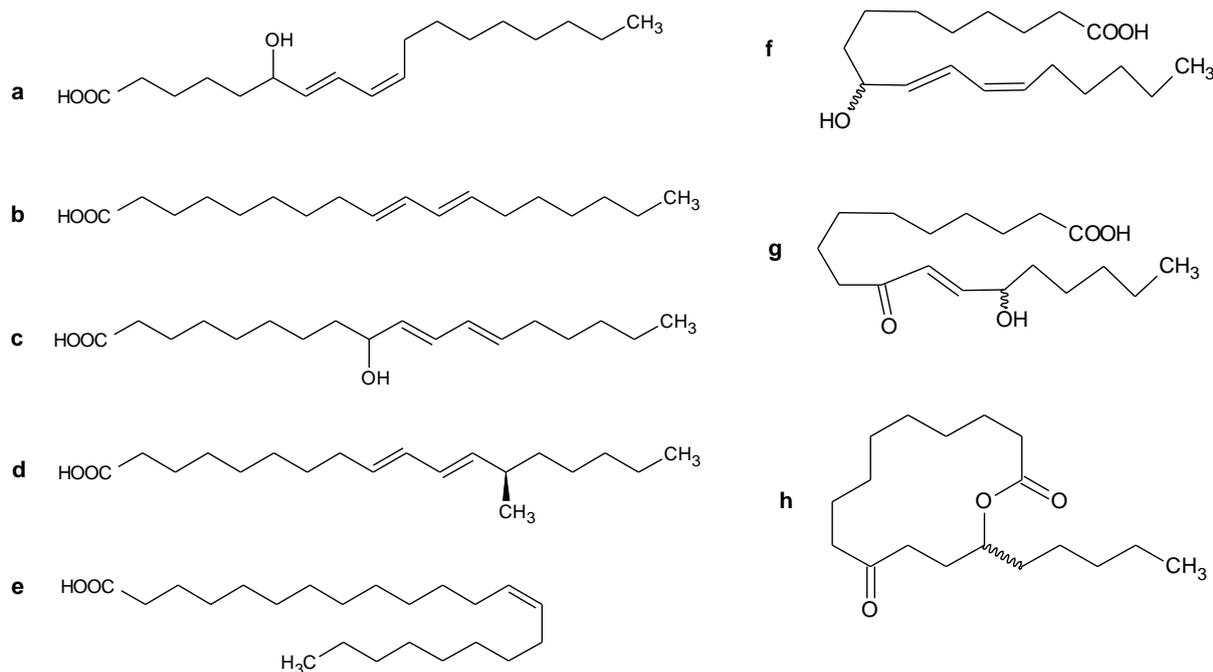


Abbildung 64: TWRC-1 und strukturell verwandte Fettsäuren mit biologischer Aktivität. a: TWRC-1 b: Linolsäure c: 9-Hydroxy-Octadecadiensäure (9-HODE) d: (S)-Coriolinsäure (13-Hydroxy-Octadecadiensäure (13-HODE)) e: Erucasäure f: (±)-9-Hydroxy-*trans-cis*-10,12-Octadecadiensäure (9-HOA) g: (±)-13-Hydroxy-10-oxo-*trans*-11-octadecensäure (13-HOA) h: (±)-10-Oxo-*trans*-11-octadecen-13-olid (10-ODO)

In einer Studie von Hanh *et al.* (2011) wurden Fettsäure-Metaboliten, isoliert aus oberirdischen Pflanzenteilen aus *C. odorata*, auf ihre inhibitorische Wirkung auf das NF- κ B-Signal und die Ausprägung der NO-Produktion, des Zielgens iNOS von NF- κ B, in den murinen Makrophagenzellen RAW264.7 untersucht. Unter den Verbindungen waren Metaboliten der Linolsäure oder Linolensäure, für die Humangesundheit essentielle Fettsäuren. Es wurden insgesamt sechs Fettsäuren mit inhibitorischer Wirkung isoliert, wobei die Methylveresterte (S)-Coriolinsäure, mit den IC_{50} -Werten jeweils um 5 μ M die stärkste Wirkung zeigte. Die mit gleicher Summenformel strukturell eng mit TWRC-1 verwandte (S)-Coriolinsäure (Abbildung 63, d), im Vergleich mit TWRC-1 an Position 13 statt an Position 6 hydroxyliert und mit Doppelbindungen an Stelle 9 und 11 statt 7 und 9, zeigte hierbei eine hemmende Wirkung auf die NF- κ B-Signaltransduktion mit einer IC_{50} von 30 μ M, während die NO-Produktion mit einer IC_{50} von 34 μ M inhibiert werden konnte. Die Studie zeigte, dass die aus *C. odorata* isolierten Fettsäurederivate natürliche Inhibitoren von NF- κ B und der NO-Produktion sind. (S)-Coriolinsäure, isoliert aus den Samen von *Hernandia ovigera*, zeigte in einer weiteren Studie ebenfalls eine starke hemmende Wirkung auf die Enzymaktivität der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 (COX-1: IC_{50} = 2.1 μ g/mL; COX-2: IC_{50} = 0.14 μ g/mL) (Jang *et al.*, 2004). Ein

Einfluss auf die mRNA-Expression der COX-2 infolge einer Induktion durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL1- β und IFN- γ konnte für TWRc-1 in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Murakami *et al.* (2005) untersuchten die suppressiven Wirkungen verschiedener Fettsäuren, einschließlich einer neuen Klasse von Lipoxigenasemetaboliten der Linolsäure, die in Getreide vorkommen, nämlich (\pm)-9-Hydroxy-trans-cis-10,12-Octadecadiensäure (9-HOA aus Reis), (\pm)-13-Hydroxy-10-oxo-trans-11-octadecensäure (13-HOA aus Mais) und (\pm)-10-Oxo-trans-11-octadecen-13-olid (10-ODO aus Mais), auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von proinflammatorischen Mediatoren in RAW264.7-Zellen (Abbildung 64, f, g, h). Alle drei Metaboliten unterdrückten die LPS-induzierte NO-Produktion stärker als das Ausgangssubstrat Linolsäure und die (S)-Coriolsäure. Die durch LPS hochregulierte mRNA-Expression der iNOS, der COX-2, von IL-6, weniger stark von TNF- α und der Toll-like-Rezeptoren-2,-4 und -9 wurden ebenfalls deutlich, insbesondere von 13-HOA, abgeschwächt. Darüber hinaus zeigte 13-HOA in einer Konzentration von 20 μ M Einfluss auf die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK2, c-Jun, p38 und Akt (Ser473), und verminderte den Abbau des Inhibitors I κ B- α . Auch die Signaltransduktionen von NF- κ B und AP-1 konnten in Reporterassays inhibiert werden (Murakami *et al.*, 2005). Auch in Bezug auf andere Omega-9-Fettsäuren konnten bereits antiinflammatorische Wirkungen postuliert werden. Beispielsweise offenbarte die Erucasäure, ein PPAR- δ -Ligand, antioxidative und entzündungshemmende Wirkungen in Tiermodellen, welche wohl auf einer Unterdrückung der p38-MAPK- und NF- κ B-Signalübertragung beruhen (Liang *et al.*, 2020).

Angesichts dieser antiinflammatorisch relevanten Wirkungen strukturell eng mit TWRc-1 verwandter Fettsäuren sollten zum einen weitere Untersuchungen wie Signalkaskaden-spezifische Phosphorylierungen beschriebener MAPKs sowie etwaige Hemmungen der Translokationen und Bindung der entsprechenden Zielsequenz via ChIP bezüglich der Eingrenzung des Wirkortes von TWRc-1 erfolgen. Zum anderen wären strukturelle Derivate in Bezug auf entsprechende essentielle Teile des Molekulargerüsts von Interesse. Hinsichtlich der Aktivität infolge der strukturellen Modifikation konnten Hanh *et al.* (2011) feststellen, dass vermehrte Doppelbindungen in der Fettsäurekette die hemmende Wirkung verringerten, während beispielsweise eine Methylveresterung die Aktivität auf die NO-Produktion und die NF- κ B-Signaltransduktion erhöhte. Beim Vergleich der Kettenlänge erwiesen sich Fettsäuren mit mehr als 20 Atomen als Hemmstoffe der COX-2 und diejenigen mit weniger als 16 Atomen als inaktiv, wobei bei Fettsäuren mit 18 Atomen ebenso Sättigung und Etherfunktion als ausschlaggebend für eine Aktivität vermutet wurde (Gautam & Jachak, 2009).

Neben der Aktivitäts-gebundenen Aufreinigung aus dem Wurzelextrakt von *R. cordifolia* der Omega-9-Fettsäure TWRc-1 konnte auch eine weitere Verbindung mit antiinflammatorischer Wirkung isoliert werden, welche sich in der Strukturaufklärung als das bereits bekannte Rubiadin (TWRc-2) darstellte (vgl.: 3.3.2.2). Rubiadin wurde erstmalig durch Dosseh *et al.* 1981 aus *R. cordifolia* isoliert und gehört der Gruppe der Anthrachinone (AQs) an, wovon gegenwärtig 28 aus *R. cordifolia* isoliert wurden, darunter Alizarin, Munjistin, Rubiadin, Purpurin, Techochinon und Xanthopurpurin (Wen *et al.*, 2022). AQs sind die größte Gruppe von Verbindungen mit natürlichen Farbstoffen, von denen bisher über 700 identifiziert wurden und etwa 200 stammen aus Pflanzen, der Rest aus Flechten und Pilzen. Sie finden sich in allen Pflanzenteilen, einschließlich Wurzeln, Rhizomen, Früchten und Blüten, und aufgrund ihres breiten Anwendungsspektrums gehören AQs und ihre Derivate zu den am meisten genutzten Phytomolekülen in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie (Watroly *et al.*, 2021). Studien haben gezeigt, dass AQs antioxidative, antitumorale, entzündungshemmende, harntreibende, antiarthritische, antimykotische, antibakterielle und malariabekämpfende Wirkungen haben (Chien, Wu, Chen, Yang, & others, 2015; Davis, Agnew, & Shapiro, 1986; Fosso, Chan, Gregory, & Chang, 2012; Malik & Müller, 2016; Winter *et al.*, 1996; Wuthi-udomlert, Kupittayanant, & Gritsanapan, 2010). Aus Anthrachinonen abgeleitete Wirkstoffe gehören zu den wirksamsten Faktoren für die Therapie verschiedener Krebsarten und AQ-basierte Medikamente wie Doxorubicin, Valrubicin, Mitoxantron, Idarubicin und Epirubicin werden erfolgreich zur Behandlung hämatologischer und solider Malignome eingesetzt (Tikhomirov, Shtil, & Shchekotikhin, 2018). Daher ist der AQ-Kern weiterhin ein potenzielles Gerüst für die Entwicklung neuer therapeutischer Kandidaten, allerdings müssen zukünftig auch einige Nachteile wie die fehlende Selektivität und damit Toxizität für gesunde Zellen überwunden werden.

In einer kürzlich erschienenen Studie von Chitsaz *et al.* (2023) wurde die entzündungshemmende Wirkung von Rubiadin in Baumwollpellet-induzierten Granulomen und Carrageen-induzierten Ödemen als chronische und akute Entzündungsmodelle bei Ratten untersucht. Rubiadin (0,5 mg/kg, i.p.) bewirkte eine signifikante Verringerung des TNF- α -Spiegels und des Pfoten-Ödems im Vergleich zur Kontrollgruppe im Carrageen-Test. Außerdem wurde festgestellt, dass die entzündungshemmende Wirkung von Rubiadin (0,5 mg/kg, i.p.) mit der des nichtsteroidalen Antirheumatikums Mefenaminsäure (30 mg/kg, i.p.) als Standardmedikament vergleichbar ist. Rubiadin war bei durch Baumwollpellets-induzierten Granulomen wirksam, was die Menge der Granulom- und Transsudatbildung betraf. Die entzündungshemmenden Wirkungen von Rubiadin waren in diesem Modell mit einem signifikanten Rückgang von IL-1 β verbunden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass

Rubiadin als natürliche Verbindung signifikante entzündungshemmende Wirkungen haben kann.

Bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften ermöglichen die Umwandlung eines Moleküls in ein arzneimittelähnliches Molekül. Das Molekül sollte klein genug sein, um durch den Körper transportiert werden zu können, hydrophil genug, um sich im Blutkreislauf aufzulösen, lipophil genug, um Fettbarrieren im Körper zu überwinden und genügend polare Gruppen enthalten, um an einen Rezeptor zu binden, jedoch nicht zu viele, die dazu führen, dass es zu schnell über den Urin aus dem Körper ausgeschieden wird, um die therapeutische Wirkung zu entfalten. Die arzneimittelähnlichen Eigenschaften (Molekulargewicht, H-Bindungs-Donatoren, H-Bindungs-Akzeptoren, log P-Wert und drehbare Bindungen), wie sie in Lipinskis Fünferregel beschrieben sind, scheint Rubiadin zu erfüllen (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 1996; Watroly *et al.*, 2021).

Das nahe verwandte Rubiadin-1-methylester RBM zeigte in einem Modell für osteoklastische Knochenresorption eine Blockade des NF- κ B-Signalwegs. RBM hemmte dabei die Phosphorylierung von NF- κ B p65 und den Abbau von I κ B α und verringerte die nukleare Translokation von p65 (He *et al.*, 2018). Bao *et al.* (2011) untersuchten die *In-vitro*-Wirkungen von Rubiadin auf die Knochenresorptionsaktivität und ihren Mechanismus auf Osteoklasten, die aus Rattenknochenmarkszellen stammen und konnten belegen, dass Rubiadin und RBM in die c-Jun N-terminale Kinase und den NF- κ B-Signalweg eingreift. Mohr *et al.* (2019) untersuchten den antiinflammatorischen Effekt von RBM auf LPS-induzierte RAW264.7 Makrophagen. RBM inhibierte mit 30 μ M die NO-Produktion, sowie die Sekretion der proinflammatorische Zytokine IL-6 und IL1- β in ähnlich potenter Weise, wie die Vergleichsmedikation mit 7 μ M Dexamethason. Die Sekretion von TNF- α hingegen konnte durch die applizierte Konzentration nicht verringert werden. In dieser Arbeit konnte im Gegensatz dazu durch Rubiadin (TWRc-2) eine Inhibition der Sekretion von TNF- α aus BEAS-2B-Zellen festgestellt werden, jedoch wurde die mRNA-Aktivität von IL-6 nicht beeinflusst, was die Selektivität der Derivatisierung unterstreicht, wobei die Differenz der Wirkstoffkonzentration, des Stimulus, der Zelllinie und des Versuchsaufbau die Aussagekraft dieses Vergleiches mindern. Dennoch wiesen weitere *In-vivo*-Experimente der Arbeitsgruppe mit LPS-induzierter Lungenschädigung bei Mäusen ebenfalls eine durch RBM reduzierte Leukozyteninfiltration, sowie eine Reduktion proinflammatorischer Marker, u. a. TNF- α , IL-6, IFN- γ und CCL-2, nach (Mohr *et al.*, 2019). TWRc-2 konnte in dieser Arbeit die CCL-2 Sekretion nur geringfügig um 14 % hemmen, zeigte jedoch auf die Sekretion und mRNA-Ausprägung der Entzündungsmediatoren CCL-5, CXCL-10 und TNF- α großes Potential. Bis

auf die Aktivität der NF- κ B-Signalkaskade konnten auch die Signalweiterleitungen von SMAD2/3 und STAT6, sowie die Promotoraktivität von *cxcl-10* signifikant durch TWRc-2 reduziert werden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass RBM, wie auch Rubiadin (TWRc-2) in dieser Arbeit, für weitere Krankheitsbilder, wie Asthma und deren beteiligter Signalkaskaden und inflammatorischen Marker wie den beschriebenen Zytokinen und Chemokinen, vielversprechende Wirkstoffe oder Leitstrukturen darstellen könnte. Ein Ansatz in Zukunft wäre die Bioaktivität von Rubiadin durch strukturelle Veränderungen zu verbessern. Einige Analoga von Rubiadin wurden isoliert oder mit Hilfe von Methylierungs- und Acylierungsreaktionen synthetisiert, die aufgrund ihrer phenolischen Hydroxylgruppen möglich sind. Die Seitenkettenmodifikationen sind ein Anstoß für weitere Bemühungen, das therapeutische Potenzial dieser Klasse von Wirkstoffen zu erhöhen. Beispielsweise wurden durch Akhtar *et al.* (2013) Rubiadin-Analoga synthetisiert und ihre zytotoxischen Aktivitäten gegen die Krebszelllinien MCF-7 und K-562 untersucht. Die Struktur-Wirkungs-Beziehung deutet darauf hin, dass Methoxy- und Hydroxylgruppen für die Zytotoxizität und Selektivität der substituierten Anthrachinone wichtig sind. Der *In-silico*-Entwurf von wirksameren Rubiadin-Derivaten kann als Weg zur Entdeckung und Entwicklung neuer Arzneimittel genutzt werden. Dennoch sollten in Zukunft *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien durchgeführt werden, um die Sicherheit und Wirksamkeit aller halbsynthetischen Derivate von Rubiadin zu bestätigen. Darüber hinaus sind in Zukunft weitere Studien zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) erforderlich, um weitere neue, von Rubiadin abgeleitete Verbindungen zu erhalten (Watroly *et al.*, 2021).

4.5.3 Cyclonerodiol

Initial wurde Cyclonerodiol in einem Screening pilzlicher Sekundärmetaboliten als Inhibitor der IL-4-induzierten Reporter-genaktivität und Eotaxin-1-Markergenexpression in der alveolären Epithelzelllinie A549 beschrieben (Langhanki, Rudolph, Erkel, & Opatz, 2014b). Hierbei konnte geklärt werden, dass Cyclonerodiol die IL-4/IL-13-induzierte Aktivierung eines STAT6-abhängigen Transkriptionsreporters in A549-Zellen auf dosisabhängige Weise (IC_{50} : 6-7 μ M) hemmt, ohne zytotoxische Wirkungen zu zeigen, wobei die eng verwandten IL-6-induzierbaren STAT3-, IFN- γ -induzierbaren STAT1- und IFN- α -induzierbare STAT1/STAT2-Signalwege nicht beeinflusst wurden. Auch die TGF- β -induzierte SMAD2/3-Signaltransduktion als Hauptinduktor der pathophysiologischen Konsequenzen des *airway remodelings*, sowie die NF- κ B-Signaltransduktion blieben durch die Verbindung unbeeinflusst, was die Spezifität von Cyclonerodiol hinsichtlich einer inhibitorischen Wirkungsweise auf die STAT6-Signaltransduktion andeutet.

4.5.3.1 Untersuchung zur Stimulation der Eotaxine

Das inflammatorische Milieu von allergischem Asthma ist eng assoziiert mit der TH2-spezifischen Zytokin-Sekretion von IL-4 und IL-13 und induziert die STAT6-abhängige Expression von Chemokinen, welche nachfolgend die Migration eosinophiler Granulozyten einleiten (P. J. Barnes, 2011; Q. Yuan *et al.*, 2006). Die transepitheliale Migration von Eosinophilen ist einer der wichtigsten Schritte bei der allergischen Entzündung der Atemwege und führt zur Migration von Eosinophilen in die Atemwege und zur Schädigung der Schleimhaut (Luster, 1998). Epithelzellen der Atemwege produzieren unter verschiedenen Zytokin-Stimulationen eine Vielzahl eosinophil-aktiver Chemokine. Eotaxin-1-defiziente Mäuse sind in der Lage eine Eosinophilie der Atemwege und eine Überempfindlichkeit der Atemwege zu entwickeln, was darauf hindeutete, dass auch andere eosinophil-aktive Chemoattraktoren wie Eotaxin-3 an der Rekrutierung von Eosinophilen in die Atemwege beteiligt sind (Q. Yuan *et al.*, 2006). In einer Studie von Yuan *et al.* (2006) wurden die Zelllinien BEAS-2B und A549, primäre Epithelzellen der Atemwege (NHBE) und zum Vergleich normale menschliche Nabelvenenendothelzellen (HUVEC) zur Analyse der Induzierbarkeit von Eotaxinen genutzt. Eotaxin-3 mRNA wurde in allen getesteten Zellen nach Stimulation mit den Th2-Zytokinen IL-4 und IL-13 deutlich induziert, jedoch konnte keine nachweisbare mRNA-Expression von Eotaxin-1 und -2 beobachtet werden. Komiya *et al.* (2003) belegten, dass die Produktion von Eotaxin-1 durch bronchiale Epithelzellen sowohl von IL-4, als auch von TNF- α abhängig war. Im Gegensatz dazu hing die Produktion von Eotaxin-2 und Eotaxin-3 durch diese Zellen nicht von der Anwesenheit von TNF- α ab und wurde vollständig durch IL-4 oder IL-13 allein induziert. IL-13, das eine gemeinsame Rezeptoruntereinheit mit IL-4 teilt, zeigte in Bezug auf Eotaxin-3 eine stärkere Induktion als IL-4 und eine annähernd starke wie durch die Co-Stimulation mit IL-4/TNF- α (Komiya *et al.*, 2003). Während die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 nachweislich die Eotaxin-1-Produktion von Epithelzellen und Fibroblasten in geringem Maße anregen, induzierten nur die entzündlichen Zytokine TNF- α und IFN- γ eine signifikante mRNA-Expression von Eotaxin-1 und in den Epithelzellen der Atemwege (Komiya *et al.*, 2003; Q. Yuan *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von Eotaxin-3 während einer anhaltenden Th2-Dominanz stattfindet. Die Produktion von Eotaxin-3 erfordert eine kontinuierliche Exposition gegenüber IL-4, was die Eliminierung von IL-4 aus den A549-Zellkulturen und daraus bedingte Expressionseinschränkung von CCL-26 vermuten lässt (Komiya *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurden ebenso Untersuchungen zur Induzierbarkeit der Eotaxine-1 und -3 durchgeführt. Die vorherig beschriebenen Studien zur Induzierbarkeit konnten hierbei bestätigt werden. Wie aus Abbildung 41 hervorgeht, konnte eine signifikante Induktion von CCL-11 in

A549-Zellen nur durch eine Co-Stimulation mit TNF- α gewährleistet werden, wohingegen die alleinige Behandlung mit IL-4 keine Induktion bedingte. Auch in BEAS-2B-Zellen wirkte sich die Co-Induktion 250-fach stärker auf die transkriptionelle Aktivität von Eotaxin-1 aus. Demgegenüber hatte die zusätzliche Applikation von TNF- α zu IL-4 bei CCL26 in beiden Zelllinien kaum einen Induktions-steigernden Effekt, was die Beobachtung von Komiya *et al.* (2003) mit IL-4 als maßgeblichem Stimulus für die Eotaxin-3-Expression erhärtet.

Um die Ergebnisse mit den bereits in der Arbeitsgruppe publizierten Daten aus Langhanki *et al.* (2014) konsistent zu halten, wurde zur Stimulation der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 zur Untersuchung des Einflusses von Cyclonerodiol auf Eotaxin-3 neben IL-4 auch IL-13 genutzt. IL-13 fungiert als Effektor-Molekül auch in der späten Phase der asthmatischen Reaktion und dient so der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus der Asthma-Reaktion (Oh *et al.*, 2010).

4.5.3.2 Einfluss von Cyclonerodiol auf die mRNA- und Proteinexpression von Eotaxin-3

Im Zuge der weiterführenden Aufklärung zur Wirkweise von Cyclonerodiol und der Evaluation weiterer inhibitorischer Effekte wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss der Verbindung auf die transkriptionelle und translationale Aktivität des Chemokins Eotaxin-3 untersucht. Wie in Abbildung 51, A dargestellt, reduzierte die Gabe von 50 μ M Cyclonerodiol den Eotaxin-3-mRNA-Spiegel in A549-Zellen um etwa 60 %. Zur Bestätigung der aus den qRT-PCR-Experimenten gewonnenen Daten wurde nachfolgend die Eotaxin-3-Proteinexpression nach IL-4/IL-13-Induktion untersucht. Wie in Abbildung 51 B und C gezeigt, reduzierte Cyclonerodiol den endogenen Eotaxin-3-Proteinspiegel ab 10 μ M nach 24-stündiger Behandlung signifikant, mit einer Hemmung von ebenfalls 60 % infolge der Applikation von 50 μ M Cyclonerodiol. Die Hemmung der Eotaxin-3-mRNA und Proteinexpression beruhte hierbei nicht auf einer durch Cyclonerodiol bedingten Beeinträchtigung der Bindung von STAT6 an den endogenen *eotaxin-3*-Promotor (Abbildung 52). Der untersuchte Chromatinbereich umfasste -110 bis +85 Basenpaare relativ zur TSS innerhalb des *eotaxin-3* Promotors und beinhaltete die proximale STAT6-Bindestelle (TTCTCTGGAA) und eine TATA-Box (X. Zhang *et al.*, 2012). Die Amplifikation des IL-4/13-behandelten gebundenem Chromatins ergab eine 10-fache Induktion von STAT6 gegenüber der nicht-spezifischen IgG-Isotypen-Kontrolle, worauf die Applikation von 50 μ M Cyclonerodiol keinen Einfluss ausübte. Ebenso konnte kein Einfluss der Substanz auf die Bindung von Lysin9-acetyliertem Histon H3 (H3K9Ac) an den konstitutiven *gapdh*-Promotor als Marker für zugängliches, transkriptionell aktives Chromatin festgestellt werden. Diese Ergebnisse ließen

vermuten, dass Cyclonerodiol die Transkriptionsaktivität von STAT6 beeinflusst, ohne Einfluss auf die Bindungsaffinität von STAT6 an die korrespondierende Promotorregion von *eotaxin-3* auszuüben.

Die Eotaxine-1, -2 und -3 signalisieren ihre funktionellen Aktivitäten alle über den Rezeptor CCR3, jedoch weisen sie mit 40 % nur eine geringe Homologie auf und die *eotaxin*-Gene sind in unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Die Expression von CCL-26 ist jedoch im Gegensatz zu CCL-11 und CCL-24, welche auch bei Nagern exprimiert werden, human-spezifisch (Ahmadi *et al.*, 2016). Die Bedeutung von Eotaxin-3 bei Asthma wird unterlegt mit der Beobachtung, dass die chemotaktische Wirkung von CCL-26 auf Eosinophile bei Probanden mit leichtem Asthma stärker als bei CCL-11 und CCL-24 ausfiel. Im Gegensatz zu CCL-11 und CCL-24 war diese Wirkung von CCL-26 mit einer biphasischen chemotaktischen Reaktion von Eosinophilen verbunden, die eine einzigartige späte Reaktion zwischen 12 und 18 Stunden beinhaltete, welche durch eine CCR-3-Blockade nicht gehemmt wurde (Provost *et al.*, 2013). Diese Daten deuten darauf hin, dass CCL-26 bei Asthma die Migration von Eosinophilen auf eine andere Art und Weise fördert als CCL-11 und CCL-24 und wahrscheinlich eine einzigartige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen bei dieser Krankheit spielt (Provost *et al.*, 2013). Eine ähnliche Beobachtung konnten Berkman, Ohnona, Chung, & Breuer (2001) bei der Expression von Zellen bronchialer Biopsien und BALF machen, wobei Eotaxin-3, und nicht Eotaxin-1 oder Eotaxin-2, 24 Stunden nach der Allergenbelastung deutlich erhöht war, was dafür spricht, dass Eotaxin-3 für die anhaltende Rekrutierung von Eosinophilen in die asthmatischen Atemwege in den späteren Stadien nach einer Allergenexposition verantwortlich sein könnte. Die Blockierung von CCR3 hatte auch hier keinen Einfluss auf die durch CCL26 ausgelöste zweite Migrationsphase bei Eosinophilen von Asthmapatienten (Berkman *et al.*, 2001). Des weiteren deuteten Coleman *et al.* (2012) aufgrund hoher Eotaxin-2 und 3-Expressionen in Epithelzellen der Atemwege bei schweren Asthmatikern eine relative Kortikosteroid-Resistenz an. Wenngleich die durch IL-13 stimulierte Eotaxin-2- und Eotaxin-3-Expression durch Dexamethason unterdrückt wurde, war der Gesamtrückgang gering (25 %), obwohl *In-vitro*-Studien bereits konsistente Abnahmen der Eotaxine infolge einer Glukokortikoid-Behandlung bestätigten (Komiya *et al.*, 2003; Lilly *et al.*, 1997). Coleman *et al.* (2012) spekulierten dabei, dass die fortgesetzte Eotaxin-Expression mit dem Vorhandensein anderer Zelltypen oder Zytokine als IL-4/IL-13 zusammenhängt, darunter TNF- α , IL-1 β und andere, die möglicherweise nicht durch Kortikosteroide unterdrückt werden.

Die Ergebnisse des inhibierenden Einflusses von Cyclonerodiol auf Eotaxin-3 als Effektormolekül der IL4/13-induzierten STAT6-Signaltransduktion unterstreicht das Potential der Verbindung als Leitstruktur. Die letztendliche Aufklärung der Wirkungsweise wurde durch Kristina Rudolph, wie in Rudolph, Walter, & Erkel (2018) beschrieben, durchgeführt. Hinsichtlich des *mode of action* konnte kein Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung (Tyr 641) von STAT6 und nukleäre Translokation von aktiviertem STAT6, jedoch eine Inhibition der Serin-Phosphorylierung von STAT6 festgestellt werden. Eine Transaktivierung von STAT6 kann auch durch eine Serin-Phosphorylierung über mehrere Mitogen-aktivierte Kinasen des MAPK-Signalwegs (JNK, p38, ERK1/2), sowie der die Proteinkinase B des PI3K-Signalweges erfolgen (Shirakawa *et al.*, 2011). Eine Inhibition der in A549-Zellen durch IL-4 induzierbaren MAPKs ERK1/2 und p38 konnte nicht festgestellt werden, jedoch beeinträchtigt Cyclonerodiol die Assoziation dieser Kinasen mit STAT6 ebenso wie auch die darauffolgende Rekrutierung und Assoziation des Cofaktors p300, und so die Transkriptionsaktivität. Abschließend wurde durch Rudolph *et al.* (2018) auch eine Inhibition der Acetyltransferase-Aktivität von p300 durch reduziertes acetyliertes STAT6 infolge der Behandlung mit Cyclonerodiol nachgewiesen, welche die Transkriptionsaktivierung moduliert (Zhuang, 2013).

Die spezifische Wirkung auf die IL-4/13-induzierte STAT6-Signaltransduktion, und im Zuge dieser Signalkaskade Inhibition resultierender Inflammationsmarker wie den Chemokinen CCL-2, CCL-5, CXCL-1, den Eotaxinen CCL-11 und dem hier untersuchten CCL-26, sowie weiterer an der persistierenden Inflammation beteiligter Zytokine, machen Cyclonerodiol zu einer hoffnungsvollen Leitstruktur für die Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung von Asthma und anderer atopischer Erkrankungen (A. K. Rudolph *et al.*, 2018).

4.5.4 Derivatisierung Oxacyclododecindion

Analysen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen belegten, dass die TGF- β -induzierbare SMAD2/3-Reporterexpression durch Oxacyclododecindion mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich gehemmt wurde (K. Rudolph *et al.*, 2013). Das verwandte gesättigte makrozyklische Lacton (S)-Curvularin zeigte sich hier 200-mal weniger aktiv, und Dehydrocurvularin, dem ebenfalls das Chlor an C-4 und die Methylgruppe an C-10 fehlt, war etwa 20-mal weniger aktiv. Vor allem das Vorhandensein der 10,11-Doppelbindung im Lactonring, die Methylgruppe an C-10, sowie die Chlorierung an C-4 scheinen wichtige Strukturmerkmale für die Aktivität auf die SMAD2/3-abhängige Signaltransduktion zu sein, wohingegen die Hydroxy-Gruppe an Stelle C-14 einen eher geringen Einfluss ausübt (Richter *et al.*, 2015). Eine fehlende Chlorierung am C4-Atom hatte auch im Zuge der Totalsynthese von 4-Dechloro-14-Deoxy-Oxacyclododecindion and 14-Deoxyoxacyclododecindion anhand

des inhibitorischen Potentials auf die TGF- β -stimulierte SMAD2/3-Signaltransduktion einen nachteiligen Effekt (Tauber, Rohr, Walter, Erkel, & Opatz, 2015). Auch die unterschiedliche räumliche Anordnung der Methylgruppe am Chiralitätszentrum C15 beeinflusst die Aktivität, wobei das (14S/15R)-Enantiomer der (14R/15S)-Konfiguration von 14-Deoxyoxacyclododecindion um den Faktor 26 überlegen war (Tauber *et al.*, 2016).

Um einen besseren Einblick in die SAR zwischen den Makrolactonen und ihren noch unbekanntem biologischen Zielstrukturen zu erhalten, wurden Derivate mit strukturellen Veränderungen zunächst an C14 durch die AG Opatz synthetisiert. Die Hydroxygruppe an C14 stellte bis dato ein Hemmnis bei der Totalsynthese dar und der Einbau einer zweiten Methylgruppe in dieser Position stellt eine Vereinfachung des Moleküls dar, da eines der beiden Stereozentren entfällt (Weber *et al.*, 2020). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Effekt der Addition einer weiteren Methylgruppe anstelle der Hydroxy-Gruppe am C-14-Atom untersucht. Im Vergleich zu den obig beschriebenen Literaturwerten des Naturstoffs, zeigte dieses Derivat [2] mit einem IC₅₀-Wert von 29 nM den bis dato potentesten inhibitorischen Effekt auf die SMAD2/3-abhängige Signaltransduktion (Tabelle 6). Der STAT6-abhängige Signalweg wies mit einer IC₅₀ von 82 nM eine etwas schwächere Wirkung im Vergleich zum Naturstoff auf. Dennoch scheint die Substitution der Hydroxylgruppe durch eine Methylgruppe insgesamt einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit zu haben, da auch die unchlorierte Form [1] einen stärkeren Effekt in Bezug auf SMAD2/3 als der Naturstoff aufwies (Tabelle 6). Geht man bei dem racemischen Gemisch von (\pm)-14-Deoxy-14-Methyl-Oxacyclododecindion [2] von einem ähnlichem Einfluss der optischen Aktivität wie im Falle der (14S/15R)- und (14R/15S)-Enantiomere von 14-Deoxyoxacyclododecindion aus, kann spekuliert werden, dass das (15R)-Enantiomer die Wirkung des Racemats noch übertrifft (Tauber *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2020).

Die 10,11-Doppelbindung im Lactonring und die Methylgruppe an C10 wurden bereits als essentielle Bereiche für die pharmakologische Wirkung beschrieben. Nachfolgend sollte untersucht werden, inwiefern sich durch Einbringung einer größeren Seitenkette die biologische Aktivität ändert. Der Ersatz der 13-Methylgruppe durch eine 13-Ethylgruppe im Falle des Gestagens Levonorgestrel steigerte dessen Potenz durch Erhöhung der Affinität für den Progesteronrezeptor (Tuba *et al.*, 2000). Die Substituierung mit einer Ethyl-Gruppe am C-10-Atom hatte gegenüber der Methylgruppe an gleicher Stelle eine stark verminderte Aktivität auf die SMAD2/3-Aktivität zur Folge, wohingegen die Wirkung auf die STAT6-Signaltransduktion lediglich um 43 % gemindert ist (Tabelle 6). Die verminderte Wirkung

könnte durch die erhöhte sterische Beeinflussung infolge der Ethylgruppe gegenüber einer Methylgruppe bedingt sein (Weber *et al.*, 2020).

Das Fehlen des Chlor-Substituenten an C-4 führte in großen Teilen zu einem signifikanten Verlust der Bioaktivität der Makrolactone vom Oxacyclododecindion-Typ. Zur weiteren Untersuchung wurde der Einfluss der Halogenierung mit den alternativen Substituenten Fluor und Brom anstelle von Chlor getestet. Die Substituierung mit Fluor und Brom am C-4-Atom zeigt eine Abschwächung der Wirkung gegenüber der C4-Chlorierung auf beide Signaltransduktionen, wobei sich die Halogenierung mit Brom [4] der durch Fluor [5] überlegen zeigt, und die Bromierung einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die STAT6-Signaltransduktion ausübte als das nicht-halogenierte Derivat [1] (Tabelle 6). Eine zusätzliche Halogenierung am C-6-Atom mit Chlor [7] oder Brom [6] führte zu einer weiteren Verringerung der Bioaktivität. Weiterführende Arbeiten identifizierten auch die Hydroxygruppen an Position 5 und 7 als für die Aktivität entscheidende Substituenten, da durch die jeweilige Methoxylierung eine Wirkung ausblieb (Kiefer, 2023). Insbesondere der Einfluss der C5-Hydroxgruppe erscheint in diesem Zusammenhang überraschend. Deng *et al.* (2019) fügten über diese Gruppe einen Alkin-Tag ein, um über eine Azid-Alkin-Klick-Cycloaddition potenzielle Interaktionspartner von Dehydrocurvularin zu identifizieren. Die Modifizierung der 5-OH-Gruppe hatte laut der Arbeitsgruppe kaum Einfluss auf die antitumorale Aktivität von Dehydrocurvularin. Als Zielprotein konnte so die ATP-Citrat-Lyase, welche unter ATP-Verbrauch die Produktion von Acetyl-CoA aus Citrat katalysiert, identifiziert werden (Z. Deng *et al.*, 2019). Eine Beteiligung der Inhibition der ATP-Citrat-Lyase an den beschriebenen antiinflammatorischen Effekten von Oxa und den daraus abgeleiteten Derivaten erscheint nicht sinnvoll, da eine Abschirmung der Hydroxygruppe an dieser Stelle die Wirksamkeit auf die untersuchten Signaltransduktionen von SMAD2/3 und STAT6 komplett entzieht (Kiefer, 2023).

4.5.4.1 DM-Oxa-Bead Pulldown

Vorarbeiten zur Identifizierung der Wirkungsweise von Oxacyclododecindion konnten inhibitorische Einflüsse einerseits auf Phosphorylierungen der MAPKs p38 und JNK, sowie der *upstream* befindlichen Kinasen MKK3/6 und TAK1 im nicht-kanonischen TGF- β -induzierten Signalweg identifizieren, sowie andererseits einen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Reduktion des I κ B-Abbaus und Hemmung der vorgeschalteten Kinasen p38 und TAK1 belegen (Rohr, 2018; A.-K. Rudolph, 2015). Die Derivatisierung von Oxacyclododecindion lieferte mit dem vollständig synthetisierbaren (\pm)-14-deoxy-14-methyl-oxacyclododecindion (DM-Oxa) einen Kandidaten, dessen Wirkung auf den TGF- β -induzierten SMAD2/3-abhängigen Signalweg sich als noch

potenter gegenüber dem Naturstoff erwies. Dieses wurde nachfolgend genutzt, um ein funktionelles Derivat zu synthetisieren, welches, gekoppelt mit einem *Agarose-Bead*-Säulenmaterial, die Identifizierung potenzieller Interaktionspartner ermöglichen sollte. Im vorherigen Abschnitt 4.5.4 wurde bereits beschrieben, dass einige pharmakophore Bereiche nicht als veränderbare Substituenten dienen, weshalb nun die C-15-Methylgruppe von DM-Oxa gewählt wurde, um eine Alkin-Gruppe anzufügen, was in der Verbindung DM-Oxa-Alkin resultierte. Die Arbeiten zur Funktionalisierung wurden durch Nina Vierengel von der AG Opatz (Institut für Organische Chemie, Uni Mainz) durchgeführt. Zur Verminderung eines potentiellen sterischen Einflusses wurde mit Linker-DM-Oxa ein Molekül synthetisiert, welches mit Azid-PEG(4)-Azid einen PEG-Spacer beinhaltet, der einerseits den physikalischen Abstand zur reaktiven Gruppe erhöhte, und andererseits eine weitere Azid-Alkin-Klick-Cycloaddition mit BCN-NHS-Ester funktionalisierten *CarboxyLink-Beads*TM ermöglichte. Die Bindung potentieller Interaktionspartner sollte initial vor der Zellyse stattfinden, weshalb der Einfluss von DM-Oxa-Alkin und Linker-DM-Oxa auf die SMAD2/3-Signaltransduktion untersucht wurde. Aufgrund der verminderten Wirkungen der Funktionalisierungen, insbesondere durch die Addition des Linkers mit einem Aktivitätsverlust um den Faktor 222 gegenüber DM-Oxa, wurde ein Ansatz mit Inkubation vollständig funktionalisierter *Beads* und nativem Proteinlysate gewählt. Die verminderte Aktivität der funktionalisierten Derivate in den Reporterassays kann im Umstand einer verringerten Membranpermeabilität, aufgrund der erhöhten molekularen Masse und einer veränderten Lipophilie, begründet sein (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 2012).

BEAS-2B-Zellen wurden für den Versuch einerseits mit Cytomix (CM), bestehend aus 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ und 5 ng/ml IL1- β , sowie andererseits mit 5 ng/mL TGF- β induziert. Als Kontrolle hierzu dienten unstimulierte Zellen. Das Lysat wurde jeweils mit nicht-funktionalisierten Kontroll-*Beads* inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu selektionieren, um nachfolgend die Inkubation des nichtpräzipitierten Überstandes mit den funktionalisierten DM-Oxa-*Beads* durchzuführen. Ein Teil der Proben wurde vor dieser Inkubation mit einem 50-fachen Überschuss an DM-Oxa behandelt, um eine weitere Kontrolle unspezifisch gebundener Proteine zu erhalten. Die Visualisierung der Proben aus Abbildung 56 verdeutlicht, dass durch die Prä-Inkubation mit den Kontroll-*Beads* ein Großteil unspezifisch-bindender Proteine abgefangen werden konnte. Auch durch die Konkurrenz mit DM-Oxa wird ein leicht differentes Bandenmuster ersichtlich. Nach der Elution der jeweilig gebundenen Proteine wurden diese für die massenspektroskopische Analyse vorbereitet. Als Grundlage zur Berechnung dienten die *label-free-quantification*-Daten (LFQ) durch MaxQuant (Cox & Mann, 2008), wobei der Vergleich der Daten ungepaart erfolgte. Die statistische

Auswertung wurde mit Hilfe der Software Plattform „Perseus“ durchgeführt (Tyanova et al., 2016). Zur Normalisierung wurde das Verhältnis der Gesamt-LFQs der Kontroll-*Bead*-Proben genutzt. Die Kriterien potentieller Zielproteine beinhalteten eine mindestens 2-fach angereicherte Bindung im Signifikanzniveau $p < 0,05$ induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads im Vergleich zur Bindung induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads bei Konkurrenz (A), im Vergleich zur Bindung induzierter Proteine an Kontroll-Beads (B) und im Vergleich zur Bindung nicht-induzierter Proteine an DM-Oxa-Beads (C) (vgl. Tabelle 7).

Von TGF- β induzierten Proteinen an DM-Oxa-*Beads* wurden 15 Proteine identifiziert, die gegenüber der Konkurrenz und Kontroll-*Beads* angereichert detektiert werden konnten, jedoch konnten diese nicht vermehrt in den stimulierten gegenüber unstimulierten Vergleichsproben quantifiziert werden. Im Gegensatz hierzu konnten zwei CM-stimulierte Proteine angereichert gegenüber allen drei Bedingungen identifiziert werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich zum einen um die im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Aminopeptidase ERAP-1. Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Spaltung von Ektodomänen von Zytokinrezeptoren, der Antigenprozessierung und -präsentation für MHC-Klasse-I-Moleküle, der Blutdruckregulierung sowie der Angiogenese (Goto *et al.*, 2019). Auch eine auf einen inflammatorischen Stimulus mit LPS und IFN- γ folgende Sekretion durch Makrophagen von ERAP-1 konnte bereits beobachtet werden (Goto *et al.*, 2014). ERAP-1 konnte ausschließlich in den mit Cytomix induzierten Proteinproben durch eine mögliche Interaktion mit DM-Oxa-*Beads* signifikant angereichert werden, jedoch nicht durch eine Stimulation mit TGF- β . ERAP-1, auch als *aminopeptidase regulator of TNFR shedding 1* (ARTS-1) bekannt, ist eine polyfunktionelle Zink-Metallopeptidase, die an der endgültigen Verarbeitung, Stabilität und den immunologischen Eigenschaften von Peptiden beteiligt ist, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden (Daryabor, Harsini, & Rezaei, 2018). ERAP-1, wie auch andere an der Antigenpräsentation beteiligte Proteine, wird in hohem Maße durch IFN- γ und TNF- α induziert, welche Bestandteile des Cytomix darstellen (Daryabor *et al.*, 2018; Saric *et al.*, 2002). ERAP-1 kann antigene Epitope einerseits zerstören und gleichzeitig Peptidvorstufen verarbeiten, um reife antigene Epitope für die Präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche zu erzeugen (Stratikos, 2014). Verschiedene *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien haben die Rolle von ERAP-1 bei der Regulation adaptiver Immunantworten nachgewiesen, weshalb ERAP-1 ein attraktives Target sowohl für die Krebsimmuntherapie als auch für die Kontrolle von Autoimmunreaktionen darstellt (Stamogiannos, Papakyriakou, Mauvais, Van Ender, & Stratikos, 2016; Stratikos, 2014). Eine Herunterregulierung von ERAP-1 durch verfügbare Inhibitoren verstärkt zytotoxische Reaktionen gegen Krebs und unterdrückt zelluläre Autoimmunreaktionen, wie eine IL-17-Sekretion, bei der chronisch entzündlichen

Erkrankung Morbus Bechterew (L. Chen *et al.*, 2016; Stratikos, 2014). Eine weitere Studie vermutet, dass ERAP-1 bei der unspezifischen Immunreaktion ähnlich wie *acute-phase*-Proteine agiert. LPS induzierte hier als inflammatorischer Stimulus die Sekretion von ERAP-1 ins Blut, um Peptide zu spalten, die N-terminales Arginin enthalten, welches dann durch iNOS als Substrat zur Synthese von NO dient (Goto *et al.*, 2019). Die Freisetzung von Zytokinrezeptoren durch *Shedding* ist eine weitere Funktion von ERAP-1. ERAP-1 wurde als Bindungsprotein für mehrere Zytokinrezeptoren identifiziert, darunter Typ 1 Tumornekrosefaktorrezeptor (TNF-R1), Interleukin-6-Rezeptor α (IL-6R α) und Typ 2 Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R2) (Goto *et al.*, 2019). Die Erzeugung von beispielsweise löslichen IL-6-Rezeptoren (sIL-6R α) stellt einen wichtigen Mechanismus dar, mit dem die IL-6-Signalisierung verstärkt werden kann. Lösliche IL-6-Rezeptoren binden IL-6 mit einer ähnlichen Affinität wie die Membran IL-6-Rezeptoren und verlängern so die Halbwertszeit von IL-6 (Cui, Rouhani, Hawari, & Levine, 2003). Natürlich könnte dies ein potentieller Mechanismus sein, bei dem DM-Oxa durch Inhibition von ERAP-1 die Erzeugung löslicher Zytokinrezeptoren und so eine Ausweitung der induktiven Wirkung mindert. Jedoch ist die Rolle von löslichen Zytokinrezeptoren divers, und sowohl agonistische, als auch antagonistische Rollen können Sie in der Signalübermittlung spielen (Lokau & Garbers, 2020).

Die Coproporphyrinogen-Oxidase (CPOX) ist gegenüber ERAP-1 geringer angereichert in CM-induzierten Proben und erfüllt das Signifikanzniveau nur knapp. Es fungiert als sechstes Enzym im Häm-Biosyntheseweg, und eine Bedeutung in Bezug auf inflammatorische Prozesse liegt laut Literatur nicht vor, weswegen die Interaktion mit funktionalisiertem DM-Oxa wohl nicht die antiinflammatorische Rolle von DM-Oxa erklärt (Stephenson *et al.*, 2007).

Interaktionen von DM-Oxa mit dem Zielprotein könnten zum einen Signaltransduktions-spezifisch durch die jeweilige Zytokin-Induktion ermöglicht werden, was in den Abbildungen Abbildung 57 und Abbildung 58 graphisch dargestellt wurde. Dies beinhaltet Interaktionen, die auf der Aktivierung der Signaltransduktionskaskade beruhen, wie beispielsweise eine potentielle Bindung an dimerisierte Transkriptionsfaktoren wie SMAD2/3 oder eine Bindung in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus eines Proteins. Eine Gruppe solcher Wirkstoffe, bilden Kinase-Inhibitoren (KI). Der Wirkmechanismus beruht, beispielsweise bei Typ 1 KI, auf einer kompetitiven Hemmung der ATP-Bindungsdomäne der aktiven, phosphorylierten Konformation (Dar & Shokat, 2011). Dies bedeutet, dass die Kinase-Aktivierung, welche upstream, beispielsweise mittels Stimulus erfolgte, die Bindung des KI ermöglichte. Einen Mechanismus von KI, welcher unabhängig eines Stimulus erfolgt, bilden sogenannte Typ 2 oder Typ 3 Kinase-Inhibitoren. Typ 2 KI binden außerhalb der ATP-

Bindedomäne die inaktive Konformation des Enzyms (Bhullar *et al.*, 2018). Typ 3 Kinase-Inhibitoren wirken allosterisch, nicht ATP-kompetitiv, und verhindern sowohl die Aktivierung der Kinase, als auch deren nachfolgende Kinase-Aktivität (Eglen & Reisine, 2011). Im Falle der Kinase-Inhibitoren Typ 2 und Typ 3, deren Wirkmechanismus nicht von einer vorherigen Modulation der Kinase durch einen Stimulus abhängig ist, wäre Kriterium C (Tabelle 7) nicht maßgebend. In findet sich die Darstellung von vier Proteinen, welche unter dieser Berücksichtigung das erforderliche Signifikanzniveau erreichten. RAB7A (RAs-related in Brain 7A), eine GTPase der Rab-Familie, ist als Hauptregulator des intrazellulären Verkehrs an der Steuerung von Prozessen wie Vesikelbildung, -transport und -fusion beteiligt, und steht in Verbindung mit der Regulierung von Signaltransduktionen (Zhiping Li *et al.*, 2023). RAB7A potenziert die NF- κ B-Aktivierung und interagiert mit TRAF6, um die TRAF6-Aktivität zu verstärken. In murinen B-Zellen wurde RAB7A zusammen mit TAK1 und TRAF6 Co-präzipitiert, und B-Zellen, die hohe Mengen an RAB7A exprimierten, zeigten eine Phosphorylierung der p65-Untereinheit an Ser532 von NF- κ B, einem Kennzeichen der NF- κ B-Aktivierung über den kanonischen Weg (Yan *et al.*, 2020). Ein wichtiger Weg der NF- κ B-Aktivierung führt über TRAF6, eine E3-Ubiquitin-Ligase, die an CD40- oder TLR-aktiviertes IRAK-1 rekrutiert wird und dann die Polyubiquitinierung über den Lys63-Rest (K63) von Ubiquitin katalysiert. Die K63-Polyubiquitinierung von TRAF6 führt zur Aktivierung von TAK1- und IKK γ -Kinasen, die beide IKK β im IKK α /IKK β -Komplex phosphorylieren können, was zu einer I κ B-Phosphorylierung und einem anschließenden I κ B-Abbau führt, was wiederum die Gentranskription von NF- κ B induziert (Adhikari, Xu, & Chen, 2007). Auch die Arbeitsgruppe von Romano *et al.* (2021) konnten eine reduzierte NF- κ B-Abundanz infolge der Herabregulierung von RAB7A feststellen, während die Überexpression von RAB7A im Vergleich zu Kontrollzellen nicht nur die NF- κ B-Proteinmenge, sondern auch die Kerntranslokation erhöhte. Die Phosphorylierung von I κ B bewirkt den Abbau von I κ B und die anschließende NF- κ B-Kerntranslokation. Möglicherweise ist die Wirkung auf NF- κ B auf die Aktivität der Proteinkinase AKT zurückzuführen, da I κ B ein AKT-Substrat darstellt. In diesem Zusammenhang konnten Romano *et al.* (2021) belegen, dass RAB7A die Phosphorylierung und somit die Aktivität von AKT reguliert, und eine durch RAB7A-Überexpression beobachtete erhöhte Vimentin-Phosphorylierung an Ser38 auf die Aktivität von AKT zurückzuführen ist (Romano *et al.*, 2021).

Im Zuge der Interaktion mit DM-Oxa ist dies durchaus interessant, da durch Rohr (2018) mittels Co-IP eine Interaktion von TRAF6 mit TAK1 und p38 nach Stimulation mit CM in der humanen Monocyten-Zelllinie THP-1 nachgewiesen werden konnte. Die Stimulation mit CM führte zu einer Anreicherung von p38 und TAK1 an präzipitiertem TRAF6. Die Behandlung mit 813 nM

Oxa reduzierte die induzierte Interaktion der untersuchten Proteine. Auch die Aktivitätsbeeinflussung von AKT durch RAB7A in Bezug auf die nicht-kanonische Signaltransduktion von TGF- β kann eine Erklärung für Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Oxa bieten, wo die Phosphorylierung von TAK1 downstream der Ligase TRAF6 den ersten Schritt der Inhibition der Signalkaskade durch Oxa darstellt (A.-K. Rudolph, 2015).

Prohibitin-1 und -2 (PHB1/2) sind pleiotrope Gerüstproteine, die an vielen wichtigen Zellfunktionen, wie Überleben, Proliferation, Stoffwechselfunktionen und mitochondrialer Dynamik beteiligt sind (D. Wang *et al.*, 2020). Die zahlreichen Funktionen von Prohibitin sind dabei abhängig von der subzellulären Lokalisierung. Obwohl PHB in erster Linie in den Mitochondrien lokalisiert ist, nimmt es auch eine extramitochondriale Rolle in Signalwegen wie Ras/MAPK/ERK, PI3K/Akt und TGF- β und STAT ein (Mishra, Ande, & Nyomba, 2010). PHB in den Membranen reguliert die zelluläre Signalübertragung des Membrantransports, PHB im Nukleus steuert die Transkriptionsaktivierung und den Zellzyklus, und der mitochondriale PHB-Komplex stabilisiert das mitochondriale Genom und moduliert die mitochondriale Dynamik, die mitochondriale Morphologie, die mitochondriale Biogenese und den mitochondrialen intrinsischen apoptotischen Weg (F. Zhang, Fan, & Mo, 2018).

Die Bindung von Wachstumsfaktoren an Tyrosinkinase-Rezeptoren löst eine Kaskade von Ereignissen aus, die den Ras/C-RAF/MEK/ERK-Signalweg zur Förderung der Tumorentwicklung induzieren (D. Wang *et al.*, 2020). PHB1 ist an der Regulierung des Ras vermittelten Raf-MEK-ERK-Signalwegs beteiligt, da eine Aktivierung der Proteinkinase C-RAF durch das Proto-Onkogen RAS eine direkte Interaktion von PHB mit C-RAF erfordert. Diese ERK-Aktivität wird auch durch verschiedene Rocaglamid-Derivate in malignen Zellen herunterreguliert. Das Flavaglin Rocaglimide inhibiert die PHB/CRAF-vermittelte Aktivierung des MEK-ERK-Signalwegs, was zu einer Hemmung der Proteinsynthese, der Zellzyklusprogression und der Zellproliferation in malignen Zellen führt (Polier *et al.*, 2012). Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass Flavagline den kanonischen NF- κ B-Signalweg in Jurkat-T-Zellen in nanomolarer Konzentration hemmen (Baumann *et al.*, 2002). PHB wird auch mit Lungenerkrankungen, einschließlich Lungenfibrose, in Verbindung gebracht. In einem Zellmodell der akuten Lungenverletzung waren mRNA- und Proteinexpressionswerte von PHB1 und PHB2 in mit LPS stimulierten murinen Alveolarepithelzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, und eine durch LPS-Induktion erhöhte IL-6-Konzentration war mit der Hochregulierung von PHB verbunden (F. Zhang *et al.*, 2018). Andererseits schützt beispielsweise eine Überexpression von PHB kultivierte intestinale Epithelzellen vor

mitochondrialem Stress und Apoptose, induziert durch TNF- α . Die Interaktion von PHB mit mitochondrialem STAT3 verhindert dabei die für chronisch entzündliche Darmerkrankungen charakteristische mitochondriale Dysfunktion von Epithelzellen (Han, Yu, Souza, & Theiss, 2014). Angesichts der pleiotropen Wirkungen von PHB je nach Krankheitsbild und Zelltypus wäre eine bestätigte Interaktion von DM-Oxa mit diesem Protein schwierig in Bezug auf eine therapeutische Nutzbarkeit anzusehen.

Auch die vermehrt identifizierte Glutathion-Transferase-Omega-1 ist an der Modulation wichtiger pathophysiologischer Prozesse, wie dem Überleben von Krebszellen und Entzündungen, beteiligt. So wurde beispielsweise durch Menon *et al.* (2017) gezeigt, dass GSTO1-1 die proinflammatorische LPS/TLR-4-induzierte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in Makrophagen modulieren kann. Die LPS-stimulierte Entzündungsreaktion von Makrophagen über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) Signalweg durch NF κ B erzeugt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Ein Knockdown von GSTO1-1 reduziert die stimulierte Erzeugung von ROS und blockiert die nukleäre Translokation von NF- κ B (Menon, Coll, O'Neill, & Board, 2014). Oxa konnte die LPS-stimulierte TLR4-abhängige NF- κ B-vermittelte Luciferaseexpression in der Monocyten-Zelllinie MM6 im nanomolaren Bereich inhibieren (Rohr, 2018).

Ebenso spielt PRDX1 eine Rolle bei der inflammatorischen Reaktion, indem es die TLR4-abhängige Zytokinsekretion von Makrophagen und dendritischen Zellen stimuliert. Extrazelluläres PRDX1 kann als *damage-associated molecular pattern* (DAMP) wirken, um die TLR4-abhängige Sekretion von TNF- α und IL-6, sowie die Reifung dendritischer Zellen auszulösen, wenn es mit murinen Makrophagen oder unreifen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark inkubiert wird (Riddell, Wang, Munderman, & Gollnick, 2010). Mullen *et al.* (2015) belegten die Freisetzung von PRDX1 und PRDX2 von verschiedenen Zellen durch Exposition gegenüber LPS oder TNF- α und die Produktion weiterer inflammatorischer Zytokine durch freigesetztes PRDX.

Generell bedürfen die Ergebnisse dieses *Pulldown*-Versuches weiterführende und verifizierende Analysen, wie beispielsweise die Durchführung reverser Experimente zur Bestätigung etwaiger Interaktionen. Auch die Versuchsdurchführung selbst birgt einige Schritte, welche die Aussagekraft der Ergebnisse minimieren. So ist beispielsweise die Stringenz der Waschschritte ein entscheidender Punkt, welche, abhängig von der Art der Bindung von DM-Oxa mit dem Zielprotein beeinflusst werden könnte. Auch die Anbringung des Linkers an DM-Oxa könnte möglicherweise die Interaktion mit dem Zielprotein sterisch hindern. Die Untersuchungen mit DM-Oxa-Alkin und Linker-DM-Oxa resultierten in einer

erheblich verminderten Aktivität gegenüber DM-Oxa, welche einerseits auf eine beeinträchtigte Membranpermeabilität zurückzuführen sein könnte, jedoch auch modulierte Bindungseigenschaften hervorrufen könnte (vgl. Abbildung 54). Der Versuch zur Identifizierung von Zielproteinen von DM-Oxa wurde in weiteren Folgeversuchen von Anna Kiefer, einerseits mithilfe eines Biotin-Streptavidin Pulldowns mit DM-Oxa-Alkin um eine sterische Hinderung zu umgehen, sowie andererseits mittels eines an DM-Oxa angebrachten photoaktivierbaren Linker, welcher nachfolgend eine kovalente Bindung mit dem Zielprotein eingehen kann und eine mögliche schwache Affinität zum Zielprotein überwindet, eruiert. Die Variabilität solcher Versuchsanordnungen zeigte sich auch hier mit unterschiedlichen möglichen Interaktionspartnern für DM-Oxa. Darüber hinaus können viele Faktoren die Genauigkeit der quantitativen Proteomik beeinflussen, darunter die Art des quantitativen Arbeitsablaufs, die Geräteparameter, die Anzahl der Replikate und der statistische Ansatz. Herausforderungen der LFQ wie Inkonsistenzen von Lauf zu Lauf bei der Peptididentifizierung und -quantifizierung sowie fehlende Peptidintensitäten, insbesondere bei Proteinen und Peptiden mit geringer Häufigkeit in den Proben, können sich negativ auf nachgelagerte statistische Analysen auswirken (Dupree *et al.*, 2020).

5 Literaturverzeichnis

- Adhikari, A., Xu, M., & Chen, Z. J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*, *26*(22), 3214–3226. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210413>
- Adwankar, M. K., Chitnis, M. P., Khandalekar, D. D., & Bhadsavale, C. G. (1980). Anti-cancer activity of the extracts of *Rubia cordifolia* Linn. *Indian J Exp Biol*.
- Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, *71*(10), 1397–1421.
- Ahmadi, Z., Hassanshahi, G., Khorramdelazad, H., Zainodini, N., & Koochakzadeh, L. (2016). An Overlook to the Characteristics and Roles Played by Eotaxin Network in the Pathophysiology of Food Allergies: Allergic Asthma and Atopic Dermatitis. *Inflammation*, *39*(3), 1253–1267. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0303-9>
- Åkerblom, M., & Jakobsson, J. (2014). MicroRNAs as neuronal fate determinants. *The Neuroscientist*, *20*(3), 235–242.
- Akhtar, M. N., Zareen, S., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Lo, K. M., Hasan, A., & Alitheen, N. B. (2013). Total synthesis, cytotoxic effects of damnacanthal, nordamnacanthal and related anthraquinone analogues. *Molecules*, *18*(8), 10042–10055. <https://doi.org/10.3390/molecules180810042>
- Alam, A. K., Suzuki, H., & Tsukahara, T. (2010). Retinoic acid treatment and cell aggregation independently regulate alternative splicing in P19 cells during neural differentiation. *Cell Biology International*, *34*(6), 631–643. <https://doi.org/10.1042/cbi20090332>
- Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N 6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, *519*(7544), 482–485.
- Allard, B., Levardon, H., Esteves, P., Celle, A., Maurat, E., Thumerel, M., ... Berger, P. (2020). Asthmatic Bronchial Smooth Muscle Increases CCL5-Dependent Monocyte Migration in Response to Rhinovirus-Infected Epithelium. *Frontiers in Immunology*, *10*(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02998>
- Allard, S. T. M., & Kopish, K. (2008). Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes*, *21*, 23–26.
- Aly, A. H., Debbab, A., Clements, C., Edrada-Ebel, R., Orlikova, B., Diederich, M., ... Proksch, P. (2011). NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *19*(1), 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.11.012>
- Antarkar, D. S., Chinwalla, T. S., Bhatt, N. S., & Vaiya, A. B. (1983). Anti-inflammatory activity of *rubia cordifolia* linn. *Indian Journal of Pharmacology*, Vol. 15. Pp. 185, 1983, 15, 1983.
- Antarkar, S. S., Chinwalla, T., Bhatt, N., & others. (1983). Anti-inflammatory activity of *Rubia cordifolia* Linn. in rats. *Indian J Pharmacol*, *15*(3), 185–188.
- Armstrong, L., Hughes, O., Yung, S., Hyslop, L., Stewart, R., Wappler, I., ... Lako, M. (2006). The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFκβ signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Human Molecular Genetics*, *15*(11), 1894–1913. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl112>
- Auld, D. S., & Inglese, J. (2018). Interferences with Luciferase Reporter Enzymes. *Assay Guidance Manual*, *1*(Md), 1–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27478246>
- Auld, D. S., Southall, N. T., Jadhav, A., Johnson, R. L., Diller, D. J., Simeonov, A., ... Inglese, J. (2008). Characterization of chemical libraries for luciferase inhibitory activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*(8), 2372–2386.
- Baillif, B., Wichard, J., Méndez-Lucio, O., & Rouquié, D. (2020). Exploring the Use of Compound-Induced Transcriptomic Data Generated From Cell Lines to Predict Compound Activity Toward Molecular Targets. *Frontiers in Chemistry*, *8*(April).

- <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00296>
- Bain, G., Ray, W. J., Yao, M., & Gottlieb, D. I. (1994). From embryonal carcinoma cells to neurons: The P19 pathway. *BioEssays*, *16*(5), 343–348.
<https://doi.org/10.1002/bies.950160509>
- Ballas, N., & Mandel, G. (2005). The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(5), 500–506.
- Balzer, E., Heine, C., Jiang, Q., Lee, V. M., & Moss, E. G. (2010). LIN28 alters cell fate succession and acts independently of the let-7 microRNA during neurogenesis in vitro. *Development*, *137*(6), 891–900. <https://doi.org/10.1242/dev.042895>
- Bao, L., Qin, L., Liu, L., Wu, Y., Han, T., Xue, L., & Zhang, Q. (2011). Anthraquinone compounds from *Morinda officinalis* inhibit osteoclastic bone resorption in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, *194*(2–3), 97–105.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.08.013>
- Barbera, M. J., Puig, I., Dominguez, D., Julien-Grille, S., Guaita-Esteruelas, S., Peiro, S., ... others. (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene*, *23*(44), 7345–7354.
- Barnes, P. J. (2011). Similarities and differences in inflammatory mechanisms of asthma and COPD. *Breathe*, *7*(3), 229–238. <https://doi.org/10.1183/20734735.026410>
- Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (1998). Transcription factors and asthma. *European Respiratory Journal*, *12*(1), 221–234. <https://doi.org/10.1183/09031936.98.12010221>
- Barnes, Peter J. (2009). The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *41*(6), 631–638.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0220TR>
- Barnes, Peter J. (2018). Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*, *18*(7), 454–466.
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0006-6>
- Barnes, Peter J., & Adcock, I. M. (1997). NF- κ B: A pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, *18*(2), 46–50.
[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(97\)89796-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(97)89796-9)
- Baumann, B., Bohnenstengel, F., Siegmund, D., Wajant, H., Weber, C., Herr, I., ... Wirth, T. (2002). Rocaglamide derivatives are potent inhibitors of NF- κ B activation in T-cells. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 44791–44800.
- Bellenchi, G. C., Volpicelli, F., Piscopo, V., Perrone-Capano, C., & Di Porzio, U. (2013). Adult neural stem cells: An endogenous tool to repair brain injury? *Journal of Neurochemistry*, *124*(2), 159–167. <https://doi.org/10.1111/jnc.12084>
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2011). DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem Cell Research and Therapy*, *2*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1186/scrt83>
- Berkman, N., Ohnona, S., Chung, F. K., & Breuer, R. (2001). Eotaxin-3 but not eotaxin gene expression is upregulated in asthmatics 24 hours after allergen challenge. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *24*(6), 682–687.
<https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.6.4301>
- Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*, *17*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>
- Bian, W., Yang, J., Tang, K., & Jing, N. H. (1999). Nestin expression during P19 neuron differentiation. *Acta Physiologica Sinica*, *51*(3), 246–252. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/11498984>
- Bindu A, H., & B, S. (2011). Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, *01*(03), 1–6.
<https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000115>
- Bingsen, X. U., Zhang, K., & Huang, Y. (2009). Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. *Rna*, *15*(3),

- 357–361. <https://doi.org/10.1261/rna.1368009>
- Boer, B., Kopp, J., Mallanna, S., Desler, M., Chakravarthy, H., Wilder, P. J., ... Rizzino, A. (2007). Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Research*, *35*(6), 1773–1786. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm059>
- Boissart, C., Nissan, X., Giraud-Triboulet, K., Peschanski, M., & Benchoua, A. (2012). MiR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development*, *139*(7), 1247–1257. <https://doi.org/10.1242/dev.073627>
- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., ... Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, *122*(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Bratt-Leal, A. M., Carpenedo, R. L., & McDevitt, T. C. (2009). Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnology Progress*, *25*(1), 43–51.
- Brennan, G. P., & Henshall, D. C. (2020). MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0369-8>
- Breuss, M. W., Leca, I., Gstrein, T., Hansen, A. H., & Keys, D. A. (2017). Tubulins and brain development--The origins of functional specification. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *84*, 58–67.
- Breving, K., & Esquela-Kerscher, A. (2010). The complexities of microRNA regulation: Mirandering around the rules. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *42*(8), 1316–1329. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.09.016>
- Brightling, C., Berry, M., & Amrani, Y. (2008). Targeting TNF- α : A novel therapeutic approach for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(1), 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.10.028>
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva De Sousa Lopes, S. M., ... Vallier, L. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, *448*(7150), 191–195. <https://doi.org/10.1038/nature05950>
- Brumbaugh, J., Hou, Z., Russell, J. D., Howden, S. E., Yu, P., Ledvina, A. R., ... Thomson, J. A. (2012). Phosphorylation regulates human OCT4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(19), 7162–7168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203874109>
- Burdon, T., Smith, A., & Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology*, *12*(9), 432–438.
- Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, *380*(6569), 64–66. <https://doi.org/10.1038/380064a0>
- Canzoniero, L. M. T., Sensi, S. L., Turetsky, D. M., Finley, M. F. A., Choi, D. W., & Huettner, J. E. (1996). Glutamate receptor-mediated calcium entry in neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells. *Journal of Neuroscience Research*, *45*(3), 226–236.
- Carey, M. F., Peterson, C. L., & Smale, S. T. (2009). ChIP Protocol. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2009*(9), 1–14. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5279>
- Casey, S. G., Veale, D. R., & Smith, H. (1983). Cytotoxicity of *Neisseria gonorrhoeae* for human peripheral blood phagocytes. *Microbiology*, *129*(4), 1097–1102.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, *113*(5), 643–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., ... Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, *450*(7173), 1230–1234. <https://doi.org/10.1038/nature06403>
- Charo, I. F., & Ransohoff, R. M. (2006). The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *New England Journal of Medicine*, *354*(6), 610–621.

- <https://doi.org/10.1056/nejmra052723>
- Chatagnon, A., Veber, P., Morin, V., Bedo, J., Triqueneaux, G., Sémon, M., ... Benoit, G. (2015). RAR/RXR binding dynamics distinguish pluripotency from differentiation associated cis-regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, *43*(10), 4833–4854. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv370>
- Chen, G., Guo, Y., Li, C., Li, S., & Wan, X. (2020). Small Molecules that Promote Self-Renewal of Stem Cells and Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cell Reviews and Reports*, *16*(3), 511–523. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09965-w>
- Chen, G., Xu, X., Zhang, L., Fu, Y., Wang, M., Gu, H., & Xie, X. (2014). Blocking autocrine VEGF signaling by sunitinib, an anti-cancer drug, promotes embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Cell Research*, *24*(9), 1121–1136. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.112>
- Chen, J., & Li, Q. (2016). Implication of retinoic acid receptor selective signaling in myogenic differentiation. *Scientific Reports*, *6*(October 2015), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep18856>
- Chen, K., Gao, T., Bai, Z., & Yuan, Z. (2018). Circulating APP, NCAM and Aβ serve as biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain Research*, *1699*, 117–120.
- Chen, L., Ridley, A., Hammitzsch, A., Al-Mossawi, M. H., Bunting, H., Georgiadis, D., ... Bowness, P. (2016). Silencing or inhibition of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) suppresses free heavy chain expression and Th17 responses in ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *75*(5), 916–923.
- Chen, S., Do, J. T., Zhang, Q., Yao, S., Yan, F., Peters, E. C., ... Ding, S. (2006). Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(46), 17266–17271. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608156103>
- Chen, T., He, S., Zhang, Z., Gao, W., Yu, L., & Tan, Y. (2014). Foxa1 contributes to the repression of Nanog expression by recruiting Grg3 during the differentiation of pluripotent P19 embryonal carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, *326*(2), 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.04.020>
- Chen, X., Ye, S., & Ying, Q. L. (2015). Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: Past, current and future. *BMB Reports*, *48*(12), 668–676. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.12.215>
- Cheng, L., Hu, W., Qiu, B., Zhao, J., Yu, Y., Guan, W., ... Pei, G. (2014). Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Research*, *24*(6), 665–679.
- Chien, S.-C., Wu, Y.-C., Chen, Z.-W., Yang, W.-C., & others. (2015). Naturally occurring anthraquinones: chemistry and therapeutic potential in autoimmune diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Chitsaz, R., Zarezadeh, A., Asgarpanah, J., Najafizadeh, P., & Mousavi, Z. (2023). Rubiadin exerts an acute and chronic anti-inflammatory effect in rodents. *Brazilian Journal of Biology*, *83*, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.243775>
- Cho, Y., Kang, H. G., Kim, S. J., Lee, S., Jee, S., Ahn, S. G., ... Chun, K. H. (2018). Post-translational modification of OCT4 in breast cancer tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation*, *25*(10), 1781–1795. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0079-6>
- Cohen, D. E., & Melton, D. (2011). Turning straw into gold: Directing cell fate for regenerative medicine. *Nature Reviews Genetics*, *12*(4), 243–252. <https://doi.org/10.1038/nrg2938>
- Coleman, J. M., Naik, C., Holguin, F., Ray, A., Ray, P., Trudeau, J. B., & Wenzel, S. E. (2012). Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: Relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. *Thorax*, *67*(12), 1061–1066. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-201634>
- Conaco, C., Otto, S., Han, J. J., & Mandel, G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(7), 2422–2427.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0511041103>
- Coolen, M., Katz, S., & Bally-Cuif, L. (2013). miR-9: A versatile regulator of neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00220>
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367.
- Crawford, T. Q., & Roelink, H. (2007). The Notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of Sonic Hedgehog signaling. *Developmental Dynamics*, 236(3), 886–892. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21083>
- Cui, X., Rouhani, F. N., Hawari, F., & Levine, S. J. (2003). An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28677–28685.
- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). *Cummings, Jeffrey L_Alzheimer's_drug development candidates failures_2014*. 1–7.
- Dahéron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, W. M., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J., & Daley, G. Q. (2004). LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22(5), 770–778.
- Dahlstrand, J., Lardelli, M., & Lendahl, U. (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Developmental Brain Research*, 84(1), 109–129.
- Dar, A. C., & Shokat, K. M. (2011). The Evolution of Protein Kinase Inhibitors from Antagonists to Agonists of Cellular Signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 769–795. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-090308-173656>
- Darr, H., & Benvenisty, N. (2009). Genetic Analysis of the Role of the Reprogramming Gene LIN-28 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 27(2), 352–362. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0720>
- Darras, B. T., Chiriboga, C. A., Iannaccone, S. T., Swoboda, K. J., Montes, J., Mignon, L., ... De Vivo, D. C. (2019). Nusinersen in later-onset spinal muscular atrophy: Long-term results from the phase 1/2 studies. *Neurology*, 92(21), e2492–e2506. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007527>
- Daryabor, G., Harsini, S., & Rezaei, N. (2018). Immunopathogenesis of ankylosing spondylitis: An updated review. *Acta Medica Iranica*, 56(4), 214–225.
- Das, V., Bhattacharya, S., Chikkaputtaiah, C., Hazra, S., & Pal, M. (2019). The basics of epithelial–mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 14535–14555. <https://doi.org/10.1002/jcp.28160>
- Davis, R. H., Agnew, P. S., & Shapiro, E. (1986). Antiarthritic activity of anthraquinones found in aloe vera for podiatric medicine. *J Am Podiatr Med Assoc*, 76(2), 1–8.
- De Los Angeles, A., & Daley, G. Q. (2013). A chemical logic for reprogramming to pluripotency. *Cell Research*, 23(12), 1337–1338. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.119>
- De Moliner, E., Moro, S., Sarno, S., Zagotto, G., Zanotti, G., Pinna, L. A., & Battistutta, R. (2003). Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone-related compounds: A structural insight. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1831–1836. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209367200>
- De Pietri Tonelli, D., Pulvers, J. N., Haffner, C., Murchison, E. P., Hannon, G. J., & Huttner, W. B. (2008). *miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex*.
- Delalay, C., & Gao, F. B. (2010). A new role for microRNA-9 in human neural progenitor cells. *Cell Cycle*, 9(15), 2913–2914. <https://doi.org/10.4161/cc.9.15.12699>
- Deng, X., Xu, M., Yuan, C., Yin, L., Chen, X., Zhou, X., ... Pang, L. (2013). Transcriptional

- regulation of increased CCL2 expression in pulmonary fibrosis involves nuclear factor- κ B and activator protein-1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(7), 1366–1376. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.003>
- Deng, Z., Wong, N. K., Guo, Z., Zou, K., Xiao, Y., & Zhou, Y. (2019). Dehydrocurvularin is a potent antineoplastic agent irreversibly blocking ATP-citrate lyase: Evidence from chemoproteomics. *Chemical Communications*, 55(29), 4194–4197. <https://doi.org/10.1039/c9cc00256a>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Di Masi, A., Leboffe, L., De Marinis, E., Pagano, F., Cicconi, L., Rochette-Egly, C., ... Nervi, C. (2015). Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine*, 41, 1–115. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.12.003>
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., ... Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321(5893), 1218–1221. <https://doi.org/10.1126/science.1158799>
- Divakar, K., Pawar, A. T., Chandrasekhar, S. B., Dighe, S. B., & Divakar, G. (2010). Protective effect of the hydro-alcoholic extract of *Rubia cordifolia* roots against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(4), 1013–1018.
- Do, M. T., Hwang, Y. P., Kim, H. G., Na, M., & Jeong, H. G. (2013). Mollugin inhibits proliferation and induces apoptosis by suppressing fatty acid synthase in HER2-overexpressing cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 228(5), 1087–1097.
- Doerner, A. M., & Zuraw, B. L. (2009). TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1 β but not abrogated by corticosteroids. *Respiratory Research*, 10, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-100>
- Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13(5), 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.08.012>
- Don-Doncow, N., Escobar, Z., Johansson, M., Kjellström, S., Garcia, V., Munoz, E., ... Hellsten, R. (2014). Galiellalactone is a direct inhibitor of the transcription factor STAT3 in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 15969–15978. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.564252>
- Dosseh, C., Tessier, A. M., & Delaveau, P. (1981). New quinones in *Rubia cordifolia* L. Roots, III. *Planta Medica*, 43(4), 360–366.
- Dreesen, O., & Brivanlou, A. H. (2007). Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews*, 3(1), 7–17. <https://doi.org/10.1007/s12015-007-0004-8>
- Dupree, E. J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B. A., & Darie, C. C. (2020). A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and the future of this field. *Proteomes*, 8(3), 1–26. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>
- Dutta, D., Ray, S., Home, P., Larson, M., Wolfe, M. W., & Paul, S. (2011). Self-renewal versus lineage commitment of embryonic stem cells: protein kinase C signaling shifts the balance. *Stem Cells*, 29(4), 618–628.
- Edwards, M. R., Bartlett, N. W., Hussell, T., Openshaw, P., & Johnston, S. L. (2012). The microbiology of asthma. *Nature Reviews Microbiology*, 10(7), 459–471. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2801>
- Eglen, R., & Reisine, T. (2011). Drug discovery and the human kinome: Recent trends. *Pharmacology and Therapeutics*, 130(2), 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.007>
- Endo, M., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2009). Cdc42-mTOR signaling pathway controls Hes5 and Pax6 expression in retinoic acid-dependent neural differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 5107–5118. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807745200>

- Erkel, G., Wisser, G., & Anke, T. (2007). Influence of the fungal NF- κ B inhibitor panepoxydone on inflammatory gene expression in MonoMac6 cells. *International Immunopharmacology*, 7(5), 612–624. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.01.001>
- Erkel, Gerhard, Anke, T., & Sterner, O. (1996). Inhibition of NF- κ B activation by panepoxydone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(1), 214–221.
- Erkel, Gerhard, Belahmer, H., Serwe, A., Anke, T., Kunz, H., Kolshorn, H., ... Opatz, T. (2008). Oxacyclododecindione, a novel inhibitor of IL-4 signaling from *Exserohilum rostratum*. *Journal of Antibiotics*, 61(5), 285–290. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.40>
- Fanarraga, M. L., Avila, J., & Zabala, J. C. (1999). Expression of unphosphorylated class III β -tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *European Journal of Neuroscience*, 11(2), 516–527. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00459.x>
- Fenwick, P. S., Macedo, P., Kilty, I. C., Barnes, P. J., & Donnelly, L. E. (2015). Effect of JAK inhibitors on release of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 from human airway epithelial cells. *PLoS One*, 10(6), e0128757.
- Folmer, F., Jaspars, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2008). Marine natural products as targeted modulators of the transcription factor NF- κ B. *Biochemical Pharmacology*, 75(3), 603–617.
- Fong, C. Y., Gauthaman, K., & Bongso, A. (2010). Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(4), 769–781. <https://doi.org/10.1002/jcb.22775>
- Fosso, M. Y., Chan, K. Y., Gregory, R., & Chang, C.-W. T. (2012). Library synthesis and antibacterial investigation of cationic anthraquinone analogs. *ACS Combinatorial Science*, 14(3), 231–235.
- Foster, P. S., Maltby, S., Rosenberg, H. F., Tay, H. L., Hogan, S. P., Collison, A. M., ... Mattes, J. (2017). Modeling T H 2 responses and airway inflammation to understand fundamental mechanisms regulating the pathogenesis of asthma. *Immunological Reviews*, 278(1), 20–40. <https://doi.org/10.1111/imr.12549>
- Freudlsperger, C., Burnett, J. R., Friedman, J. A., Kannabiran, V. R., Chen, Z., & Van Waes, C. (2011). EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: Attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(1), 63–74. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.541440>
- Furness, J. B. (2006). *The enteric nervous system* (Vol. 13). Wiley Online Library.
- Gandhi, N. A., Bennett, B. L., Graham, N. M. H., Pirozzi, G., Stahl, N., & Yancopoulos, G. D. (2016). Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(1), 35–50. <https://doi.org/10.1038/nrd4624>
- Gautam, R., & Jachak, S. M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*, 29(5), 767–820.
- Gauthier, M., Chakraborty, K., Oriss, T. B., Raundhal, M., Das, S., Chen, J., ... Ray, A. (2017). Severe asthma in humans and mouse model suggests a CXCL10 signature underlies corticosteroid-resistant Th1 bias. *JCI Insight*, 2(13), 1–17. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94580>
- Ghorbani, R., Emamzadeh, A., Khazaie, V., Dormiani, K., Ghaedi, K., Rabbani, M., ... Esfahani, M. H. N. (2013). Constructing a mouse Oct4 promoter/EGFP vector, as a whole-cellular reporter to monitor the pluripotent state of cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 5(1), 2–9.
- Ginçberg, G., Arien-zakay, H., Lazarovici, P., & Lelkes, P. I. (2012). *Neural stem cells: therapeutic potential for neurodegenerative diseases*. 7–19. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds024>
- Gong, X.-P., Sun, Y.-Y., Chen, W., Guo, X., Guan, J.-K., Li, D.-Y., & Du, G. (2017). Anti-diarrheal and anti-inflammatory activities of aqueous extract of the aerial part of *Rubia cordifolia*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–9.

- Gonzalo, J.-A., Lloyd, C. M., Wen, D., Albar, J. P., Wells, T. N. C., Proudfoot, A., ... others. (1998). The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *The Journal of Experimental Medicine*, *188*(1), 157–167.
- Gordeeva, O. (2019). TGF β Family Signaling Pathways in Pluripotent and Teratocarcinoma Stem Cells' Fate Decisions: Balancing Between Self-Renewal, Differentiation, and Cancer. *Cells*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/cells8121500>
- Goto, Y., Nakamura, T. J., Ogawa, K., Hattori, A., & Tsujimoto, M. (2019). Acute-phase protein-like properties of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. *Journal of Biochemistry*, *165*(2), 159–165. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy090>
- Goto, Y., Ogawa, K., Nakamura, T. J., Hattori, A., & Tsujimoto, M. (2014). TLR-Mediated Secretion of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 from Macrophages. *The Journal of Immunology*, *192*(9), 4443–4452. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300935>
- Gudas, L. J., & Wagner, J. A. (2011). Retinoids regulate stem cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, *226*(2), 322–330. <https://doi.org/10.1002/jcp.22417>
- Gui, T., Sun, Y., Shimokado, A., & Muragaki, Y. (2012). The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of Signal Transduction*, *2012*(type I), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/289243>
- Gupta, P., Ho, P. C., Huq, M. D. M., Sung, G. H., Sung, W. P., Amjad, A. K., ... Wei, L. N. (2008). Retinoic acid-stimulated sequential phosphorylation, PML recruitment, and SUMOylation of nuclear receptor TR2 to suppress Oct4 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(32), 11424–11429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710561105>
- Gurdon, J. B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*, *4*(2), 256–273.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Ha, T.-Y. (2011). MicroRNAs in human diseases: from cancer to cardiovascular disease. *Immune Network*, *11*(3), 135–154.
- Hagl, C. I., Heumüller-Klug, S., Wink, E., Wessel, L., & Schäfer, K. H. (2013). The Human Gastrointestinal Tract, a Potential Autologous Neural Stem Cell Source. *PLoS ONE*, *8*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072948>
- Hallstrand, T. S., Hackett, T. L., Altemeier, W. A., Matute-Bello, G., Hansbro, P. M., & Knight, D. A. (2014). Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clinical Immunology*, *151*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.12.003>
- Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H., & Hamid, Q. (2011). Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *44*(2), 127–133. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0027TR>
- Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2021). The basic immunology of asthma. *Cell*, *184*(6), 1469–1485. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.016>
- Han, J., Yu, C., Souza, R. F., & Theiss, A. L. (2014). Prohibitin 1 modulates mitochondrial function of Stat3. *Cellular Signalling*, *26*(10), 2086–2095.
- Hanh, T. T. H., Hang, D. T. T., Van Minh, C., & Dat, N. T. (2011). Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *4*(10), 760–763. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60189-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60189-2)
- He, Y. Q., Zhang, Q., Shen, Y., Han, T., Zhang, Q. L., Zhang, J. H., ... Zhang, Q. Y. (2018). Rubiadin-1-methyl ether from *Morinda officinalis* How. Inhibits osteoclastogenesis through blocking RANKL-induced NF- κ B pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *506*(4), 927–931. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.100>
- Henig, I., & Zuckerman, T. (2014). Hematopoietic stem cell transplantation—50 years of evolution and future perspectives. *Rambam Maimonides Medical Journal*, *5*(4).
- Henke, J. (2014). *Analyse der Wirkung des Naturstoffes Oxacyclododecindion in einem*

- chronisch-entzündlichen Krankheitsmodell*. Johannes-Gutenberg Universität Mainz.
- Henke, J., Erkel, G., Brochhausen, C., Kleinert, H., Schwarting, A., Menke, J., & Pautz, A. (2014). The fungal lactone oxacyclododecandione is a potential new therapeutic substance in the treatment of lupus-associated kidney disease. *Kidney International*, *86*(4), 780–789. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.109>
- Heo, I., Joo, C., Kim, Y. K., Ha, M., Yoon, M. J., Cho, J., ... Kim, V. N. (2009). TUT4 in Concert with Lin28 Suppresses MicroRNA Biogenesis through Pre-MicroRNA Uridylation. *Cell*, *138*(4), 696–708. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.002>
- Heo, J. S., Lee, Y. J., & Han, H. J. (2006). EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺ influx and p44/42 MAPKs. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *290*(1), C123–C133.
- Heurtier, V., Owens, N., Gonzalez, I., Mueller, F., Proux, C., Mornico, D., ... Navarro, P. (2019). The molecular logic of Nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09041-z>
- Hiratochi, M., Nagase, H., Kuramochi, Y., Koh, C. S., Ohkawara, T., & Nakayama, K. (2007). The Delta intracellular domain mediates TGF- β /Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway. *Nucleic Acids Research*, *35*(3), 912–922. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1128>
- Höpfl, G., Gassmann, M., & Desbaillets, I. (2004). Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies. In *Germ Cell Protocols* (pp. 79–98). Springer.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., ... Deng, H. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, *341*(6146), 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1239278>
- Hu, B. Y., Weick, J. P., Yu, J., Ma, L. X., Zhang, X. Q., Thomson, J. A., & Zhang, S. C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(9), 4335–4340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910012107>
- Hu, C., & Li, X. (2020). Gene therapeutic strategies and relevant clinical trials in neuromuscular disorder in China. *Gene Therapy*, (399). <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0158-4>
- Hua, Y., Sahashi, K., Hung, G., Rigo, F., Passini, M. A., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2010). Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes & Development*, *24*(15), 1634–1644.
- Huang, Q., Shen, H.-M., & Ong, C.-N. (2004). Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor- κ B. *Biochemical Pharmacology*, *68*(2), 361–371.
- Huang, Y. (2012). A mirror of two faces: Lin28 as a master regulator of both miRNA and mRNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *3*(4), 483–494. <https://doi.org/10.1002/wrna.1112>
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., & Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology*, *26*(7), 795–797. <https://doi.org/10.1038/nbt1418>
- Husmann, M., Görden, I., Weisgerber, C., & Bitter-Suermann, D. (1989). Up-regulation of embryonic NCAM in an EC cell line by retinoic acid. *Developmental Biology*, *136*(1), 194–200. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90141-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90141-3)
- Ichida, J. K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E. Y., Chung, J. E., Egli, D., ... Eggan, K. (2009). A Small-Molecule Inhibitor of Tgf- β Signaling Replaces Sox2 in Reprogramming by Inducing Nanog. *Cell Stem Cell*, *5*(5), 491–503. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.012>
- Ijaz, T., Pazdrak, K., Kalita, M., König, R., Choudhary, S., Tian, B., ... Brasier, A. R. (2014). Systems biology approaches to understanding epithelial mesenchymal transition (EMT)

- in mucosal remodeling and signaling in asthma. *World Allergy Organization Journal*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-7-13>
- Inberg, A., Bogoch, Y., Bledi, Y., & Linial, M. (2007). Cellular processes underlying maturation of P19 neurons: Changes in protein folding regimen and cytoskeleton organization. *Proteomics*, 7(6), 910–920.
- Ip, W. K., Wong, C. K., & Lam, C. W. K. (2006). Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2. *Clinical and Experimental Immunology*, 145(1), 162–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03085.x>
- Ishmael, F. T. (2011). The inflammatory response in the pathogenesis of asthma. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 111(11 Suppl 7), 11–17.
- Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., ... others. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482(7384), 216–220.
- Jang, D. S., Cuendet, M., Su, B.-N., Totura, S., Riswan, S., Fong, H. H. S., ... Kinghorn, A. D. (2004). Constituents of the seeds of *Hernandia ovigera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Planta Medica*, 70(10), 893–896.
- Jeong, M. H., Ho, S. M., Vuong, T. A., Jo, S. B., Liu, G., Aaronson, S. A., ... Kang, J. S. (2014). Cdo suppresses canonical Wnt signalling via interaction with Lrp6 thereby promoting neuronal differentiation. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6455>
- Jin, Z. G., Liu, L., Zhong, H., Zhang, K. J., Chen, Y. F., Bian, W., ... Jing, N. H. (2006). Second intron of mouse nestin gene directs its expression in pluripotent embryonic carcinoma cells through POU factor binding site. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(3), 207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00149.x>
- Jin, Z., Liu, L., Bian, W., Chen, Y., Xu, G., Cheng, L., & Jing, N. (2009). Different transcription factors regulate nestin gene expression during P19 cell neural differentiation and central nervous system development. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 8160–8173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805632200>
- Joy, J., Nair, C. K. K., & others. (2008). Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity in Swiss albino mice by *Rubia cordifolia* extract. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 4(3), 111.
- Jung, Y. W., Hysolli, E., Kim, K. Y., Tanaka, Y., & Park, I. H. (2012). Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: Prospects for novel therapies. *Current Opinion in Neurology*, 25(2), 125–130. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3283518226>
- Kamitani, S., Yamauchi, Y., Kawasaki, S., Takami, K., Takizawa, H., Nagase, T., & Kohyama, T. (2011). Simultaneous stimulation with TGF- β 1 and TNF- α induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 155(2), 119–128. <https://doi.org/10.1159/000318854>
- Kasai, H., Allen, J. T., Mason, R. M., Kamimura, T., & Zhang, Z. (2005). TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research*, 6(1), 56.
- Kaufman, M. H., & Evans, M. J. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(July), 154–156.
- Kawazoe, S., Ikeda, N., Miki, K., Shibuya, M., Morikawa, K., Nakano, S., ... Shirayoshi, Y. (2009). Extrinsic factors derived from mouse embryonal carcinoma cell lines maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells through a novel signal pathway: Original Article. *Development Growth and Differentiation*, 51(2), 81–93. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01082.x>
- Kelly, G. M., & Gatie, M. I. (2017). Mechanisms Regulating Stemness and Differentiation in Embryonal Carcinoma Cells. *Stem Cells International*, 2017.

- <https://doi.org/10.1155/2017/3684178>
- Kenda, M., Vegelj, J., Herlah, B., Perdih, A., Mladěnka, P., & Sollner Dolenc, M. (2021). Evaluation of firefly and Renilla Luciferase inhibition in reporter-gene assays: A case of isoflavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13).
<https://doi.org/10.3390/ijms22136927>
- Kiefer, A. M. (2023). omics -basierte Untersuchungen zum Wirkmechanismus des makrozyklischen Lactons Oxacyclododecindion. RPTU Kaiserslautern.
- Kim, D., Kim, C., Moon, J., Chung, Y., Chang, M., Han, B., ... Kim, K. (2010). *Delivery of Reprogramming Proteins*. 4(6), 472–476.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>.Generation
- Kim, H.-J., Litztenburger, B. C., Cui, X., Delgado, D. A., Grabiner, B. C., Lin, X., ... others. (2007). Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF- κ B and snail. *Molecular and Cellular Biology*, 27(8), 3165–3175.
- Kim, J. B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M. J., Sasse, P., Gentile, L., ... others. (2009). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136(3), 411–419.
- Kim, J., Efe, J. A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., ... Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 7838–7843.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1103113108>
- Kim, K.-J., Lee, J. S., Kwak, M.-K., Choi, H. G., Yong, C. S., Kim, J.-A., ... Park, Y.-J. (2009). Anti-inflammatory action of mollugin and its synthetic derivatives in HT-29 human colonic epithelial cells is mediated through inhibition of NF- κ B activation. *European Journal of Pharmacology*, 622(1–3), 52–57.
- Kim, S.-J., Kim, M.-C., Lee, B.-J., Park, D.-H., Hong, S.-H., & Um, J.-Y. (2010). Anti-inflammatory activity of chrysophanol through the suppression of NF- κ B/caspase-1 activation in vitro and in vivo. *Molecules*, 15(9), 6436–6451.
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2009). Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *Journal of Neuroscience Research*, 87(10), 2183–2200.
<https://doi.org/10.1002/jnr.22054>
- Kim, Y.-E., Kang, H.-B., Park, J.-A., Nam, K.-H., Kwon, H.-J., & Lee, Y.-H. (2008). Upregulation of NF- κ B upon differentiation of mouse embryonic stem cells. *BMB Reports*, 41(10), 705–709.
- Kleene, R., Mzoughi, M., Joshi, G., Kalus, I., Bormann, U., Schulze, C., ... Schachner, M. (2010). NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments. *Journal of Neuroscience*, 30(32), 10784–10798.
- Kleinman, H. K., & Martin, G. R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*, 15(5), 378–386.
- Komiya, A., Nagase, H., Yamada, H., Sekiya, T., Yamaguchi, M., Sano, Y., ... Hirai, K. (2003). Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cellular Immunology*, 225(2), 91–100.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2003.10.001>
- Koya, T., Takeda, K., Kodama, T., Miyahara, N., Matsubara, S., Balhorn, A., ... Gelfand, E. W. (2006). RANTES (CCL5) regulates airway responsiveness after repeated allergen challenge. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(2), 147–154.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0394OC>
- Krishnamurthy, P., & Kaplan, M. H. (2016). STAT6 and PARP family members in the development of T cell-dependent allergic inflammation. *Immune Network*, 16(4), 201–210. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.4.201>
- Kunath, T., Saba-El-Leil, M. K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., & Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent

- embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, 134(16), 2895–2902. <https://doi.org/10.1242/dev.02880>
- Laferrère, N. B., & Brown, D. L. (1996). Expression and posttranslational modification of Class III β -tubulin during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 35(3), 188–199. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1996\)35:3<188::AID-CM2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1996)35:3<188::AID-CM2>3.0.CO;2-5)
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Langhanki, J., Rudolph, K., Erkel, G., & Opatz, T. (2014a). Total synthesis and biological evaluation of the natural product (-)-cyclonerodiol, a new inhibitor of IL-4 signaling. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 12(47), 9707–9715. <https://doi.org/10.1039/c4ob02021a>
- Langhanki, J., Rudolph, K., Erkel, G., & Opatz, T. (2014b). Total synthesis and biological evaluation of the natural product (-)-cyclonerodiol, a new inhibitor of IL-4 signaling. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 12(47), 9707–9715. <https://doi.org/10.1039/c4ob02021a>
- Lecoœur, H., Prévost, M.-C., & Gougeon, M.-L. (2001). Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 44(1), 65–72.
- Lee, M. G., Wynder, C., Schmidt, D. M., McCafferty, D. G., & Shiekhattar, R. (2006). Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chemistry & Biology*, 13(6), 563–567.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854.
- Lee, S. H., Cho, S., Kim, M. S., Choi, K., Cho, J. Y., Gwak, H.-S., ... others. (2014). The ubiquitin ligase human TRIM71 regulates let-7 microRNA biogenesis via modulation of Lin28B protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(5), 374–386.
- Lee, W., Ku, S. K., Kim, T. H., & Bae, J. S. (2013). Emodin-6-O- β -d-glucoside inhibits HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.061>
- Leszczyński, P., Śmiech, M., Teeli, A. S., Zołocińska, A., Słysz, A., Pojda, Z., ... Taniguchi, H. (2019). Neurogenesis using P19 embryonal carcinoma cells. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(146), 2–7. <https://doi.org/10.3791/58225>
- Li, C. W., Xia, W., Huo, L., Lim, S. O., Wu, Y., Hsu, J. L., ... Hung, M. C. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Research*, 72(5), 1290–1300. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3123>
- Li, G., Zhang, K., Xu, J., Dong, J., & Liu, Y. (2007). Nematicidal substances from fungi. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(3), 212–233.
- Li, H., Fan, R., Sun, M., Jiang, T., & Gong, Y. (2013). Nspc1 regulates the key pluripotent Oct4-Nanog-Sox2 axis in P19 embryonal carcinoma cells via directly activating Oct4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(4), 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.095>
- Li, N., Mirzakhani, H., Kiefer, A., Koelle, J., Vuorinen, T., Rauh, M., ... Finotto, S. (2021). Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES) drives the resolution of allergic asthma. *iScience*, 24(10). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103163>
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., ... Pei, D. (2010). A mesenchymal-to-Epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.014>

- Li, W., Sun, W., Zhang, Y., Wei, W., Ambasudhan, R., Xia, P., ... others. (2011). Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(20), 8299–8304.
- Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., ... Ding, S. (2009). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*, *4*(1), 16–19.
- Li, W., Zhou, H. Y., Abujarour, R., Zhu, S., Joo, J. Y., Lin, T., ... Ding, S. (2009). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells*, *27*(12), 2992–3000. <https://doi.org/10.1002/stem.240>
- Li, Y.-Q. (2010). Master stem cell transcription factors and signaling regulation. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, *12*(1), 3–13.
- Li, Y. Q. (2017). Networks of Transcription Factors for Oct4 Expression in Mice. *DNA and Cell Biology*, *36*(9), 725–736. <https://doi.org/10.1089/dna.2017.3780>
- Li, Y., Zhang, Q., Yin, X., Yang, W., Du, Y., Hou, P., ... Deng, H. (2011). Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Research*, *21*(1), 196–204. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.142>
- Li, Zhen, Chen, B., Wang, P., Li, X., Cai, G., Wei, W., & Dong, W. (2016). A proteomic analysis of acute leukemia cells treated with 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *Lipids in Health and Disease*, *15*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0359-4>
- Li, Zhiping, Lai, M., Li, J., Yang, D., Zhao, M., Wang, D., ... Yang, L. (2023). RAB7A GTPase Is Involved in Mitophagosome Formation and Autophagosome–Lysosome Fusion in N2a Cells Treated with the Prion Protein Fragment. *Molecular Neurobiology*, *60*(3), 1391–1407. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03118-5>
- Liang, X., Huang, Y., Pan, X., Hao, Y., Chen, X., Jiang, H., ... Yang, Z. (2020). Erucic acid from *Isatis indigotica* Fort. suppresses influenza A virus replication and inflammation in vitro and in vivo through modulation of NF- κ B and p38 MAPK pathway. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *10*(2), 130–146. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.09.005>
- Lilly, C. M., Nakamura, H., Kesselman, H., Nagler-Anderson, C., Asano, K., Garcia-Zepeda, E. A., ... Luster, A. D. (1997). Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *The Journal of Clinical Investigation*, *99*(7), 1767–1773.
- Lin, K.-Y., & Uen, Y.-H. (2010). Aloe-emodin, an anthraquinone, in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon carcinoma cells. *Oncology Letters*, *1*(3), 541–547.
- Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., ... Ding, S. (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nature Methods*, *6*(11), 805–808. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1393>
- Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2010). Stem cells in human neurodegenerative disorders - Time for clinical translation? *Journal of Clinical Investigation*, *120*(1), 29–40. <https://doi.org/10.1172/JCI40543>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1996). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(SUPPL.), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(SUPPL.), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
- Liu, C., Zhang, X., Xiang, Y., Qu, X., Liu, H., Liu, C., ... Qin, X. (2018). Role of epithelial chemokines in the pathogenesis of airway inflammation in asthma (Review). *Molecular Medicine Reports*, *17*(5), 6935–6941. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8739>
- Liu, K., Yu, C., Xie, M., Li, K., & Ding, S. (2016). Chemical Modulation of Cell Fate in Stem

- Cell Therapeutics and Regenerative Medicine. *Cell Chemical Biology*, 23(8), 893–916. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.07.007>
- Loh, K. M., & Lim, B. (2011). A precarious balance: Pluripotency factors as lineage specifiers. *Cell Stem Cell*, 8(4), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.013>
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., ... Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 38(4), 431–440. <https://doi.org/10.1038/ng1760>
- Lokau, J., & Garbers, C. (2020). Biological functions and therapeutic opportunities of soluble cytokine receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 55, 94–108.
- Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B., & Smith, A. G. (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biology*, 4(5), 805–818. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040121>
- Lu, Y., Jeong, Y. T., Li, X., Kim, M. J., Park, P. H., Hwang, S. L., ... Chang, H. W. (2013). Emodin isolated from *polygoni cuspidati radix* inhibits TNF- α and IL-6 release by blocking NF- κ B and MAP kinase pathways in mast cells stimulated with PMA plus A23187. *Biomolecules and Therapeutics*, 21(6), 435–441. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.068>
- Luo, H., Qin, W., Zhang, H., Ren, F.-C., Fang, W.-T., Kong, Q.-H., ... others. (2022). Anthraquinones from the Aerial Parts of *Rubia cordifolia* with Their NO Inhibitory and Antibacterial Activities. *Molecules*, 27(5), 1730.
- Luster, A. D. (1998). Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 338(7), 436–445. <https://doi.org/10.1056/nejm199802123380706>
- Lutz, J.-F. (2008). Kupferfreie Azid-Alkin-Cycloadditionen: Erkenntnisse und Perspektiven. *Angewandte Chemie*, 120(12), 2212–2214. <https://doi.org/10.1002/ange.200705365>
- Magnuson, D. S. K., Morassutti, D. J., Staines, W. A., McBurney, M. W., & Marshall, K. C. (1995). In vivo electrophysiological maturation of neurons derived from a multipotent precursor (embryonal carcinoma) cell line. *Developmental Brain Research*, 84(1), 130–141.
- Maherali, N., & Hochedlinger, K. (2009). Tgf β Signal Inhibition Cooperates in the Induction of iPSCs and Replaces Sox2 and cMyc. *Current Biology*, 19(20), 1718–1723. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.025>
- Malik, E. M., & Müller, C. E. (2016). Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal Research Reviews*, 36(4), 705–748.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12 II), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Martínez-Cerdeño, V., & Noctor, S. C. (2018). Neural progenitor cell terminology. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12(December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00104>
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., ... Niwa, H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 625–635. <https://doi.org/10.1038/ncb1589>
- Matera, M. G., Calzetta, L., & Cazzola, M. (2010). TNF- α inhibitors in asthma and COPD: We must not throw the baby out with the bath water. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 23(2), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2009.10.007>
- Mathieu, P., Battista, D., Depino, A., Roca, V., Graciarena, M., & Pitossi, F. (2010). The more you have, the less you get: The functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *Journal of Neurochemistry*, 112(6), 1368–1385. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06548.x>
- Mayr, F., & Heinemann, U. (2013). Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA

- regulation--a structural and functional perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16532–16553. <https://doi.org/10.3390/ijms140816532>
- McBurney, M. W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *International Journal of Developmental Biology*, 37(1), 135–140. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-423-8_4
- McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E. M. V., Edwards, M. K. S., & Anderson, P. J. (1982). Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature*, 299(5879), 165–167. <https://doi.org/10.1038/299165a0>
- McBurney, M. W., Reuhl, K. R., Ally, A. I., Nasipuri, S., Bell, J. C., & Craig, J. (1988). Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *Journal of Neuroscience*, 8(3), 1063–1073. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-03-01063.1988>
- McBurney, Michael W., & Rogers, B. J. (1982). Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Developmental Biology*, 89(2), 503–508. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90338-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90338-4)
- Mellado, M., de Ana, A. M., Gómez, L., Martínez-A, C., & Rodríguez-Frade, J. M. (2008). Chemokine receptor 2 blockade prevents asthma in a cynomolgus monkey model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(2), 769–775.
- Menon, D., Coll, R., O'Neill, L. A. J., & Board, P. G. (2014). Glutathione transferase Omega 1 is required for the lipopolysaccharide- stimulated induction of NADPH oxidase 1 and the production of reactive oxygen species in macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.020>
- Menon, D., Innes, A., Oakley, A. J., Dahlstrom, J. E., Jensen, L. M., Brüstle, A., ... Board, P. G. (2017). GSTO1-1 plays a pro-inflammatory role in models of inflammation, colitis and obesity. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17861-6>
- Metzger, M., Caldwell, C., Barlow, A. J., Burns, A. J., & Thapar, N. (2009). Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology*, 136(7), 2214–2225.
- Meyer, J., Park, K. I., Zaehres, H., Kim, J. B., Greber, B., Arau, M. J., & Scho, H. R. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *461*(October), 649–654. <https://doi.org/10.1038/nature08436>
- Minucci, S., Botquin, V., Yeom, Y. I., Dey, A., Sylvester, I., Zand, D. J., ... Scholer, H. R. (1996). Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy in vivo. *The EMBO Journal*, 15(4), 888–899. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00423.x>
- Miotto, D., Christodoulopoulos, P., Olivenstein, R., Taha, R., Cameron, L., Tsicopoulos, A., ... others. (2001). Expression of IFN- γ -inducible protein; monocyte chemotactic proteins 1, 3, and 4; and eotaxin in TH1-and TH2-mediated lung diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(4), 664–670.
- Mishra, S., Ande, S. R., & Nyomba, B. L. G. (2010). The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS Journal*, 277(19), 3937–3946. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07809.x>
- Mistri, T. K., Arindrarto, W., Ng, W. P., Wang, C., Lim, L. H., Sun, L., ... Robson, P. (2018). Dynamic changes in Sox2 spatio-temporal expression promote the second cell fate decision through Fgf4/Fgfr2 signaling in preimplantation mouse embryos. *Biochemical Journal*, 475(6), 1075–1089. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170418>
- Mita, A. C., Mita, M. M., Nawrocki, S. T., & Giles, F. J. (2008). Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research*, 14(16), 5000–5005.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., ... Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631–642. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00393-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00393-3)
- Mitsumoto, H., Brooks, B. R., & Silani, V. (2014). Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: Why so many negative trials and how can trials be improved? *The Lancet*

- Neurology*, 13(11), 1127–1138. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70129-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70129-2)
- Mohr, E. T. B., Dos Santos Nascimento, M. V. P., Da Rosa, J. S., Vieira, G. N., Kretzer, I. F., Sandjo, L. P., & Dalmarco, E. M. (2019). Evidence That the Anti-Inflammatory Effect of Rubiadin-1-methyl Ether Has an Immunomodulatory Context. *Mediators of Inflammation*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6474168>
- Monzo, H. J., Park, T. I. H., Montgomery, J. M., Faull, R. L. M., Dragunow, M., & Curtis, M. A. (2012a). A method for generating high-yield enriched neuronal cultures from P19 embryonal carcinoma cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 204(1), 87–103. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.11.008>
- Monzo, H. J., Park, T. I. H., Montgomery, J. M., Faull, R. L. M., Dragunow, M., & Curtis, M. A. (2012b). A method for generating high-yield enriched neuronal cultures from P19 embryonal carcinoma cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 204(1), 87–103.
- Morgado, A. L., Rodrigues, C. M. P., & Solá, S. (2016). MicroRNA-145 regulates neural stem cell differentiation through the Sox2--Lin28/let-7 signaling pathway. *Stem Cells*, 34(5), 1386–1395.
- Mosblech, A., Feussner, I., & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 511–517.
- Moss, E. G., & Tang, L. (2003). Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Developmental Biology*, 258(2), 432–442.
- Mullen, L., Hanschmann, E. M., Lillig, C. H., Herzenberg, L. A., & Ghezzi, P. (2015). Cysteine oxidation targets peroxiredoxins 1 and 2 for exosomal release through a novel mechanism of Redox-dependent secretion. *Molecular Medicine*, 21(10), 98–108. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00033>
- Mummery, C. L., Feijen, A., Moolenaar, W. H., den Brink, C. E., & De Laat, S. W. (1986). Establishment of a differentiated mesodermal line from P19 EC cells expressing functional PDGF and EGF receptors. *Experimental Cell Research*, 165(1), 229–242.
- Munro, H. D., Musgrave, O. C., & Templeton, R. (1967). Curvularin. Part V. The compound C₁₆H₁₈O₅, α -dehydrocurvularin. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 947–948.
- Murakami, A., Nishizawa, T., Egawa, K., Kawada, T., Nishikawa, Y., Uenakai, K., & Ohgashi, H. (2005). New class of linoleic acid metabolites biosynthesized by corn and rice lipoxygenases: Suppression of proinflammatory mediator expression via attenuation of MAPK- and Akt-, but not PPAR γ -, dependent pathways in stimulated macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 70(9), 1330–1342. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.07.032>
- Murray, H. C., Low, V. F., Swanson, M. E. V., Dieriks, B. V., Turner, C., Faull, R. L. M., & Curtis, M. A. (2016). Distribution of PSA-NCAM in normal, Alzheimer's and Parkinson's disease human brain. *Neuroscience*, 330, 359–375. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.003>
- Myszczyńska, M. A., Ojamies, P. N., Lacoste, A. M. B., Neil, D., Saffari, A., Mead, R., ... Ferraiuolo, L. (2020). Applications of machine learning to diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0377-8>
- Naber, H. P. H., Drabsch, Y., Snaar-Jagalska, B. E., ten Dijke, P., & van Laar, T. (2013). Snail and Slug, key regulators of TGF- β -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.037>
- Nakayama, Y., Wada, A., Inoue, R., Terasawa, K., Kimura, I., Nakamura, N., & Kurosaka, A. (2014). A rapid and efficient method for neuronal induction of the P19 embryonic carcinoma cell line. *Journal of Neuroscience Methods*, 227, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.011>
- Nam, H. (2015). Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status

- and prospect. *World Journal of Stem Cells*, 7(1), 126.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i1.126>
- Natarajan, S., Mishra, P., Vadivel, M., Basha, M. G., Kumar, A., & Velusamy, S. (2019). ISSR Characterization and Quantification of Purpurin and Alizarin in *Rubia cordifolia* L. Populations from India. *Biochemical Genetics*, 57(1), 56–72.
<https://doi.org/10.1007/s10528-018-9875-4>
- Nelson, P. T., Wang, W. X., & Rajeev, B. W. (2008). MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathology*, 18(1), 130–138.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00120.x>
- Ng, H. H., & Surani, M. A. (2011). The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nature Cell Biology*, 13(5), 490–496. <https://doi.org/10.1038/ncb0511-490>
- Niwa, H., Miyazaki, J. I., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- Noggle, S. A., Weiler, D., & Condie, B. G. (2006). Notch Signaling Is Inactive but Inducible in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 24(7), 1646–1653.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0314>
- Nordhoff, V., Hübner, K., Bauer, A., Orlova, I., Malapetsa, A., & Schöler, H. R. (2001). Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mammalian Genome*, 12(4), 309–317.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., ... others. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th anniversary of the shaking palsy. *Movement Disorders*, 32(9), 1264–1310.
- Oh, C. K., Geba, G. P., & Molfino, N. (2010). Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *European Respiratory Review*, 19(115), 46–54. <https://doi.org/10.1183/09059180.00007609>
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *448*(July), 313–318. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
- Olariu, V., Lövkvist, C., & Sneppen, K. (2016). Nanog, Oct4 and Tet1 interplay in establishing pluripotency. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep25438>
- Ordóñez, C. L., Shaughnessy, T. E., Matthay, M. A., & Fahy, J. V. (2000). Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: clinical and biologic significance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(4), 1185–1190.
- Osei-Sarfo, K., & Gudas, L. J. (2014). Retinoic acid suppresses the canonical Wnt signaling pathway in embryonic stem cells and activates the noncanonical Wnt signaling pathway. *Stem Cells*, 32(8), 2061–2071. <https://doi.org/10.1002/stem.1706>
- Pacherník, J., Bryja, V., Ešner, M., Kubala, L., Dvořák, P., & Hampl, A. (2005). Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma cells by retinoic acid: Inhibitory effect of serum. *Physiological Research*, 54(1), 115–122.
- Pacherník, Jiří, Horváth, V., Kubala, L., Dvořák, P., Kozubík, A., & Hampl, A. (2007). Neural differentiation potentiated by the leukaemia inhibitory factor through STAT3 signalling in mouse embryonal carcinoma cells. *Folia Biologica*, 53(5), 157–163.
- Palmqvist, C., Wardlaw, A. J., & Bradding, P. (2007). Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *British Journal of Pharmacology*, 151(6), 725–736. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707263>
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., ... Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134(5), 877–886.
- Parmar, M., Grealish, S., & Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for

- Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(2), 103–115.
<https://doi.org/10.1038/s41583-019-0257-7>
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 271–282.
<https://doi.org/10.1038/nrg3162>
- Patel, A., Patel, T., Macwan, C., Patel, M., Chauhan, K., & Patel, J. (2010). Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of roots of *Rubia cordifolia* in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(12), 809–813.
- Patil, R., Mohan, M., Kasture, V., & Kasture, S. (2009). *Rubia cordifolia*: a review. *Advances in Traditional Medicine*, 9(1), 1–13.
- Pawar, A. T., Anap, R. M., Ghodasara, J. V., & Kuchekar, B. S. (2011). Protective effect of hydroalcoholic root extract of *Rubia cordifolia* in indomethacin-induced enterocolitis in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 250.
- Peng, X., Gao, H., Wang, Y., Yang, B., Liu, T., Sun, Y., ... others. (2013). Conversion of rat embryonic stem cells into neural precursors in chemical-defined medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(4), 783–787.
- Pérez, M., Soler-Torronteras, R., Collado, J. A., Limones, C. G., Hellsten, R., Johansson, M., ... Muñoz, E. (2014). The fungal metabolite galiellalactone interferes with the nuclear import of NF- κ B and inhibits HIV-1 replication. *Chemico-Biological Interactions*, 214(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.02.012>
- Peter, M. E. (2010). Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: The next step. *Oncogene*, 29(15), 2161–2164. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.59>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45–e45.
- Pikarsky, E., Sharir, H., Ben-Shushan, E., & Bergman, Y. (1994). Retinoic acid represses Oct-3/4 gene expression through several retinoic acid-responsive elements located in the promoter-enhancer region. *Molecular and Cellular Biology*, 14(2), 1026–1038.
<https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1026-1038.1994>
- Pineda, J. R., Daynac, M., Chicheportiche, A., Cebrian-Silla, A., Sii Felice, K., Garcia-Verdugo, J. M., ... Mouthon, M. A. (2013). Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Molecular Medicine*, 5(4), 548–562.
<https://doi.org/10.1002/emmm.201202197>
- Piskounova, E., Polyarchou, C., Thornton, J. E., Lapierre, R. J., Pothoulakis, C., Hagan, J. P., ... Gregory, R. I. (2011). Lin28A and Lin28B inhibit let-7 MicroRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*, 147(5), 1066–1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.039>
- Polier, G., Neumann, J., Thuaud, F., Ribeiro, N., Gelhaus, C., Schmidt, H., ... Li-Weber, M. (2012). The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chemistry and Biology*, 19(9), 1093–1104.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.012>
- Popova, D., Karlsson, J., & Jacobsson, S. O. P. (2017). Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical-and toxin-induced neurotoxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 18(1), 42.
- Post, S., Rozeveld, D., Jonker, M. R., Bischoff, R., Van Oosterhout, A. J., & Heijink, I. H. (2015). ADAM10 mediates the house dust mite-induced release of chemokine ligand CCL20 by airway epithelium. *Allergy*, 70(12), 1545–1552.
- Provost, V., Larose, M.-C., Langlois, A., Rola-Pleszczynski, M., Flamand, N., & Laviolette, M. (2013). CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(2), 213–222. <https://doi.org/10.1189/jlb.0212074>
- Qi, X., Li, T. G., Hao, J., Hu, J., Wang, J., Simmons, H., ... Zhao, G. Q. (2004). BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 101(16), 6027–6032. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401367101>
- Qiu, C., Ma, Y., Wang, J., Peng, S., & Huang, Y. (2009). Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 38(4), 1240–1248. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1071>
- Quint, J. K., Donaldson, G. C., Goldring, J. J. P., Baghai-Ravary, R., Hurst, J. R., & Wedzicha, J. A. (2010). Serum IP-10 as a biomarker of human rhinovirus infection at exacerbation of COPD. *Chest*, 137(4), 812–822.
- Rao, G. M. M., Rao, C. V., Pushpangadan, P., & Shirwaikar, A. (2006). Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(3), 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.073>
- Raundhal, M., Morse, C., Khare, A., Oriss, T. B., Milosevic, J., Trudeau, J., ... others. (2015). High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(8), 3037–3050.
- Rawal, A. K., Muddeshwar, M. G., & Biswas, S. K. (2004). *Rubia cordifolia*, *Fagonia cretica* linn and *Tinospora cordifolia* exert neuroprotection by modulating the antioxidant system in rat hippocampal slices subjected to oxygen glucose deprivation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 4(1), 1–9.
- Richter, J., Sandjo, L. P., Liermann, J. C., Opatz, T., & Erkel, G. (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*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(3), 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.004>
- Riddell, J. R., Wang, X.-Y., Minderman, H., & Gollnick, S. O. (2010). Peroxiredoxin 1 Stimulates Secretion of Proinflammatory Cytokines by Binding to TLR4. *The Journal of Immunology*, 184(2), 1022–1030. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901945>
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (50), e2597.
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., & Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24731–24737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502573200>
- Rohr, M. (2018). *Antiinflammatorische Wirkung isolierter Naturstoffe aus Pilzen in zellulären Modellen humaner Autoimmunerkrankungen*. TU Kaiserslautern.
- Romagnani, S. (2002). Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molecular Immunology*, 38(12–13), 881–885.
- Romano, R., Calcagnile, M., Margiotta, A., Franci, L., Chiariello, M., Alifano, P., & Bucci, C. (2021). Rab7a regulates vimentin phosphorylation through akt and pak. *Cancers*, 13(9), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers13092220>
- Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, 18(10), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>
- Rowe, R. G., & Daley, G. Q. (2019). Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Genetics*, 20(7), 377–388. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0100-z>
- Rudolph, A.-K. (2015). *Isolierung und Charakterisierung immunmodulatorischer Wirkstoffe aus Pilzen als Inhibitoren inflammatorischer und fibrotischer Pathomechanismen bei Asthma*. TU Kaiserslautern.
- Rudolph, A. K., Walter, T., & Erkel, G. (2018). The fungal metabolite cyclonerodiol inhibits IL-4/IL-13 induced Stat6-signaling through blocking the association of Stat6 with p38, ERK1/2 and p300. *International Immunopharmacology*, 65, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.033>
- Rudolph, K., Serwe, A., & Erkel, G. (2013). Inhibition of TGF- β signaling by the fungal lactones (S)-curvularin, dehydrocurvularin, oxacyclododecindione and galiellalactone. *Cytokine*, 61(1), 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.10.011>

- Ruggieri, M., Riboldi, G., Brajkovic, S., Bucchia, M., Bresolin, N., Comi, G. P., & Corti, S. (2014). Induced neural stem cells: Methods of reprogramming and potential therapeutic applications. *Progress in Neurobiology*, *114*, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.001>
- Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E. E., Nitsch, R., & Wulczyn, F. G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature Cell Biology*, *10*(8), 987–993. <https://doi.org/10.1038/ncb1759>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, the third edition*, Cold Spring Harbor laboratory Press. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York.
- Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., ... Goldberg, A. L. (2002). An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP I, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nature Immunology*, *3*(12), 1169–1176. <https://doi.org/10.1038/ni859>
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., & Brivanlou, A. H. (2004a). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine*, *10*(1), 55–63. <https://doi.org/10.1038/nm979>
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., & Brivanlou, A. H. (2004b). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine*, *10*(1), 55–63. <https://doi.org/10.1038/nm979>
- Sauty, A., Dziejman, M., Taha, R. A., Iarossi, A. S., Neote, K., Garcia-Zepeda, E. A., ... Luster, A. D. (1999). The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *162*(6), 3549–3558. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092813>
- Sawant, K. V., Xu, R., Cox, R., Hawkins, H., Sbrana, E., Kolli, D., ... Rajarathnam, K. (2015). Chemokine CXCL1-Mediated Neutrophil Trafficking in the Lung: Role of CXCR2 Activation. *Journal of Innate Immunity*, *7*(6), 647–658. <https://doi.org/10.1159/000430914>
- Schoorlemmer, J., van Puijenbroek, A., van Den Eijnden, M., Jonk, L., Pals, C., & Kruijer, W. (1994). Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(2), 1122–1136. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1122-1136.1994>
- Schoorlemmer, J., Jonk, L., Shen, S., van Puijenbroek, A., Feijen, A., & Kruijer, W. (1995). Regulation of Oct-4 gene expression during differentiation of EC cells. *Molecular Biology Reports*, *21*(3), 129–140. <https://doi.org/10.1007/BF00997235>
- Schreiber, D. (2015). *Etablierung und Validierung eines Darmperfusionssystems und Evaluierung von neuen antiinflammatorischen Wirkstoffen aus Pilzen zur Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen*.
- Schuster, A., Klotz, M., Schwab, T., Di Liddo, R., Bertalot, T., Schrenk, S., ... Schäfer, K. H. (2014). Maintenance of the enteric stem cell niche by bacterial lipopolysaccharides? Evidence and perspectives. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *18*(7), 1429–1443. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12292>
- Schwamborn, J. C., Berezikov, E., & Knoblich, J. A. (2009). The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell*, *136*(5), 913–925.
- Schwingshackl, A., Duszyk, M., Brown, N., & Moqbel, R. (1999). Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF- α . *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *104*(5), 983–990.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., ...

- Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, 48(17), 4827–4833.
- Seipp, K., Grölz, V., Glass, H., Quraishi, E., Vierengel, N., & Opatz, T. (2024). Total Synthesis of (±)-Oxacyclododecindione. *Journal of Organic Chemistry*, 89(8), 5746–5763. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.4c00333>
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, 5(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r13>
- Shao, N.-Y., Hu, H. Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., ... Khaitovich, P. (2010). Comprehensive survey of human brain microRNA by deep sequencing. *BMC Genomics*, 11(1), 409.
- Shen, C. H., Liu, C. T., Song, X. J., Zeng, W. Y., Lu, X. Y., Zheng, Z. L., ... Ping-Yan. (2018). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Rubia cordifolia* L. by spectrum-effect relationships. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1090(2017), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.021>
- Shenoy, A., & Blelloch, R. H. (2014). Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(9), 565–576. <https://doi.org/10.1038/nrm3854>
- Shi, G., Zheng, X., Zhang, S., Wu, X., Yu, F., Wang, Y., & Xing, F. (2018). Kanglaite inhibits EMT caused by TNF- α via NF- κ B inhibition in colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 9(6), 6771–6779. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23645>
- Shi, Y., Zhao, X., Hsieh, J., Wichterle, H., Impey, S., Banerjee, S., ... Kosik, K. S. (2010). MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 30(45), 14931–14936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4280-10.2010>
- Shirakawa, T., Kawazoe, Y., Tsujikawa, T., Jung, D., Sato, S. I., & Uesugi, M. (2011). Deactivation of STAT6 through serine 707 phosphorylation by JNK. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 4003–4010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168435>
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., ... Smith, A. (2009). Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell*, 138(4), 722–737. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.039>
- Simandi, Z., Horvath, A., Wright, L. C., Cuaranta-Monroy, I., De Luca, I., Karolyi, K., ... Nagy, L. (2016). OCT4 Acts as an Integrator of Pluripotency and Signal-Induced Differentiation. *Molecular Cell*, 63(4), 647–661. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.039>
- Smit, J. J., & Lukacs, N. W. (2006). A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *European Journal of Pharmacology*, 533(1–3), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.064>
- Sousa, A. R., Lane, S. J., Nakhosteen, J. A., Yoshimura, T., & others. (1994). Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 10(2), 142.
- Spelat, R., Ferro, F., & Curcio, F. (2012). Serine 111 phosphorylation regulates OCT4A protein subcellular distribution and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(45), 38279–38288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386755>
- Spurrell, J. C. L., Wiehler, S., Zaheer, R. S., Sanders, S. P., & Proud, D. (2005). Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(1), L85–L95.
- Stamogiannos, A., Papakyriakou, A., Mauvais, F. X., Van Endert, P., & Stratikos, E. (2016). Screening Identifies Thimerosal as a Selective Inhibitor of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7(7), 681–685A.

- <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00084>
- Stappert, L., Roese-Koerner, B., & Brüstle, O. (2015). The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification. *Cell and Tissue Research*, 359(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1981-y>
- Stephenson, J. R., Stacey, J. A., Morgenthaler, J. B., Friesen, J. A., Lash, T. D., & Jones, M. A. (2007). Role of aspartate 400, arginine 262, and arginine 401 in the catalytic mechanism of human coproporphyrinogen oxidase. *Protein Science*, 16(3), 401–410. <https://doi.org/10.1110/ps.062636907>
- Stratikos, E. (2014). Modulating antigen processing for cancer immunotherapy. *Oncot Immunology*, 3(1), 2–4. <https://doi.org/10.4161/onci.27568>
- Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., & Suemori, H. (2007). Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene*, 26(38), 5564–5576. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210353>
- Sun, A. X., Crabtree, G. R., & Yoo, A. S. (2013). MicroRNAs: Regulators of neuronal fate. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(2), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.12.007>
- Suzuki, K., Bose, P., Leong-Quong, R. Y., Fujita, D. J., & Riabowol, K. (2010). REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Research Notes*, 3(1), 294. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-294>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Publishing Group*, 17(March), 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>
- Takaku, Y., Nakagome, K., Kobayashi, T., Hagiwara, K., Kanazawa, M., & Nagata, M. (2011). IFN- γ -inducible protein of 10 kDa upregulates the effector functions of eosinophils through β 2-integrin and CXCR3. *Respiratory Research*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-138>
- Tan, C. L., Plotkin, J. L., Venø, M. T., Von Schimmelmann, M., Feinberg, P., Mann, S., ... others. (2013). MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science*, 342(6163), 1254–1258.
- Tan, E. K., Chao, Y. X., West, A., Chan, L. L., Poewe, W., & Jankovic, J. (2020). Parkinson disease and the immune system — associations, mechanisms and therapeutics. *Nature Reviews Neurology*, 16(6), 303–318. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0344-4>
- Tauber, J., Rohr, M., Walter, T., Erkel, G., & Opatz, T. (2015). Total synthesis of two potent anti-inflammatory macrolactones of the oxacyclododecindione type. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 13(28), 7813–7821. <https://doi.org/10.1039/c5ob01044f>
- Tauber, J., Rohr, M., Walter, T., Schollmeyer, D., Rahn-Hotze, K., Erkel, G., & Opatz, T. (2016). A surprising switch in absolute configuration of anti-inflammatory macrolactones. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 14(15), 3695–3698. <https://doi.org/10.1039/c6ob00430j>
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B., & Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 455(7216), 1124–1128. <https://doi.org/10.1038/nature07299>
- Taylor, C. J., Bolton, E. M., & Bradley, J. A. (2011). Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1575), 2312–2322. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0030>
- Telias, M., & Ben-Yosef, D. (2021). Pharmacological Manipulation of Wnt/ β -Catenin

- Signaling Pathway in Human Neural Precursor Cells Alters Their Differentiation Potential and Neuronal Yield. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.680018>
- Tewary, M., Shakiba, N., & Zandstra, P. W. (2018). Stem cell bioengineering: building from stem cell biology. *Nature Reviews Genetics*, 19(10), 595–614. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0040-z>
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thomson, M., Liu, S. J., Zou, L. N., Smith, Z., Meissner, A., & Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*, 145(6), 875–889. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.017>
- Thorne, N., Inglese, J., & Auld, D. S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology*, 17(6), 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.012>
- Thorne, N., Shen, M., Lea, W. A., Simeonov, A., Lovell, S., Auld, D. S., & Inglese, J. (2012). Firefly luciferase in chemical biology: A compendium of inhibitors, mechanistic evaluation of chemotypes, and suggested use as a reporter. *Chemistry and Biology*, 19(8), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.015>
- Tian, Z., Zhao, Q., Biswas, S., & Deng, W. (2018). Methods of reactivation and reprogramming of neural stem cells for neural repair. In *Methods* (Vol. 133). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.08.014>
- Tikhomirov, A. S., Shtil, A. A., & Shchekotikhin, A. E. (2018). Advances in the discovery of anthraquinone-based anticancer agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 13(2), 159–183.
- Torres, J., & Watt, F. M. (2008). Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFκB and cooperating with Stat3. *Nature Cell Biology*, 10(2), 194–201. <https://doi.org/10.1038/ncb1680>
- Tripathi, Y. B., Sharma, M., & Manickam, M. (1997). Rubiadin, a new antioxidant from *Rubia cordifolia*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 34(3), 302–306.
- Tsanov, K. M., Pearson, D. S., Wu, Z., Han, A., Triboulet, R., Seligson, M. T., ... Daley, G. Q. (2017). LIN28 phosphorylation by MAPK/ERK couples signalling to the post-transcriptional control of pluripotency. *Nature Cell Biology*, 19(1), 60–67. <https://doi.org/10.1038/ncb3453>
- Tuba, Z., Bardin, C. W., Dancsi, A., Francsics--Czinege, E., Molnár, C., Csörgei, J., ... others. (2000). Synthesis and biological activity of a new progestogen, 16-methylene-17 α -hydroxy-18-methyl-19-norpregn-4-ene-3, 20-dione acetate. *Steroids*, 65(5), 266–274.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., ... Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nature Methods*, 13(9), 731.
- Ustianenko, D., Chiu, H. S., Treiber, T., Weyn-Vanhentenryck, S. M., Treiber, N., Meister, G., ... Zhang, C. (2018). LIN28 Selectively Modulates a Subclass of Let-7 MicroRNAs. *Molecular Cell*, 71(2), 271–283.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.029>
- Vasic, V., Barth, K., & Schmidt, M. H. H. (2019). Neurodegeneration and neuro-regeneration— Alzheimer’s disease and stem cell therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174272>
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463(7284), 1035–1041. <https://doi.org/10.1038/nature08797>
- Viswanathan, S. R., & Daley, G. Q. (2010). Lin28: A MicroRNA Regulator with a Macro Role. *Cell*, 140(4), 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.007>
- Voelkel, N. F., Douglas, I. S., & Nicolls, M. (2007). Angiogenesis in chronic lung disease. *Chest*, 131(3), 874–879.

- Wagner, R. T., & Cooney, A. J. (2013). Minireview: The diverse roles of nuclear receptors in the regulation of embryonic stem cell pluripotency. *Molecular Endocrinology*, 27(6), 864–878. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1383>
- Walker, J. M. (1994). The bicinechoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 32, pp. 5–8). <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:11>
- Walsh, G. M. (2013). Eosinophil apoptosis and clearance in asthma. *Journal of Cell Death*, 6, JCD--S10818.
- Walter, T. (2015). *Isolierung und Charakterisierung von Sekundärmetaboliten aus Eurotium herbariorum mit potentiellen anti-inflammatorischen Effekten auf Asthma-relevante Signaltransduktionswege*. TU Kaiserslautern.
- Wang, C., Xia, C., Bian, W., Liu, L., Lin, W., Chen, Y.-G., ... Jing, N. (2006). Cell aggregation-induced FGF8 elevation is essential for P19 cell neural differentiation. *Molecular Biology of the Cell*, 17(7), 3075–3084.
- Wang, D., Tabeti, R., Elderwish, S., Abou-Hamdan, H., Djehal, A., Yu, P., ... Désaubry, L. (2020). Prohibitin ligands: a growing armamentarium to tackle cancers, osteoporosis, inflammatory, cardiac and neurological diseases. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77). <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03475-1>
- Wang, L., Wang, L., Huang, W., Su, H., Xue, Y., Su, Z., ... Pei, D. (2013). Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nature Methods*, 10(1), 84–89. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2283>
- Wark, P. A. B., Bucchieri, F., Johnston, S. L., Gibson, P. G., Hamilton, L., Mimica, J., ... others. (2007). IFN- γ -induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 586–593.
- Watabe, T., & Miyazono, K. (2009). Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Research*, 19(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.323>
- Watroly, M. N., Sekar, M., Fuloria, S., Gan, S. H., Jeyabalan, S., Wu, Y. S., ... Fuloria, N. K. (2021). Chemistry, biosynthesis, physicochemical and biological properties of rubiadin: A promising natural anthraquinone for new drug discovery and development. *Drug Design, Development and Therapy*, 15(October), 4527–4549. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S338548>
- Way, T. Der, Huang, J. T., Chou, C. H., Huang, C. H., Yang, M. H., & Ho, C. T. (2014). Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β -catenin and Akt pathways. *European Journal of Cancer*, 50(2), 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.09.025>
- Weber, C., Vierengel, N., Walter, T., Behrendt, T., Lucas, T., Erkel, G., & Opatz, T. (2020). Total synthesis and biological evaluation of seven new anti-inflammatory oxacyclododecindione-type macrolactones. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 18(30), 5906–5917. <https://doi.org/10.1039/d0ob00958j>
- Weidler, M., Rether, J., Anke, T., & Erkel, G. (2000). Inhibition of interleukin-6 signaling by galiellalactone. *FEBS Letters*, 484(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02115-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02115-3)
- Weissman, I. L. (2000). Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X)
- Wen, M., Chen, Q., Chen, W., Yang, J., Zhou, X., Zhang, C., ... Wang, L. (2022). A comprehensive review of *Rubia cordifolia* L.: Traditional uses, phytochemistry, pharmacological activities, and clinical applications. *Frontiers in Pharmacology*, 13(September). <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.965390>
- Willis, B. C., & Borok, Z. (2007). TGF- β -induced EMT: Mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(3). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00163.2007>
- Willis, C. M., Nicaise, A. M., Krzak, G., Ionescu, R. B., Pappa, V., D'Angelo, A., ... Pluchino, S. (2022). Soluble factors influencing the neural stem cell niche in brain physiology,

- inflammation, and aging. *Experimental Neurology*, 355(May).
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114124>
- Wilson, M. S., & Wynn, T. A. (2009). Pulmonary fibrosis: Pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunology*, 2(2), 103–121. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.85>
- Winner, B., Kohl, Z., & Gage, F. H. (2011). Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1139–1151.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07613.x>
- Winter, R. W., Cornell, K. A., Johnson, L. L., Ignatushchenko, M., Hinrichs, D. J., & Riscoe, M. K. (1996). Potentiation of the antimalarial agent rifugalol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(6), 1408–1411.
- Witter, L., Anke, T., & Sterner, O. (1998). A new inhibitor of synovial phospholipase A2 from fermentations of *Penicillium* sp. 62-92. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 53(1–2), 60–64.
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., ... Nagy, A. (2009). PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458(7239), 766–770. <https://doi.org/10.1038/nature07863>
- Wu, D., & Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(3), 161–168.
- Wu, G., & Schöler, H. R. (2014). Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration*, 3(1), 3:7. <https://doi.org/10.1186/2045-9769-3-7>
- Wu, S. C., Chang, W. H., Dong, G. C., Chen, K. Y., Chen, Y. S., & Yao, C. H. (2011). Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(6), 565–577.
<https://doi.org/10.1177/0883911511423563>
- Wu, Y., Ai, Z., Yao, K., Cao, L., Du, J., Shi, X., ... Zhang, Y. (2013). CHIR99021 promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells by modulation of protein-encoding gene and long intergenic non-coding RNA expression. *Experimental Cell Research*, 319(17), 2684–2699.
- Wuthi-udomlert, M., Kupittayanant, P., & Gritsanapan, W. (2010). In vitro evaluation of antifungal activity of anthraquinone derivatives of *Senna alata*. *Journal of Health Research*, 24(3), 117–122.
- Xie, L., Law, B. K., Chytil, A. M., Brown, K. A., Aakre, M. E., & Moses, H. L. (2004). Activation of the Erk pathway is required for TGF- β 1-induced EMT in vitro. *Neoplasia*, 6(5), 603–610.
- Xie, Z., Tan, G., Ding, M., Dong, D., Chen, T., Meng, X., ... Tan, Y. (2010). Foxm1 transcription factor is required for maintenance of pluripotency of P19 embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Research*, 38(22), 8027–8038.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq715>
- Xu, Jian, Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-B-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Xu, Junfang, Zhang, Y., Qiu, C., & Cheng, F. (2017). Global and regional economic costs of dementia: a systematic review. *The Lancet*, 390, S47.
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A., & Kosik, K. S. (2009). MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 137(4), 647–658. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.038>
- Xu, Y., Pang, W., Lu, J., Shan, A., & Zhang, Y. (2016). Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13 contributes to neurogenesis via stabilizing the mucin-type O-glycoprotein podoplanin. *Journal of Biological Chemistry*, 291(45), 23477–23488.
- Yamashita, M., Fathyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., & Zhang, Y. E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β . *Molecular Cell*, 31(6), 918–924.
- Yan, H., Fernandez, M., Wang, J., Wu, S., Wang, R., Lou, Z., ... Xu, Z. (2020). B Cell

- Endosomal RAB7 Promotes TRAF6 K63 Polyubiquitination and NF- κ B Activation for Antibody Class-Switching. *The Journal of Immunology*, 204(5), 1146–1157. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901170>
- Yang, X., Hou, D., Jiang, W., & Zhang, C. (2014). Intercellular protein-protein interactions at synapses. *Protein and Cell*, 5(6), 420–444. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0054-z>
- Yao, Y., Hausding, M., Erkel, G., Anke, T., Förstermann, U., & Kleinert, H. (2003). Sporogen, S14-95, and S-curvularin, three inhibitors of human inducible nitric-oxide synthase expression isolated from fungi. *Molecular Pharmacology*, 63(2), 383–391. <https://doi.org/10.1124/mol.63.2.383>
- Ye, S., Tan, L., Yang, R., Fang, B., Qu, S., Schulze, E. N., ... Li, P. (2012). Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains. *PLoS One*, 7(4), e35892.
- Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., ... Scholer, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 122(3), 881–894.
- Yesudhas, D., Batoo, M., Anwar, M. A., Panneerselvam, S., & Choi, S. (2017). Proteins recognizing DNA: Structural uniqueness and versatility of DNA-binding domains in stem cell transcription factors. *Genes*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/genes8080192>
- Yim, H., Lee, Y. H., Lee, C. H., & Lee, S. K. (1999). Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Medica*, 65(1), 9–13. <https://doi.org/10.1055/s-1999-13953>
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281–292.
- Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., ... Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453(7194), 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature06968>
- Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., ... Crabtree, G. R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 476(7359), 228–231. <https://doi.org/10.1038/nature10323>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... others. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Others. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells: Commentary. *Science*, 318(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000305193.72586.39>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Yuan, Q., Campanella, G. S., Colvin, R. A., Hamilos, D. L., Jones, K. J., Mathew, A., ... Luster, A. D. (2006). Membrane-bound eotaxin-3 mediates eosinophil transepithelial migration in IL-4-stimulated epithelial cells. *European Journal of Immunology*, 36(10), 2700–2714. <https://doi.org/10.1002/eji.200636112>
- Yuan, Y., Park, J., Tian, Y., Choi, J., Pasquariello, R., Alexenko, A. P., ... Ezashi, T. (2019). A six-inhibitor culture medium for improving naïve-type pluripotency of porcine pluripotent stem cells. *Cell Death Discovery*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0184-4>
- Zhang, F., Fan, D., & Mo, X. N. (2018). Prohibitin and the extracellular matrix are upregulated in murine alveolar epithelial cells with LPS-induced acute injury. *Molecular Medicine Reports*, 17(6), 7769–7773. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8808>
- Zhang, S. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural

- differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.305>
- Zhang, X., Cheng, E., Huo, X., Yu, C., Zhang, Q., Pham, T. H., ... Souza, R. F. (2012). Omeprazole Blocks STAT6 Binding to the Eotaxin-3 Promoter in Eosinophilic Esophagitis Cells. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050037>
- Zhang, Y., Li, W., Laurent, T., & Ding, S. (2012). Small molecules, big roles - the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Journal of Cell Science*, 125(23), 5609–5620. <https://doi.org/10.1242/jcs.096032>
- Zhao, C., Sun, G. Q., Li, S., Lang, M. F., Yang, S., Li, W., & Shia, Y. (2010). MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 1876–1881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908750107>
- Zhao, C., Sun, G., Ye, P., Li, S., & Shi, Y. (2013). MicroRNA let-7d regulates the TLX/microRNA-9 cascade to control neural cell fate and neurogenesis. *Scientific Reports*, 3, 3–9. <https://doi.org/10.1038/srep01329>
- Zhong, X., Li, N., Liang, S., Huang, Q., Coukos, G., & Zhang, L. (2010). Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41961–41971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.169607>
- Zhou, M., Hu, Z., Qiu, L., Zhou, T., Feng, M., Hu, Q., & Zeng, B. (2017). Seamless genetic conversion of SMN2 to SMN1 via CRISPR / Cpf1 and single-stranded oligodeoxynucleotides in spinal muscular atrophy patient-specific iPSCs. 1–41. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.255>
- Zhu, H., Ng, S. C., Segr, A. V., Shinoda, G., Shah, S. P., Einhorn, W. S., ... Daley, G. Q. (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell*, 147(1), 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.033>
- Zhu, H., Shah, S., Shyh-Chang, N., Shinoda, G., Einhorn, W. S., Viswanathan, S. R., ... others. (2010). Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies. *Nature Genetics*, 42(7), 626.
- Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasadhan, R., Lin, T., ... Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*, 7(6).
- Zhu, W., Fan, Y., Frenzel, T., Gasmi, M., Bartus, R. T., Young, W. L., ... Chen, Y. (2008). Insulin growth factor-1 gene transfer enhances neurovascular remodeling and improves long-term stroke outcome in mice. *Stroke*, 39(4), 1254–1261.
- Zhuang, S. (2013). Regulation of STAT signaling by acetylation. *Cellular Signalling*, 25(9), 1924–1931. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.05.007>
- Zile, M. (2001). Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *The Journal of Nutrition*, 131(December 2000), 2074–2077.
- Ziliotto, N., Zivadinov, R., Jakimovski, D., Baroni, M., Tisato, V., Secchiero, P., ... others. (2019). Plasma levels of soluble NCAM in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 396, 36–41.
- Zumbrägel, F. K., Machtens, D. A., Curth, U., Lüder, C. G. K., Reubold, T. F., & Eschenburg, S. (2017). Survivin does not influence the anti-apoptotic action of XIAP on caspase-9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 530–535.

6 Anhang

Ergänzende Tabelle 1: signifikante Proteine ($p \leq 0,05$; ratio ≥ 2) an DM-Oxa-Beads TGF- β -stimuliert vs. DM-Oxa-Beads TGF- β -stimuliert mit Konkurrenz.

TGF_OB gg. TGF_V_OB			
Protein names	Gene names	neg LOG(P-value)	Ratio
WW domain-binding protein 2	WBP2	6,692446328	10,5236931
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	VAPA	5,096309835	9,92070738
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	ATP1B3	1,33086325	8,33485476
Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	2,234716579	3,33760516
Prohibitin-2	PHB2	2,241816385	3,12937514
4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2	3,851468212	2,17613284
Transferrin receptor protein 1;Transferrin receptor protein 1, serum form	TFRC	2,944213886	2,054643
HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain	HLA-B	1,972843223	1,79399427
Beta-2-microglobulin;Beta-2-microglobulin form pl 5.3	B2M	1,791364221	1,74099668
Prohibitin	PHB	3,000645002	1,7352101
Glutathione S-transferase P	GSTP1	1,460436439	1,68818283
Vesicle-trafficking protein SEC22b	SEC22B	2,62301417	1,68382263
Putative HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain H	HLA-H	1,877825326	1,54575539
HLA class I histocompatibility antigen, Cw-17 alpha chain	HLA-C	2,180838829	1,49828307
Ras-related protein Rab-11A;Ras-related protein Rab-11B	RAB11A;RAB11B	1,690994129	1,34990565
Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	2,008269238	1,28618113
Peroxiredoxin-1	PRDX1	2,887069642	1,21589279
HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	HLA-A	2,118904078	1,21129195
Peroxiredoxin-2	PRDX2	2,737599645	1,19321219
Cofilin-1	CFL1	2,14599867	1,0229613

Ergänzende Tabelle 2: signifikante Proteine ($p \leq 0,05$; ratio ≥ 2) an DM-Oxa-Beads TGF- β -stimuliert vs. Kontroll-Beads TGF- β -stimuliert.

TGF_OB gg. TGF_KB			
Protein names	Gene names	neg LOG(P-value)	Ratio
Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	ALDH7A1	5,652819171	13,5230996
Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	3,182636957	12,530474
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic;Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic, N-terminally processed	YARS	5,522206181	12,5116329
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	4,730964116	12,498354
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	SYNCRIP	7,951756382	12,2647196
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	6,130368963	12,0609261
Nuclear transport factor 2	NUTF2	5,621334276	11,853941
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	5,897196656	11,8389626
Aldose reductase	AKR1B1	5,107950628	11,6656348

Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	6,695661774	11,5175203
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	2,585387968	11,3000496
Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	7,383732537	11,2762461
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHS1	2,709679804	11,2462296
Prohibitin-2	PHB2	2,241148066	11,1036857
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	UGP2	4,507005577	10,8116751
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1;Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC1;RAC2	5,632103644	10,7936074
Sorcin	SRI	5,283694944	10,6918236
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4	5,425421305	10,6213077
WW domain-binding protein 2	WBP2	6,692446328	10,5236931
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB	7,602396038	10,4617341
Sideroflexin-1	SFXN1	6,346453014	10,3776528
Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	2,721305852	10,3211999
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1	2,829502162	10,3088113
Far upstream element-binding protein 1	FUBP1	1,6658977	10,2523174
Phospholipase D3	PLD3	6,89027818	10,1008482
Lysosome membrane protein 2	SCARB2	2,405588353	9,97460175
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	VAPA	5,096309835	9,92070738
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	SHMT2	7,729588038	9,8808492
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5	11,17428933	9,87760099
DnaJ homolog subfamily B member 1	DNAJB1	4,356217728	9,85574595
Biliverdin reductase A	BLVRA	2,86926368	9,8122975
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	NSDHL	7,56383268	9,68558407
Tubulin-folding cofactor B	TBCB	4,849835156	9,67352867
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial;Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	GLUD1;GLUD2	3,159594719	9,64307563
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA	4,126368923	9,53689798
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO	1,435557854	9,45226987
ATP-dependent DNA helicase Q1	RECQL	6,816852121	9,44348049
Protein S100-A11;Protein S100-A11, N-terminally processed	S100A11	4,31313737	9,26099205
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	2,345000954	9,13997857
Ras-related protein Rab-11A;Ras-related protein Rab-11B	RAB11A;RAB11B	1,520026058	8,98538224
Major vault protein	MVP	1,370125174	8,97899024
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1;Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, N-terminally processed	GNB2L1	1,418984219	8,83381255
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase;UDP-N-acetylgalactosamine pyrophosphorylase;UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	UAP1	3,250180254	8,75410239
Adipocyte plasma membrane-associated protein	APMAP	1,770922594	8,73151557
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1	1,442528935	8,72872035
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic;Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase;Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase;Formyltetrahydrofolate synthetase;C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic, N-terminally processed	MTHFD1	1,561366417	8,7077686
Transgelin-2	TAGLN2	2,232692156	8,64109111
Nucleolysin TIAR	TIAL1	1,978173557	8,61523533

Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	1,691799768	8,27877251
ELAV-like protein 1	ELAVL1	1,744246252	8,15220817
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH;Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase;IMP cyclohydrolase	ATIC	1,6058197	8,13435332
Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	1,525002875	7,86075385
PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	1,933596484	7,72139454
Cytosol aminopeptidase	LAP3	1,425613162	7,369174
NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	NQO1	5,973617927	7,34777371
Perilipin-3	PLIN3	1,431404229	7,28852383
Multifunctional protein ADE2;Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase;Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	PAICS	1,986228431	7,18016052
Lanosterol synthase	LSS	1,766539723	7,12025229
Protein FAM49B	FAM49B	1,44290085	7,09095558
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	1,335055975	6,76090018
Lactoylglutathione lyase	GLO1	1,311764562	6,64938513
Programmed cell death 6-interacting protein	PDCD6IP	3,60539915	6,24985838
Prohibitin	PHB	2,850791994	6,07155863
Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	2,916168542	5,99820677
Calcyclin-binding protein	CACYBP	3,687519014	5,82755057
Alpha-enolase	ENO1	4,366498438	5,58355554
Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	3,772485353	4,78855801
Nucleoside diphosphate kinase B;Putative nucleoside diphosphate kinase	NME2;NME2P1	4,582196175	4,74994405
Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	2,927382115	4,49913979
Vesicle-trafficking protein SEC22b	SEC22B	2,011759589	4,27150806
Cofilin-1	CFL1	3,470289248	4,04735883
Peroxiredoxin-1	PRDX1	6,279396199	3,93016561
Annexin A2;Putative annexin A2-like protein	ANXA2;ANXA2P2	3,544079562	3,88616625
Beta-2-microglobulin;Beta-2-microglobulin form pl 5.3	B2M	2,990342429	3,68101565
Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	3,421132405	3,42316977
Gamma-enolase	ENO2	2,389343781	3,20971235
Beta-enolase	ENO3	2,804107138	3,11058076
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	ACAT2	1,592438408	2,92547194
ADP-ribosylation factor 5	ARF5	1,670703999	2,37872378
Nicastrin	NCSTN	1,706809197	2,34410191
Heat shock protein beta-1	HSPB1	3,505847629	2,26585484
Integrin beta-1	ITGB1	1,655024226	2,0897007
Ras-related protein Rab-10	RAB10	3,161183163	2,0228068
Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	2,902434915	1,95875772
Myosin-9	MYH9	3,100472658	1,88757451
Myosin-14	MYH14	2,591407699	1,82825247
ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 3	ARF1;ARF3	1,865596193	1,82794189
Pyruvate kinase PKM	PKM	5,662579799	1,8212293
HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain	HLA-B	2,288165635	1,78158855
Ras-related protein Rab-6B	RAB6B	4,01944519	1,77499167
Putative HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain H	HLA-H	3,55909252	1,73862235

Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	4,021664608	1,73200035
Putative elongation factor 1-alpha-like 3;Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1P5;EEF1A1	4,058139964	1,68962892
Myosin-10	MYH10	2,075584873	1,68166733
Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	1,999430735	1,67929045
Clathrin heavy chain 1	CLTC	1,648938321	1,58407911
HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	HLA-A	2,482704224	1,53575134
Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRRC59	3,287954485	1,5074269
Ras-related protein Rab-1B;Putative Ras-related protein Rab-1C	RAB1B;RAB1C	4,93459008	1,46396383
Nucleobindin-1	NUCB1	1,37484522	1,45828597
Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	1,81742489	1,44513957
ADP/ATP translocase 2;ADP/ATP translocase 2, N-terminally processed	SLC25A5	2,728588053	1,41347535
Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha;Thymopoietin;Thymopentin	TMPO	1,724182431	1,41320928
Transferrin receptor protein 1;Transferrin receptor protein 1, serum form	TFRC	1,8256987	1,40272586
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	1,5467117	1,37942727
ADP/ATP translocase 3;ADP/ATP translocase 3, N-terminally processed;ADP/ATP translocase 1	SLC25A6;SLC25A4	2,144017529	1,20353953
40S ribosomal protein S3	RPS3	2,068398142	1,172575
Protein S100-A6	S100A6	1,533636976	1,03623231

Ergänzende Tabelle 3: signifikante Proteine ($p \leq 0,05$; ratio ≥ 2) an DM-Oxa-Beads CM-stimuliert vs. DM-Oxa-Beads CM-stimuliert mit Konkurrenz.

CM_OB gg. CM_V_OB			
Protein names	Gene names	neg LOG(P-value)	Difference
Leukocyte surface antigen CD47	CD47	5,779870381	11,0755666
Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1	5,807628044	10,3249623
Vesicular integral-membrane protein VIP36	LMAN2	6,987060227	10,0082509
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	CPOX	5,301892279	9,84483051
Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	ERAP1	6,142777139	9,76823107
Coatamer subunit zeta-1	COPZ1	6,138110891	9,39817047
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	4,990512362	9,11925379
Alpha-soluble NSF attachment protein	NAPA	5,087611839	8,96990267
26S protease regulatory subunit 6B	PSMC4	4,734066661	8,44575278
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	2,107911265	7,99157492
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	GNAI2	1,448428937	7,97564618
Cytochrome c oxidase subunit 2	MT-CO2	1,669525739	7,7351594
Prohibitin-2	PHB2	1,731287642	3,20448812
Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	1,762753158	3,06843185
Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	1,555272155	3,03021812
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	2,060466739	1,68890349
Peroxisredoxin-2	PRDX2	3,584472392	1,57197984

Prohibitin	PHB	1,694329464	1,27750556
Ras-related protein Rab-11A;Ras-related protein Rab-11B	RAB11A;RAB11B	1,582977477	1,23012288
Beta-2-microglobulin;Beta-2-microglobulin form pl 5.3	B2M	2,453757616	1,22925917
Peroxiredoxin-1	PRDX1	2,288133738	1,20418135
4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2	1,449521598	1,1140159
Nucleobindin-1	NUCB1	2,008852669	1,10668437

Ergänzende Tabelle 4: signifikante Proteine ($p \leq 0,05$; $\text{ratio} \geq 2$) an DM-Oxa-Beads CM-stimuliert vs. Kontroll-Beads CM-stimuliert.

Protein names	Gene names	neg LOG(P-value)	Difference
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	5,792681301	13,3352639
Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	2,122018206	12,2713197
Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	TARS	3,375860303	11,9223378
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1	3,191528836	11,6491025
Ornithine aminotransferase, mitochondrial;Ornithine aminotransferase, hepatic form;Ornithine aminotransferase, renal form	OAT	6,965109032	11,581502
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM	7,22971599	11,4648504
ADP-ribosylation factor-like protein 8B	ARL8B	5,827487107	11,1749544
Leukocyte surface antigen CD47	CD47	5,779870381	11,0755666
Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB	5,690322894	11,0646747
ADP-ribosylation factor-like protein 8A	ARL8A	6,383975522	11,0553134
Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	2,12794944	11,0531179
Far upstream element-binding protein 1	FUBP1	1,752888387	10,9840778
Lanosterol synthase	LSS	4,776342478	10,804889
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1	3,475696531	10,7670892
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB	5,642364099	10,7399152
NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	NQO1	2,163506823	10,7399036
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	VAPA	5,861797657	10,4708614
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	4,170206863	10,4635277
CD63 antigen	CD63	5,556353113	10,4494203
Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1	5,807628044	10,3249623
Aminopeptidase B	RNPEP	3,57844912	10,3094501
Phospholipase D3	PLD3	4,539979513	10,2792044
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1;Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC1;RAC2	4,380460144	10,2752342
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH;Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase;IMP cyclohydrolase	ATIC	1,934814074	10,1706053

Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	ILKAP	6,030212956	10,1311216
Sideroflexin-1	SFXN1	4,104369516	9,93458144
Flap endonuclease 1	FEN1	4,811405835	9,8711319
Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	ERAP1	6,142777139	9,76823107
DnaJ homolog subfamily B member 1	DNAJB1	3,549159565	9,66111565
Cytosol aminopeptidase	LAP3	1,453196573	9,61001396
Programmed cell death protein 6	PDCD6	2,964906201	9,5929567
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase;UDP-N-acetylgalactosamine pyrophosphorylase;UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	UAP1	4,68574137	9,51557668
L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	4,935499605	9,43141301
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	1,390012546	9,36263371
Aldose reductase	AKR1B1	1,90272636	9,33067417
Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic;Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic, N-terminally processed	YARS	2,126700356	9,30382125
Lanosterol 14-alpha demethylase	CYP51A1	5,330140106	9,18412336
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	FARSB	5,764926428	9,15556494
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	4,990512362	9,11925379
S-formylglutathione hydrolase	ESD	1,645402252	9,04014031
Prohibitin-2	PHB2	5,207233395	8,95081488
Ras-related protein Rab-32	RAB32	4,847882889	8,94293149
Nuclear transport factor 2	NUTF2	1,977574918	8,93292904
Lysosomal protective protein;Lysosomal protective protein 32 kDa chain;Lysosomal protective protein 20 kDa chain	CTSA	2,586472971	8,879035
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3	3,893820622	8,78259087
Multifunctional protein ADE2;Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase;Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	PAICS	2,948400802	8,7078948
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	1,399961274	8,70263481
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	1,764811166	8,56348372
Vesicular integral-membrane protein VIP36	LMAN2	2,373452338	8,55322997
Nesprin-1	SYNE1	1,30285054	8,49103165
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	CPOX	2,183943773	8,2787021
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4	1,896002201	8,21285868
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHS1	1,365244172	7,95464881
Perilipin-3	PLIN3	1,488969628	7,91559919
Major vault protein	MVP	3,152246549	7,87638569
Vesicle-trafficking protein SEC22b	SEC22B	1,361828292	7,7663544
Fragile X mental retardation protein 1	FMR1	1,467094897	7,69417206

Diphosphomevalonate decarboxylase	MVD	1,410546434	7,63393434
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	1,454537981	7,60420609
Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	ECI1	2,401594291	7,4960688
Prohibitin	PHB	1,738162878	7,4736414
ATP-dependent DNA helicase Q1	RECQL	1,441053964	7,00679096
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	1,433030051	6,8725729
Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	ALDH7A1	3,307338272	6,29808029
Programmed cell death 6-interacting protein	PDCD6IP	2,064518327	6,01965284
Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	1,901840903	5,33248091
Transferrin receptor protein 1;Transferrin receptor protein 1, serum form	TFRC	1,998761613	5,29807123
NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	FDXR	1,943237084	5,29208946
Ras-related protein Rab-11A;Ras-related protein Rab-11B	RAB11A;RAB11B	3,454267774	5,04136912
Copine-3	CPNE3	3,401939982	4,95461861
Transgelin-2	TAGLN2	1,67375193	4,58063285
Alpha-enolase	ENO1	3,28588287	4,42323144
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1;Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, N-terminally processed	GNB2L1	2,516767415	4,37450886
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	1,891234284	4,32774162
Nucleoside diphosphate kinase B;Putative nucleoside diphosphate kinase	NME2;NME2P1	2,568902394	3,83592765
Peroxiredoxin-1	PRDX1	4,238200444	3,52669621
Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	2,801497284	3,52320576
Integrin beta-1	ITGB1	1,359146057	3,51615286
Ezrin;Radixin	EZR;RDX	2,00586287	3,43186124
Beta-2-microglobulin;Beta-2-microglobulin form pl 5.3	B2M	2,766551284	3,30088679
Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	3,295338778	2,95891539
Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	2,761129586	2,92274984
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	1,573336238	2,91505051
ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 3	ARF1;ARF3	1,502889581	2,78417126
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	PAFAH1B3	1,874570975	2,65452449
Nucleobindin-1	NUCB1	3,279917658	2,44556872
ADP/ATP translocase 3;ADP/ATP translocase 3, N-terminally processed;ADP/ATP translocase 1	SLC25A6;SLC25A4	1,309733827	2,31406085
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	1,318756378	2,29713631
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	COX5B	1,747822446	2,17314339
Ras-related protein Rab-5B	RAB5B	2,321461773	2,11742083
Ras-related protein Rab-8A	RAB8A	2,250193451	2,0993131
Ras-related protein Rab-5A	RAB5A	2,266824711	2,01993752
Putative HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain H	HLA-H	2,607892596	1,87245369

Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	2,83794992	1,83881219
Pyruvate kinase PKM	PKM	3,408854183	1,82296117
ADP-ribosylation factor 4	ARF4	2,10262598	1,80952613
Ras-related protein Rab-10	RAB10	2,556103181	1,79118951
Ras-related protein Rab-8B	RAB8B	2,492904489	1,74656041
Myosin-9	MYH9	2,227550364	1,71588167
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3	1,89081459	1,68285275
ADP/ATP translocase 2;ADP/ATP translocase 2, N-terminally processed	SLC25A5	1,946399142	1,64268239
Heat shock protein beta-1	HSPB1	1,708423581	1,63496939
Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	3,121924646	1,59466871
Myosin-14	MYH14	1,978799158	1,59103266
HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	HLA-A	1,978799495	1,58651829
Putative elongation factor 1-alpha-like 3;Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1P5;EEF1A1	2,455717482	1,49694983
Myosin-10	MYH10	2,11064174	1,4881827
Nicastrin	NCSTN	1,340033836	1,44118818
Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRRC59	1,38809135	1,30742105
Clathrin heavy chain 1	CLTC	1,541823606	1,27252706
40S ribosomal protein S3	RPS3	2,754113292	1,23659579
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-terminally processed;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRNPH1;HNRNPH2	1,525751012	1,11277962

Ergänzende Tabelle 5: signifikante Proteine ($p \leq 0,05$; ratio ≥ 2) an DM-Oxa-Beads CM-stimuliert vs. DM-Oxa-Beads unstimuliert.

CM_OB gg. Neg_OB			
Protein names	Gene names	neg LOG(P-value)	Difference
Integrin beta-6	ITGB6	6,143437365	11,4285835
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	4,170206863	10,4635277
Fragile X mental retardation protein 1	FMR1	3,16308405	9,89291684
Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	ERAP1	6,142777139	9,76823107
Coatomer subunit zeta-1	COPZ1	6,138110891	9,39817047
Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	2,194683069	9,24316359
Alpha-soluble NSF attachment protein	NAPA	5,087611839	8,96990267
Ras-related protein Rab-32	RAB32	4,847882889	8,94293149
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARPC3	3,893820622	8,78259087
Proteasome subunit alpha type-7	PSMA7	3,052384528	8,60339244

26S protease regulatory subunit 6B	PSMC4	4,734066661	8,44575278
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	2,107911265	7,99157492
Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial	ECI1	2,401594291	7,4960688
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	1,402177193	6,20430231
Clathrin heavy chain 1	CLTC	2,448640133	3,04411507
Major vault protein	MVP	1,610099556	2,28070641
Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	ILKAP	1,559697555	2,21096245
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	CPOX	1,378231427	1,30007982
Basigin	BSG	2,533189888	1,24912898

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulausbildung

02.2015 – 12.2024 **Promotion**

TU Kaiserslautern

Abteilung Molekulare Biotechnologie und Systembiologie

Thema der Dissertation: Einfluss biologisch aktiver Naturstoffe auf Pluripotenzmarker in der Zelllinie P19 und Evaluierung potenzieller Wirkstoffe in zellulären Modellen entzündlicher und fibrotischer Erkrankungen

11.2012 – 01.2015 **Masterstudium Microbial and Plant Biotechnology**

TU Kaiserslautern

Thema der Abschlussarbeit: Isolierung und Charakterisierung von Sekundärmetaboliten aus *Eurotium herbariorum* mit potentiellen anti-inflammatorischen Effekten auf Asthma-relevante Signaltransduktionswege

Abschluss: **Master of Science** (Note: 1,1)

10.2009 – 10.2012 **Bachelorstudium der Biowissenschaften**

TU Kaiserslautern

Thema der Abschlussarbeit: *Allantophomopsis lycopodina* – Phytopathogene Naturstoffe, genetische Manipulation und Untersuchung zur Biosynthese von Allantofuranon - erstellt am Institut für Biotechnologie- und Wirkstoff-Forschung e. V. (IBWF)

Abschluss: **Bachelor of Science** (Note: 2,1)