



***Omics*-basierte Untersuchungen zum Wirkmechanismus des  
makrozyklischen Lactons Oxacyclododecindion**

vom Fachbereich Biologie  
der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau  
zur Verleihung des akademischen Grades Dr. rer. nat. genehmigte

**Dissertation**

von

**Anna Maria Kiefer, M.Sc., geb. in Merzig**

**Mündliche Prüfung: 23.05.2023**

**Dekan: Prof. Dr. Stefan Kins**

**Promotionskommissionsvorsitzender: Prof. Dr. Timo Mühlhaus**

**1. Berichterstatter: PD Dr. Gerhard Erkel**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Kins**



# I. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel und Hilfestellungen in der Arbeit angegeben habe.

Weder wurde diese Arbeit oder Teile davon als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung bereits abgegeben noch die gleiche oder eine andere Abhandlung bei einem anderen Fachbereich oder einer anderen Universität als Dissertation eingereicht.

Kaiserslautern, Januar 2023

---

Anna Maria Kiefer

## II. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben. Besonders herzlicher Dank gebührt dabei PD Dr. Gerhard Erkel. Danke für Deine Betreuung dieser Arbeit, für die konstruktiven Gespräche aller Art und für alles, was ich in den vergangenen Jahren in Deiner Arbeitsgruppe lernen durfte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Stefan Kins für die Übernahme des zweiten Gutachtens und Prof. Dr. Timo Mühlhaus für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission und die hilfreichen Ratschläge bei der Planung der *Transcriptomics*-Experimente.

Dank gilt auch Prof. Dr. Michael Schroda für die Unterstützung und die sehr angenehme Zusammenarbeit über die gesamte Zeit und Dr. Frederik Sommer für die massenspektrometrischen Messungen.

Ein großes Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Till Opatz und seine Arbeitsgruppe, die alle hier verwendeten Oxa-Derivate bereitgestellt und die Strukturaufklärung der Perylenchinone durchgeführt haben. Besonders an Nina Vierengel, für die sehr schöne und konstruktive Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Eine wichtige Stütze waren mir auch meine lieben Kollegen in den Abteilungen MBS und CSB, besonders meine Büronachbarn Marcel, Karin und Anja einerseits und Anna P und Justus andererseits: Ohne euch alle wäre die Zeit hier nicht mal halb so schön gewesen.

Dank gilt auch allen Bachelor- und Masterstudent\*Innen und allen Praktikant\*Innen, die ich während meiner Zeit als Doktorandin betreuen durfte.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und Freunden, die mich immer unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten, besonders auch bei Catherine für die Korrektur dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich meinem Venny, auf den ich mich in wirklich jeder Lebenslage verlassen kann: Egal ob es deine Expertise bei der Auswertung der *Transcriptomics*- und *Proteomics*-Daten war oder deine aufmunternden Worte in schwierigen Zeiten, du warst mir immer eine große Hilfe. Auch dir danke ich natürlich für die Korrektur dieser Arbeit.

### III. Zusammenfassung

Die Suche nach neuen therapeutischen Wirkstoffen ist, aufgrund der geringen Erfolgsquote vor allem in späteren Phasen der Zulassung, nach wie vor eine große Herausforderung. Für einen möglichst effizienten Entwicklungs- und Zulassungsprozess zu erhöhen, ist eine möglichst genaue Charakterisierung des Moleküls und der davon ausgehenden biologischen Aktivität sinnvoll. Eine wertvolle Quelle an potenziellen Wirkstoffen stellen Sekundärmetaboliten aus Bakterien, Algen, Pflanzen oder Pilzen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene, aus Pilzen isolierte Stoffe näher untersucht, die durch eine phänotypische Wirkstoffsuche gefunden wurden. Im Gegensatz zu einer Target-basierten Wirkstoffsuche, wird sich bei dieser Methode nicht auf ein bestimmtes Zielprotein fokussiert, sondern in einem zellbasierten System nach Stoffen gesucht, die einen phänotypischen Effekt hervorrufen. Das genaue Target bleibt daher zunächst unbekannt.

Hauptsächlich wurde das Makrolacton Oxacyclododecindion (Oxa) bzw. dessen Derivate untersucht. In phänotypischen Analysen stellte sich Oxa bereits in der Vergangenheit als vielversprechender Wirkstoff zur Behandlung inflammatorischer und fibrotischer Erkrankungen heraus. Verschiedene Derivate des Naturstoffs wurden durch die Abteilung für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. So konnte der Einfluss verschiedener Derivatisierungen auf die biologische Aktivität analysiert und mit bereits publizierten Derivaten verglichen werden. So konnte die optimale Position für weitere Funktionalisierungen des Moleküls gefunden werden.

Neben der Analyse globaler Effekte auf BEAS-2B und HepG2 stand vor allem die Identifikation möglicher Targets im Vordergrund. Dazu wurden zunächst verschiedene Ansätze zur Identifikation von Proteinen, die an das besonders aktive Derivat 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion (DM-Oxa) binden, durchgeführt. So konnten bereits erste Kandidaten, insbesondere das Hitzeschockprotein HSP90, als mögliche Interaktoren identifiziert werden. Dieses Protein hat einen zentralen Stellenwert in zahlreichen zellulären Prozessen, wodurch es bereits als mögliches Target für verschiedene Erkrankungen bekannt ist.

Um erstmals einen Einblick in die globalen Effekte von DM-Oxa auf die Genexpression und das Proteom in verschiedenen Zelltypen zu erhalten, wurden sowohl mRNA-Sequenzierungs- als auch MS-*Proteomics*-Ansätze durchgeführt. Somit konnten bereits bekannte Charakteristika verifiziert und neue Einblicke in beteiligte Signalwege gewonnen werden. Im Rahmen dieser Analysen konnten potenzielle Zielproteine von DM-Oxa identifiziert werden. Darunter beispielsweise die zentralen Transkriptionsfaktoren FOXO3 und AP-1.

Auch die Rolle von HSP90 als möglicher Interaktionspartner von DM-Oxa wurde weiter beleuchtet. Dazu wurde eine Co-Immünpräzipitation mit HSP90 Antikörpern durchgeführt, um Veränderungen in der Abundanz von Proteinen, die an HSP90 binden, festzustellen. Solche Veränderungen könnten auf die Blockade von Bindestellen durch DM-Oxa hinweisen. Tatsächlich wurde die Abundanz von 100 bekannten Interaktionspartnern durch DM-Oxa Behandlung signifikant beeinflusst, sodass die Rolle von HSP90 als Oxa-Target weiter ins Zentrum rückt.

Neben der Analyse von Oxacyclododecindion und verschiedenen Derivaten wurden zwei weitere bisher unveröffentlichte Naturstoffe aus einem Pilz der Gattung *Alternaria* näher untersucht. Diese gehören zu Klasse der Perylenchinone und zeigten zum Teil toxische und oxidative Wirkung in BEAS-2B-Zellen, was durch verschiedene Versuchsansätze nachgewiesen werden konnte.

## IV. Abstract

The search for new and effective therapeutic substances remains a major challenge due to the low success rate, especially in the later phases of approval. To increase the chances of success during drug approval, it is useful to characterize the molecule and its biological activity as precisely as possible, before using it in animals or humans. Secondary metabolites from bacteria, algae, plants or fungi represent a valuable source of potential active ingredients. In this work, several compounds isolated from fungi were investigated. They all have been found by a phenotypic drug search. In contrast to a target-based drug search, this method does not focus on a specific target protein, but searches for substances that cause a phenotypic effect in a cell-based system. The exact target of the substance therefore remains unclear.

Mainly the derivatives of the macrolactone oxacyclododecindione (Oxa) were investigated. In phenotypic analyses, Oxa has previously been shown to be a promising candidate for the treatment of inflammatory and fibrotic diseases. Various derivatives of the natural substance were synthesized by the Department of Organic Chemistry at the Johannes Gutenberg University in Mainz and their biological activity was investigated in the course of this work. Thus, the influence of different derivatizations on the biological activity could be analyzed and compared with already published derivatives. This information helped to find the optimal position for further functionalization of the molecule.

Another focus of this work was on the identification of potential targets and the global effects of Oxa-type macrolactones on BEAS-2B and HepG2 cells. First, different approaches to identify proteins binding to the particularly active derivative 14-deoxy-14-methyloxacyclododecindione (DM-Oxa) were performed. Thus, first candidates, especially the heat shock protein HSP90, could already be identified as possible interactors. This protein has a central role in numerous cellular processes, making it a known potential target for various diseases.

For the first time, -omics approaches allowed to take a glance at the global effects of DM-Oxa on gene expression and on the proteome in different cell types. By this, already known characteristics could be verified and new insights into involved signaling pathways could be gained. Potential target proteins of DM-Oxa could be identified in the course of these analyses. These include, for example, the central transcription factors FOXO3 and AP-1.

The role of HSP90 as a potential interaction partner of DM-Oxa was also further elucidated. To this end, co-immunoprecipitation with HSP90 antibodies was performed to detect changes in the abundance of proteins that bind to HSP90. Such changes could indicate the blocking of binding sites by DM-Oxa. Indeed, the abundance of 100 known interaction partners was significantly affected by DM-Oxa treatment.

In addition to the analysis of oxacyclododecindione and various derivatives, two other previously unpublished natural products from a fungus of the Genus *Alternaria* were studied. These belong to the class of perylenequinones and showed partly toxic and oxidative effects in BEAS-2B cells, which could be demonstrated by different experimental approaches.



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Drug Development.....	1
1.2. Oxidativer Stress .....	2
1.2.1. Beteiligte Signalwege.....	3
1.2.2. Therapeutisches Potenzial des Nrf2-Signalwegs .....	4
1.3. Die epithelial-mesenchymale Transition.....	4
1.3.1. Beteiligte Signalwege.....	5
1.3.2. Pathologische Deregulation der EMT.....	7
1.4. Oxacyclododecindion.....	9
1.5. Target-Identifizierung von biologisch aktiven Substanzen.....	12
1.5.1. Transkriptomik .....	13
1.5.2. Proteomik .....	14
2. Zielsetzung .....	16
3. Material und Methoden .....	17
3.1. Medien.....	17
3.1.1. Medien und Zusätze für die Zellkultur .....	17
3.1.2. Weitere Medien.....	17
3.2. Puffer und Lösungen.....	18
3.3. Zytokine .....	19
3.4. Moleküle für die Click-Chemie .....	19
3.4.1. Synthetische Oxacyclododecindion-Derivate .....	19
3.5. Plasmide.....	19
3.6. Oligonukleotide .....	20
3.7. Zelllinien .....	20
3.7.1. BEAS-2B .....	20
3.7.2. HepG2 .....	20
3.8. Handhabung von <i>Escherichia coli</i> und humanen Zelllinien.....	20
3.8.1. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	20

3.8.2.	Kultivierung und Passage humaner Zellen.....	20
3.8.3.	Kryokonservierung humaner Zellen .....	21
3.8.4.	Kryokonservierung transformierter <i>E. coli</i> .....	21
3.9.	Handhabung und ITS-Sequenzierung von Pilzen.....	21
3.9.1.	Kultivierung und Konservierung von Pilzen .....	21
3.9.2.	DNA-Isolation und ITS-Sequenzierung .....	21
3.10.	Aufreinigung von Reinsubstanzen .....	22
3.10.1.	Herstellung von Rohextrakten aus Filtrat und Mycel.....	22
3.10.2.	Analytische HPLC von Reinsubstanzen und Gemischen.....	22
3.10.3.	Fraktionierung von Extrakten durch präparative HPLC .....	23
3.11.	Zellbasierte Methoden .....	23
3.11.1.	Transiente Transfektion humaner Zellen .....	23
3.11.2.	Applikation von Substanzen und Extrakten .....	23
3.11.3.	Messung der Luciferase Aktivität.....	24
3.11.4.	XTT-Zellviabilitäts Versuch.....	24
3.11.5.	Giemsafärbung.....	24
3.12.	Proteinbasierte Methoden .....	24
3.12.1.	Herstellung von Proteinextrakten.....	24
3.12.2.	Herstellung von Proteinextrakten für die Click-Chemie.....	25
3.12.3.	Proteinbestimmung mittels BCA-Assay .....	25
3.12.4.	Markierung der Zielproteine von DM-Oxa.....	25
3.12.5.	Kupfer-katalysierte Click-Reaktion in Proteinextrakten .....	25
3.12.6.	Immunpräzipitation .....	25
3.12.7.	SDS-PAGE.....	26
3.12.8.	Western-Blot .....	26
3.12.9.	Antikörper.....	27
3.13.	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie .....	27
3.13.1.	In-Gel-Verdau von Proteinproben.....	27
3.13.2.	In-Solution-Verdau für die Analyse des Proteoms .....	28

3.13.3.	Coomassie-Färbung.....	29
3.14.	Massenspektrometrische Messungen .....	29
3.15.	mRNA-Quantifizierung.....	29
3.15.1.	RNA-Isolation .....	29
3.15.2.	mRNA-Sequenzierung .....	29
3.15.3.	Quantitative Real-Time PCR .....	30
3.15.4.	qPCR-Primer.....	30
3.16.	Methoden zur Detektion von oxidativem Stress.....	32
3.16.1.	2,7-Dichlorhydrofluorescein-Assay .....	32
3.16.2.	Comet-Assay.....	32
3.17.	Auswertung der Daten.....	33
3.17.1.	Software.....	33
3.17.2.	Auswertung von Proteom- und Transkriptom-Daten.....	33
4.	Ergebnisse.....	34
4.1.	Struktur-Wirkungsbeziehungen von Oxacyclododecindion Derivaten.....	34
4.2.	Biologische Aktivität von DM-Oxa in BEAS-2B-Zellen.....	36
4.2.1.	Anti-inflammatorische Aktivität in BEAS-2B .....	37
4.2.2.	Anti-EMT Aktivität in BEAS-2B.....	38
4.3.	Versuche zur Identifikation möglicher der Zielproteine von DM-Oxa .....	42
4.3.1.	Pulldown an funktionalisierten Agarosebeads.....	42
4.3.2.	Biotin-Streptavidin Pulldown mit DM-Oxa-Alkin.....	51
4.3.3.	Kovalente Kopplung eines DM-Oxa-Diazirins an potenzielle Zielproteine .....	56
4.4.	Einfluss von DM-Oxa auf mRNA.....	67
4.4.1.	Vorbereitung und Qualität der Daten.....	69
4.4.2.	Identifikation differenziell exprimierter Gene (DEG) .....	73
4.4.3.	Angereicherte Signalwege nach DM-Oxa Behandlung.....	83
4.4.4.	Korrelationsnetzwerk zur Identifikation relevanter Transkriptionsfaktoren .....	85
4.5.	Einfluss von DM-Oxa auf das Proteom .....	89
4.5.1.	Vorbereitung und Qualität der Daten.....	89

4.5.2.	Identifikation signifikant veränderter Proteine.....	91
4.5.3.	Angereicherte Signalwege nach DM-Oxa Behandlung.....	92
4.6.	Vergleichende Betrachtung von Transkript- und Proteom-Daten.....	94
4.7.	Co-Immunpräzipitation mit HSP90 .....	101
4.8.	Charakterisierung von Perylenchinonen.....	104
4.8.1.	Isolation und Strukturaufklärung .....	104
4.8.2.	Biologische Aktivität .....	105
5.	Diskussion .....	114
5.1.	Struktur-Wirkungsbeziehungen von Oxacyclododecindion Derivaten.....	114
5.2.	Biologische Aktivität von DM-Oxa in BEAS-2B-Zellen.....	118
5.3.	Zielproteine von Oxacyclododecindion.....	119
5.3.1.	Pulldown Versuche .....	119
5.3.2.	Wirkung auf Proteom und mRNA-Expression .....	122
5.3.3.	HSP90 Interaktion.....	128
5.4.	Charakterisierung von Perylenchinonen aus <i>Alternaria sp.</i> .....	129
5.5.	Ausblick .....	130
5.5.1.	Oxacyclododecindion.....	130
5.5.2.	HSP90 als therapeutisches Target.....	132
5.5.3.	Perylenchinone .....	133
6.	Quellenverzeichnis.....	135
7.	Anhang .....	162
8.	Lebenslauf .....	177

# 1. Einleitung

## 1.1. Drug Development

Die Verwendung von Arzneimitteln jeglicher Art hat in der Geschichte der Menschheit wohl unzählige Leben verbessert, verlängert und gerettet. Dabei ist die Wirkung von Arzneimitteln generell auf die Aktivität von Wirkstoffen zurückzuführen. Eine der wichtigsten Quellen für Wirkstoffe sind nach wie vor natürlich vorkommende Moleküle, wie z.B. von Pflanzen, Pilzen oder Bakterien gebildete Sekundärmetaboliten, oder davon abgeleitete Derivate (Newman and Cragg 2020). Trotz der Vielfalt an verfügbaren Arzneimitteln und Wirkstoffen gibt es nach wie vor unheilbare Krankheiten. Solange dies der Fall ist, wird es auch einen Bedarf für die Entwicklung neuer und besserer Wirkstoffe geben. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist jedoch ein langwieriger und kostspieliger Prozess, der in über 90 % der Fälle vor der erfolgreichen Zulassung abgebrochen werden muss (Sun et al. 2022). Ein häufiges Problem ist dabei eine mangelnde klinische Wirksamkeit, die, aufgrund einer schlechten Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus *in vitro* und Tiermodellen auf humane Erkrankungen, erst spät erkannt wird. Häufig werden Naturstoffe zur Verbesserung von ADME (*absorption, distribution, metabolism and excretion*) Eigenschaften synthetisch optimiert, um die Erfolgchancen eines Stoffs in den nachfolgenden Phasen zu verbessern (Cragg and Newman 2013). Auch die Kenntnis des genauen Wirkmechanismus und der so genannten off-Targets ist ein Schlüsselpunkt, der die Wahrscheinlichkeit des Scheiterns in späteren Zulassungsphasen verringert und damit die Erfolgchancen einer Zulassung erhöht (Becker and Villingner 2017). Als Target bezeichnet man die molekularen Interaktionspartner eines Wirkstoffs, wenn diese Interaktionen zur beobachteten Wirkung beitragen. off-Targets hingegen sind Interaktionspartner, die von einem Wirkstoff beeinflusst werden, jedoch nicht zur eigentlich erwünschten Wirkung beitragen.

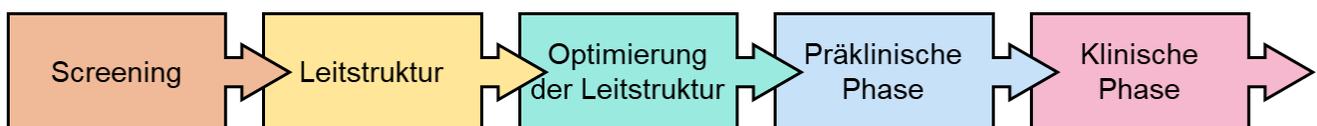


Abbildung 1 Typischer Verlauf der phänotypischen Wirkstoffsuche. Durch Screening Ansätze können Leitstrukturen gefunden werden, die dann chemisch optimiert werden können. Nach Erhebung von Daten zur Toxizität und Wirkung durch *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* Studien können vielversprechende Kandidaten die klinischen Phasen I bis III durchlaufen und bei erfolgreicher Evaluation durch zuständige Behörden für die Verwendung zugelassen werden (Kubota et al. 2019; Réda et al. 2020).

Für die Entwicklung von neuen Wirkstoffen gibt es verschiedene Herangehensweisen: Einerseits können von einem bestimmten validierten Target ausgehend Modulatoren gesucht werden (Target-basierte Wirkstoffsuche), andererseits können Wirkstoffe anhand ihrer phänotypischen Effekte auf ein bestimmtes Krankheitsbild identifiziert werden (Phänotypische Wirkstoffsuche, Abbildung 1) (Vincent et al. 2022). Ansätze für die phänotypische Wirkstoffsuche können aus geplanten Versuchen, wie zellbasierten Screeningsystemen, aber auch aus zufälligen Entdeckungen, wie der Nutzung von unerwarteten Nebenwirkungen bekannter Wirkstoffe, entstehen (Vincent et al. 2022).

Ob Target-basierte Vorgehen oder die phänotypische Wirkstoffsuche zu bevorzugen sind ist umstritten, festzuhalten ist aber, dass beide Ansätze Vor- und Nachteile aufweisen (Kubota et al. 2019): Während bei der Suche nach Modulatoren eines bestimmten bekannten Targets die Komplexität eines Krankheitsbildes vernachlässigt wird und Erkenntnisse daher nur begrenzte Übertragbarkeit auf eine Wirksamkeit im Organismus zulassen, wird ein phänotypischen Ansatz dieser Komplexität zwar eher gerecht, Targets bleiben aber zunächst unbekannt. Die aufwendige Aufgabe der Target-Identifikation bleibt somit vorerst ungelöst. Näheres zur Wichtigkeit der Target-Identifikation und Strategien zur Identifikation von Targets und off-Targets werden in folgenden Abschnitten näher beschrieben. Die in dieser Arbeit beschriebenen Naturstoffe wurden über ein aktivitätsgeleitetes phänotypisches Screening in zellbasierten Systemen identifiziert: Oxacyclododecindion als Inhibitor von Inflammations- und Fibrose-relevanter Signalwege und verschiedene Perylenchinone als Modulatoren antioxidativer Vorgänge. Auf die in diesem Kontext betrachteten Vorgänge und deren Bedeutung in bestimmten Erkrankungen wird im Folgenden näher eingegangen.

### 1.2. Oxidativer Stress

Die Erhaltung eines Gleichgewichts zwischen Oxidation und Reduktion ist ein zentraler Teil des aeroben Lebens. Prozesse, die mit der Oxidation-Reduktion (Redox) Regulation zusammenhängen finden sich in nahezu allen fundamentalen biologischen Prozessen (Sies et al. 2017). Kommt es dabei durch ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und reduktiven Vorgängen zu einem Überschuss an freien Radikalen, wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), so spricht man von oxidativem Stress. Treten vermehrt ROS in der Zelle auf, so kann dies unter anderem zur Schädigung von Zellmembranen, DNA, Mitochondrienmembran und von Proteinen führen (Lang et al. 2019). ROS können sowohl aus endogenen als auch aus exogenen Quellen entstehen. Zu den endogenen Quellen zählen dabei verschiedene Organellen, in denen ein hoher Bedarf an Sauerstoff besteht. Dazu gehören vor allem Mitochondrien, aber auch Peroxisomen und das endoplasmatische Retikulum (ER) (Phaniendra et al. 2015). Zu den exogenen Ursachen für ROS zählen z.B. hohe Temperatur, ultraviolettes Licht und verschiedene Chemikalien (Phaniendra et al. 2015) Allgemein lässt sich sagen, dass ein kurzzeitiges Ansteigen von ROS als physiologisch, eine längerfristige Erhöhung des ROS Spiegels als pathologisch angesehen werden kann (Shadel and Horvath 2015). Physiologisch dienen ROS als wichtige Signalmoleküle, die essenziell zur Erhaltung der Zellhomöostase beitragen. Zentrale Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) und das *activator protein 1* (AP-1) aber auch wichtige Proteinkinasen wie die Proteinkinase A (PKA) sind durch ROS reguliert (Lang et al. 2019). Das Auftreten von oxidativem Stress löst eine Reihe an Bewältigungsmechanismen aus, wie z.B. die „*unfolded protein response*“, die eine Schädigung der Zelle verhindern sollen (Lang et al. 2019). Teil

dieses Vorgangs ist die erhöhte Aktivität sogenannter Hitzeschockproteine, die unter anderem bei der Faltung von Proteinen und Erhaltung der korrekten Sekundärstruktur helfen. Die Neutralisierung von ROS erfolgt durch Enzyme wie z.B. Superoxid-Dismutasen (SOD) oder Hämoxigenase 1 (HMOX1) (Lang et al. 2019).

### 1.2.1. Beteiligte Signalwege

Ein wichtiger Signalweg zur Regulation des Redox-Status ist der Nrf2-ARE Signalweg. Nrf2 liegt unter physiologischen Bedingungen an *kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) gebunden vor, wodurch es ubiquitiniert und dem proteolytischen Abbau zugeführt wird. Kommt es durch ROS zur Dissoziation von KEAP1 und Nrf2, so kann Nrf2 in den Nucleus translozieren, wo es über das *antioxidant response element* (ARE) an die DNA bindet (Abbildung 2). So werden Gene exprimiert, die für detoxifizierende und antioxidative Proteine codieren, z.B. *NAD(P)H quinone oxidoreductase 1* (NQO1), SOD oder HMOX1 (Ahmed et al. 2017; Neilson et al. 2020). ROS können weitere Signalwege induzieren, so beispielsweise auch den NF- $\kappa$ B Signalweg. Durch ROS kann die I $\kappa$ B Kinase (IKK) aktiviert werden, die dann den NF- $\kappa$ B Inhibitor (I $\kappa$ B) phosphoryliert. Durch diesen Vorgang wird das normalerweise von I $\kappa$ B gebundene NF- $\kappa$ B frei und kann in den Nucleus translozieren, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression inflammatorischer Gene induziert (Ganesh Yerra et al. 2013). Die Aktivierung von IKK kann außerdem durch Bindung von KEAP1 destabilisiert werden, was ebenfalls zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen kann (Kim et al. 2010).

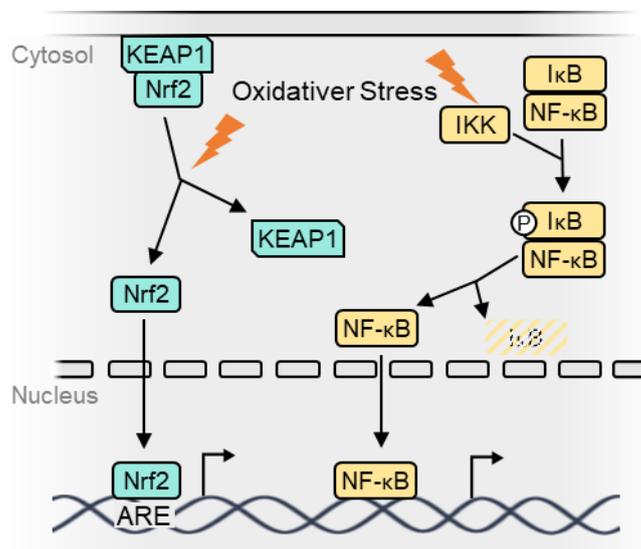


Abbildung 2 Aktivierung von Nrf2 und NF- $\kappa$ B durch oxidativen Stress. Unter physiologischen Bedingungen markiert KEAP1 Nrf2 für den Ubiquitin-abhängigen Abbau im Proteasom. Durch ROS kommt es zur Dissoziation des Komplexes aus Nrf2 und KEAP1, woraufhin Nrf2 in den Nucleus transloziert. Dort bindet es an das ARE-Element und reguliert so die Genexpression von detoxifizierenden und zytoschutzprotektiven Proteinen. Auch die NF- $\kappa$ B abhängige Genexpression wird durch ROS induziert, da diese IKK aktivieren. Aktives IKK phosphoryliert den Inhibitor I $\kappa$ B welcher dann proteolytisch degradiert wird. NF- $\kappa$ B kann dann in den Nucleus translozieren und die Expression pro-inflammatorischer Gene induzieren (Ganesh Yerra et al. 2013; Ahmed et al. 2017).

### 1.2.2. Therapeutisches Potenzial des Nrf2-Signalwegs

Der Nrf2-ARE Signalweg ist aufgrund seiner zentralen Rolle in der Regulation von oxidativem Stress und zytoprotektiven Wirkung ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe (Coppole et al. 2017). Dementsprechend könnten Aktivatoren des Nrf2 Signalwegs in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen und zur Krebsprävention Anwendung finden (Brandes and Gray 2020; Telkoparan-Akillilar et al. 2021). Eine präventive Wirkung von Nrf2 auf die Krebsentstehung wurde in Mausmodellen nachgewiesen (Moon and Giaccia 2015). Auch in neurodegenerativen Erkrankungen könnte eine Nrf2 Aktivierung aufgrund der zytoprotektiven Wirkung positive Auswirkungen zeigen: Durch die Verminderung von Schäden durch oxidativen Stress und Inflammation und die Verbesserung der Mitochondrienfunktion werden neuroprotektive Effekte angenommen (Brandes and Gray 2020; Tavakkoli et al. 2019). Eine erhöhte Aktivität des Nrf2 Signalwegs wurde andererseits als Biomarker in Krebserkrankungen identifiziert (Taguchi and Yamamoto 2020). In Krebszellen bewirkt die unregulierte Akkumulation von Nrf2 ein verbessertes Überleben in limitierten Mikroumgebungen, sowie eine erhöhte Zellproliferation (Telkoparan-Akillilar et al. 2021; Taguchi and Yamamoto 2020). Eine Inhibition der Nrf2 Akkumulation könnte hingegen den Zelltod induzieren und stellt somit einen möglichen Therapieansatz bei Nrf2 abhängigen Krebserkrankungen dar (Telkoparan-Akillilar et al. 2021). Aufgrund der beschriebenen ambivalenten Rolle von Nrf2 könnten sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren des entsprechenden Signalwegs kontextabhängig therapeutische Anwendung finden (Telkoparan-Akillilar et al. 2021; Cuadrado et al. 2019).

### 1.3. Die epithelial-mesenchymale Transition

Alle Metazoen, zu denen auch der Mensch gehört, sind aus verschiedenen Arten von Geweben aufgebaut. Dazu zählen neben Muskel und Nervengewebe auch das Epithel- und Bindegewebe. Epithelien, aufgebaut aus dicht gepackten flächenhaften Zellverbänden, haben eine abgrenzende Funktion, sowohl zwischen Körperkompartimenten als auch nach außen. Bindegewebe, zu dem das mesenchymale Bindegewebe gehört, sind strukturgebende Gewebe mit vielfältigen Aufgaben (Sadava et al. 2019). Das Mesenchym besteht aus amöboid beweglichen, multipotenten Zellen, die durch Migration an ihren Zielort in unterschiedliche Zelltypen ausdifferenzieren (Dominici et al. 2006). Die Epithelial-mesenchymale Transition, also der Übergang von epithelialen Zellen in Zellen mit mesenchymalen Merkmalen, ist ein essenzieller Vorgang während der Embryonalentwicklung. Epitheliale Zellen verlieren während der EMT die für sie typische Anbindung an ihre basale Membran und zeigen stattdessen mesenchymale Merkmale, wie eine erhöhte Migrationsfähigkeit, eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen apoptotischen Zelltod und die erhöhte Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM). Durch die EMT kommt es zum Verlust der apikal-basalen Zellpolarität von Epithelzellen durch den Abbau von Zell-Zellverbindungen wie Tight Junctions und Desmosomen

(Brabletz et al. 2021). Insgesamt erfolgt also während der EMT ein Abbau der Basalmembran und parallel dazu eine Umwandlung der epithelialen Zelle in eine mesenchymalen Zelle, die durch die ECM migrieren kann (Kalluri and Neilson 2003). Durch den umgekehrten Prozess, die Mesenchymal-epitheliale Transition (MET) erfolgt die Umkehr dieser Charakteristika zurück zum epithelialen Phänotyp (Pei et al. 2019). Auch nach Abschluss der Embryonal- und Organentwicklung spielen diese Prozesse weiterhin eine Rolle, beispielsweise in der Wundheilung. Diese EMT wird von der während der Embryonalentwicklung auftretenden abgegrenzt (Kalluri and Weinberg 2009; Marconi et al. 2021). Innerhalb der Wundheilung tritt die EMT zusammen mit inflammatorischen Prozessen auf und führt zur Reparatur beschädigter Gewebe (Kalluri and Weinberg 2009). Induziert wird die EMT in diesem Falle durch verschiedene Signalmoleküle und führt dann zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit von epithelialen Zellen und deren Umwandlung zu Fibroblasten (Lamouille et al. 2014; Marconi et al. 2021). Dieser Prozess ermöglicht den Wundverschluss und wird anschließend mit abklingender Inflammation durch die Reepithelialisierung der eingewanderten Zellen beendet (Barriere et al. 2015).

### 1.3.1. Beteiligte Signalwege

Inflammatorische Prozesse führen zur Rekrutierung verschiedener Zellen, die die EMT durch Ausschüttung von Faktoren und Änderungen im Mikroumfeld triggern. Als zentraler Induktor der EMT wird das Zytokin TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) angesehen (Katsuno and Derynck 2021; Yu et al. 2015). Zu den Zellen, die EMT induzierende Faktoren ausschütten, gehören beispielsweise Makrophagen und Fibroblasten. Diese sekretieren zusätzlich Matrix-Metalloproteasen (MMP-2, MMP-3, MMP-9) (Kalluri and Weinberg 2009). MMP degradieren und modifizieren die ECM und Zell-Zell Kontakte, was zu einem Abbau der Basalmembran führt (Horejs 2016). Durch diese Aktivitäten fördern sie die Ablösung epithelialer Zellen von der Basalmembran. In den umliegenden epithelialen Zellen werden, vermittelt durch z.B. TGF- $\beta$ , WNT, Notch, Hedgehog und Rezeptor-Tyrosinkinasen, beteiligte Signalwege aktiviert (Gonzalez and Medici 2014). Einige relevante Signalwege sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Induktion EMT-relevanter Signalwege führt letztendlich zur Aktivierung zentraler Transkriptionsfaktoren wie ZEB1, SNAIL, SLUG und TWIST. Diese inhibieren die Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin und induzieren die Expression mesenchymaler Marker wie Vimentin, Fibronectin und N-Cadherin (Brabletz et al. 2021). Das Zusammenspiel aus stimulierten Immunzellen und Epithelzellen führt zudem zum Abbau der Basalmembran, Typ IV Collagen und Laminin (Kalluri and Weinberg 2009).

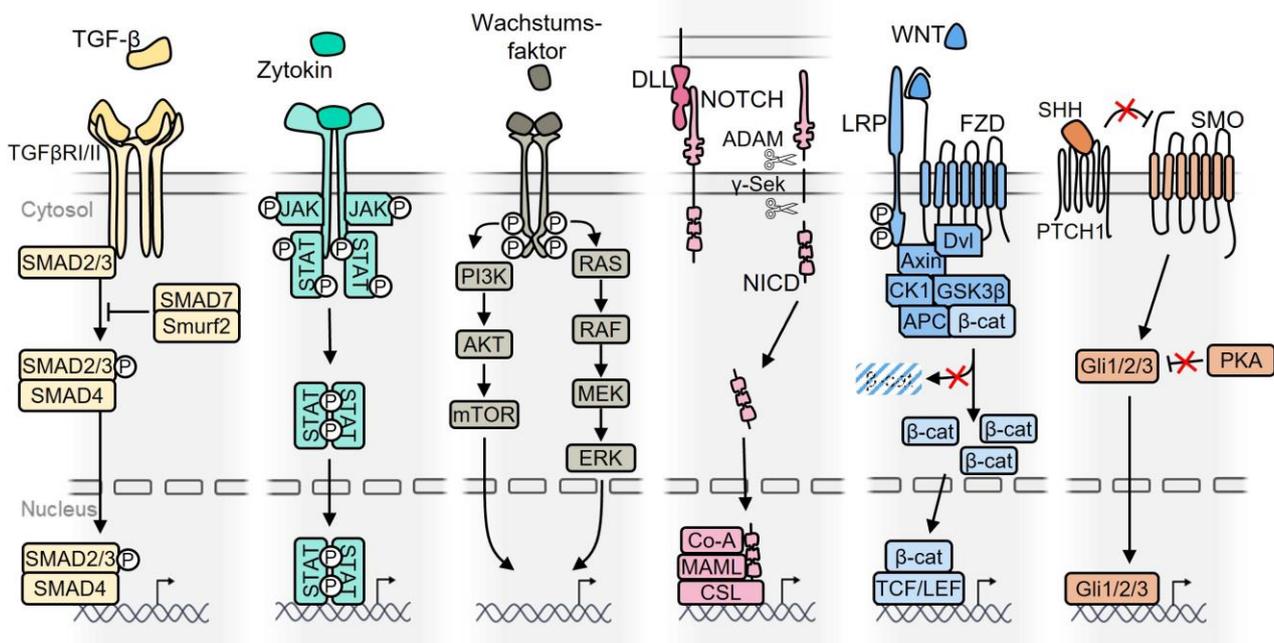


Abbildung 3 Ausgewählte EMT relevante Signalwege. Die Initiation und Persistenz der EMT beruht auf einer Vielzahl an Signalwegen. Einige ausgewählte Signalwege sind hier mit den wichtigsten Komponenten dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass es zusätzliche Querverbindungen zwischen den Signalwegen und weitere regulatorische Proteine gibt, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt sind. Von links nach rechts. **TGF-β Signalweg:** Durch Bindung des Zytokins TGF-β kommt es zur Aktivierung des Rezeptors TGFRI/II, woraufhin es zur Phosphorylierung und Aktivierung von SMAD2 und SMAD3 kommt, die daraufhin dimerisieren. Das aktivierte Heterodimer kann dann mit SMAD4 interagieren und in den Kern translozieren, wo der Komplex durch Bindung an entsprechende Promotorelemente die Genexpression reguliert. Der Signalweg wird durch weitere Proteine reguliert. Eines davon ist SMAD7, was nach Aktivierung eine inhibitorische Wirkung auf die SMAD2/3 Phosphorylierung hat. **Tyrosinkinase vermittelte Signalwege:** Verschiedene Zytokine (z.B. IFN-γ, IL-6, IL-4) können an entsprechende Tyrosinkinase-assoziierte Rezeptoren binden. Durch die Bindung eines Liganden werden Januskinasen (JAK) aktiviert, die daraufhin STAT-Proteine phosphorylieren. Die so aktivierten STAT können dimerisieren und in den Kern translozieren. Dort binden sie an entsprechende Promotorbereiche und regulieren so die Genexpression. **Rezeptor-Tyrosinkinasen:** Durch Bindung eines Liganden an Rezeptorkinasen können verschiedene Signalwege aktiviert werden. Zwei der wichtigsten sind hier dargestellt. Durch die Aktivierung von PI3K wird PIP3 generiert, was die Phosphorylierung von AKT über PDK1 (nicht dargestellt) ermöglicht. AKT aktiviert daraufhin seinerseits Proteine wie mTOR oder FOXO (nicht dargestellt), die dann direkt oder indirekt die Genexpression im Kern regulieren. Durch Rezeptorkinasen kann außerdem RAS aktiviert werden, welches dann über RAF bestimmte MAP-Kinasen aktiviert (MEK). Diese phosphorylieren wiederum ERK, welches daraufhin verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. **NOTCH Signalweg:** Durch Bindung eines Notch Liganden werden Proteasen aktiv, die zur Abspaltung der intrazellulären Domäne (NICD) des NOTCH Proteins führen. Diese kann daraufhin in den Nucleus translozieren, wo es zusammen mit anderen Proteinen die Expression relevanter Gene induziert. **WNT Signalweg:** Durch Bindung von WNT an den FZD-Rezeptor kommt es zu Inhibition des Komplexes, der für die Degradation von β-Catenin zuständig ist. Ist diese Inhibition aufgehoben, kommt es zur Akkumulation von β-Catenin. Im Kern kann β-Catenin durch Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren TCF oder LEF die Expression WNT-regulierter Gene induzieren. **Sonic-Hedgehog Signalweg:** Durch Bindung von Sonic-Hedgehog (SHH) an seinen Rezeptor, wird dessen inhibitorische Wirkung auf SMO aufgehoben. Die Aktivierung von SMO führt zur Inhibition des proteolytischen Abbaus von Gli-Proteinen, wodurch diese im Kern die Genexpression von SHH regulierten Genen induzieren. Abbildung nach Brabletz et al. 2021; Crompton et al. 2007; Zhang and Zhang 2019.

Durch die Aktivität von TGF-β werden außerdem Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophile rekrutiert und aktiviert, die ihrerseits inflammatorische Prozesse verstärken, indem sie proinflammatorische Zytokine und Faktoren sekretieren (Lagraoui and Gagnon 1997; Marconi et al. 2021). Dazu gehören beispielsweise *tumor necrosis factor α* (TNF-α), aber auch Interleukine (IL) wie IL-6, IL-1 und Wachstumsfaktoren wie *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF) (Marconi et al. 2021). Letztere führen außerdem zur Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese), während durch die Zytokine TNF-α und IL-6 die

zentralen pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B aktiviert werden (Abbildung 4). Ist die Wunde verschlossen, so kommt es zur Terminierung der Inflammation und Wundheilungsprozesse durch kontraktile Fibroblasten (Myofibroblasten) (Stone et al. 2016).

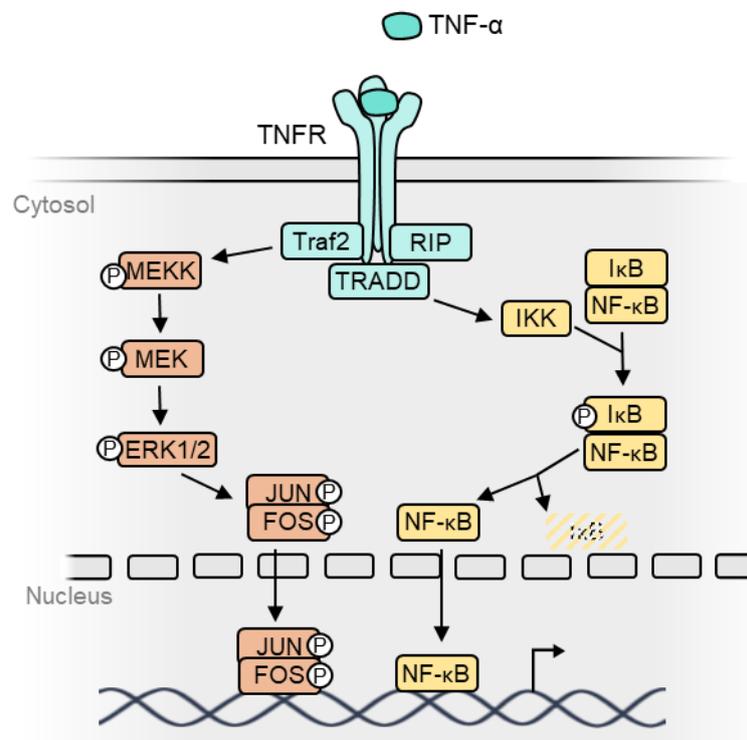


Abbildung 4 TNF- $\alpha$  Signalweg. Die Bindung von TNF- $\alpha$  an den Rezeptor TNFR rekrutiert TRADD, welches dann seinerseits die Bildung eines Komplexes mit Traf Proteinen wie Traf2 und Traf5 sowie der Kinase RIP initiiert. Durch diesen Vorgang kann es zur Aktivierung von MAP Kinase Kaskaden kommen. So wird JNK aktiv und aktiviert daraufhin die Dimerisierung von JUN und FOS. Dieser Komplex wird auch als AP-1 bezeichnet und aktiviert als Transkriptionsfaktor die Expression pro-inflammatorischer und apoptotischer Gene (Holbrook et al. 2019; Wu and Zhou 2010). Außerdem wird durch Bindung von TNF- $\alpha$  die Kinase IKK aktiviert, wodurch I $\kappa$ B abgebaut und NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor die Expression pro-inflammatorischer Gene induziert (Holbrook et al. 2019; Wu and Zhou 2010).

### 1.3.2. Pathologische Deregulation der EMT

Wie bereits erwähnt spielt die EMT nicht nur in der Embryonalphase, sondern auch später eine wichtige Rolle, beispielsweise im Wundheilungsprozess. Eine Deregulation der EMT ist jedoch mit einer Vielzahl an Krankheiten assoziiert, wie beispielsweise Krebs und fibrotischen Vorgängen, sowie in Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus Erythematoses (SLE) Nephritis (Lovisa 2021; Sisto et al. 2021). Als Fibrose bezeichnet man das Resultat einer chronischen Entzündung, wodurch epitheliale Zellen im Rahmen der EMT anhaltend zu Myofibroblasten umgewandelt werden (Stone et al. 2016). Die Fibrose ist gekennzeichnet durch die exzessive Bildung von ECM, was letztendlich zu einem Funktionsverlust des betroffenen Organs führt (Wynn 2008).

Typische EMT-Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung bis hin zur Metastasierung von Krebszellen (Nieto et al. 2016). So induzieren sie beispielsweise anti-apoptotische Vorgänge und wirken generell der Onkogen-induzierten Zellseneszenz entgegen (Puisieux et al. 2014). Obwohl es dabei meist nicht zur vollständigen Umwandlung epithelialer in

mesenchymale Zellen kommt, wird dennoch die Migrationsfähigkeit der Krebszellen deutlich erhöht. Ein weiterer Effekt der EMT-Transkriptionsfaktoren ist die erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , was zur Tumor-Progression beiträgt (Suarez-Carmona et al. 2017). Es ist allerdings zu beachten, dass die Effekte EMT-assoziiierter Prozesse und die Auswirkungen von EMT-Transkriptionsfaktoren nicht universal, sondern stark abhängig von der vorliegenden Gewebe- und Krebsart sind (Brabletz et al. 2018). Das für die EMT zentrale Zytokin TGF- $\beta$  wirkt zwar in frühen Phasen der Krebsentstehung durch apoptotische Effekte entgegen, hat aber in späteren Phasen den gegenteiligen Effekt (Yang et al. 2021). Es trägt dann nicht nur zur Angiogenese und so zur Versorgung der Tumore bei, sondern inhibiert zusätzlich die Immunzellaktivität, was das Tumorwachstum und die Metastasierung begünstigt. Eine Inhibition von TGF- $\beta$  Signalwegen auf verschiedenen Leveln wird zwar als mögliches Target für die Behandlung von Krebserkrankungen diskutiert, ist aber nicht unumstritten (Yang et al. 2021; Gonzalez-Sanchez et al. 2021; Kim et al. 2021). Ein Grund dafür ist die ambivalente Rolle des Zytokins in der Tumorentstehung und Progression aber auch die vielen ungeklärten Fragen in Bezug auf die Gewebespezifität und die nicht abschließend erforschten Folgen einer TGF- $\beta$  Inhibition für den Organismus.

Ähnliche Probleme ergeben sich auch bei der Evaluation von TGF- $\beta$  Inhibitoren zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen. Obwohl der TGF- $\beta$ -Signalweg als vielversprechendes Target für einige fibrotische Erkrankungen angesehen wird und bereits einige klinische Studien zu TGF- $\beta$  Inhibitoren vorliegen (Sisto et al. 2018; Zhao et al. 2022), fehlen für viele dieser Substanzen Nachweise, die die Wirksamkeit im Menschen bestätigen (Fintha et al. 2019; Sisto et al. 2021).

Alles in allem bleiben TGF- $\beta$  und der TGF- $\beta$  Signalweg ein interessantes und vielversprechendes Target zur Behandlung von Krebserkrankungen und fibrotischer Veränderungen. Allerdings gibt es einen großen Bedarf an zusätzlichen Daten zu den Auswirkungen einer TGF- $\beta$  Inhibition. Zudem ist es aufgrund der ambivalenten Rolle des Zytokins besonders wichtig, dass zukünftig Fortschritte für TGF- $\beta$  inhibierende Behandlungen in kombinatorischen Ansätzen gefunden werden. Diese sollten die Vorteile einer Inhibition nutzbar machen und gleichzeitig die Nebenwirkungen minimieren (Peng et al. 2022).

Eine Substanz die *in vitro* eine potente Inhibition TGF- $\beta$  induzierter Signalwege zeigt ist das Makrolacton Oxacyclododecindion (Saurin et al. 2022), das im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird.

#### 1.4. Oxacyclododecindion

Oxacyclododecindion ist ein zwölfgliedriges makrozyklisches Lacton, das aus dem imperfekten Pilz *Exserohilium rostratum* isoliert wurde. Oxacyclododecindion (nachfolgend Oxa genannt) zeigt sowohl anti-inflammatorische als auch anti-fibrotische Eigenschaften in Zellkultur- und Maus-Modellen:

Es wurde gezeigt, dass Oxa die IL-4 induzierte STAT6 abhängige Signaltransduktion in HepG2-Zellen hemmt. Eine Hemmung der Phosphorylierung durch die entsprechenden Januskinasen konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings war die Bindung von STAT6 Dimeren an die entsprechende Konsensus Sequenz verringert (Erkel et al. 2008). Auch die TGF- $\beta$  induzierte SMAD2/3 abhängige Signaltransduktion wird durch Oxa gehemmt. Hier konnte ebenfalls keine Inhibition der Phosphorylierung durch die zuständigen Kinasen gezeigt werden, wohingegen eine deutlich verminderte Bindung von SMAD2/3 an die DNA beobachtet werden konnte (Rudolph et al. 2013). Damit einhergehend konnte eine verringerte Expression TGF- $\beta$  induzierter Gene gezeigt werden (Rudolph et al. 2013). In MRL-*Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen, einem SLE-Modell, konnte eine verringerte Expression verschiedener Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  in der Niere festgestellt werden. Damit einhergehend zeigten die mit Oxa behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verringerte Histopathologie der Niere (Henke et al. 2014). Es konnte keine Zytotoxizität auf HepG2-Zellen bis zu einer Konzentration von 1350 nM festgestellt werden (Erkel et al. 2008). Auch in Mäusen konnten keine adversen Effekte durch Oxa-Behandlung beobachtet werden.

Als problematisch für die weitere Testung und Charakterisierung von Oxacyclododecindion stellte sich die sehr geringe Produktionsmenge des verwendeten Pilzstammes heraus. Diese verringert sich mit zunehmendem Alter des Stammes zusätzlich. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit der organischen Chemie der Universität Mainz (Prof. Dr. Till Opatz) die Synthese des Stoffes angestrebt. Bisher ist dies für den Naturstoff Oxacyclododecindion nicht gelungen. Es konnten jedoch zahlreiche Derivate, mit einer ähnlich starken biologischen Aktivität synthetisiert werden (Abbildung 5). Diese können effizienter synthetisiert werden und ermöglichen so eine biologische Charakterisierung. Die Derivatisierung des Makrolactons ist zusätzlich zur Evaluation von Struktur-Wirkungs-Beziehungen essenziell. Dazu wurden Derivate synthetisiert, die an unterschiedlichen Stellen verändert wurden und auf ihre Hemmung des IL-4 und TGF- $\beta$  induzierten Signalwegs getestet wurden (Tabelle 1). So kann herausgefunden werden, welcher Teil des Moleküls für dessen biologische Aktivität verantwortlich ist. Diese Information ist besonders hilfreich für die Aufklärung des genauen Wirkmechanismus.

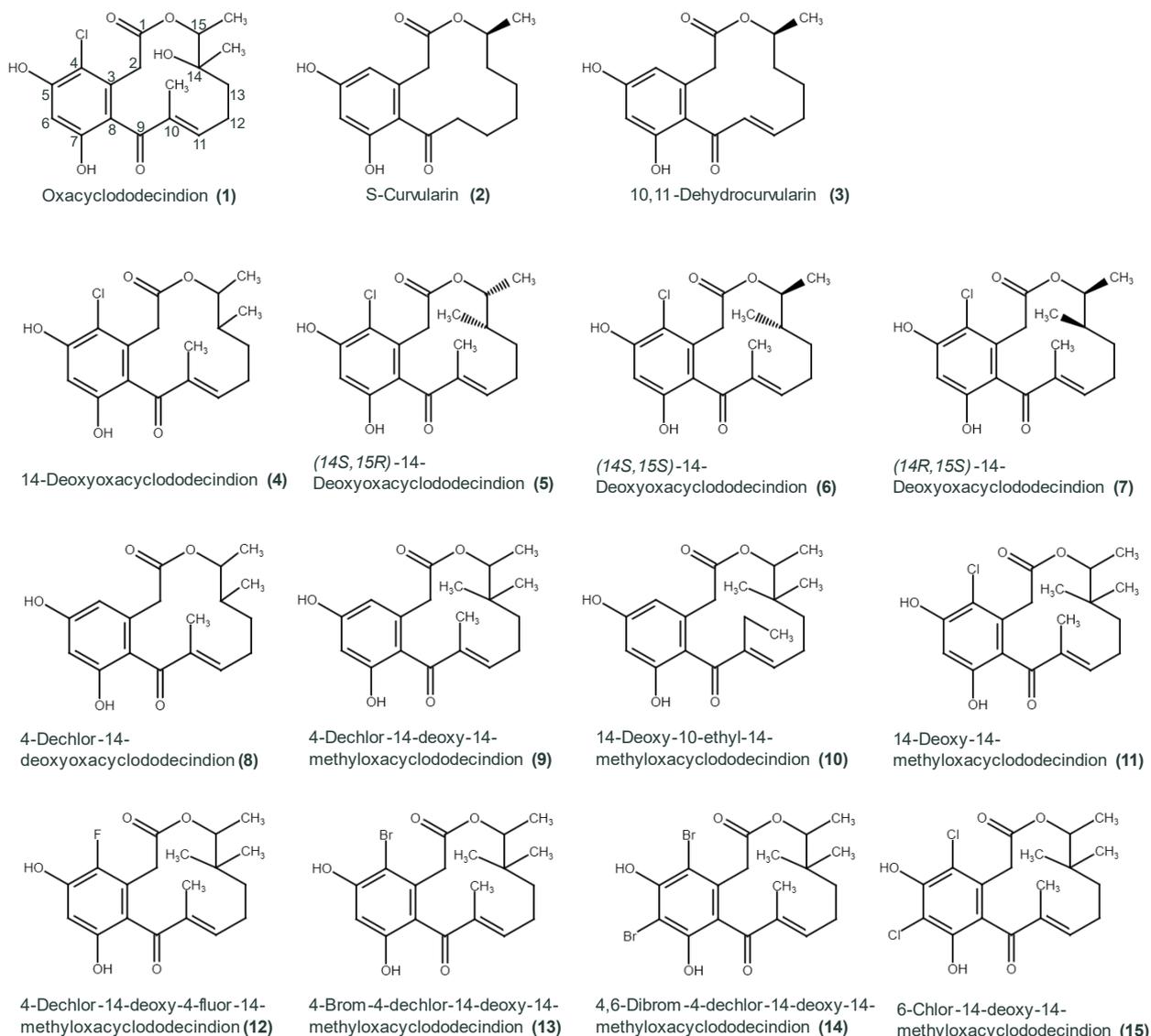


Abbildung 5 Die natürlichen Makrolactone S-Curvarin, Dehydrocurvarin und Oxacyclododecindion (mit Nummerierung der Kohlenstoffe im Grundgerüst) sowie dessen synthetische Derivate (Munro et al. 1967; Erkel et al. 2008; Tauber et al. 2015; Weber et al. 2020; Tauber et al. 2016; Elzner et al. 2008).

Mit dieser gezielten Derivatisierung konnte bereits festgestellt werden, dass das Vorhandensein eines Chlors an Position 4 für die biologische Aktivität essenziell ist. Eine zusätzliche Einführung eines Chlors an Position 6 führt nicht zu einer Steigerung der Aktivität. Wird Position 4 statt mit Chlor mit Brom oder Fluor funktionalisiert, so führt dies ebenfalls zu einer Verringerung der biologischen Aktivität (12, 13). Derivate, denen die Hydroxygruppe an Position 14 fehlt, sind weiterhin ähnlich stark aktiv wie Oxacyclododecindion. Eine wichtige Rolle für die Aktivität scheint ebenfalls die 3D Struktur des Moleküls zu spielen. Dies wurde anhand des Derivats 14-Deoxyoxacyclododecindion (4) gezeigt. (14*S*,15*R*)-14-Deoxyoxacyclododecindion (5) hat eine stärkere inhibitorische Wirkung auf die untersuchten Signalwege als (14*S*,15*S*)-14-Deoxyoxacyclododecindion (6). (14*R*,15*S*)-14-

Deoxyoxacyclododecindion (**7**) zeigt nur noch 4 % der Aktivität auf die SMAD2/3 vermittelte Signaltransduktion verglichen mit dem aktivsten Stereoisomer (**5**).

Tabelle 1 Anti-inflammatorische Aktivität natürlicher und synthetischer Makrolactone. Die Makrolactone sind nach biologischer Aktivität absteigend sortiert. Um die anti-inflammatorische Aktivität zu analysieren, wurden die Verbindungen mittels Reporterassays auf die TGF- $\beta$  induzierte, SMAD2/3 vermittelte Reporteraktivität sowie die IL-4 induzierte, STAT6 vermittelte Reporteraktivität getestet. Dargestellt sind die IC<sub>50</sub> Werte der Verbindungen, also die Konzentration, bei der nur 50 % der Aktivität im Vergleich zur induzierten Kontrolle gemessen werden konnte. (Weber et al. 2020; Tauber et al. 2015; Tauber et al. 2016)

<b>Verbindung</b>	<b>SMAD2/3 vermittelte Promotoraktivität IC<sub>50</sub> [nM]</b>	<b>STAT6 vermittelte Promotoraktivität IC<sub>50</sub> [nM]</b>
14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>11</b> )	30	79,1
(14S,15R)-14-Deoxyoxacyclododecindion ( <b>5</b> )	90,1	20,1
14-Deoxyoxacyclododecindion ( <b>4</b> )	137,9	58,4
Oxacyclododecindion ( <b>1</b> )	135,6	67,8
(14S,15S)-14-Deoxyoxacyclododecindion ( <b>6</b> )	198,2	140
4-Dechloro-14-deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>9</b> )	87,2	264,7
4-Bromo-4-dechloro-14-deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>13</b> )	381,7	177,5
14-Deoxy-10-ethyl-14-methyloxacyclododecindion ( <b>10</b> )	519,9	105
4-Dechloro-14-deoxyoxacyclododecindion ( <b>8</b> )	521,4	138,52
4,6-Dibromo-4-dechloro-14-deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>14</b> )	852,7	379,4
4-Dechloro-14-deoxy-4-fluoro-14-methyloxacyclododecindion ( <b>12</b> )	1264	442,4
(14R,15S)-14-Deoxyoxacyclododecindion ( <b>7</b> )	2400	343
10,11-Dehydrocurvularin ( <b>3</b> )	1700	3400
6-Chloro-14-deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>15</b> )	4623	1017
(S)-Curvularin ( <b>2</b> )	3420	

## 1.5. Target-Identifizierung von biologisch aktiven Substanzen

Das Ziel der Entwicklung neuer Wirkstoffe sind Verbindungen, die bei maximaler Effizienz in der Behandlung einer Krankheit, möglichst wenige Komplikationen und Nebenwirkungen für das behandelte Individuum mit sich bringen. Dabei ist umstritten, ob zur Anwendung von Wirkstoffen eine tiefgehende Kenntnis des Wirkmechanismus nötig ist (Davis 2020). Selbst für einige Substanzen, die breite Anwendung finden ist die genaue biochemische Interaktion, auf der die pharmakologische Wirkung beruht (*mechanism-of-action*, MOA), nicht vollständig aufgeklärt. Ein Beispiel für eine solche Substanz ist Paracetamol (N-acetyl-para-aminophenol), für das bis heute, obwohl bereits seit 1887 angewendet, der genaue Wirkmechanismus nicht bekannt ist (Ghanem et al. 2016). Für die Zulassung eines Wirkstoffs beispielsweise durch die US-Behörde Food and Drug Administration (FDA) ist die Kenntnis des genauen Wirkmechanismus nicht zwingend nötig (Mechanism matters 2010). Wichtig ist hier eher die genaue Kenntnis des *mode-of-action* (MoA), also aller anatomischen und funktionalen Veränderungen nach Kontakt mit einem Wirkstoff. So kann nachgewiesen werden, dass die Substanz sowohl sicher in der Anwendung ist als auch eine nachweisbare Wirkung entfaltet. Dennoch ist festzuhalten, dass für eine sichere Anwendung vor allem von neuen Wirkstoffen die Kenntnis des MOA und damit des genauen molekularen Wirkorts die Wahrscheinlichkeit auf eine erfolgreiche Zulassung erhöht (Alex 2016; Khanna 2012). Ein Grund hierfür ist auch, dass mit Kenntnis aller Targets toxische Effekte und Nebenwirkungen schon vor der Anwendung in klinischen Studien besser abgeschätzt werden können (Trusheim et al. 2007; Trapotsi et al. 2020). Die Identifikation des MOA ist jedoch ein besonders herausfordernder und zeitaufwendiger Teil der Erforschung neuer Wirkstoffe.

Die Wirkungsweise einer Substanz kann neben der direkten Interaktion mit Proteinen auch auf zahlreichen anderen Mechanismen beruhen. So kann die Wirkung beispielsweise die Membran von Zellen beeinflussen, Einfluss auf die DNA, die RNA oder den pH Wert haben oder auf proteolytischen Effekten basieren (Lai and Crews 2017; Trapotsi et al. 2022; Disney 2019). Zudem muss bei der Suche nach molekularen Targets beachtet werden, dass die meisten Wirkstoffe mehr als nur eine Interaktion eingehen (Lounkine et al. 2012). Diese Interaktionen können sowohl nichtkovalent als auch kovalent sein.

Aufgrund der Annahme, dass strukturell ähnliche Substanzen an ähnliche Targets binden, kann durch bioinformatische Analysen, auch für Substanzen ohne bekannten MOA, eine Voraussage über mögliche Targets getroffen werden. Allerdings ist diese Annahme aufgrund der hohen Komplexität eines biologischen Systems nur begrenzt gültig (Trapotsi et al. 2020). Da die *in silico* Analysen auf Daten zu bereits bekannten Interaktionen beruhen, sind diese zudem nur eingeschränkt für Substanzen mit neuem Wirkmechanismus oder Molekülklassen mit spärlicher Datenbasis geeignet. Obwohl bioinformatische Vorhersagen mittlerweile in der Lage sind die Anzahl der zu untersuchenden Interaktionen drastisch einzugrenzen, ist eine Validierung der vorhergesagten Interaktionen im

Nachhinein empfehlenswert (Musa et al. 2018). Neben der rein bioinformatischen Vorhersage möglicher Targets gibt es zahlreiche experimentelle Herangehensweisen zur Aufklärung des MOA. Für eine experimentelle Annäherung an den MOA eines Wirkstoffs sind verschiedene Methoden etabliert. Zur Analyse der Bioaktivität auf zellulärer Ebene bieten sich beispielsweise Reportergergenversuche an, die signalwegspezifisch Hinweise auf den Wirkort eines Wirkstoffs geben können (Wagner and Schreiber 2016). Diese phänotypischen Screenings können schnell und mit wenig Aufwand durchgeführt werden. Die daraus erhaltenen Daten zur Bioaktivität geben Hinweise, wenn auch keine tieferen Einblicke in den MOA (Trapotsi et al. 2022). Neben weiteren Methoden zur Erfassung der Bioaktivität werden zunehmend auch *omics*-basierte Ansätze genutzt, von denen einige im Folgenden näher beschrieben werden.

### 1.5.1. Transkriptomik

Für möglichst umfassende Informationen über Veränderungen der Expression zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Applikation eines Wirkstoffs zu erhalten, kann eine Analyse des Transkriptoms durchgeführt werden. Als Transkriptom bezeichnet man die Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden RNA-Moleküle (Abbildung 6). Zur Analyse des Transkriptoms können Methoden wie RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) oder Microarrays angewendet werden. Dabei bietet ersteres Vorteile durch die einfache Anwendbarkeit, hohe Sensitivität und hohe Auflösung (Yang et al. 2020). Durch Transkriptom-Analysen können beispielsweise sogenannte differenziell exprimierte Gene (DEG) identifiziert werden. Diese ergeben sich durch den Vergleich von mindestens zwei Bedingungen, z.B. der Expression in einem Organismus, Gewebe oder in Zellen vor und nach Behandlung mit einem Wirkstoff. Die Analyse der so identifizierten Expressionsmuster gibt Aufschluss über die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und kann so einen Beitrag zur Aufklärung des MOA erbringen (Trapotsi et al. 2022). Zusätzlich sollten für eine Netzwerk-basierte Auswertung Datenbanken wie STRING oder STITCH einbezogen werden, die Informationen über Protein-Protein Interaktionen bzw. bekannte humane Targets liefern (Isik et al. 2015). Dies ermöglicht es, potenzielle Zielproteine oder Zielsignalwege zu identifizieren, die dann in folgenden Schritten experimentell bestätigt werden können. Auch hier muss jedoch beachtet werden, dass diese Methode vor allem für die Suche nach Target-Proteinen geeignet ist, die bereits als Interaktionspartner anderer Wirkstoffe und damit als *druggable* bekannt sind. Zudem muss bei der Verwendung von Netzwerken wie STRING und STITCH bedacht werden, dass die dort hinterlegten Einträge teilweise aus Text Mining Ansätzen entstammen oder nicht manuell kuratiert und experimentell bestätigt sind. Mit Hilfe von Datenbanken wie LINCS (Library of Integrated Cellular Signatures) können die gemessenen Expressionsprofile auch mit denen anderer Substanzen verglichen werden.

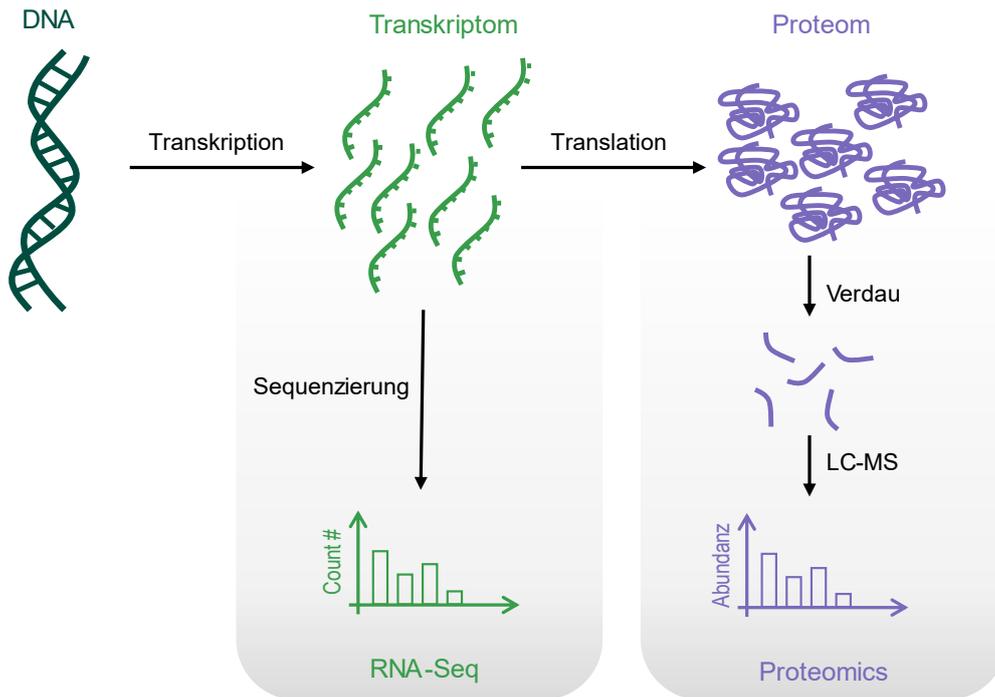


Abbildung 6 Übersicht über RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) und Proteomik. DNA wird zu RNA transkribiert, die Gesamtheit aller zu einem Zeitpunkt vorliegenden RNA-Moleküle werden als Transkriptom bezeichnet. Dieses kann über Sequenzierung analysiert werden. Um die Komplexität zu verringern, kann die mRNA vor der Sequenzierung angereichert werden. Das Proteom bezeichnet analog die Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden Proteine. Proteine können über massenspektrometrische Methoden (LC-MS) detektiert und quantifiziert werden. Dies kann entweder direkt oder nach Anreicherung, beispielsweise über eine Immunpräzipitation, durchgeführt werden.

### 1.5.2. Proteomik

Ein weiterer Ansatz, der es ermöglicht direkte Informationen zu potenziellen Zielproteinen einer Substanz zu erheben, ist die chemoproteomische Herangehensweise. Dieser interdisziplinäre Ansatz ermöglicht es, direkte Informationen über die Interaktion zwischen Wirkstoff und Zielproteinen zu gewinnen. Die zu untersuchende Verbindung kann dazu beispielsweise an eine Matrix immobilisiert oder durch eine Sonde markiert werden. Die so modifizierte Substanz wird dann entweder in Zellen oder in Zelllysaten angewendet. Nach Bindung der Substanz an das oder die Zielproteine erfolgt häufig eine kovalente Kopplung beider Bindepartner, beispielsweise über photoaktivierbare Crosslinker (PAL). Die in dem, nach Kopplung erhaltenen, Komplex vorliegenden Proteine werden dann entweder direkt, oder nach Anreicherung, durch LC-MS analysiert und identifiziert (Wright and Sieber 2016). Hier werden häufig die durch den Verdau mit Proteasen erhaltenen Peptide über eine unpolare Umkehrphasenchromatographie aufgetrennt und nachfolgend ionisiert. Zur Masseanalyse sind zahlreiche Detektoren auf dem Markt, die unter anderem durch die zusätzliche Fragmentierung der Peptide eine möglichst sensitive und exakte Isolation der Peptid- bzw. Fragmentmassen ermöglichen (Tao and Zhang 2019). Ein anschließender Vergleich mit Datenbanken ermöglicht die Zuordnung der gemessenen Daten zu den jeweiligen Proteinen.

Damit ein chemoproteomischer Ansatz erfolgreich genutzt werden kann, sollten bereits Informationen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen der zu untersuchenden Struktur vorliegen. So kann verhindert werden, dass die nötige Modifikation die Aktivität der Substanz aufhebt (Rix and Superti-Furga 2009). Dementsprechend ist das Design der Sonde ein Kernpunkt für die erfolgreiche Nutzung von Chemoproteomik-basierten Methoden. Grundsätzlich besteht eine Sonde aus der reaktiven Gruppe, die von der zu untersuchenden Substanz abstammt und über einen Linker an eine Reportergruppe angebracht ist (Chen et al. 2020a). Diese kann beispielsweise ein Fluoreszenzmarker oder auch Biotin, zur Kopplung an ein Streptavidin-Säulenmaterial, sein. Bei der Planung einer solchen Sonde sind einige Fallgruben zu umgehen. Es gilt beispielsweise, die Länge des Linkers so zu wählen, dass es nicht zur sterischen Hinderung der Bindung von reaktiver Gruppe und Zielprotein durch die Reportergruppe kommt. Als Alternative zum beschriebenen Sondendesign kann die reaktive Gruppe durch eine bioorthogonale Markierung erst nach der Bindung an das Target an die Reportergruppe gekoppelt werden (Chen et al. 2020a). Dazu werden häufig sogenannte Click Reaktionen genutzt, wie z.B. die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (Abbildung 7).

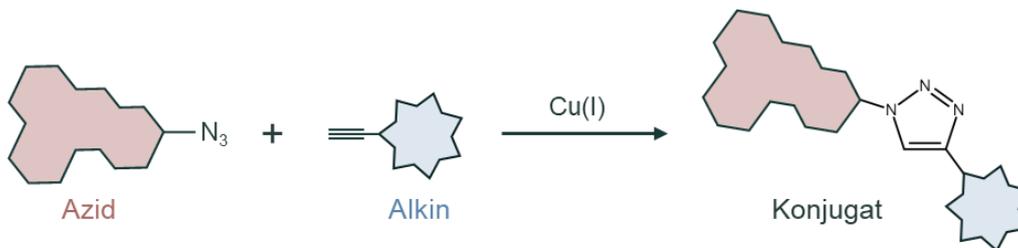


Abbildung 7 Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition. Bei dieser Art der Click-Chemie wird eine Komponente, beispielsweise ein zu untersuchender Wirkstoff, mit einer Azid-Gruppe funktionalisiert, während die zu koppelnde Sonde eine Alkin-Gruppe enthält. Katalysiert durch Kupfer kommt es dann zur Kopplung und der Entstehung von 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazolen (Kolb and Sharpless 2003). So können beispielsweise fluoreszierende Sonden als Alkin an einen Azid-funktionalisierten Wirkstoff gekoppelt werden.

Da die bei dieser Methode benötigten Funktionalisierungen (Azid, Alkin) sehr klein sind, wird die Beeinträchtigung der biologischen Aktivität der reaktiven Gruppe minimiert. Zudem ist eine Reihe an Alkin- und Azid-Sonden kommerziell erhältlich, daher kann ein passend modifizierter Wirkstoff für verschiedene Anwendungen flexibel genutzt werden. Weitere Vorteile der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition ist die einfache und schnelle Durchführbarkeit in wässrigen Lösungen bei hohen Ausbeuten und hoher Spezifität (Kolb and Sharpless 2003).

Click-Chemie basierte Ansätze sind inzwischen ein weit verbreitetes Mittel, um Interaktionen von Wirkstoffen mit Liganden zu analysieren (Thirumurugan et al. 2013; Sharpless and Manetsch 2006; Mackinnon and Taunton 2009). Auch Ansätze, PAL und Click-Chemie Funktionalisierungen zu kombinieren werden erfolgreich genutzt, um Liganden von Wirkstoffen *in vivo* und *in vitro* zu identifizieren (Smith and Collins 2015).

## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die weitere Charakterisierung des makrozyklischen Lactons Oxacyclododecindion und davon abgeleiteter Derivate. Trotz der bereits bekannten Informationen über Struktur-Wirkungsbeziehungen und der Daten zur *in vivo* und *in vitro* Wirksamkeit von Oxa und Oxa-Derivaten ist bisher unbekannt, welches deren molekulare Targets sind. Neben der näheren Evaluation der biologischen Aktivität ist daher die Identifikation von Kandidaten, die molekulare Targets von 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion sein könnten, das übergeordnete Ziel dieser Arbeit. So sollen zuerst mögliche Ansatzpunkte für Funktionalisierungen gefunden werden, die für chemoproteomische Versuchsansätze genutzt werden können. Darüber können nachfolgend Proteine identifiziert werden, die als Kandidaten für Oxa-Targets in Frage kommen. Dieser Teil der Arbeit wird in Zusammenarbeit mit der Organischen Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt, die die Synthese der Oxa-Derivate realisieren.

Außerdem sollen durch Oxa induzierte Änderungen auf mRNA- und Proteinebene global mittels *-omics* Experimenten charakterisiert werden. Dazu soll das Oxa-Derivat 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion verwendet werden. Neben der näheren Evaluation der biologischen Aktivität des Moleküls sollen die daraus erhaltenen Daten zur Analyse möglicher Targetproteine genutzt werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist, Modulatoren des Nrf2-ARE Signalwegs aus Pilzen zu isolieren und identifizieren und eine initiale biologische Charakterisierung durchzuführen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Medien

##### 3.1.1. Medien und Zusätze für die Zellkultur

*Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, 22320030)*

*Fötale Kälberserum (FKS; Thermo Fisher Scientific; 10270106)*

##### *Vollmedium*

DMEM wurde mit 10 % FKS, 65 µg/mL Penicillin G (Serva, 31749) und 100 µg/mL Streptomycin Sulfat (VWR, 31749) versetzt.

##### *Minimalmedium*

DMEM wurde mit 0,5 % FKS, 65 µg/mL Penicillin G (Serva, 31749) und 100 µg/mL Streptomycin Sulfat (VWR, 31749) versetzt.

*Serumfreies Medium (PAN Biotech, P04-710629)*

##### 3.1.2. Weitere Medien

Zur Herstellung von Festmedien wurde 2 % (w/v) Agar zugesetzt. Medien und Zusätze wurden entweder durch Filtration oder Autoklavieren sterilisiert. Hitzeempfindliche Bestandteile wie Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.

<b>Medium</b>	<b>Zutaten</b>
HA-Medium	10 g Malzextrakt, 4 g Hefeextrakt, 4 g Glucose, ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 5,5
LB-Medium für Bakterien	10 g Trypton, 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 7,5 (Wenn zutreffend Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin)

### 3.2. Puffer und Lösungen

Wenn nötig wurden Puffer und Lösungen vor der Verwendung durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert.

<b>Lösung</b>	<b>Zutaten</b>
PBS (Zellkultur)	0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8 g NaCl, 1,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrid), ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 7,6
10x PBS (Western Blot)	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10x TBS (Western Blot)	24,2 g TRIS-Base, 80 g NaCl, ad 1 L H <sub>2</sub> O pH 7,6
RIPA	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 % Nonidet P-40, 0,1 % SDS, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 1x cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail
Lysepuffer (Click-Chemie)	40 mM Tris pH 8, 0,8% CHAPS, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 1x cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail
Entfärber für SDS-Gele	40 % Methanol, 10 % Essigsäure
Kolloidale Färbelösung	Coomassie 781,2 mL H <sub>2</sub> O, 80 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 18,8 mL Phosphorsäure (85 %), 800 mg Coomassie Brilliant G-250 Vor Gebrauch werden 20 % (v/v) Methanol frisch zugesetzt
Ponceau Färbelösung	200 mg Ponceau, 10 mL Essigsäure, ad 200 mL H <sub>2</sub> O
Lysepuffer (Comet Assay)	1,2 M NaCl, 100 mM EDTA, 1 % Triton-X 100, 300 mM NaOH
Elektrophoresepuffer (Comet Assay)	30 mM NaOH, 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA
Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	5 mL SDS (5 mL), 70,07 g TRIS, ad 1 L H <sub>2</sub> O
Probenpuffer (SDS-PAGE)	250 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 50 % Glycerin (v/v), 10 % SDS (v/v), 250 mM DTT, 50 mM EDTA, 0,05 mM Bromphenolblau
T1 (Western Blot)	100 mL T2, 525 mg ε-Aminocaprinsäure
T2 (Western Blot)	25 mL TRIS-HCl (1 M, pH 10,4), 200 mL 2-Propanol, ad 1 L H <sub>2</sub> O
T3 (Western Blot)	300 mL TRIS-HCl (1 M, pH 10,4), 200 mL 2-Propanol, ad 1 L H <sub>2</sub> O
PBS-T/TBS-T	1x PBS/TBS, 0,1 % Tween-20
PBS-TM/TBS-TM	1x PBS/TBS, 0,1 % Tween-20, 3 % Magermilchpulver
ECL 1	5 mL TRIS-HCl (1 M, pH 8,5), 0,5 mL Luminol (250 mM), 0,22 mL p-Cumarsäure (90 mM), ad 50 mL H <sub>2</sub> O
ECL 2	5 mL TRIS-HCl (1 M, pH 8,5), 0,0305 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)
Lysepuffer (Immunpräzipitation)	10 mM TRIS (pH 7,4), 10 mM KCl, 0,05 % Nonidet P-40 (v/v), 1x cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail, ad H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>

### 3.3. Zytokine

Alle verwendeten Zytokine wurde über die Firma Immuntools bezogen.

### 3.4. Moleküle für die Click-Chemie

#### 3.4.1. Synthetische Oxacyclododecindion-Derivate

Alle synthetischen Oxacyclododecindion-Derivate wurden durch die Arbeitsgruppe Organische Chemie von Prof. Dr. Till Opatz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

##### 3.4.1.1. 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion

Dieses synthetische Makrolacton enthält im Unterschied zu Oxacyclododecindion eine Methylgruppe anstatt Hydroxygruppe an Position 14.

##### 3.4.1.2. 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion-Alkin

Dieses Molekül enthält einen Alkin Rest an Position 15 und ist ansonsten identisch zum synthetischen Oxacyclododecindion-Derivat 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion.

##### 3.4.1.3. 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion-PEG3-Diazirin-PEG3-Azid

Dieses Molekül enthält ein über PEG3 an 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion gekoppeltes Diazirin, welches bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von ca. 360 nm kovalent mit verschiedenen Gruppen von Aminosäuren eine kovalente Bindung eingeht. Über einen Azid-Rest können beliebige Alkine durch Kupfer-katalysierte Click-Reaktionen an das Molekül gekoppelt werden

##### 3.4.1.4. Weitere Alkine und Azide

Alle weiteren verwendeten Alkine und Azide für die Kupfer-katalysierte Click-Chemie wurden über Jena Bioscience bezogen: Dde-Alkin-Agarose (CLK-1140), Acetylen-PEG4-Biotin (CLK-TA105), AF647-Alkin (CLK-1301), PEG3-Biotin-Azid (CLK-AZ104P4)

### 3.5. Plasmide

**TOPO-STAT6:** STAT6 Expressionsvektor auf Basis des pcDNA3.1/V5-His-TOPO Plasmids (Invitrogen). Das Plasmid enthält einen konstitutiv aktiven CMV-Promotor.

**pGL3-TK-7xN4:** STAT6 Reportervektor auf Basis des pGL3-Luc Plasmids (Promega), es enthält sieben Kopien der N4 Bindestelle.

**pRL-EF1 $\alpha$ :** Reportervektor, der abhängig vom konstitutiv aktiven EF1 $\alpha$  Promotor die Renilla Luciferase exprimiert (Promega). Wird zur Normalisierung genutzt.

**(CAGA)<sub>9x</sub>-MLP-Luc:** Reportervektor für die TGF-1 induzierte abhängige SMAD2/3 Expression (bereitgestellt von Prof. Dr. S. Dooley). Der Vektor basiert auf dem Plasmid pGL3-basic (Promega).

**M50Super8xTOPFlash:** Reportervektor auf Basis des pTA-Luc Plasmids (Clontech) zur Erfassung der  $\beta$ -Catenin abhängigen Expression. Das Plasmid wurde über Addgene bezogen und enthält

mehrere TCF/LEF Bindestellen (Addgene #12456 (Veeman et al. 2003)). Der Signalweg wird durch 3  $\mu$ M CHIR-99021 (GSK-3-Inhibitor) induziert.

**pGL4.11-IP10pro-Luc:** Reportervektor auf Basis des pGL4.11-Luc Plasmids (Promega) zur Detektion der CXCL10 Promotoraktivität. Der Vektor enthält Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren STAT1, NF- $\kappa$ B und IRF3.

**pTA-3xARE-Luc:** Reportervektor basierend auf dem Plasmid pTA-Luc (Clontech). Die Expression der Firefly Luciferase wird durch die dreifache Sequenz des *antioxidant response elements* (ARE) kontrolliert.

### 3.6. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden durch Sigma-Aldrich synthetisiert.

### 3.7. Zelllinien

#### 3.7.1. BEAS-2B

Die adhären wachsende Zelllinie BEAS-2B entstammt aus humanem, nicht tumorösem Lungenepithel. Die Zellen wurden durch Virusinfektion immortalisiert. (ATCC, CRL-9609)

#### 3.7.2. HepG2

Die adhären wachsende Zelllinie entstammt einem Leberzellkarzinom. Sie haben eine epithel-ähnliche Morphologie. (ATCC, HB-8065)

### 3.8. Handhabung von *Escherichia coli* und humanen Zelllinien

#### 3.8.1. Transformation kompetenter *E. coli*

Um Plasmid DNA in kompetente *E. coli* zu transformieren, werden diese zunächst auf Eis aufgetaut. 1  $\mu$ g der zu transformierenden DNA wird zu den aufgetauten Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C durchgeführt. Nach Zugabe von 1 mL frischem LB-Medium werden die Zellen für 60 min bei 37 °C inkubiert und danach auf LB-Platten (ggf. mit Selektionsmarker) ausplattiert. Die Platten werden bei inkubiert, bis Kolonien sichtbar sind.

#### 3.8.2. Kultivierung und Passage humaner Zellen

Humane Zelllinien (HepG2, BEAS-2B) wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Alle Puffer und Medien werden vor Verwendung auf 37 °C erwärmt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht haben, werden sie passagiert. Dazu wird der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin abgelöst und in Vollmedium suspendiert. Eine geeignete Menge der Zellsuspension wird dann in eine Zellkulturflasche oder Schale übertragen und mit Vollmedium aufgefüllt.

### 3.8.3. Kryokonservierung humaner Zellen

Um humane Zellen langfristig erhalten zu können, werden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Vorbereitung werden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Durch Trypsin werden adhärenzte Zelllinien von der Wachstumsfläche gelöst und in Vollmedium resuspendiert. 900 µl der Zellsuspension wird dann mit 100 µl DMSO gemischt und langsam auf -80 °C gekühlt (-1 °C/h). Nach Erreichen dieser Temperatur werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen aufzutauen, werden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, und sofort in 37 °C warmem Wasser aufgetaut und in Vollmedium gegeben. Sobald die Zellen Adhärenz erreicht haben, wird das Medium durch frisches Vollmedium ersetzt.

### 3.8.4. Kryokonservierung transformierter *E. coli*

Um Plasmide jederzeit kultivieren zu können, werden diese bei -80 °C konserviert. Dazu werden je 6 mL LB-Medium mit dem Antibiotikum versetzt, für dessen Resistenz das jeweilige Plasmid kodiert. Nach Inkubation der Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. vier werden Kultur und steriles 70 % Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach gründlicher Durchmischung wird der Ansatz sofort bei -80 °C weggefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Um die transformierten Bakterien wieder in Kultur zu nehmen, wird der Ansatz ohne vorheriges Auftauen auf Eis gestellt. Von der Kultur wird eine geringe Menge mit einer Impföse abgekratzt und auf LB-Festmedium mit Selektionsmarker ausgestrichen. Der restliche Ansatz wird bis zur erneuten Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 3.9. Handhabung und ITS-Sequenzierung von Pilzen

### 3.9.1. Kultivierung und Konservierung von Pilzen

Die verwendeten Pilzstämme wurde auf HA-Festmedium kultiviert. Sobald eine Agarplatte zu ca. 90 % bewachsen war, wurde der Pilz auf eine frische Platte übertragen, indem ein ca. 0,5 cm x 0,5 cm Stück des bewachsenen Agars ausgestochen und auf die unbewachsene Platte gelegt wurde. Zur Kultivierung in Flüssigmedium wird das entsprechende Medium durch drei Stücke gut bewachsenen Agars inokuliert. Flüssigkulturen wurden bei Raumtemperatur und unter Agitation (120 rpm) inkubiert. Um Pilze zu konservieren, wird HA-Festmedium in Reagenzgläser so gegossen, dass eine schräge Oberfläche entsteht. Darauf werden Stücke einer gut bewachsenen Festmediums Platte gelegt. Die so inokulierten Reagenzgläser werden dann bei Raumtemperatur inkubiert. Bedeckt der Pilz ca. 90 % der Agarfläche, werden die Gläser mit Paraffinöl überschichtet, das zuvor für 12 h bei 120 °C im Backschrank sterilisiert wurde. Die so angesetzten Pilze werden dann bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufrechtstehend gelagert.

### 3.9.2. DNA-Isolation und ITS-Sequenzierung

Um Gattung und Art des unbekanntes Pilzes zu bestimmen, wurde eine Sequenzierung der *internal transcribed spacer* (ITS) durchgeführt. Dazu wurde der Pilz zunächst auf HA-Agar angezogen. Die Isolation der DNA erfolgte wie von Liu et al. beschrieben aus Mycel, das von Agarplatten abgezapft

wurde (Liu et al. 2000). Die PCR zur Anreicherung der relevanten Bereiche erfolgte ebenso wie die Sequenzierung mit ITS4 und ITS5 Primern (White et al. 1990). Die Sequenzierung ergab folgende Fragmente:

Sequenz forward (5'→3'):

```
ATTACACAATATGAAGGCGGGCTGGACACCCTCCAGCCGGGCACTGCTTCACGGCGTGCGCGGCTGGAGCCGGCCCTGCTG
AATTATTCACCCGTGTCTTTTTCGCTACTTCTTGTTCCTGGGTGGGCTCGCCCCGCCATCAGGACCAACCATAAACCTTTTT
GTAATAGCAATCAGCGTCAGTAACAACGTAATTAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
TATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCTTTTTGTCTCCAGCTC
GCTGGAGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCGCTCTTGCCAGCCAA
GGTCAGCGTCCAGCAAGCCTTTTTTCAACCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
```

Sequenz reverse (5'→3'):

```
AAAGGTTGAAAAAAGGCTTGCTGGACGCTGACCTTGGCTGGGCAAGAGCGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGC
CGGCTGCCAATGACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCGAGCTGGAGACAAAAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACA
AATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCT
GCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATT
AATTACGTTGTTACTGACGCTGATTGCTATTACAAAAAGGTTTATGGTTGGTCCCTGATGGCGGGCGAGCCACCCAGGAAA
CAAGAAGTACGCAAAAGACACGGGTGAATAATTCAGCAGGGCCGGCTCCAGCCGCGCACGCCGTGAAGCAGTCCCCGGCTG
GAGGGTGTCCAGCCCCCCTTCATATTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTCACGC
```

### 3.10. Aufreinigung von Reinsubstanzen

#### 3.10.1. Herstellung von Rohextrakten aus Filtrat und Mycel

Um eine aktivitätsgeleitete Aufreinigung von Reinsubstanzen durchführen zu können, mussten zunächst Rohextrakte aus Filtrat und Mycel des zu untersuchenden Pilzes hergestellt werden. Dazu wurde der Pilz in Flüssigkultur angezogen und das Mycel vom Kulturmedium Durch Vakuumfiltration getrennt. Das Mycel wurde mit Aceton beschichtet und unter ständigem Rühren für 2 h extrahiert. Die festen Bestandteile wurden dann durch Vakuumfiltration abgetrennt und das Aceton im Rotationsverdampfer von der wässrigen Phase getrennt. Der so entstandene Mycelauszug wird dann genau wie das Kulturfiltrat im Verhältnis 1:1 mit Ethylacetat gemischt und ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird verworfen und die organischen Bestandteile im Rotationsverdampfer bzw. einem Zentrifugenkonzentrator getrocknet. Der so entstandene Extrakt wird dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.10.2. Analytische HPLC von Reinsubstanzen und Gemischen

Substanzgemischen und Reinsubstanzen wurden mittels eines HP Agilent 1100 HPLC-Systems mit binärer Pumpe und Dioden Array Detektor analysiert. Dazu wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Lichrospher 100 RP18, 125 x 4 mm, 5 µm Säule (Macherey-Nagel) verwendet. Die verwendeten Standardbedingungen für analytische Läufe sind in Tabelle 2 angegeben. Wenn nicht anders

vermerkt wurde ein Wasser (A) - Acetonitril (B) Gemisch verwendet. Zur Verbesserung des Laufverhaltens wurde für einige Substanzen und Gemische 0,1 % Ameisensäure zum Eluenten A hinzugefügt.

Tabelle 2 Analytischer Standardlauf. Die Tabelle zeigt die Bedingungen für analytische Standardläufe über ein Lichrospher 100 RP18, 125 x 4 mm, 5 µm Säule (Macherey-Nagel).

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	99	1
20	0	100
25	0	100

### 3.10.3. Fraktionierung von Extrakten durch präparative HPLC

Zur Auftrennung der Reinsubstanzen aus *Alternaria sp.* wurde der getrocknete Extrakt mittels präparativer HPLC aufgetrennt. Dazu wurde ein C8 Säule verwendet (Agilent ZORBAX XDB-C8, 21.2 x 150 mm, 5 µm, Fluss 21.24 mL/min). Der Lauf erfolgte isokratisch mit H<sub>2</sub>O+0.1% HCO<sub>2</sub>H:MeCN im Verhältnis 27:73. Die Reinheit der erhaltenen Reinsubstanzen wurde mittels Integration über das Chromatogramm bestimmt. Zur weiteren Verwendung wurden Fraktionen mit einer Reinheit >95 % ausgewählt.

## 3.11. Zellbasierte Methoden

### 3.11.1. Transiente Transfektion humaner Zellen

#### 3.11.1.5. Elektroporation von BEAS-2B und HepG2

Die Zellen werden in Vollmedium bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80 % bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. AM Tag der Elektroporation werden die Zellen nach zweimaligem waschen in 1x PBS durch Trypsinieren abgelöst und durch Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in DMEM ohne Zusätze resuspendiert. Nach Aufteilung der Zellsuspension auf Küvetten (je 400 µl) wird die entsprechenden Plasmide hinzu pipettiert und durch Agitation vermischt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wird die Elektroporation durchgeführt (Nepagene 21, Bedingungen: Poring Pulse: 220 Volt, 5 msec pulse length, 50 msec pulse interval, two pulses, 10 % decay rate, + polarity; Transfer Pulse: 20 Volt, 50 msec pulse length, 50 msec pulse interval, five pulses, 40 % decay rate, +/- polarity). Danach erfolgt die Zugabe von 500 µL Vollmedium in die Küvette. Nach 5-minütiger Ruhephase wird die Zellsuspension in 25 mL Vollmedium suspendiert und in 24-Loch Platten ausgesät.

### 3.11.2. Applikation von Substanzen und Extrakten

Substanzen oder Extrakte werden in benötigter Konzentration vorzugsweise in Ethanol angesetzt. Das erforderliche Volumen wurde steril in 24-Loch Platten gegeben und das Lösungsmittel verdampft. Die Substanzen oder Extrakte werden dann im entsprechenden Medium gelöst und für 10 min bei

37 °C unter Agitation (300 rpm) gelöst. Diesem Medium wurden gegebenenfalls Induktoren zugegeben. Danach wird das Medium von den Zellen genommen, die 24 h zuvor transfiziert wurden und durch das mit Substanzen versetzte Medium ersetzt. Die weitere Inkubation erfolgt wie zuvor bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 3.11.3. Messung der Luciferase Aktivität

Zur Erfassung der relativen Menge an Luciferase wurden die Zellen in den 24-Loch Platten vom Medium befreit und 50 µL Lysepuffer (Passive Lysis Buffer, E1941, Promega) zugegeben. Zur Lyse wurden die Zellen für 10 min auf einem Plattenschüttler unter Agitation inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate bei -80 °C gelagert. Vor der Messung wurden die Zelllysate aufgetaut und dann 20 µL jedes Lochs der 24-Loch Platte in eine weiße, opake 96-Loch Platte transferiert. Die Messung der Lumineszenz erfolgte über 10 s nach Zugabe von 20 µL einer Luciferin und ATP haltigen Lösung (Luciferase Assay System, E4550, Promega) in einem Platten Luminometer (FLUOStar Omega, BMG Labtech).

#### 3.11.4. XTT-Zellviabilitäts Versuch

Um zytotoxische Effekte von Substanzen zu identifizieren, wurde ein XTT-Assay durchgeführt. Dazu werden 5\*10<sup>4</sup> Zellen/mL in eine 24-Loch Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei Standardbedingungen, werden die Substanzen in 1 mL Vollmedium gelöst und zu den Zellen gegeben. Nach Ablauf der benötigten Inkubationszeit, werden 0,5 mL des Mediums abgesaugt und 250 µL frisch angesetzter XTT Färbelösung hinzugefügt (25 µM Phenazinmethosulfat und 1 mg/mL XTT in PBS). Die photometrische Messung der Absorption erfolgt nach 2 h, im Plattenphotometer bei 480 nm.

#### 3.11.5. Giemsa-Färbung

Um die gebrauchsfertige Färbelösung anzusetzen, wurde zunächst eine 0,9 % NaCl Lösung hergestellt und Giemsa Lösung darin 1:10 verdünnt, danach filtriert. Vom zu färbenden Zellrasen wird das Medium vorsichtig abgesaugt und mit PBS gespült. Durch Zugabe von Methanol werden die Zellen dann für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Das Methanol wird abgesaugt und der Zellrasen für weitere 10 min bei 37 °C getrocknet. Danach erfolgt die Färbung durch Zugabe der zuvor hergestellten Färbelösung für 5 min bei Raumtemperatur. Nach Absaugen der Färbelösung wird der Zellrasen einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> gespült und mikroskopiert. Für die photometrische Messung wird 0,1 M HCl hinzugegeben und die Färbung für 10 min extrahiert, dann in eine 96-Loch Platte überführt und die Absorption bei 600 nm gemessen.

### 3.12. Proteinbasierte Methoden

#### 3.12.1. Herstellung von Proteinextrakten

Zur Herstellung eines Proteinextraktes wird zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt und der Zellrasen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Danach werden die Zellen in PBS abgeschabt und

durch Zentrifugation pelletiert (1000 x g, 10 min, 4 °C). Je nach Größe des Pellets wird ein entsprechendes Volumen RIPA Puffer hinzugefügt und das Pellet darin zentrifugiert. Der Extrakt wird dann mindestens einmal eingefroren und aufgetaut, bevor er bei mind. 5000 x g für mind. 10 min zentrifugiert wird. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 6 µL entnommen und mit 54 µL PBS gemischt, um die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay zu bestimmen. Der restliche Extrakt wird bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 3.12.2. Herstellung von Proteinextrakten für die Click-Chemie

BEAS-2B-Zellen wurden für 24 h in Minimalmedium mit 5 ng/ml TGF-β1 inkubiert und in PBS abgeschabt. Die Zellen wurden dann pelletiert und nach Zugabe des Click-Chemie Lysepuffers durch Sonifizieren lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 000 x g, 8 min, 4 °C) entfernt.

#### 3.12.3. Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung des Proteingehalts in Zellextrakten und proteinhaltigen Lösungen wurde ein BCA Assay nach Herstellerangaben durchgeführt (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) und in einem Platten Luminometer vermessen und analysiert (FLUOStar Omega, BMG Labtech).

Die Eichgerade wird mit BSA erstellt und umfasst folgende Konzentrationen: 0 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,75 mg/mL; 1 mg/mL; 1,5 mg/mL; 2 mg/mL

#### 3.12.4. Markierung der Zielproteine von DM-Oxa

Zur Markierung des Zielprotein in BEAS-2B Zell-Lysat wurde dieses zunächst falls zutreffend mit freiem DM-Oxa versetzt. Proben ohne freies DM-Oxa wurden stattdessen mit dem gleichen Volumen an reinem Lösungsmittel versetzt. Nach 10-minütiger Vorinkubation bei 37 °C wurde dann das DM-Oxa-PAL Alkin hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C, um die Bindung von DM-Oxa-PAL an die Zielproteine zu ermöglichen, wurde der Linker durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von ca. 360 nm aktiviert und für 40 min unter ständiger Agitation bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 3.12.5. Kupfer-katalysierte Click-Reaktion in Proteinextrakten

Die Kopplung von Aziden und Alkinen wurde durch Kupfer-katalysierte Click-Reaktionen vorgenommen. Dazu wurde das CLK-CSTM Click-&-Go™ Protein Reaction Buffer Kit (Click Chemistry Tools) nach Herstellerangaben verwendet.

#### 3.12.6. Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation von HSP90 und assoziierten Proteinen wurden BEAS-2B-Zellen in Ø10 cm Schalen ausgesät und in Vollmedium inkubiert. Das Medium wurde bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 70 % durch Minimalmedium ersetzt. Nach 16 h Inkubationszeit wurde das Medium durch Minimalmedium ersetzt, dem zuvor 1 µM DM-Oxa zugesetzt wurde. Nach einstündiger Vorinkubation wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ng/mL stimuliert. Unstimulierte und stimulierte, unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Vor Lyse der Zellen wurden diese durch Zugabe von 1 % Formaldehyd

für 10 min fixiert. Lysiert wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS in einem TRIS-haltigen Lysepuffer. Die Zur Immunpräzipitation verwendeten Beads (Dynabeads™ Antibody Coupling Kit, Invitrogen) wurden nach Packungsangabe vorbereitet und je 2 mg der Beads mit 7 µg HSP90 und 1 µg GAPDH Antikörper gekoppelt. Die eigentlich Immunpräzipitation erfolgte nach Literaturangaben (Lagundžin et al. 2022). Eluate wurden für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Formaldehydbindung zu lösen. Eluierte Proteine wurden wie unten beschrieben durch Acetonzugabe gefällt und für die Massenspektrometrie vorbereitet. Es wurde ein in-Solution-Verdau durchgeführt.

### 3.12.7. SDS-PAGE

Die elektrophoretische Trennung von Proteinextrakten erfolgte durch SDS-PAGE. Dazu wird zunächst ein Polyacrylamidgel mit 0,75 mm oder 1 mm gegossen, bestehend aus Sammel- und Trenngel. Das Trenngel hat dabei je nach Anwendung einen Acrylamidgehalt zwischen 8 % bis 12 %, das Sammelgel von 3 %. Die Proben werden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Wenn nicht anders angegeben wurde der Marker Pageruler Plus Prestained (Thermo Fisher Scientific) geladen. Die Auftrennung erfolgt in SDS-Laufpuffer bei 115 V.

Tabelle 3 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE (für vier Gele). Alle Angaben sind in mL.

	<b>Trenngel 8 %</b>	<b>Trenngel 10 %</b>	<b>Trenngel 12 %</b>	<b>Sammelgel 3 %</b>
<b>30 % 37,5:1 Acrylamid</b>	5,3	6,8	8	3
<b>1,5 M Tris HCl pH 8,8</b>	5	5	5	-
<b>0,5 M Tris HCl pH 6,8</b>	-	-	-	2,5
<b>Wasser</b>	9,5	8	6,8	5,1
<b>20 % SDS</b>	0,1	0,1	0,1	0,05
<b>10 % APS</b>	0,2	0,2	0,2	0,1
<b>TEMED mL</b>	0,012	0,012	0,012	0,02

### 3.12.8. Western-Blot

Nach Trennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden diese in einer Semi-Dry Apparatur (PerfectBlue™, Peqlab, VWR) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran NC, Cytiva Amersham) übertragen. Dazu wurden je zwei, drei und fünf zugeschnittene Whatman Papiere mit Puffer T2, T3 und T1 befeuchtet und in folgender Weise mit Membran und Polyacrylamidgel geschichtet: Auf der Anode werden Papiere mit T3 platziert, dann folgen die in T2 getränkten Papiere. Darauf wird die mit T2 befeuchtete Membran platziert und nachfolgend das Gel, equilibriert in T2. Die oberste Schicht des Stapels besteht aus fünf Papieren, befeuchtet mit Puffer T1, es folgt die Kathode. Der Transfer der Proteine erfolgt bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> je nach Größe des Zielproteins für 45 bis 75 min. Der korrekte Transfer wird durch Ponceau-Färbung überprüft und die Membran in Blockingpuffer für mindestens 30 min geblockt. Die Membran wird dann in Primärantikörper über Nacht bei 4 °C oder für mindestens

120 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T oder TBS-T für jeweils 5 min erfolgt gegebenenfalls die Inkubation in sekundären Antikörper für mindestens 45 min.

### 3.12.9. Antikörper

Die zur Proteindetektion und Immunpräzipitation verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 Antikörper zur Proteindetektion und Immunpräzipitation

<b>Antigen</b>	<b>Produktnummer, Lieferant</b>	<b>Verdünnung (Western Blot)</b>
GAPDH	sc-47724, Santa Cruz Biotechnology	1 : 1000
Nrf-2	MABC1556, Sigma-Aldrich	1 : 2000
HMOX	ZRB1609, Sigma-Aldrich	1 : 2000
TrxR1	sc-28321, Santa Cruz Biotechnology	1 : 500
NQO1	sc-32793, Santa Cruz Biotechnology	1 : 500
mouse IgG	sc-516102, Santa Cruz Biotechnology	1 : 10 000
rabbit IgG	A9169, Sigma-Aldrich	1 : 60 000
HSP90 $\alpha/\beta$	sc-13119, Santa Cruz Biotechnology	1 : 1000
SOD3	HPA042110, Sigma-Aldrich	1 : 6000

## 3.13. Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

### 3.13.1. In-Gel-Verdau von Proteinproben

Für diesen Versuch sollten alle Puffer stets frisch angesetzt werden.

Je 100  $\mu$ g Protein wird in ein 10 % SDS-Gel geladen und in das Trenngel einlaufen gelassen. Das Gel wird für 10 min und weitere 5 min mit frischem Entfärber fixiert. Nach zweimaligem Waschen in Wasser (je 5 min) wird es für mehrere Stunden mit kolloidalem Coomassie gefärbt und bis zur guten Sichtbarkeit der Banden in 1 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Die Banden werden ausgeschnitten, in ca. 3 mm x 3 mm große Stücke zerteilt und in ein mit Entfärber befülltes 1,5 mL Gefäß gegeben. Die Gelstücke werden nun entfärbt, bis sie fast farblos sind. Die folgenden Schritte werden dreimal wiederholt: Die Stücke werden dann mit 40 mM Ammoniumbicarbonat für 5 min bei 900 rpm geschüttelt und der Überstand verworfen. Danach werden die Gelstücke für 15 min mit 70 % Acetonitril in Wasser bei 900 rpm inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wird entfernt.

Final werden die Gelstücke in Acetonitril für 5 min stehend entwässert und der Überstand erneut verworfen. Das Gel wird nun für 5 min unter Vakuum getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Reduktion und Alkylierung wird das Gel in 40 mM Ammoniumbicarbonat und 10 mM DTT rehydriert und für 15 min bei 55-60 °C inkubiert. Nach weiteren 15 min bei Raumtemperatur werden die Proben zentrifugiert (5000 x g, 1 min) und der Überstand verworfen. Die Gelstücke werden dann in 30  $\mu$ L frisch angesetzter Lösung aus 100 mM Iodacetamid und 40 mM Ammoniumbicarbonat für

15 Minuten inkubiert. Dieser Schritt erfolgt unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Überschüssige Flüssigkeit wird danach erneut nach Zentrifugation entfernt. Die Gelstücke werden mit 100 µL 40 mM Ammoniumbicarbonat überschichtet und gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation wird der Überstand verworfen und die Gelstücke in 100 % Acetonitril für 10 min stehend entwässert. Auch dieser Überstand wird verworfen und die Gelstücke unter Vakuum getrocknet.

70 µL Trypsinlösung (10 ng/µL Trypsin in 40 mM Ammoniumbicarbonat) wird zu den Gelstücken gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. 40 mM Ammoniumbicarbonat wird hinzugefügt bis die Gelstücke gerade vollgesogen sind und für weitere 5 min inkubiert. Danach werden weitere 100 µL 40 mM Ammoniumbicarbonat hinzugegeben und der Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation werden 2 % Ameisensäure zugesetzt und für 20 min unter Schütteln inkubiert. Die Flüssigkeit wird in ein frisches Eppendorf Gefäß gegeben. Ein weiterer Extraktionsschritt erfolgt mit 100 µL 2 % Ameisensäure 10 % Acetonitril in Wasser unter Schütteln für weitere 20 min. Der Überstand wird nach diesem Schritt in das zuvor genutzte Gefäß gegeben. Die finale Extraktion erfolgt mit 200 µL 1 % Ameisensäure und 60 % Acetonitril unter Schütteln für mindestens 20 min. Auch dieser Überstand wird den zuvor gewonnen Überständen vereint. Die Proben werden dann unter Vakuum getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Entsalzung über stage tips erfolgt nach Rappsilber et al. (Rappsilber et al. 2007).

### 3.13.2. In-Solution-Verdau für die Analyse des Proteoms

Die Proteinproben wurden durch Lyse der Zellen in einem kompatiblen Puffer (50 mM Ammoniumbicarbonat, 0,5 % SDS, pH 8.0) erzeugt. Um die vollständige Lyse zu gewährleisten, wurden die Zellysate für 5 min auf 95 °C inkubiert und sonifiziert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min, 16000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und die Proteinkonzentration wie zuvor durch einen BCA-Assay ermittelt. 60 µg Protein wurden dann pro Probe in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Volumen auf 100 µL eingestellt. Nach Zugabe von 400 µL Aceton wurden die Proteine über Nacht bei -20 °C gefällt und danach 20 min bei 16000 x g und 4 °C Pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 500 µL eiskaltem 80 % Aceton gewaschen. Das Pellet wurde dann 5-10 min getrocknet und in 25 µL Ureapuffer (6 M Urea, 2 M Thiourea, 12,5 mM DTT, 40 mM Ammoniumbicarbonat) gelöst. Als nächstes erfolgte die Zugabe von Iodacetamid mit einer Endkonzentration von 55 mM hinzugefügt und für 20 min bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden dann mit 40 mM Ammoniumbicarbonat verdünnt, bis der Gesamtgehalt an Urea nur noch 4 M beträgt. Es folgte die Zugabe von Lys-C in einem Verhältnis von 1:100 (w/w, Lys-C zu Protein) und eine Inkubation für mindestens 3 h bei 37 °C. Nach erneuter Verdünnung der Proben mit 40 mM Ammoniumbicarbonat auf eine Gesamtkonzentration von 1 M Urea wurde Trypsin in einem Verhältnis von 1:100 (w/w, Trypsin zu Protein) hinzugefügt. Der Verdau erfolgte dann über Nacht bei 37 °C. Danach wurde

erneut Trypsin in einem Verhältnis von 1:50 (w/w, Trypsin zu Protein) hinzugefügt und für weitere 3 h inkubiert. Nach Ansäuerung der Proben durch Zugabe von 2 % Ameisensäure erfolgte die Entsalzung mit stage tips (Rappsilber et al. 2007).

#### 3.13.3. Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen werden diese zunächst in Entfärber für 10 min fixiert und nachfolgend über Nacht in kolloidaler Coomassielösung gefärbt. Je nach gewünschter Stärke der Entfärbung wird das Gel in Wasser, 1 % Essigsäure oder Entfärber inkubiert.

### 3.14. Massenspektrometrische Messungen

Die Bedienung der Massenspektrometer erfolgte durch Dr. Frederik Sommer. Messungen nach Pulldown Experimenten wurden mit dem Sciex TripleTof 6600 Massenspektrometer durchgeführt. Messungen zur Proteom-Analyse wurden mit dem Bruker timsTOF Pro2 Massenspektrometer durchgeführt.

### 3.15. mRNA-Quantifizierung

#### 3.15.1. RNA-Isolation

Um RNA aus menschlichen Zellen zu gewinnen, wurden diese in 6-Loch Platten ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium entfernt und durch Medium ersetzt, welches die Testsubstanzen enthält. Sollte eine Induktion mit Zytokinen erfolgen, so werden die Zellen für eine Stunde in Minimalmedium mit den jeweiligen Zytokinen vorinkubiert und danach die entsprechenden Substanzen hinzugefügt. Je nach Versuch werden die Zellen dann bei Standardbedingungen für den entsprechenden Zeitraum inkubiert. Dann wird das Medium entfernt und die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Danach wird der Zellrasen mechanisch von der Platte gelöst und in PBS suspendiert. Die nachfolgende Pelletierung erfolgt bei 1000 x g, 4 °C für 10 min. Der Überstand wird entfernt und die RNA mithilfe des GenUP™ Total RNA-Kits nach Herstellerangaben extrahiert.

#### 3.15.2. mRNA-Sequenzierung

Die zuvor isolierte RNA wurde zunächst mittels NanoDrop quantifiziert (NanoDrop 2000, Thermo Fisher). Der A260/A280 Wert sollte dabei über 1,8 liegen. 10 µL der RNA wurde unmittelbar danach aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Dieser Teil der RNA wurde zur Sequenzierung eingeschickt. Mit dem übrigen Teil der RNA wurde eine weitere Analyse zur Überprüfung der Qualität durchgeführt. Dazu wurde die RNA gelelektrophoretisch über einen Q-Analyser (Q-Sep1, Nippon Genetics) aufgetrennt (Kartusche R1-O-211012-1). Der ausgegebene Qualitätsparameter (RQN, RNA Quality Number) sollte nicht unter sechs liegen. Der Wert zwischen 1 und 10 gibt an, ob RNA degradiert oder intakt vorliegt, 10 repräsentiert intakte RNA, ein RQN-Wert von 1 impliziert den vollständigen Abbau

der RNA. Die Aufreinigung der mRNA mittels Poly-A Anreicherung und Präparation der mRNA-Bibliothek sowie die anschließende Sequenzierung wurde durch die Firma Genewiz (Leipzig) realisiert. Die Sequenzierung erfolgte mittels Illumina NovaSeq (paired end, 150 bp Sequenzierung, je 10 Mio. read pairs).

### 3.15.3. Quantitative Real-Time PCR

#### 3.15.3.6. cDNA Synthese

Um die RNA in cDNA umzuwandeln, werden 1-3 µg der zuvor isolierten RNA eingesetzt und durch reverse Transkriptase (M-MLV RT, Promega) für 60 min bei 37 °C cDNA nach Herstellerangaben synthetisiert.

#### 3.15.3.7. Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative real-time PCR (qPCR) wird pro Loch einer 96-Loch Reaktionsplatte 200 ng cDNA in 8 µL H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> verwendet. Dazu wird 8 µL der Primerlösung gegeben (je 0,5 µM des sense und antisense Primers in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub>). Zuletzt werden 4 µL des Supermix hinzugefügt (HOT FIREPol qPCR Supermix, Solis Biodyne). Die PCR erfolgt nach folgendem Protokoll in einem StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher):

Initiale Denaturierung:        12 min        95 °C

40 Zyklen:

Denaturierung:                15 s            95 °C

Annealing:                    30 s            56 °C

Elongation:                    30 s            72 °C

Schmelzkurvenbestimmung:

Denaturierung:                1 s            95 °C

Annealing:                    20 s            52 °C

Analyse:        52–95 °C mit einer Heizrate von 0,3 °C pro s und einer kontinuierlichen Fluoreszenz-Messung

### 3.15.4. qPCR-Primer

Alle Primer für die quantitative real-time PCR (qPCR) sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5 Primer für die quantitative real-time PCR

<i>cdh1</i> (NM_001317186.1)	
Sense	ACACCCGGGACAACGTTTAT
Antisense	GGGTCAGTATCAGCCGCTTT
<i>cdh2</i> (NM_001792.4)	
Sense	GAAGGACAGCCTCTTCTCAATGTG
Antisense	TCACGGCATAACCCATGCCATC

<i>ccl2</i> (NM_002982)	
Sense	ATCAATGCCCCAGTCACC
Antisense	AGTCTTCGGAGTTTGGG
<i>ccl5</i> (NM_001278736)	
Sense	TACCATGAAGGTCTCCGC
Antisense	GACAAAGACGACTGCTG
<i>cxcl10</i> (NM_001565.3)	
Sense	TGAGCCTACAGCAGAGGAA
Antisense	TACTCCTTGAATGCCACTTAGA
<i>ccnd1</i> (NM_053056.2)	
Sense	CTGGCCATGAACTACCTGGA
Antisense	GTCACACTTGATCACTCTGG
<i>cyp1a1</i> (NM_000499)	
Sense	GATTGAGCACTGTCAGGAGAAGC
Antisense	ATGAGGCTCCAGGAGATAGCAG
<i>cyp1a2</i> (NM_000761)	
Sense	TCATCCTGGAGACCTTCCGACA
Antisense	GCCACTGGTTTACGAAGACACAG
<i>gapdh</i> (NM_002046)	
Sense	CCTCCGGGAAACTGTGG
Antisense	AGTGGGGACACGGAAG
<i>gm-csf</i> (NM_000758)	
Sense	GGGAGCATGTGAATGCCATC
Antisense	GGCTCCTGGAGGTCAAACAT
<i>hmox1</i> (NM_002133.3)	
Sense	ATGACACCAAGGACCAGAGC
Antisense	GTGTAAGGACCCATCGGAGA
<i>il6</i> (NM_000600)	
Sense	TCTCCACAAGCGCCTTCG
Antisense	CTCAGGGCTGAGATGCCG
<i>il8</i> (NM_001354840)	
Sense	TGCCAAGGAGTGCTAAAG
Antisense	CTCCACAACCCTCTGCAC
<i>mmp2</i> (NM_001127891)	
Sense	AGCTAAATCGGGTCGTAG
Antisense	CAGGGATATTGACTCCGA
<i>mmp9</i> (NM_004994.2)	
Sense	CGACGTCTTCCAGTACCGAG
Antisense	GTTGGTCCCAGTGGGGATTT
<i>nqo1</i> (NM_000903.3)	
Sense	CAGTGGTTTGGAGTCCCTGCC
Antisense	TCCCCGTGGATCCCTTGCAG
<i>nrf2</i> (NM_006164.5)	
Sense	CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG
Antisense	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
<i>prdx1</i> (NM_181696.3)	
sense	CTGCCAAGTGATTGGTGCTTCTG

antisense	AATGGTGCCTTCGGGTCTGAT
<hr/>	
<i>smad7</i> (NM_005904.4)	
Sense	AGAGGCTGTGTTGCTGTGAATC
Antisense	GCAGAGTCGGCTAAGGTGATG
<hr/>	
<i>sod3</i> (NM_003102.4)	
Sense	ACGCTGGCGAGGACGACCTG
Antisense	GCTTCTTGCGCTCTGAGTGCTC
<hr/>	
<i>snai1</i> (NM_005985)	
Sense	ACCACTATGCCGCGCTCTT
Antisense	GGTCGTAGGGCTGCTGGAA
<hr/>	
<i>tgfβ-1</i> (NM_000660.7)	
Sense	GCCCTGGACACCAACTATTG
Antisense	CGTGTCCAGGCTCCAAATG
<hr/>	
<i>txnrd1</i> (NM_182743.3)	
Sense	GTTACTTGGGCATCCCTGGTGA
Antisense	CGCACTCAAAGCGACATAGGA

### 3.16. Methoden zur Detektion von oxidativem Stress

#### 3.16.1. 2,7-Dichlorhydrofluorescein-Assay

2,7-Dichlorhydrofluorescein wurde verwendet, um den Redox-Status von Zellen zu erfassen. Dazu wurden BEAS-2B-Zellen in schwarze 96-Loch Platten ausgesät (5000 Zellen/Loch) und für 24 h inkubiert. Für diesen Versuch wurde serumfreies Medium (enthält kein Phenolrot) verwendet. 2,7-Dichlorhydrofluorescein (Cayman Chemical) wurde in DMSO verdünnt und in einer Endkonzentration von 100 µM zu den Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubation wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, in dem die Testsubstanzen gelöst waren. Nach weiterer Inkubation für 60 min wurde die Fluoreszenz im Plattenphotometer detektiert (Extinktion 485 nm, Emission 530 nm).

#### 3.16.2. Comet-Assay

Um die Fragmentierung von DNA zu bemessen, wurde ein Comet-Assay durchgeführt. Es wurde weitestgehend dem Protokoll von Olive und Banáth gefolgt (Olive and Banáth 2006). BEAS-2B-Zellen wurden in Vollmedium ausgesät und 24 h inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation mit den testsubstanzen wurden die Zellen mechanisch in PBS abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert (1000 x g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde dann in eiskaltem PBS suspendiert und auf 2\*10<sup>4</sup> Zellen/mL eingestellt. Objektträger wurden dünn mit 1 % Agarose (Agarose LE, Genaxxon bioscience) in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> beschichtet. 400 µL der zuvor hergestellten Zellsuspension wurden dann mit 1,4 mL 1 % Agarose in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> (40 °C) gemischt und sofort dünn auf die vorbehandelten Objektträger geschichtet. Sobald die Agarose fest war, wurde die Lyse der Zellen über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Vor der Elektrophorese wurden die beschichteten Objektträger in Elektrophoresepuffer gewaschen. Die Elektrophorese erfolgte bei 0,6 V/cm für 30 min. Nach Waschen der Objektträger in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> wurde die DNA mit 2,5 µg/mL Propidiumiodid gefärbt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch ein

Olympus BX53 System mit MC50 Mikroskop Kamera (Zeiss). Die Analyse erfolgte mithilfe der CometScore Software (Version 1.5., TriTrek Corporation).

### 3.17. Auswertung der Daten

#### 3.17.1. Software

Zur Auswertung und graphischen Darstellung von Daten wurden unter anderem folgende Softwares verwendet: Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2022, Microsoft Excel), OriginLab (Origin, 2021b, OriginLab Corporation), Cytoscape (Shannon et al. 2003), Plotly.NET (Schneider et al. 2022). Für spezielle Auswertungen verwendete Software ist in den jeweiligen Kapiteln referenziert.

#### 3.17.2. Auswertung von Proteom- und Transkriptom-Daten

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Proteom- und Transkriptom-Daten wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Computergestützte Systembiologie, Prof. Dr. Timo Mühlhaus, RPTU ausgewertet. Statistische Analysen sowie Netzwerkanalysen wurden mit FSharp.Stats durchgeführt (Venn et al. 2022). Korrelationskoeffizienten des Netzwerks und der Pulldown-Experimente wurden nach Pearson 1895 bestimmt.

Die Überrepräsentation von Ontologietermen wurde über hypergeometrische Tests ermittelt (Venn et al. 2022). Als Hintergrund wurden alle im jeweiligen Experiment gemessenen Elemente verwendet. Genutzte Ontologien sind in den jeweiligen Abschnitten referenziert.

Die Falscherkennungsrate im Rahmen der Multiple Testing Korrektur wurden über Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg 2000) bzw. q-Werten (Storey and Tibshirani 2003) bestimmt.

Die Normierung von sowohl Transkript-Counts als auch Proteinintensitäten erfolgte über die *median-of-ratios* Normierung (Love et al. 2014).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Struktur-Wirkungsbeziehungen von Oxacyclododecindion Derivaten

Zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen ist es von großem Interesse herauszufinden, welche Teile der Struktur des Naturstoffs Oxacyclododecindion für dessen biologische Aktivität essenziell sind. Die Kenntnis über relevante funktionelle Gruppen kann genutzt werden, um eine zielgerichtete Derivatisierung durchzuführen, die womöglich zur Steigerung der Wirkung führen kann. Andererseits kann so auch herausgefunden werden, an welcher Stelle zusätzliche Funktionalisierungen angebracht werden können. Diese können dann beispielsweise in Pulldown Experimenten zur Aufklärung der Zielproteine von Oxacyclododecindion genutzt werden. Aufgrund vorheriger Experimente konnten bereits einige Gruppen als essenziell für die biologische Aktivität ausgemacht werden (Weber et al. 2020; Tauber et al. 2015; Tauber et al. 2016). Unbekannt ist bisher, ob die Hydroxygruppen an Position 5 und 7 für die biologische Aktivität benötigt werden.

Für den strukturell verwandten Naturstoff 10,11-Dehydrocurvularin wurde in der Vergangenheit eine Alkin-Funktionalisierung an dieser Stelle durchgeführt, wodurch erfolgreich Zielproteine identifiziert werden konnten (Deng et al. 2019). Um herauszufinden, ob diese Stelle auch für die Identifikation von Oxacyclododecindion Zielproteinen zur Funktionalisierung geeignet wäre, wurden von der AG Opatz Derivate synthetisiert, an denen die fraglichen Positionen 5 und 7 durch Methoxygruppen abgeschirmt sind (Abbildung 8). Würden sich diese Positionen zur Anbringung eines Linkers eignen, so sollte keine Reduktion der biologischen Aktivität erfolgen.

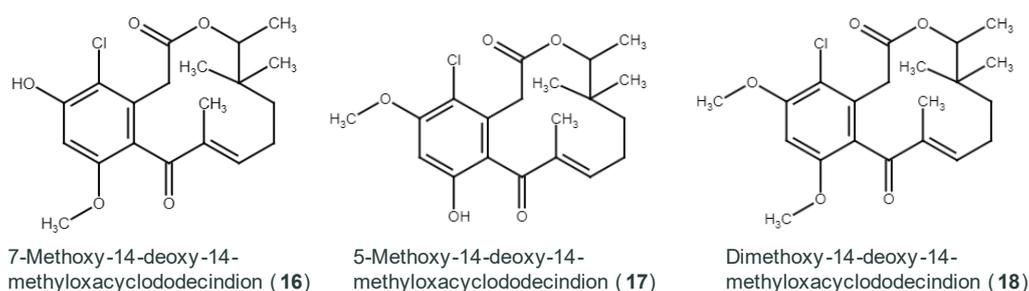


Abbildung 8 Die untersuchten 14-Deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion Derivate 7-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**16**), 5-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**17**) und Dimethoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**18**).

Die biologische Aktivität der beiden Derivate 7-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**16**) und 5-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**17**) wurde anhand von Reportergerätsversuchen charakterisiert. Um die Vergleichbarkeit zu den bereits publizierten Daten zu gewährleisten, wurden die neuen Derivate im gleichen Zellsystem und mit gleichen Reportervektoren getestet, wie auch in der Literatur beschrieben (Weber et al. 2020).

Für die Derivate 7-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**16**) und 5-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**17**) konnte keine Hemmung der TGF- $\beta$ 1 induzierten, SMAD2/3 vermittelten Signaltransduktion (Reportervektor: (CAGA)<sub>9x</sub>-MLP-Luc) und der IL-4 induzierten, STAT6 vermittelten Signaltransduktion (Vektoren: TOPO-STAT6 und pGL3-TK-7xN4) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 9). Waren sowohl die Hydroxygruppe an Position 5, als auch die an Position 7 verdeckt, konnte, wie zu erwarten, ebenfalls keine Aktivität nachgewiesen werden. Von einer weiteren Derivatisierung an Position 5 und 7 wurde deshalb abgesehen.

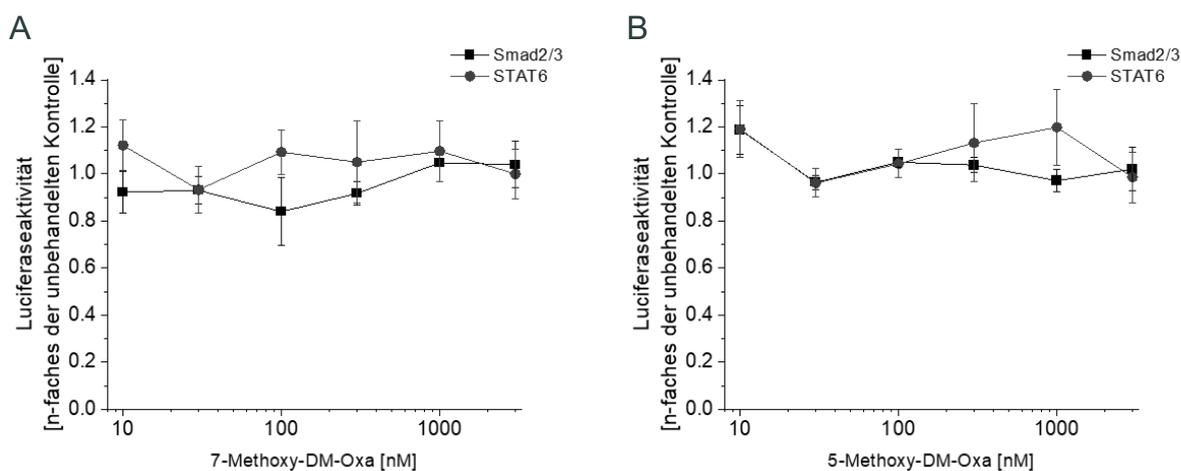


Abbildung 9 Biologische Aktivität der Oxacyclododecindion Derivate 7-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**16**) und 5-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**17**). Die Verbindungen wurden anhand von Reporterassays auf eine Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten, SMAD2/3 vermittelten Signaltransduktion ((CAGA)<sub>9x</sub>-MLP-Luc) und der IL-4 induzierten, STAT6 vermittelten Signaltransduktion (TOPO-STAT6 und pGL3-TK-7xN4) untersucht. Der Versuch erfolgte in biologischen Triplikaten,  $\pm$ Stabw.

Ebenfalls durch AG Opatz wurden zwei Stereoisomere synthetisiert, die ausgehend von 14-deoxyoxacyclododecindion eine Hydroxygruppe an Position 13 vorweisen (Abbildung 10).

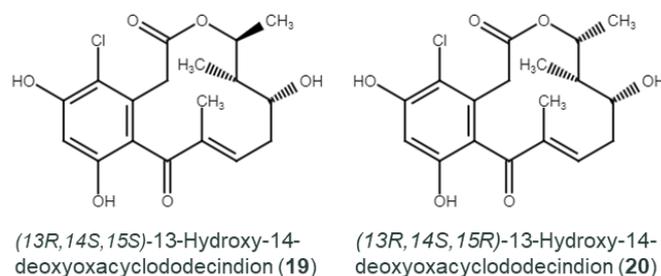


Abbildung 10 Die untersuchten 14-Deoxyoxacyclododecindion Derivate (13R,14S,15S)-13-Hydroxy-14-deoxyoxacyclododecindion (**19**) und (13R,14S,15R)-13-Hydroxy-14-deoxyoxacyclododecindion (**20**).

Auch diese Derivate wurden wie zuvor in Reporterassays getestet, um die biologische Aktivität mit anderen Derivaten und dem Naturstoff vergleichen zu können (Abbildung 11).

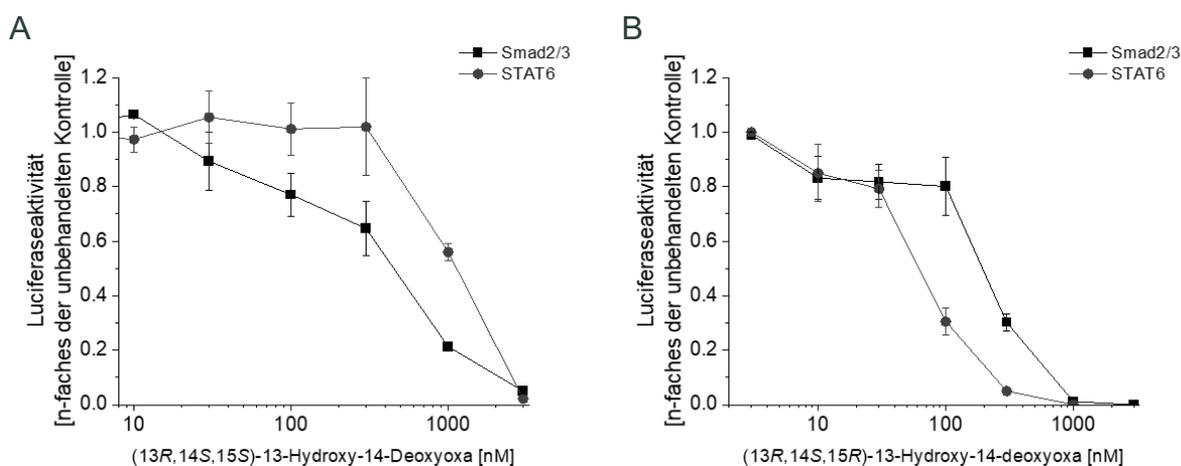


Abbildung 11 Biologische Aktivität der 14-Deoxyoxacyclododecindion Derivate (13R,14S,15S)-13-Hydroxy-14-deoxyoxacyclododecindion (**19**) und (13R,14S,15R)-13-Hydroxy-14-deoxyoxacyclododecindion (**20**). Die Verbindungen wurden anhand von Reporterassays auf eine Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten, SMAD2/3 vermittelten Signaltransduktion ((CAGA)<sub>9x</sub>-MLP-Luc) und der IL-4 induzierten, STAT6 vermittelten Signaltransduktion (TOPO-STAT6 und pGL3-TK-7xN4) untersucht. Der Versuch erfolgte in biologischen Triplikaten,  $\pm$ Stabw.

Die beiden 13-Hydroxy-14-deoxyoxacyclododecindion Stereoisomere zeigen eine deutliche biologische Aktivität, sowohl auf die TGF- $\beta$ 1 induzierte, SMAD2/3 vermittelte Signaltransduktion ((CAGA)<sub>9x</sub>-MLP-Luc) als auch auf die IL-4 induzierte, STAT6 vermittelte Signaltransduktion (TOPO-STAT6 und pGL3-TK-7xN4). Die IC<sub>50</sub> Werte liegen dabei bei 239,15 $\pm$ 7,77  $\mu$ M (SMAD2/3) und 1024,13 $\pm$ 72,64  $\mu$ M (STAT6) für Derivat **19** und 235,57 $\pm$ 27,94  $\mu$ M (SMAD2/3) und 56,40 $\pm$ 12,48  $\mu$ M (STAT6) für Derivat **20**. Die biologische Aktivität der Derivate liegt somit unter dem Niveau des Naturstoffs.

#### 4.2. Biologische Aktivität von DM-Oxa in BEAS-2B-Zellen

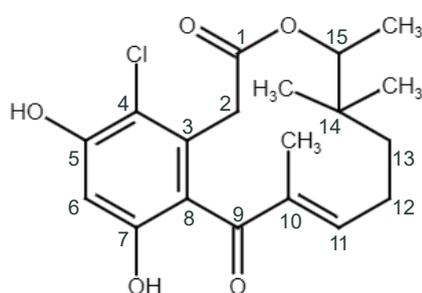


Abbildung 12 Synthetisches Makrolacton 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion (**11**).

14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion (DM-Oxa) ist ein synthetisches Derivat des Naturstoffs Oxacyclododecindion. Der Naturstoff wurde in der Vergangenheit bereits in verschiedenen Zelllinien, hauptsächlich Krebszelllinien wie z.B. MDA-MB-231, und HepG2, auf seine biologische Aktivität hin untersucht (Richter et al. 2015). DM-Oxa zeigt eine starke Inhibition der TGF- $\beta$ 1 induzierten, SMAD2/3 vermittelten Reporteraktivität (IC<sub>50</sub> = 30,0 $\pm$ 10,9 nM) sowie der IL-4 induzierten, STAT6 vermittelten Reporteraktivität (IC<sub>50</sub> = 79,1 $\pm$ 27,3 nM) in HepG2-Zellen (Weber et al. 2020). Dies wird hier nun auch für die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B verifiziert. Diese zeichnet sich durch eine hohe Induzierbarkeit sowohl für inflammatorische als

auch für einige fibrotische Stimuli aus (Doerner and Zuraw 2009). Außerdem handelt es sich im Gegensatz zu HepG2 und MDA-MB-231 nicht um eine Tumorzelllinie.

#### 4.2.1. Anti-inflammatorische Aktivität in BEAS-2B

Um die anti-inflammatorische Aktivität von DM-Oxa in BEAS-2B-Zellen zu charakterisieren, wurden zunächst Reporterassays mit entzündungsrelevanten Promotorreportern durchgeführt. Dazu wurde zunächst die STAT6 abhängige Reporteraktivität nach Induktion mit IL-4 mithilfe des Reportervektors pGL3-TK-7xN4 und des STAT6 Expressionsvektors TOPO-STAT6 erhoben. Zusätzlich wurde ein CXCL10 Reporterkonstrukt verwendet (pGL4.11-IP10pro-Luc), welches durch Elektroporation in die Zellen transfiziert wurde. Die Induktion der inflammatorischen Zellantwort erfolgte durch Applikation eines Zytokingemisches aus 10 ng/mL IFN- $\gamma$ , 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 5 ng/mL IL-1 $\beta$ . Das verwendete CXCL10 Promotorkonstrukt hat Bindestellen für mehrere Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B, ISRE und STAT1, die relevant für die anti-inflammatorischen Zellantwort sind.

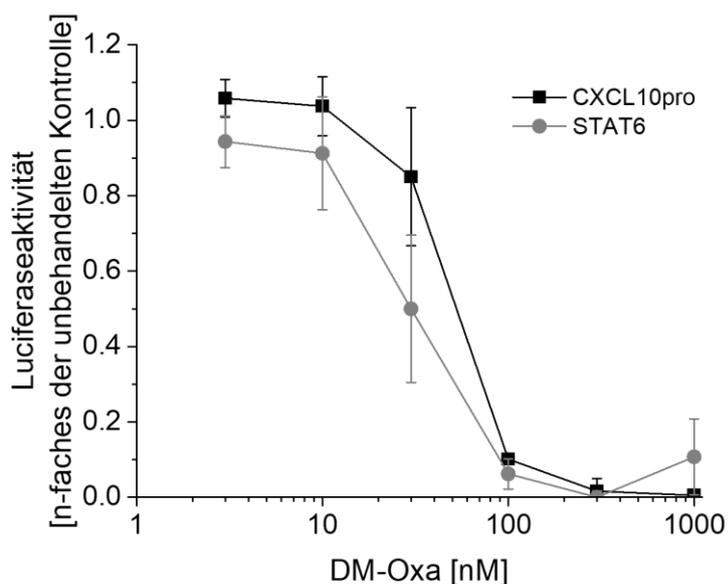


Abbildung 13 CXCL10 Promotoraktivität und STAT6 vermittelte Reporteraktivität nach Applikation von DM-Oxa. BEAS-2B-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid pGL4.11-IP10pro-Luc bzw. mit TOPO-STAT6 und pGL3-TK-7xN4 transfiziert und für 24 h inkubiert. DM-Oxa wurde dann in Minimalmedium mit einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (CXCL10pro) bzw. IL4 (STAT6) gelöst und zu den Zellen gegeben. Als Referenz dienten Zellen ohne Behandlung und Zellen, die nur mit dem entsprechenden Induktor behandelt wurden. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Replikaten.

DM-Oxa zeigt eine hemmende Wirkung sowohl auf die CXCL10 Promotoraktivität mit einer IC<sub>50</sub> von 30,73 nM als auch auf die STAT6 vermittelte Reporteraktivität mit einer IC<sub>50</sub> von 47,41 nM (Abbildung 13). Um den Einfluss der Substanz auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurden BEAS-2B-Zellen ausgesät und nach einstündiger Vorbehandlung mit DM-Oxa und Dexamethason durch ein Gemisch aus 10 ng/mL IFN- $\gamma$ , 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 5 ng/mL IL-1 $\beta$  in Minimalmedium stimuliert. Das Glucocorticoid Dexamethason wurde verwendet, da es eine starke anti-inflammatorische Wirkung hat

und so zum Vergleich der Wirkung von DM-Oxa herangezogen werden kann. Die Expression der ausgewählten inflammationsrelevanten mRNA wurde dann mittels qPCR relativ quantifiziert (Abbildung 14). Alle getesteten mRNA konnten durch den inflammatorischen Stimulus deutlich induziert werden. Auf die Expression von *ccl2* und *cxcl10* zeigt DM-Oxa den stärksten Effekt.

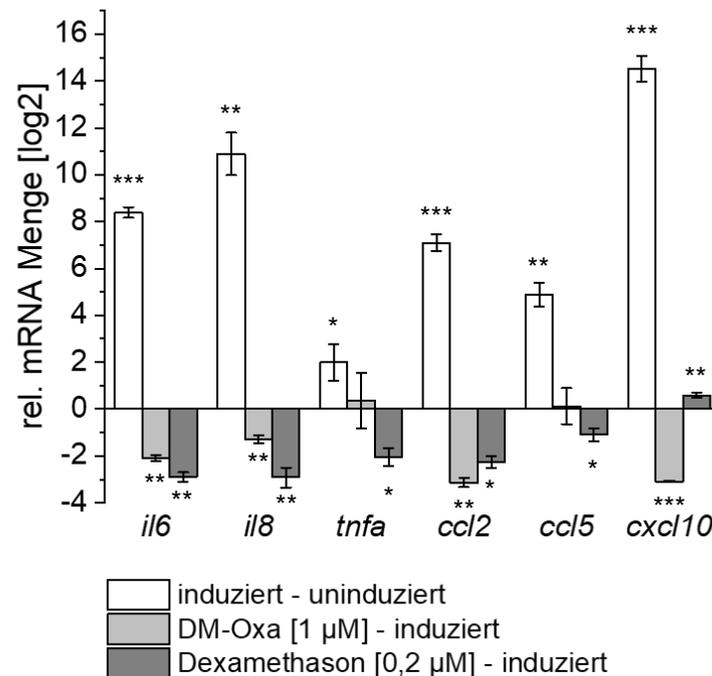


Abbildung 14 Wirkung von DM-Oxa und Dexamethason auf die Expression verschiedener inflammationsrelevanter Gene nach Induktion mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . BEAS-2B-Zellen wurden vor Versuchsbeginn 12 h in Minimalmedium inkubiert. Nach einstündiger Vorinkubation mit den Testsubstanzen, wurden die Induktoren zugegeben. Als Referenz wurden unbehandelte Zellen und Zellen die ausschließlich mit dem Induktor behandelt wurden herangezogen. Die Isolation der RNA erfolgte nach 5 h. Als Referenz diente die Expression von *gapdh*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Signifikanz der relativen Änderung wurde durch einen Einproben t-Test bestimmt mit \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2. Anti-EMT Aktivität in BEAS-2B

Als nächstes wurden weitere Reporterassays durchgeführt, um die anti-fibrotische Aktivität des Oxacyclododecindion Derivats DM-Oxa zu charakterisieren. Dazu wurden Promotoren verwendet, die während der EMT induziert sind.

So wurde die TGF- $\beta$ 1 abhängige Signaltransduktion mithilfe des (CAGA)<sub>9x</sub>-MLP-Luc Reporterkonstrukts analysiert. Die TGF- $\beta$  Isoform TGF- $\beta$ 1 wird als die häufigste und relevanteste Form der drei bekannten Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie angesehen (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) (Lichtman et al. 2016). Trotz großer struktureller Homologie gibt es Hinweise auf Unterschiede in der Wirkung der drei TGF- $\beta$  Unterformen. TGF- $\beta$ 1 ist an EMT und Fibrose beteiligt.

Es wurde außerdem der Einfluss von DM-Oxa auf die  $\beta$ -Catenin abhängige Signaltransduktion durch den Reportervektor M50Super8xTopFlash getestet.

Eine deutliche Inhibition durch DM-Oxa auf die Reporteraktivität von (CAGA)<sub>9x</sub>-MLP-Luc und M50Super8xTopFlash nach Induktion durch TGF- $\beta$ 1 bzw. den GSK-3-Inhibitor CHIR-99021 konnte detektiert werden (Abbildung 15). Die IC<sub>50</sub> wurde berechnet mit 58,45 nM für die SMAD2/3 bzw. 111,00 nM für die  $\beta$ -Catenin abhängige Reporteraktivität.

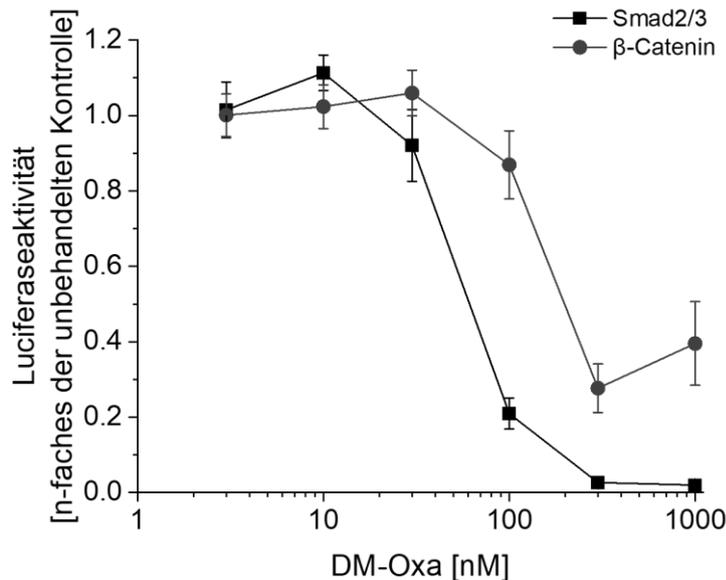


Abbildung 15 SMAD2/3 und WNT vermittelte Reporteraktivität nach Applikation von DM-Oxa. Zur Überprüfung der SMAD2/3 abhängigen Signaltransduktion wurden BEAS-2B-Zellen mit dem Reporterplasmid (CAGA)<sub>9x</sub>-MLP-Luc transfiziert und für 24 h inkubiert. Die DM-Oxa wurde dann in Minimalmedium mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 gelöst und zu den Zellen gegeben. Als Referenz dienten Zellen ohne Behandlung und Zellen, die nur mit TGF- $\beta$ 1 behandelt wurden. Analog wurden BEAS-2B-Zellen zur Analyse der  $\beta$ -Catenin vermittelten Reporteraktivität mit dem Plasmid M50Super8xTopFlash transfiziert und zur Induktion mit dem GSK-3-Inhibitor CHIR-99021 behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Replikaten.

Auch hier wurde danach die Expression einiger EMT-relevanter Gene durch qPCR quantifiziert (Abbildung 16), um die Ergebnisse der Reporterassays zu verifizieren. Dabei konnte die Expression ausgewählter EMT-relevanter Gene durch Applikation des Zytokins TGF- $\beta$ 1 induziert werden. DM-Oxa zeigt auf fast alle induzierten mRNA eine deutlich hemmende Wirkung, besonders auf *mmp2* und *smad7*. Eine hemmende Wirkung auf die TGF- $\beta$ 1 induzierte Signaltransduktion kann entsprechend auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

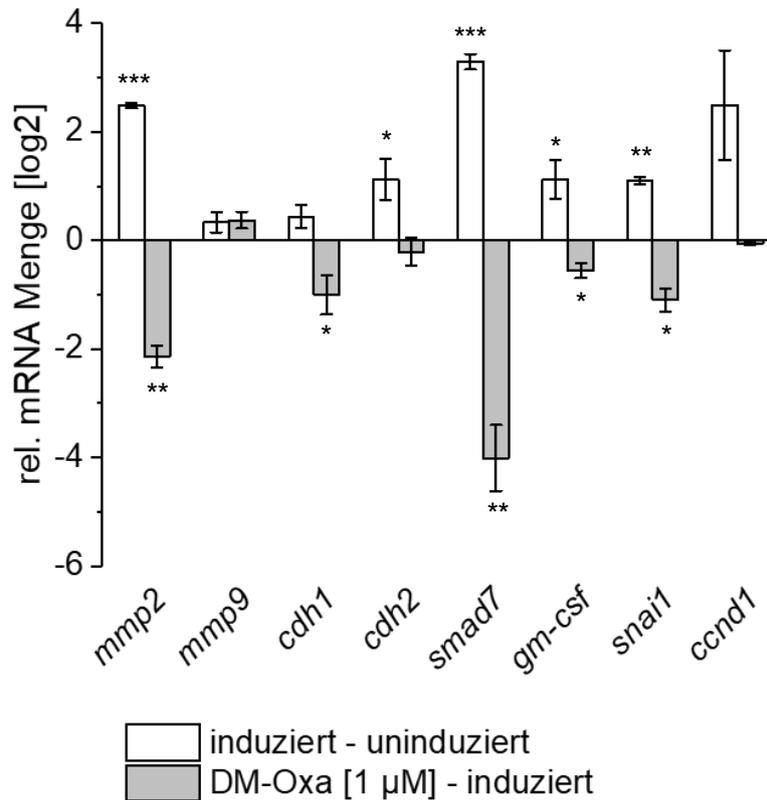


Abbildung 16 Wirkung von DM-Oxa auf die Expression verschiedener TGF- $\beta$  induzierter Gene nach Induktion mit TGF- $\beta$ 1. BEAS-2B-Zellen wurden vor Versuchsbeginn 12 h in Minimalmedium inkubiert. Nach einstündiger Vorinkubation mit der Testsubstanz, wurde der Induktor zugegeben. Als Referenz wurden unbehandelte Zellen und Zellen die ausschließlich mit dem Induktor behandelt wurden herangezogen. Die Isolation der RNA erfolgte nach 5 h. Als Referenz diente die Expression von *gapdh*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten  $\pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz der relativen Änderung wurde durch einen Einproben t-Test bestimmt mit \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Eine mögliche anti-fibrotische Aktivität der Substanz kann auch phänotypisch erfasst werden, da während der EMT die Migrationsfähigkeit von Zellen erhöht wird. Dies kann beispielsweise in einem 2D-Scratch Assay visualisiert werden (Friedl and Gilmour 2009). Dazu wurden BEAS-2B-Zellen ausgesät und bis zur Ausbildung eines Zellrasens in Vollmedium inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 12 h in Minimalmedium inkubiert. Der Zellrasen wurde dann mechanisch unterbrochen, das Medium entfernt und durch frisches Minimalmedium mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 ersetzt. Nach 16 h wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen mikroskopisch erfasst. Bei hoher Migrationsfähigkeit nach Stimulation sollte die Unterbrechung des Zellrasens erneut zugewachsen sein, was durch TGF- $\beta$ 1 Behandlung zu beobachten war (Abbildung 17). Wurden die Zellen nicht stimuliert, so blieb die Unterbrechung des Zellrasens deutlich sichtbar. Durch Applikation von 800 nM DM-Oxa konnte die Migrationsfähigkeit der Zellen trotz Stimulation sichtbar reduziert werden. Die Unterbrechung des Zellrasens blieb ähnlich gut sichtbar wie in der nicht-stimulierten Kontrolle.

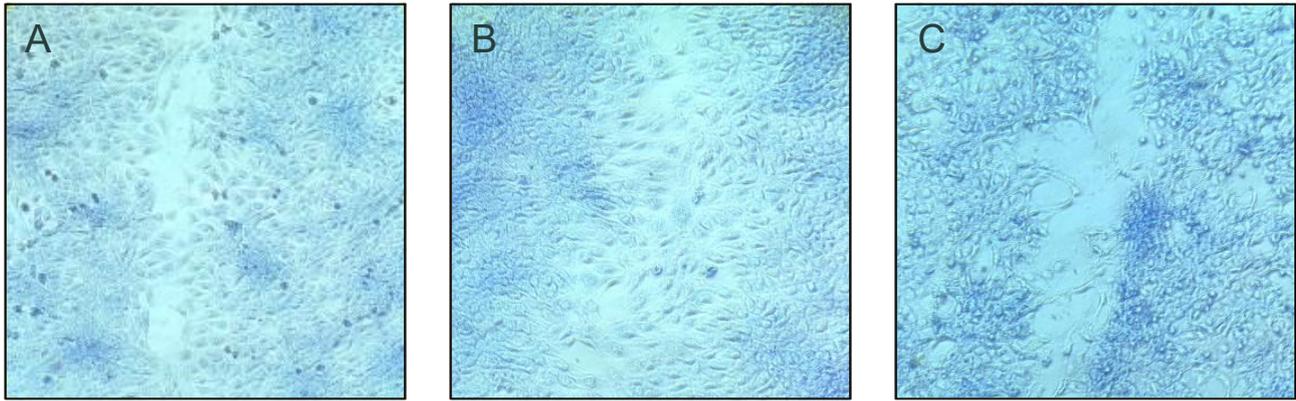


Abbildung 17 2D-Scratch Assay mit DM-Oxa und TGF- $\beta$ 1 auf BEAS-2B-Zellen. Zellen der bronchialen Lungenepithel Zelllinie BEAS-2B wurden in Vollmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte der Wechsel zu Minimalmedium und nach weiteren 12 h die Behandlung mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 (**B**) bzw. 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 und 800 nM DM-Oxa (**C**), sowie die Unterbrechung des Zellrasens durch „Scratches“. Zellen ohne Induktor und Substanz wurden gleichbehandelt (**A**). Nach 16 h wurden die Zellen zur besseren Sichtbarkeit mit Giemsa gefärbt und mikroskopiert. Der Versuch wurde mit drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. **A-C** sind repräsentative Aufnahmen für die jeweiligen Behandlungen.

Die dargestellten Versuche zeigen, dass DM-Oxa auch in der Lungenepithelzelllinie BEAS-2B eine biologische Aktivität aufweist. Somit eignet sich diese Zelllinie für die nachfolgenden Versuche zur Aufklärung von Zielproteinen.

### 4.3. Versuche zur Identifikation möglicher der Zielproteine von DM-Oxa

Wie bereits beschrieben, kann die potente Inhibition von Entzündungs- und Fibrose-relevanten Signalwege durch Oxacyclododecindion zwar in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen werden, konkrete Zielproteine des Makrolactons sind bisher jedoch unbekannt. Im Folgenden werden BEAS-2B-Zellen verwendet, um Kandidaten für molekulare Targets zu identifizieren.

#### 4.3.1. Pulldown an funktionalisierten Agarosebeads

Um die Zielproteine von DM-Oxa zu identifizieren, wurde zunächst ein Agarose Säulenmaterial mit DM-Oxa funktionalisiert. Einige Positionen des verwendeten 14-Deoxy-14-methoxyoxacyclododecindions konnten aufgrund früherer Versuche bereits für die Funktionalisierung ausgeschlossen werden. Die Funktionalisierung erfolgte daher an Position 15. Durch einen Reporter-genversuch in HepG2-Zellen konnte bereits bestätigt werden, dass ein Derivat (Abbildung 26 A), welches an Position 15 eine Alkylgruppe enthält, eine inhibitorische Wirkung auf die TGF- $\beta$  induzierte SMAD2/3 vermittelte Reporter-genaktivität behält: Diese war mit einer  $IC_{50}$  von  $478 \pm 13,4$  nM zwar deutlich schwächer als die Wirkung des nichtkonjugierten Moleküls DM-Oxa ( $IC_{50} = 35 \pm 8,2$  nM), führte jedoch ebenfalls zu einer vollständigen Inhibition der Reporteraktivität (Daten von M. Sc. Thorsten Walter). Die Funktionalisierung für den vorliegenden Versuch erfolgte daher ebenfalls an dieser Position. Die verwendeten Moleküle wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Till Opatz, Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz synthetisiert (Abbildung 19). Durch das erhaltene Säulenmaterial (Abbildung 19 A) sollten Zielproteine gebunden und massenspektrometrisch identifiziert werden.

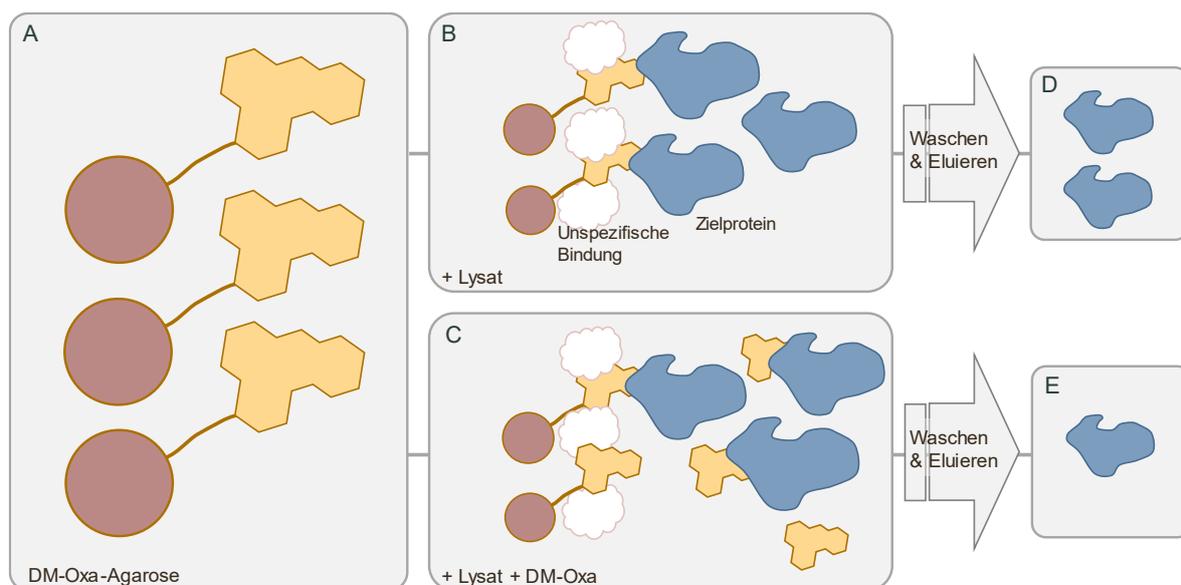


Abbildung 18 Schematischer Ablauf des Pulldowns an DM-Oxa funktionalisiertem Säulenmaterial. Die von AG Opatz (Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) mit DM-Oxa funktionalisierte Agarose (A) wird mit Lysat von Zellen inkubiert, die zuvor mit TGF- $\beta$ 1, einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  oder nicht induziert wurden (B). Zielproteine sollten dann an das gebundene DM-Oxa binden und, nach einigen Waschschritten zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine, eluiert werden (D). Um spezifisch

bindende Proteine zu identifizieren, wurde derselbe Ansatz identisch durchgeführt, aber es wurde zusätzlich ein Überschuss an freiem DM Oxa hinzugegeben (C&E).

BEAS-2B-Zellen wurden dazu für 45 min mit einem Gemisch aus 10 ng/mL IFN- $\gamma$ , 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 5 ng/mL IL-1 $\beta$  bzw. mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 induziert, lysiert und das von Zelltrümmern befreite Lysat zum Säulenmaterial gegeben. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen verwendet. Nichtfunktionalisiertes Material (Abbildung 19 B) wurde verwendet, um unspezifisch bindende Proteine zu identifizieren, diese wurden dann von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Außerdem wurde zu einem Teil der Proben ein Überschuss an freiem DM-Oxa gegeben, um spezifische von unspezifisch gebundenen Proteinen unterscheiden zu können. Nach mehreren Waschschrritten, um ungebundenen Proteine zu entfernen, wurden die potenziellen Zielproteine eluiert und für die Massenspektrometrie vorbereitet (Abbildung 18).

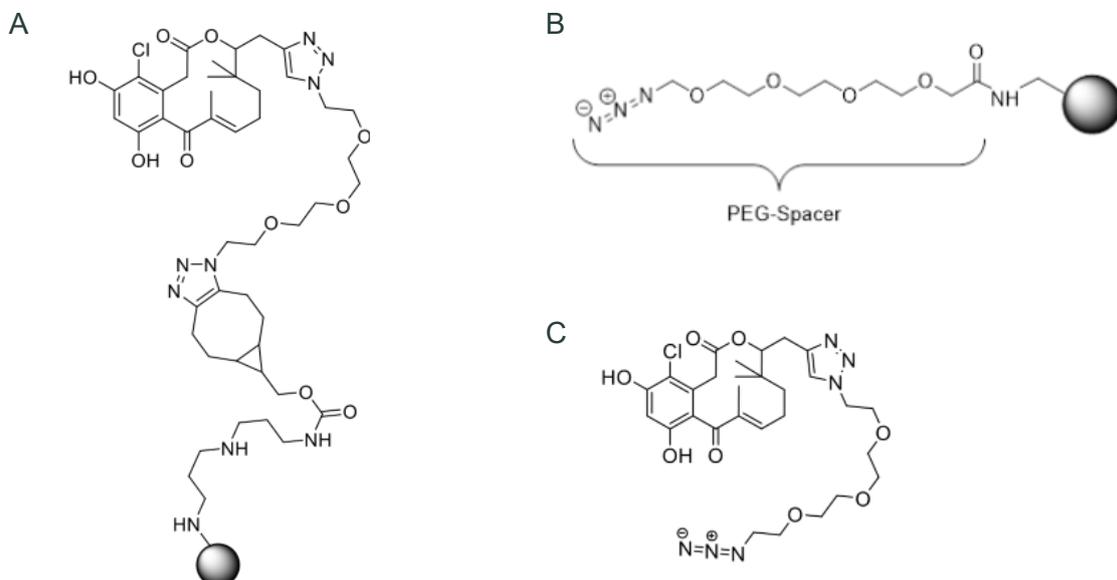


Abbildung 19 Agarosebeads für die Identifikation der Zielproteine von DM-Oxa. Alle Reaktionen zur Funktionalisierung der Agarose wurden durch die Arbeitsgruppe von Till Opatz, Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Zunächst wurde ein universelles Kopplungsmaterial (CarboxyLink™, Thermo Fisher Scientific) (B), mittels eines BCN-NHS-Esters funktionalisiert, woran daraufhin ein DM-Oxa-PEG-N<sub>3</sub> (C) mittels kupferfreier Click-Chemie gebunden wurde. So wurde ein mit DM-Oxa funktionalisiertes Säulenmaterial gewonnen (A).

Die Auswertung der massenspektrometrisch erhobenen Daten erfolgte mittels SAM (Tusher et al. 2001), einer Methode zur nicht-parametrischen Signifikanzanalyse deren Falscherkennungsrate permutationsbasiert bestimmt wird. Obwohl für Microarrays entwickelt, findet diese Methode breite Anwendung in Signifikanzanalysen von sowohl Transkriptom- als auch Proteomstudien (Cui et al. 2022; Fröhlich et al. 2022). Vor dem statistischen Test wurden die Proteinintensitäten *median-of-ratios* normiert um technische Proteinmengenunterschiede zu korrigieren (Love et al. 2014). q-Werte unter 0,05 werden als signifikant angesehen.

Für Lysate ohne Induktion konnten keine Proteine identifiziert werden, die durch die Zugabe eines Überschusses an freiem DM-Oxa bei einer tolerierten FDR von 0,05 signifikant verdrängt wurden (Abbildung 20). Dies zeigt an, dass alle identifizierten Proteine unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden waren.

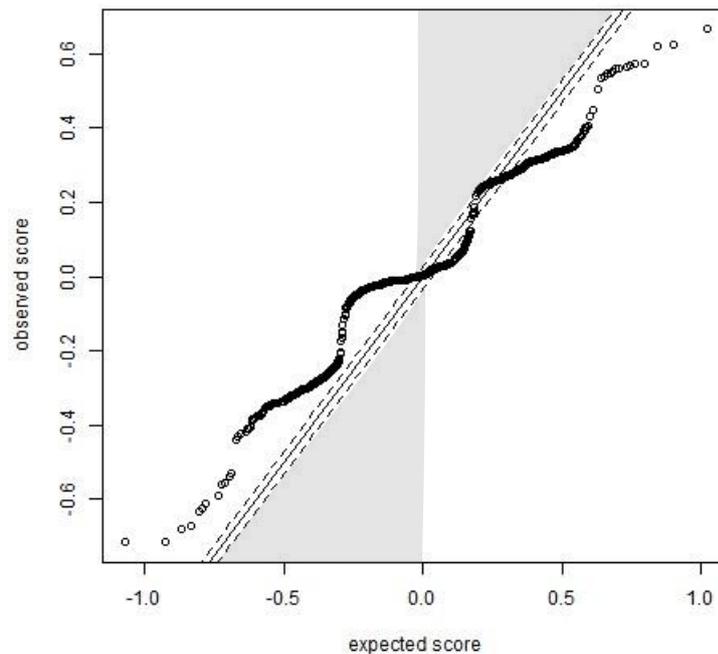


Abbildung 20 SAM-Übersichtsdiagramm der erwartbaren und gemessenen t-Statistiken für Zelllysate ohne Induktion. Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert und lysiert. Ein Pull-down wurde an DM-Oxa-funktionalisiertem Säulenmaterial durchgeführt und alle eluierten Proteine massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu identifizieren, die spezifisch gebunden sind, wurde zusätzlich eine Verdrängung mit einem Überschuss an nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Mittels SAM wurde festgestellt ob Proteine durch die Verdrängung signifikant von den Beads verdrängt wurden. Jeder Datenpunkt stellt ein Protein dar, wobei der beobachtete (*observed*) Score dem, durch Permutationen ermittelten, erwartbaren (*expected*) Score gegenübergestellt wird. Eine große Abweichung beider Werte, d.h. eine große Distanz zur Winkelhalbierenden (schwarze Linie) lässt auf signifikant veränderte Proteinmengen schließen. Gestrichelte Linien implizieren Signifikanzgrenzen zu einer FDR<0,05. Grau hinterlegt sind Bereiche, in denen Proteine lägen, die im Vergleich zur Verdrängung signifikant mehr oder weniger gebunden haben.

Für Lysate aus Zellen die mit einem Gemisch aus 10 ng/mL IFN- $\gamma$ , 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 5 ng/mL IL-1 $\beta$  induziert wurden, konnte ein Protein identifiziert werden, welches durch die Zugabe eines Überschusses an freiem DM-Oxa verdrängt wurde (Abbildung 21). Alle anderen identifizierten Proteine waren unspezifisch gebunden.

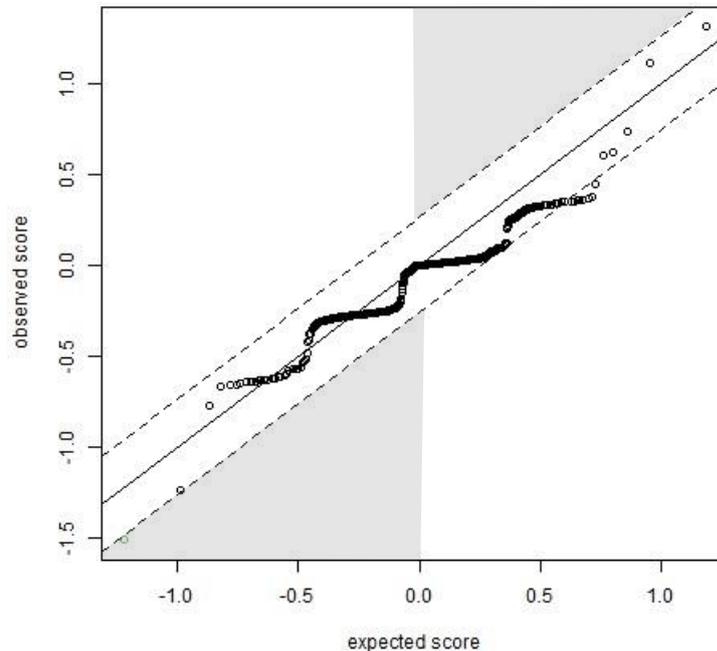


Abbildung 21 SAM-Übersichtsdiagramm der erwartbaren und gemessenen t-Statistiken für Zelllysate nach Induktion mit einer Mischung aus 10 ng/mL IFN- $\gamma$ , 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 5 ng/mL IL-1 $\beta$ . Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert, für 45 min induziert und lysiert. Ein Pulldown wurde an DM-Oxa-funktionalisiertem Säulenmaterial durchgeführt und alle eluierten Proteine massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu finden, die spezifisch gebunden sind wurde zusätzlich eine Verdrängung mit einem Überschuss an nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Mittels SAM wurde festgestellt ob Proteine durch die Verdrängung signifikant von den Beads verdrängt wurden. Jeder Datenpunkt stellt ein Protein dar, wobei der beobachtete (observed) Wert dem, durch Permutationen ermittelten, erwartbaren Wert (expected) gegenübergestellt wird. Eine große Abweichung beider Werte, d.h. eine große Distanz zur Winkelhalbierenden (schwarze Linie) lässt auf signifikant veränderte Proteinmengen schließen. Signifikante wären grün und rot markiert. Gestrichelte Linien implizieren Signifikanzgrenzen zu einer FDR<0,05. Grau hinterlegt sind Bereiche, in denen Proteine liegen die im Vergleich zur Verdrängung signifikant mehr (unten links, grün) oder weniger (oben rechts, rot) gebunden haben.

Das durch Zugabe von DM-Oxa signifikant verdrängte Protein ist Nucleobindin-1 (NUCB1). Dieses 54 kDa große Protein ist im Golgi lokalisiert, wo es zu den abundantesten Proteinen gehört und Ca<sup>2+</sup> bindet (Pacheco-Fernandez et al. 2020; Garcia-Marcos et al. 2011). Es wurde ein Zusammenhang mit dem Transport von Matrix-Metalloproteasen (MMP2, MMP14) gefunden (Pacheco-Fernandez et al. 2020). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass NUCB1 die MMP abhängige Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) unterstützt (Pacheco-Fernandez et al. 2020). Ein Knockdown des Proteins verringerte demnach den Abbau der ECM. Außerdem wurde bereits 1997 von Kanai et al. eine erhöhte Expression des Proteins in Milz Zellen von MRL-*lpr* Mäusen beobachtet (Iizuka et al. 1997). Hier wurde eine Relevanz des Proteins in Lupus Maus-Modellen impliziert, da die erhöhte Expression des Proteins eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen zu Folge hätte, was allerdings weiterer Bestätigung bedarf (Monneaux 2001).

Für Lysate aus Zellen die mit einem Gemisch aus TGF- $\beta$ 1 induziert wurden, konnten fünf Proteine identifiziert werden, welche durch Verdrängung signifikant weniger gebunden wurden (Abbildung 22). Diese sind Erlin-1 (ERLIN1), Calponin-3 (CNN3), *DnaJ homolog subfamily C member 9* (DNAJC9),

*Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK* (Isoform 1, AHNAK), *60S acidic ribosomal protein P1* (RPLP1).

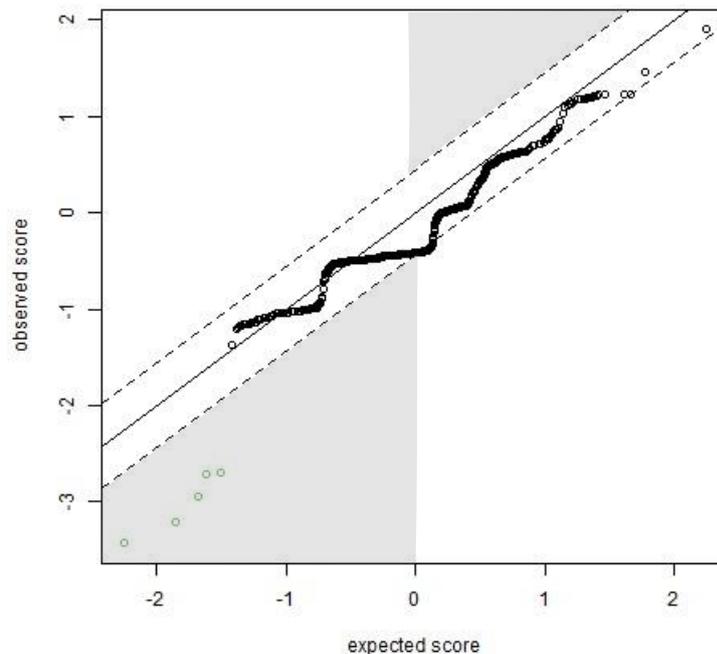


Abbildung 22 SAM-Übersichtsdiagramm der erwartbaren und gemessenen t-Statistiken für Zellysate nach Induktion mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1. Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert, für 45 min induziert und lysiert. Ein Pulldown wurde an DM-Oxa-funktionalisiertem Säulenmaterial durchgeführt und alle eluierten Proteine massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu finden, die spezifisch gebunden sind wurde zusätzlich eine Verdrängung mit einem Überschuss an nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Mittels SAM wurde festgestellt ob Proteine durch die Verdrängung signifikant von den Beads verdrängt wurden. Jeder Datenpunkt stellt ein Protein dar, wobei der beobachtete (observed) Wert dem, durch Permutationen ermittelten, erwartbaren Wert (expected) gegenübergestellt wird. Eine große Abweichung beider Werte, d.h. eine große Distanz zur Winkelhalbierenden (schwarze Linie) lässt auf signifikant veränderte Proteinmengen schließen. Signifikante wären grün und rot markiert. Gestrichelte Linien implizieren Signifikanzgrenzen zu einer FDR<0,05. Grau hinterlegt sind Bereiche, in denen Proteine liegen die im Vergleich zur Verdrängung signifikant mehr (unten links, grün) oder weniger (oben rechts, rot) gebunden haben.

Das 39 kDa Protein Erlin-1 ist Teil der Prohibitin Familie und wurde 2006 als Bestandteil von ER lokalisierten Lipid Rafts beschrieben (Browman et al. 2006). Gerace et al. wiesen 2013 die Cholesterol-bindende Aktivität des Proteins nach. Eine Verringerung von Erlin-1 und -2 führte demnach zur Aktivierung von SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*), welche wiederum wichtig für die Regulation des Cholesterinstoffwechsels sind (Huber et al. 2013). Außerdem ist der Komplex aus Erlin-1 und Erlin-2 wichtig für die Ubiquitinierung und damit den Abbau von aktivierten Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) Rezeptoren (Wright et al. 2018). IP<sub>3</sub> Rezeptoren bewirken bei Aktivierung die rapide Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>, hauptsächlich aus dem ER oder Golgi, in das Cytoplasma (Prole and Taylor 2019). Aktiviert wird der Rezeptor durch IP<sub>3</sub>, ein Produkt der Phospholipase C, welche beispielsweise durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird (Prole and Taylor 2019).

Calponin-3 ist ein 36 kDa großes Protein, welches als Aktin-Bindeprotein beispielsweise die Kontraktion von Zellen der glatten Muskulatur reguliert. Das Protein wurde jedoch auch für verschiedene Krebsarten wie Magenkrebs und Colon-Karzinomen als Treiber der EMT identifiziert (Abdel-Rahman et al. 2018; Hong et al. 2019; Nair et al. 2019).

Das 30 kDa große Protein DNAJC9 ist ein Chaperon, welches sowohl als Histon Chaperon als auch als Hitzeschock Co-Chaperon fungiert (Hammond et al. 2021). Es liegt hauptsächlich im Nucleus vor, wird aber bei Hitzestress im Cytoplasma und an der Plasmamembran vorgefunden (Han et al. 2007). Cao et al. zeigten, dass DNJC9 als HSP70 Co-Chaperon wirkt, indem es die ATPase Aktivität von HSP70 aktiviert (Han et al. 2007).

AHNAK ist mit ca. 630 kDa deutlich größer als alle anderen gefundenen Proteine. Eine erhöhte Expression des Proteins wurde in Mesotheliomen, Tumoren des Mesothels, nachgewiesen (Sudo et al. 2014). Hier wurde zudem eine Verbindung zwischen einer erhöhten Menge des Proteins AHNK und der Invasions- und Migrations-fähigkeit von Krebszellen gefunden (Sudo et al. 2014). Damit übereinstimmend wurde die EMT fördernde Wirkung des Proteins nach TGF- $\beta$  Induktion in Krebszelllinien gezeigt. Diese wird durch die Modulation der SMAD3 Phosphorylierung und damit der Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalwegs bewirkt (Sohn et al. 2018).

Das fünfte gefundene Protein RPLP1 ist mit nur 11,5 kDa das kleinste der in diesem Versuch durch Verdrängung signifikant reduzierten Proteine. Das Protein ist ein wichtiger Faktor in der Elongation und in der Regulation der Proteinbiosynthese (Tchórzewski 2002). Das Protein wird durch RAP Kinasen phosphoryliert, was zur Degradation führt (Nusspaumer et al. 2000). Autoantikörper gegen ribosomale P-Proteine wie RPLP1 gelten als SLE Marker, vornehmlich wurden sie in Patienten identifiziert, die mit einer sekundären Psychose diagnostiziert wurden (Hu et al. 2015; Bonfa et al. 1987).

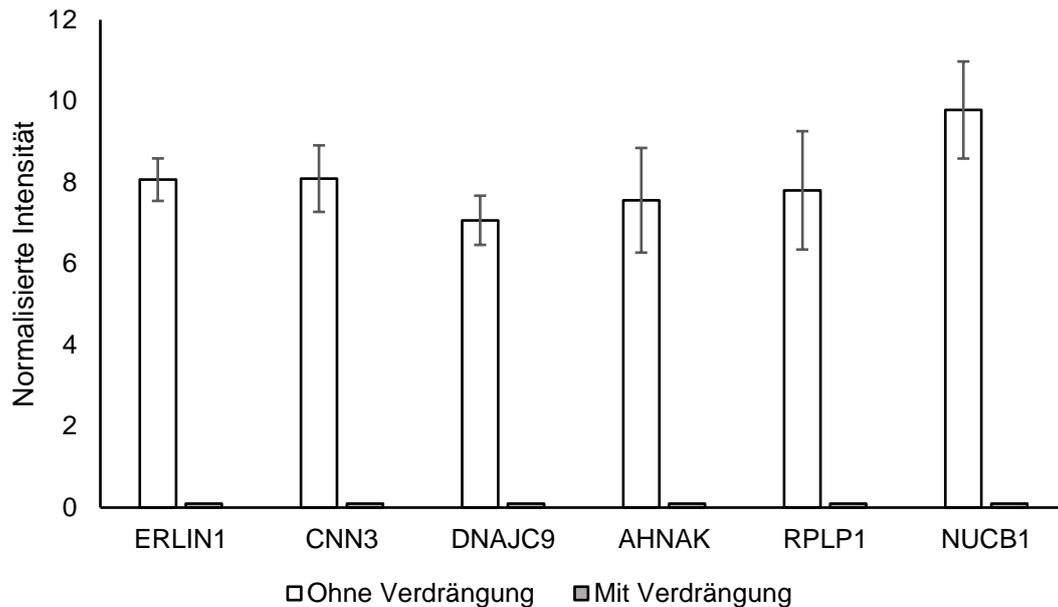


Abbildung 23 Proteine die durch Verdrängung signifikant weniger quantifiziert wurden. Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert, für 45 min induziert und lysiert. Das Lysat wurde mit DM-Oxa funktionalisierter Agarose inkubiert, um die Bindung von Zielproteinen zu ermöglichen. Alle eluierten Proteine wurden dann massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu finden, die spezifisch gebunden sind, wurde zusätzlich eine Verdrängung mit der gleichen Menge an nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Mit einer SAM wurde evaluiert, ob Proteine durch die Verdrängung signifikant weniger an DM-Oxa-Beads gebunden waren. Dargestellt sind die  $\log_e(x+1)$ -transformierten, normalisierten Intensitäten ohne und mit Verdrängung durch freies DM-Oxa.

Im beschriebenen Versuch konnte eine große Menge an Proteinen massenspektrometrisch identifiziert werden. Sechs davon zeigte das erwartete Verhalten, sie wurden nach Zugabe von freiem DM-Oxa signifikant weniger detektiert (Abbildung 23). Es zeigten sich jedoch auf die Masse der identifizierten Proteine bezogen wenige signifikante Veränderungen. Zudem wurde eine schlechte Reproduzierbarkeit der Replikate festgestellt (Abbildung 24), was die Validität der Ergebnisse einschränkt.

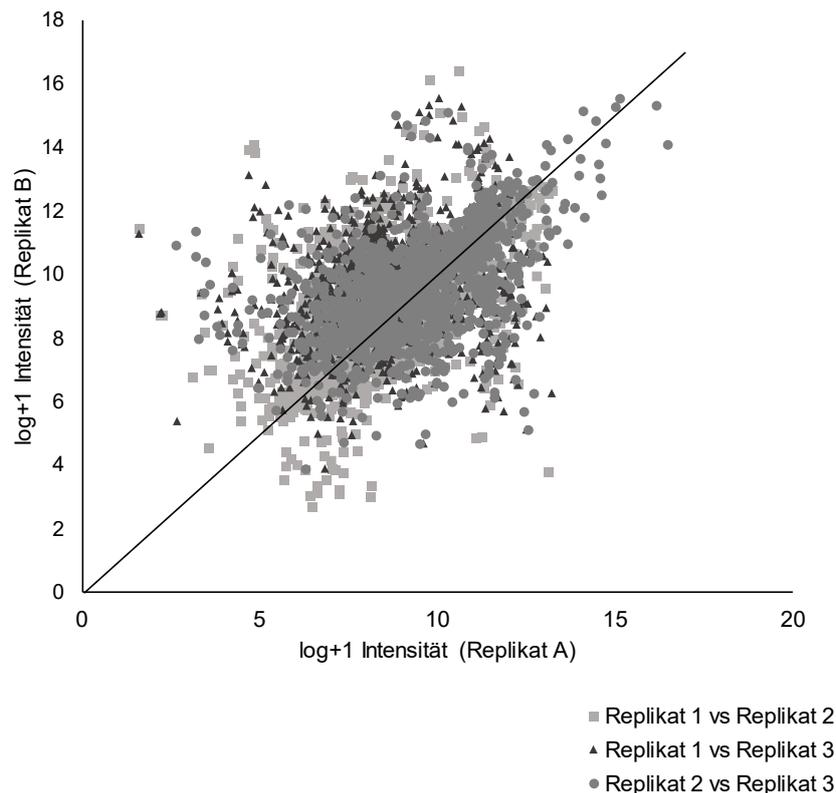


Abbildung 24 Korrelation der drei gemessenen Replikate. Proteinintensitäten wurden  $\log_e(x+1)$ -transformiert und je zwei Replikate gegeneinander aufgetragen. Um die Korrelation der Intensitäten zwischen Replikaten zu ermitteln, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt, wobei ein Wert von 1 eine perfekte Korrelation und ein Wert von 0 eine fehlende Korrelation beschreibt. Eine hohe Reproduzierbarkeit führt zu geringen Abständen zur Winkelhalbierenden. Alle drei Replikate wurden jeweils paarweise miteinander verglichen. Die so berechneten Korrelationskoeffizienten sind: Replikat 1 zu Replikat 2 = 0,62, Replikat 1 zu Replikat 3 = 0,25, Replikat 2 zu Replikat 3 = 0,50

Die schlechte Reproduzierbarkeit der Replikate zeigt die Limitationen des Versuchs. Diese sind beispielsweise bedingt durch Umfang und Stringenz der Waschschrte, welche im Vorhinein nur schwer bestimmt werden kann. Die Stärke der Bindung zwischen DM-Oxa und seinen Zielproteinen ist genau wie deren Identität unbekannt, was die Optimierung dieses Schrittes mit den gegebenen Informationen unmöglich macht. Außerdem kann eine mögliche sterische Hinderung der Bindung an Zielproteine durch den massiven Linker zur Agarose nicht ausgeschlossen werden. Um diese Limitationen zu umgehen, wurden zwei weitere Versuche designt (Abbildung 25). Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

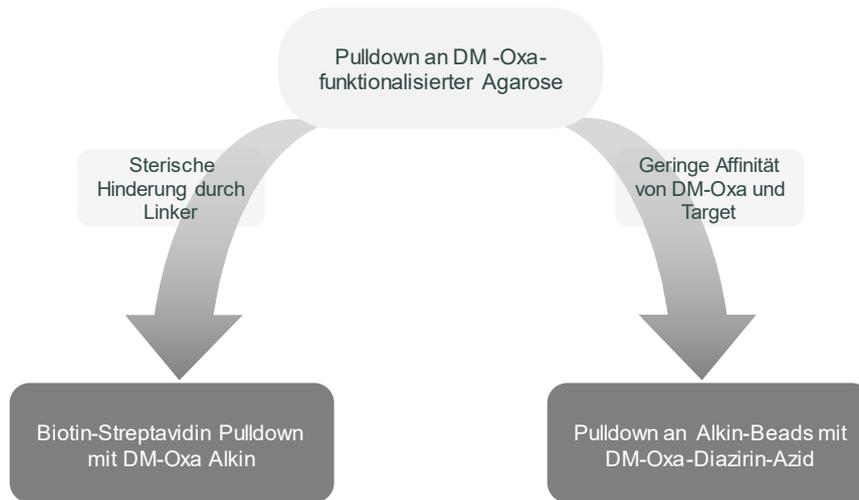


Abbildung 25 Versuche zur Identifikation der Zielproteine von DM-Oxa. Um die Zielproteine von Oxacyclododecindion und dessen Derivaten zu identifizieren, wurden verschiedene Versuchsansätze realisiert, um potenzielle Limitationen, wie die sterische Hinderung der Bindung von DM-Oxa zu Zielproteine durch die Funktionalisierung oder eine mögliche geringe Affinität von DM-Oxa zum Zielprotein, zu umgehen.

## 4.3.2. Biotin-Streptavidin Pulldown mit DM-Oxa-Alkin

Um eine mögliche sterische Hinderung durch den großen Linker zu umgehen (vgl. Abbildung 25), wurde im nächsten Schritt ein von M. Sc. Nina Vierengel (Arbeitsgruppe von Till Opatz, Organische Chemie Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiertes DM-Oxa Alkin verwendet. Dieses konnte nach Bindung an Zielproteine durch Kupfer-katalysierte Click-Chemie mit einem Biotin-Rest gekoppelt werden. So erfolgte die Bindung von DM-Oxa an die Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit weitestgehend ungestört. Auch in diesem Versuch wurde die Kopplung von Zielprotein und DM-Oxa-Alkin zell-frei in Lysat durchgeführt. Von einer Kopplung in intakten Zellen wurde aufgrund harscher Bedingungen während der Zellyse abgesehen. Nach Kopplung des DM-Oxa-Alkin-Zielproteinkomplexes an Biotin-PEG<sub>3</sub>-Azid, konnten die gebundenen Proteine über magnetisches Streptavidin Säulenmaterial angereichert werden.

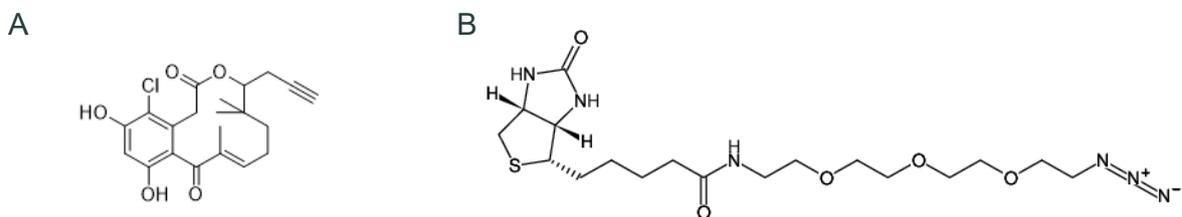


Abbildung 26 DM-Oxa Alkin und Biotin-PEG<sub>3</sub>-Azid. Das gezeigte DM-Oxa Derivat (A) wurde durch eine Alkingruppe für die Click-Chemie funktionalisiert (Synthese durch M. Sc. Nina Vierengel, AG Till Opatz, Organische Chemie Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Dieses konnte dann zu einem geeigneten Zeitpunkt über Kupfer-katalysierte Click-Reaktion an ein Biotin-PEG<sub>3</sub>-Azid (Jena Bioscience, B) gekoppelt werden.

Um Zielproteine zu finden, wurden also zunächst BEAS-2B-Zellen wie zuvor für 45 min mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 induziert. Nicht-induzierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Auch hier wurden zusätzlich induzierte, aber unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet. Aus allen Ansätzen wurden Zelllysate hergestellt, die von Zelltrümmern durch Zentrifugation befreit wurden. Um mögliche Störungen des Pulldowns durch natürlich-biotinylierte Proteine zu verhindern, wurde außerdem eine Vorbehandlung mit Streptavidinbeads durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation des Lysates mit DM-Oxa Alkin und die Kopplung an Biotin (Abbildung 27). Die Zielproteine wurden wie zuvor über Streptavidin angereichert und durch Aufkochen in SDS-Puffer eluiert. Auch hier wurde eine Verdrängung mit unverändertem DM-Oxa durchgeführt. Es erfolgte erneut die Identifikation der potenziellen Zielproteine über Massenspektrometrie.

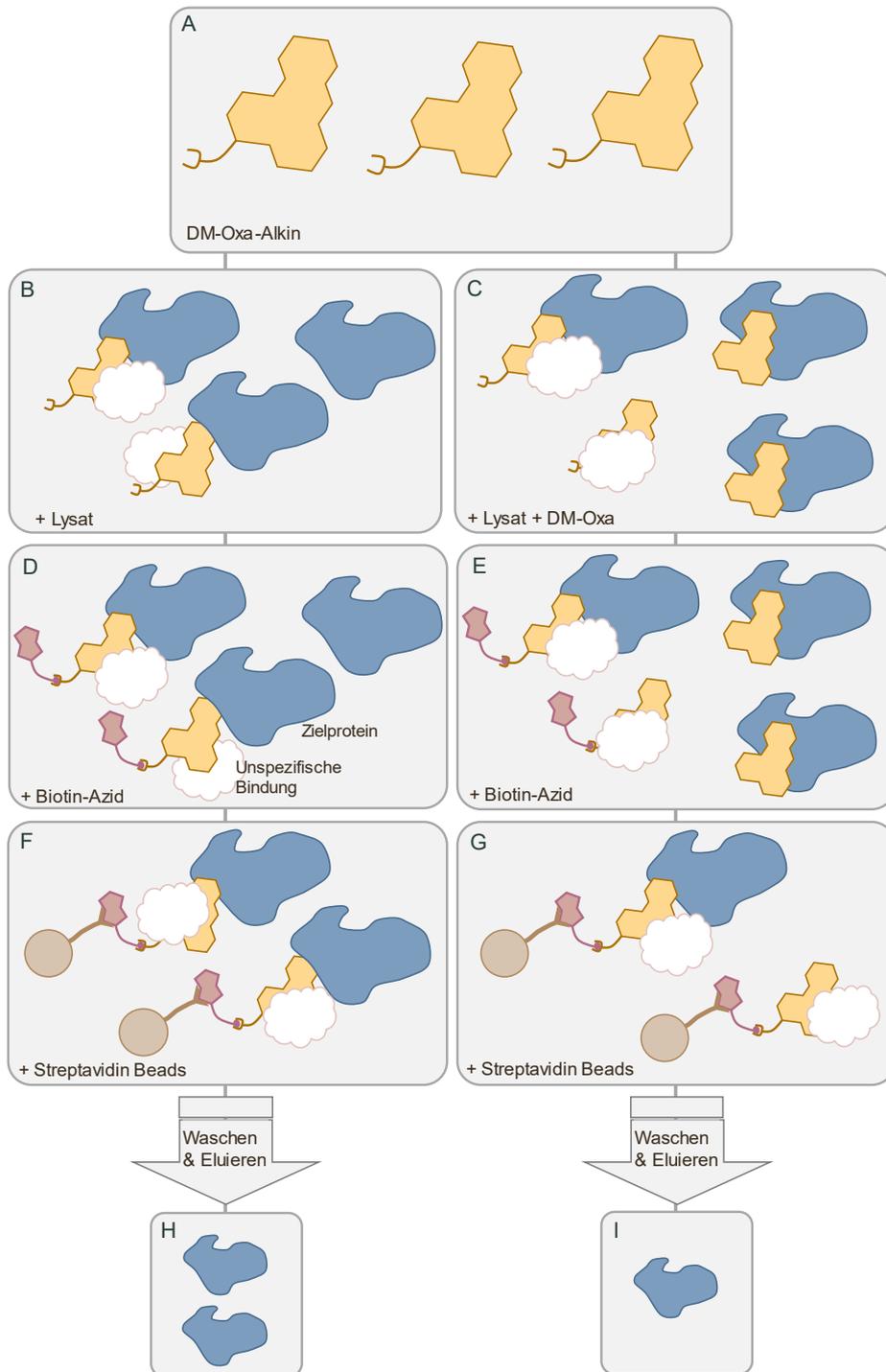


Abbildung 27 Schematischer Ablauf des Biotin-Streptavidin Pulldowns mit DM-Oxa-Alkin (A). BEAS-2B-Zellen werden lysiert und zusammen mit dem DM-Oxa-Alkin inkubiert (B). Daraufhin wird die Kopplung an ein Biotin-Azid mittels Click-Chemie durchgeführt (D). Mittels Streptavidin-Agarose wird der Komplex aus Biotin-funktionalisiertem DM-Oxa und Zielprotein gebunden (F). Nachdem unspezifisch bindende Proteine durch Waschen entfernt wurden, wird das Zielprotein durch Aufkochen in SDS-Puffer eluiert (H). Potenzielle Zielproteine werden massenspektrometrisch analysiert. Um spezifisch bindende Proteine zu identifizieren wird der Versuchsablauf zusätzlich unter Zugabe eines Überschusses an freiem DM-Oxa durchgeführt (C, E, G, I).

Wie zuvor wurden die Daten mittels SAM analysiert. q-Werte unter 0,05 werden als signifikant angesehen. Verglichen wurden Replikate ohne freies DM-Oxa mit Replikaten, denen ein 20-facher Überschuss DM-Oxa zugegeben wurde.

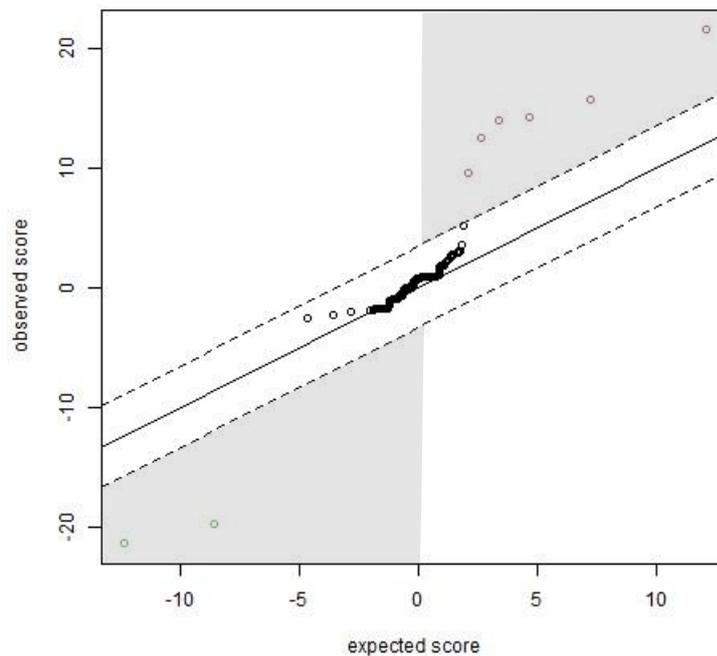


Abbildung 28 SAM-Übersichtsdiagramm der erwartbaren und gemessenen t-Statistiken für Zelllysate ohne Induktionsstimulus. Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert und lysiert. Das Lysat wurde zunächst bei 37 °C mit DM-Oxa-Alkin inkubiert, um die Bindung von Zielproteinen zu ermöglichen. Ein Pull-down wurde an Streptavidin-funktionalisiertem Säulenmaterial durchgeführt, nachdem ein Biotinrest mittels Click-Chemie an das DM-Oxa-Alkin gekoppelt wurde. Alle eluierten Proteine wurden dann massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu finden, die spezifisch gebunden sind wurde zusätzlich eine Verdrängung mit einem Überschuss an nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Eine Permutationsbasierte Signifikanzanalyse zeigt an, ob Proteine durch die Verdrängung signifikant weniger an DM-Oxa-Alkin gebunden, und damit Biotin-funktionalisiert waren. Jeder Datenpunkt stellt ein Protein dar, Signifikante sind grün und rot markiert. Die durchgezogene Linie stellt die Winkelhalbierende dar, gestrichelte Linien implizieren Signifikanzgrenzen. Grau hinterlegt sind Bereiche, in denen Proteine liegen, die im Vergleich zur Verdrängung signifikant mehr (unten links, grün) oder weniger (oben rechts, rot) gebunden haben.

Für das Lysat aus nicht-induzierten Zellen konnten zwei Proteine identifiziert werden, die nach Verdrängung signifikant reduziert waren (Abbildung 28). Diese sind EFTUD2 (*116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component*) und Basigin.

Für das 109 kDa große GTP bindende Protein EFTUD2 konnte gezeigt werden, dass es durch Aktivierung von STAT3 die EMT in HCC Zellen fördert (Tu et al. 2020). EFTUD2 hat zudem immunmodulatorische Wirkung indem es durch alternatives Spleißen die Struktur einiger TLRs beeinflusst (Arras et al. 2014). Durch differenzielles Spleißen wird zudem die Expression anderer Proteine wie RIG-I und MDA5 über EFTUD2 reguliert: Wird EFTUD2 überexprimiert, so werden RIG-I und MDA5 hochreguliert, wodurch Interferon stimulierte Gene induziert werden (Zhu et al. 2015).

Basigin ist ein 42 kDa großes Transmembran-Glykoprotein mit mehreren Isoformen. Das Protein gehört zu den Immunoglobulinen und ist in die EMT involviert: Es konnte eine erhöhte Expression von Basigin durch Applikation von IL-1 $\beta$  auf Mesothel Zellen nachgewiesen werden, außerdem führte

die Applikation von Basigin in derselben Zelllinie zur Induktion der EMT (Masoud et al. 2009). Eine erhöhte Menge des Proteins konnte zudem in epithelialen Krebszellen nachgewiesen werden (Jiang and Tang 2007). Basigin interagiert mit einer Reihe an Liganden wie beispielsweise Integrinen und Cyclophilinen (Jiang and Tang 2007).

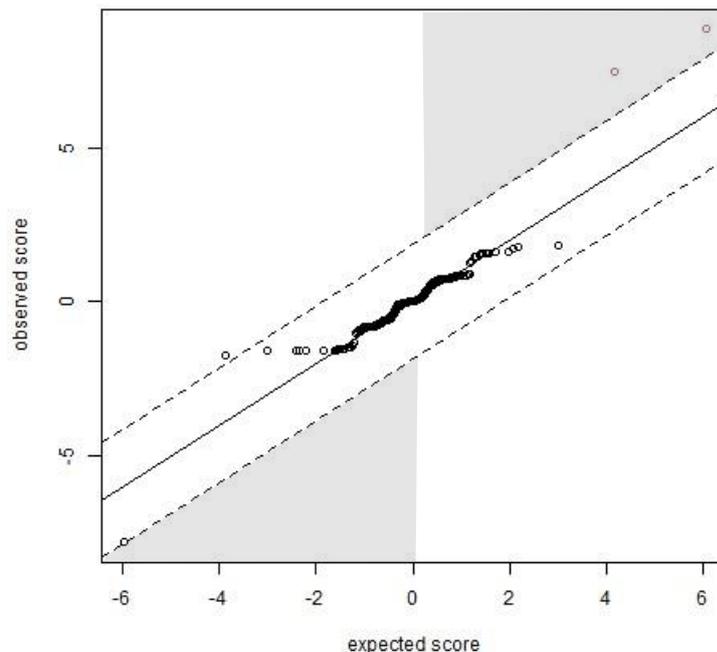


Abbildung 29 SAM-Übersichtsdiagramm der erwartbaren und gemessenen t-Statistiken für Zelllysate nach Induktion mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1. Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert, für 45 min induziert und lysiert. Das Lysat wurde zunächst bei 37 °C mit DM-Oxa-Alkin inkubiert, um die Bindung von Zielproteinen zu ermöglichen. Ein Pulldown wurde an Streptavidin-funktionalisiertem Säulenmaterial durchgeführt, nachdem ein Biotinrest mittels Click-Chemie an das DM-Oxa-Alkin gekoppelt wurde. Alle eluierten Proteine wurden dann massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu finden, die spezifisch gebunden sind wurde zusätzlich eine Verdrängung mit einem Überschuss an nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Eine Permutationsbasierte Signifikanzanalyse zeigt an, ob Proteine durch die Verdrängung signifikant weniger an DM-Oxa-Alkin gebunden, und damit Biotin-funktionalisiert waren. Jeder Datenpunkt stellt ein Protein dar, Signifikante sind grün und rot markiert. Die durchgezogene Linie stellt die Winkelhalbierende dar, gestrichelte Linien implizieren Signifikanzgrenzen. Grau hinterlegt sind Bereiche, in denen Proteine liegen, die im Vergleich zur Verdrängung signifikant mehr (unten links, grün) oder weniger (oben rechts, rot) gebunden haben.

Für Zelllysate, die aus mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 induzierten BEAS-2B-Zellen gewonnen wurden, konnten in diesem Versuch keine Proteine identifiziert werden, die durch Verdrängung signifikant weniger abundant waren. Jedoch wurde ein Protein identifiziert, das nach Verdrängung deutlich weniger vorhanden war, wenn auch zur gegebenen Falscherkennungsrate von 0,05 nicht signifikant (Abbildung 29, links unten). Es handelt sich hierbei um das 60S ribosomal protein L7a (RPL7A). Dieses 116 kDa große Protein ist involviert in die Translationsregulation. Gegen RPL7A wurden auto-Antikörper in SLE Patienten nachgewiesen (Ling et al. 2020). Durch SWATH-basierte Proteom Analysen konnte eine Hochregulation von RPL7A in Gehirnen von Alzheimer Patienten festgestellt werden (Suzuki et al. 2022).

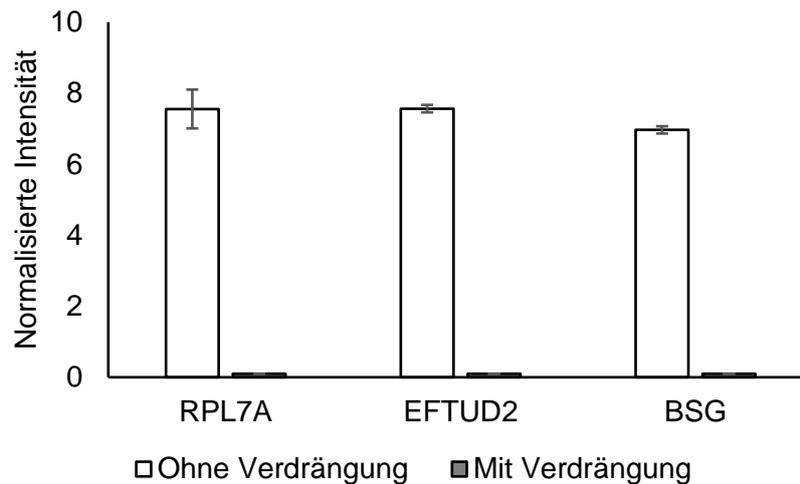


Abbildung 30 Proteine die durch Verdrängung signifikant weniger quantifiziert wurden. Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert, für 45 min induziert und lysiert. Das Lysat wurde mit DM-Oxa-Biotin inkubiert, um die Bindung von Zielproteinen zu ermöglichen. Nach Pulldown an Streptavidinbeads wurden alle eluierten Proteine massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu finden, die spezifisch gebunden sind, wurde zusätzlich eine Verdrängung durch Zugabe von nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Mit einer SAM wurde evaluiert, ob Proteine durch die Verdrängung signifikant weniger gebunden waren. Dargestellt sind die  $\log_e(x+1)$ -transformierten, normalisierten Intensitäten ohne und mit Verdrängung durch freies DM-Oxa.

Es konnten einige Proteine identifiziert werden, die durch die Verdrängung signifikant weniger gebunden waren (Abbildung 30). Um die Reproduzierbarkeit unter den Replikaten zu vergleichen und damit eine Aussage über die Qualität des Experiments zu tätigen, wurden erneut die Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet (Abbildung 31). Es zeigt sich, dass die Replikate in diesem Versuch höhere Korrelationskoeffizienten aufweisen, was auf eine bessere Reproduzierbarkeit hinweist.

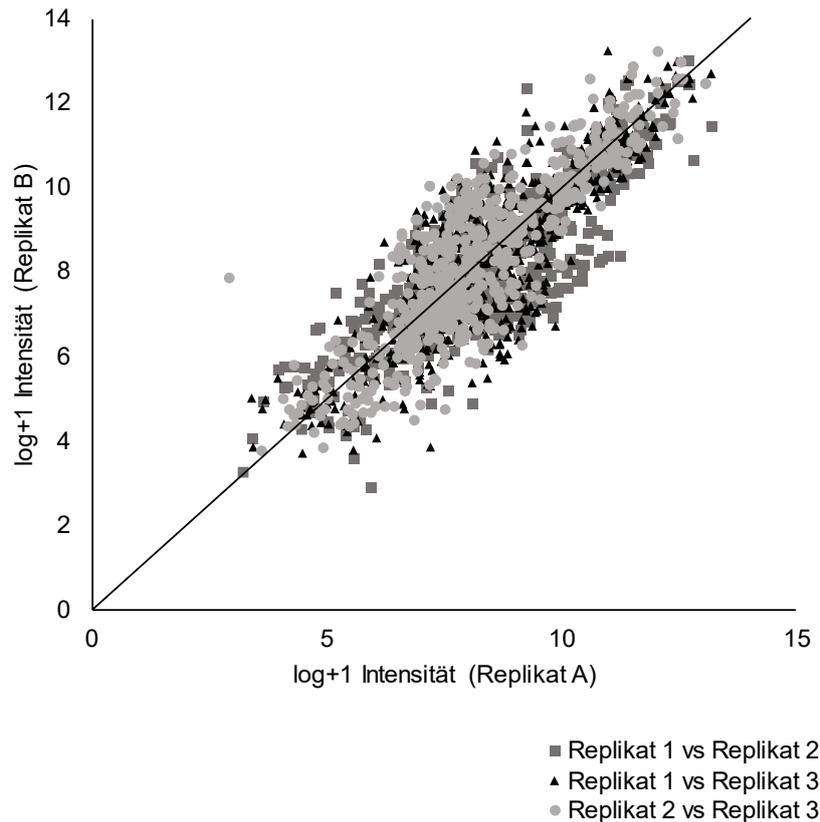


Abbildung 31 Korrelation der drei gemessenen Replikate. Proteinintensitäten wurden  $\log_e(x+1)$ -transformiert und je zwei Replikate gegeneinander aufgetragen. Um die Korrelation der Intensitäten zwischen Replikaten zu ermitteln, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt, wobei ein Wert von 1 eine perfekte Korrelation und ein Wert von 0 eine fehlende Korrelation beschreibt. Eine hohe Reproduzierbarkeit führt zu geringen Abständen zur Winkelhalbierenden. Alle drei Replikate wurden jeweils paarweise miteinander verglichen. Die so berechneten Korrelationskoeffizienten sind: Replik 1 zu Replik 2 = 0,84, Replik 1 zu Replik 3 = 0,85, Replik 2 zu Replik 3 = 0,87

#### 4.3.3. Kovalente Kopplung eines DM-Oxa-Diazirins an potenzielle Zielproteine

Zur Identifikation potentieller Zielproteine von Oxacyclododecindion und dessen Derivaten, wurde DM-Oxa an einen photoaktivierbaren Linker (PAL), hier Diazirin, gekoppelt. Das Diazirin wird durch zwei PEG<sub>3</sub> Linker auf einer Seite mit DM-Oxa und auf der anderen Seite mit einer Azid Gruppe verbunden (Abbildung 32). Über das Azid können beliebige Alkine durch Kupfer-katalysierte Click-Reaktion gekoppelt werden. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass selbst bei geringer Affinität zwischen

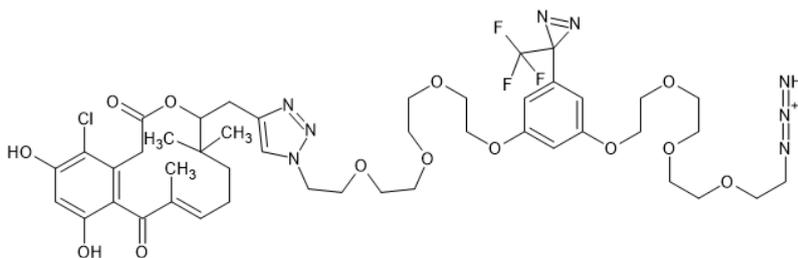


Abbildung 32 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion-Diazirin-Azid, synthetisiert durch M. Sc. Nina Vierengel, AG Till Opatz, Organische Chemie Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Zielprotein und DM-Oxa Zielproteine identifiziert werden können.

Nachdem im vorherigen Versuch das mögliche Problem einer sterischen Hinderung durch das Anhängen von großen funktionalen Gruppen an DM-Oxa umgangen wurde, so wird hier nun die zweite mögliche

Herausforderung der geringen Affinität zwischen DM-Oxa und Zielproteinen umgangen, da eine kovalente Kopplung interagierender Einheiten erreicht werden kann. Außerdem kann dieser Versuch durch die kovalente Kopplung auch mögliche sterische Hinderungen umgehen, da die Kopplung an die Säule auch unter denaturierenden Bedingungen stattfinden kann. Dies wäre besonders hilfreich, falls der dazu benötigte Teil der DM-Oxa-Sonde durch das Zielprotein oder einen Proteinkomplex verdeckt wäre.

Die Bindung von DM-Oxa-PAL an die Zielproteine wurde durch eine 30-minütige Inkubation im Lysat aus TGF- $\beta$  induzierten BEAS-2B-Zellen gewährleistet. Daraufhin wurde der Linker durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von ca. 360 nm aktiviert. Um die Proteine zu identifizieren, die spezifisch an DM-Oxa gebunden werden, wurde dieser Vorgang parallel mit einer zweiten Probe durchgeführt, in die ein 20-facher Überschuss an freiem DM-Oxa zugegeben wurde. Dies sollte eine Konkurrenz von freiem DM-Oxa und dem markierbaren DM-Oxa-Diazirin um die Zielproteine bewirken. Durch die Verdrängung des markierbaren DM-Oxa-Diazirins sollten spezifische Bindungen von DM-Oxa zu Protein erkennbar werden.

#### *4.3.3.8. Kopplung an eine fluoreszierende Sonde*

Zunächst wurde die Funktionalität der Kopplung des DM-Oxa-Diazirin-PAL an das Zielprotein überprüft. Dazu wurde der Komplex aus Protein und DM-Oxa-Diazirin-PAL über eine fluoreszierende Sonde visualisiert.

Nach der Photoaktivierung des DM-Oxa-Diazirin-PAL in 110  $\mu$ g Proteinextrakt aus BEAS-2B-Zellen, welche wie zuvor mit TGF- $\beta$ 1 induziert wurden, wurde ein Alexa Fluor 647 (AF647)-Alkin durch Kupfer-katalysierte Click-Chemie an den DM-Oxa-Diazirin-Protein Komplex gekoppelt (Abbildung 33).

Zur Detektion des markierten Komplexes wurde das erhaltene Proteingemisch gefällt und in Probenpuffer aufgenommen. Die Hälfte der eingesetzten Proteinmenge, ca. 55  $\mu$ g Protein, wurde dann in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und die Fluoreszenz detektiert (525/20 nm Exzitation und 606/36 nm Emission, Abbildung 34 A).

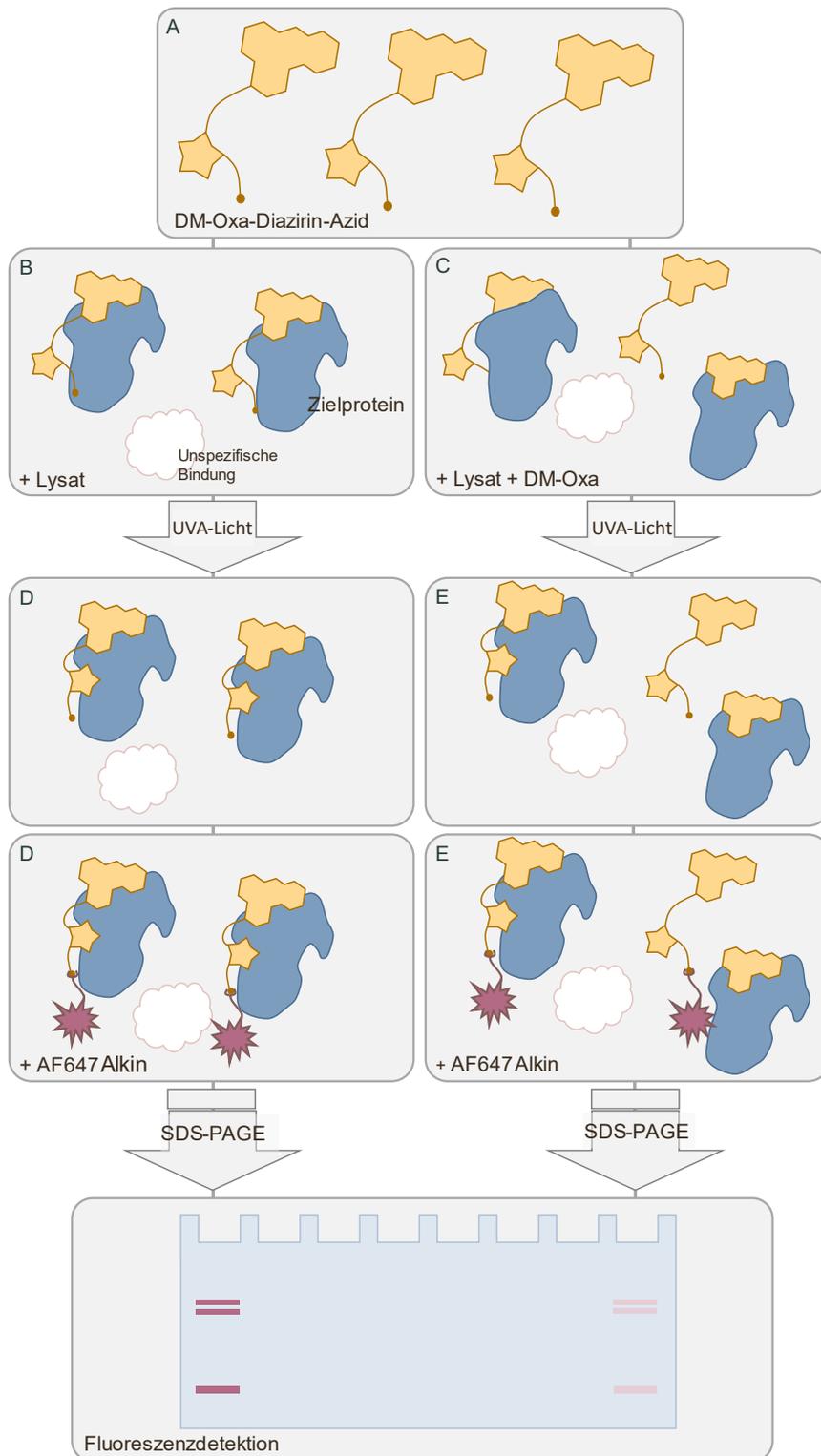


Abbildung 33 Schematischer Ablauf der Kopplung der DM-Oxa-Diazirins an Proteine mit nachfolgender Fluoreszenzmarkierung. Ausgangspunkt für diesen Versuch ist das von Nina Vierengel synthetisierte DM-Oxa-Diazirin-Azid (**A**). Dieses wurde zunächst mit Lysat aus BEAS-2B-Zellen inkubiert (**B**). Zu einem Teil der Proben wurde zusätzlich freies DM-Oxa hinzugefügt, um durch die kompetitive Wirkung eine Verdrängung des Zielproteins vom DM-Oxa-Diazirin-Azid zu erreichen (**C**). Durch UVA-Licht in einem Wellenlängenbereich um  $\sim 360$  nm wurde das Diazirin aktiviert und konnte kovalent an nahegelegene Proteine binden (**D**). Das gebundene Protein sollte im Falle der erfolgreichen Interaktion das Zielprotein sein, wobei dieses durch Verdrängung weniger oft gebunden werden sollte (**E**). Nach der Kopplung erfolgte die Markierung der gebundenen Proteine an die fluoreszierende Sonde (AF647-Alkin) durch Click Chemie (**F&G**). Nach Fällung der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Fluoreszenz detektiert. Das Zielprotein sollte in der Probe mit freiem Oxa in geringerem Maße Fluoreszenz-markiert sein als in der Probe ohne freies DM-Oxa.

Durch Detektion der Fluoreszenz konnten Banden identifiziert werden, die ohne Zugabe von freiem DM-Oxa deutlich stärker fluoreszieren. Dies konnte in mehreren Folgeexperimenten verifiziert werden. Zur Überprüfung der Gesamtproteinmenge wurde das Gel außerdem mit kolloidalem Coomassie angefärbt (Abbildung 34 B). So konnte gezeigt werden, dass keine Unterschiede in der geladenen Proteinmenge bestehen. Bereiche, in denen Fluoreszenzunterschiede festgestellt wurden, wurden ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine massenspektrometrisch analysiert.

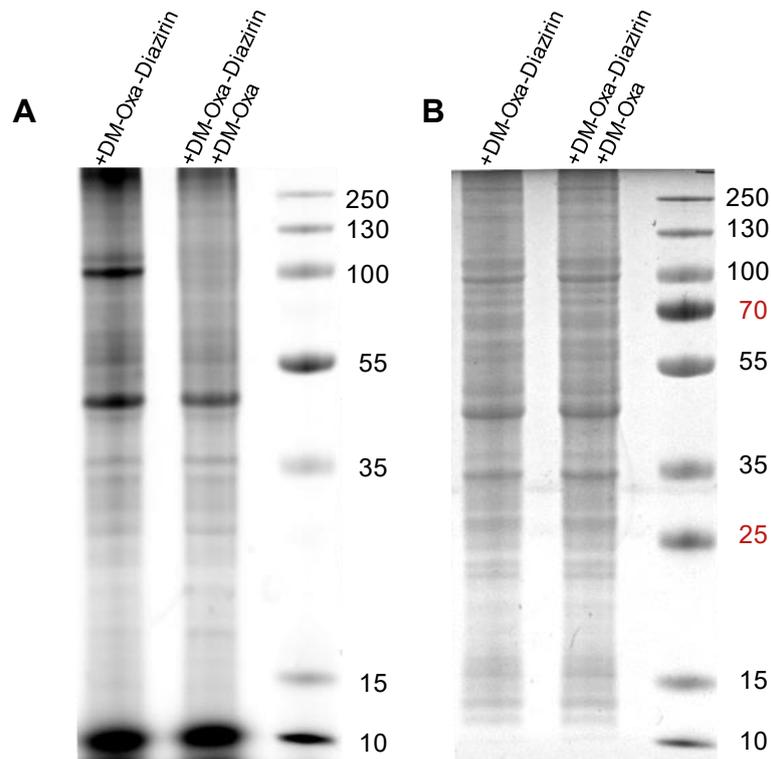


Abbildung 34 Fluoreszenz-Aufnahme (A) und kolloidale Coomassie Färbung (B) der DM-Oxa-Diazirin-Protein Komplexe nach Auftrennung der Proben in einem 10% SDS-Gel. BEAS-2B-Zellen wurden zunächst für 24 h mit 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 induziert, und in TBS durch Ultraschall lysiert. 110  $\mu$ g des Proteins wurde dann mit 1,2  $\mu$ M DM-Oxa-Diazirin versetzt. Zu einer Probe wurde zusätzlich ein 20-facher Überschuss an freiem DM-Oxa zugegeben, um eine Verdrängung des DM-Oxa-Diazirins zu erreichen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Kopplung von DM-Oxa-Diazirin und potenziellen Zielproteinen mittels des photoaktivierbaren Linkers durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 360 nm erreicht. Nach Markierung der DM-Oxa-Diazirin-Protein Komplexe mit Alexa Fluor 647 über eine Kupfer-katalysierte Click-Reaktion, wurden die Proteine gefällt und ca. 55  $\mu$ g Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (Marker: PageRuler Plus, Prestained, Thermo Fisher Scientific, rot markierte Fragmente werden in Fluoreszenzaufnahme nicht detektiert). Auffällig ist dabei ein Signal auf einer Höhe von ca. 100 kDa, welches in Zellextrakt beobachtet werden konnte, welches mit DM-Oxa-Diazirin behandelt wurde und verschwindet, wenn zusätzlich DM-Oxa dazugegeben wurde.

Da in diesem Ansatz keine Anreicherung durchgeführt, sondern das gesamte lösliche Proteom der BEAS-2B-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetragen wurden, erforderte die bioinformatische Analyse dieses Versuchs eine andere Herangehensweise als zuvor. Dies ist auch nötig, weil kein Unterschied in der Proteinmenge in der Verdrängung zu erwarten ist: Es ist anzunehmen, dass durch Zugabe von freiem DM-Oxa lediglich eine geringe Änderung der Markierung, nicht jedoch eine Änderung der Proteinmenge stattgefunden hat. Die Laufhöhe der markierten Proteine sollte ebenfalls nicht oder nur

geringfügig verändert sein, da die angehängten funktionalen Gruppen zusammen mit DM-Oxa die Masse um nur ca. 1 kDa erhöht. Diese Veränderung ist durch SDS-PAGE und Ausschneiden der Banden nicht zuverlässig aufzulösen. Außerdem ist zu beachten, dass gering abundante Proteine im Massenspektrometer womöglich von hochabundanten Proteinen überlagert und somit nicht identifiziert werden konnten.

Um die markierten Proteine dennoch indirekt identifizieren zu können, wurde zunächst mit Hilfe der Software CFM-ID (Wang et al. 2021; Allen et al. 2014) eine *in silico* Fragmentierung des konjugierten DM-Oxa-Diazirin-AF647 durchgeführt. Es wurde dann im gesamten MS-Lauf nach Massen gesucht, die den Fragmenten entsprechen (Abbildung 35). Danach wurden Peptide gesucht, die in einem Zeitfenster von 3 s mit den Fragmenten im MS<sup>2</sup> identifiziert wurden. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, dass durch die kovalente Bindung des DM-Oxa-Diazirin-AF647 Komplexes an das Protein, dieser vom markierten Peptid erst bei Fragmentierung abgelöst wird. Daher sollten DM-Oxa-PAL-AF647-Fragmente und das verbundene Peptid zur gleichen Zeit identifiziert werden.

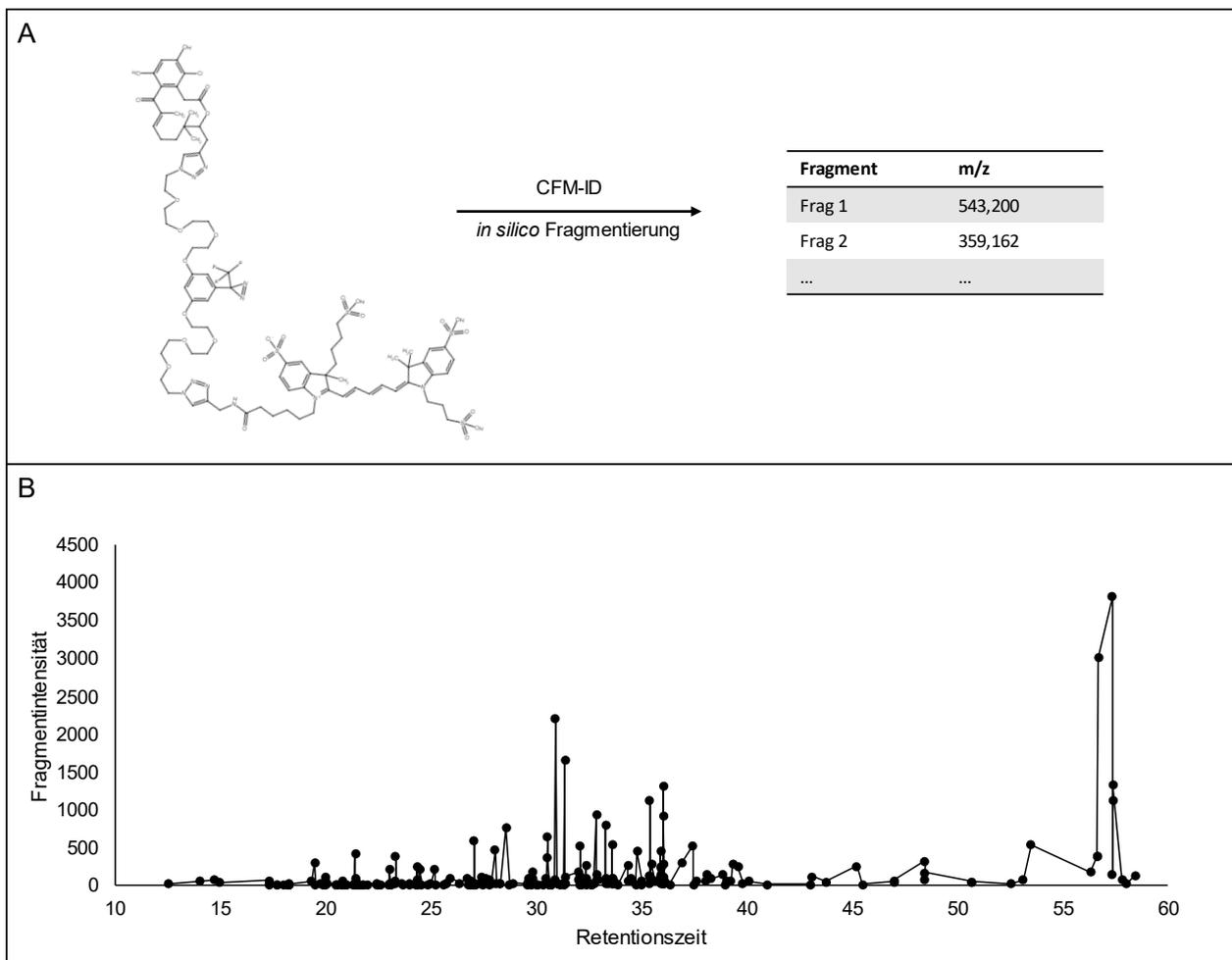


Abbildung 35 Identifikation von DM-Oxa-Diazirin-AF647 Fragmentmassen. Das DM-Oxa-Diazirin-AF647 Konstrukt wurde *in silico* fragmentiert (A) und die so erhaltenen Fragmentmassen in den gemessenen MS<sup>2</sup> Daten gesucht (B). Eine besonders hohe Fragmentintensität konnte bei einer Retentionszeit von 57 min festgestellt werden. Zu dieser Zeit konnte ein HSP90A Peptid identifiziert

werden. Auch bei einer Retentionszeit von 33,5 min konnte HSP90A identifiziert werden. Um berücksichtigt zu werden mussten Peptide in einem Zeitfenster von 3 s mit den Fragmenten co-eluiieren.

Über die beschriebene Vorgehensweise konnte ein Peptid identifiziert werden, welches hochabundant zusammen mit den *in silico* berechneten Fragmentmassen eluiert wurde. Bei dem zugehörigen Protein handelt es sich um HSP90A. Die verschiedenen Isoformen dieses Proteins zeigen eine Masse von ungefähr 90 kDa und könnten daher der in der SDS-PAGE beobachteten Bande entsprechen. Neben der induzierbaren Form von HSP90 HSP90A (HSP90AA1), gibt es eine konstitutive Form dieses Proteins, HSP90B (HSP90AB1), mit sehr hoher Homologie (Hoter et al. 2018). Beide Isoformen liegen in der Zelle als Dimer vor. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit wird häufig nicht zwischen diesen beiden Formen unterschieden. Es gibt weitere Isoformen von HSP90 beispielsweise im ER und in den Mitochondrien. HSP90A ist ein Chaperon, welches weitreichende Funktionen in der Zelle hat. Es interagiert mit zahlreichen anderen Proteinen, darunter weitere Chaperone (Woodford et al. 2017). HSP90A ist außerdem direkt oder indirekt an der Regulation von Proteinen beteiligt, die eine essenzielle Rolle in inflammatorischen und EMT-Signalwegen spielen, wie beispielsweise STAT3, JAK2, AKT, Raf-1 und NF- $\kappa$ B (Shang et al. 2014; Sevin et al. 2015). So ist HSP90 in die Transkriptionsregulation einer Vielzahl an Genen involviert (Khurana and Bhattacharyya 2015). Durch diese Eigenschaften ist HSP90 ein bekanntes therapeutisches Zielprotein beispielsweise in der Krebsforschung (Miyata et al. 2013; Birbo et al. 2021; Holzbeierlein et al. 2010).

4.3.3.9. *Pulldown an Alkinbeads über DM-Oxa-Diazirin-Azid*

Nachdem die Funktionalität des DM-Oxa-Diazirin-PAL nachgewiesen werden konnte, sollte nun eine Aufreinigung aller markierten Proteine durch Alkin-funktionalisiertes Säulenmaterial erfolgen (Abbildung 36).

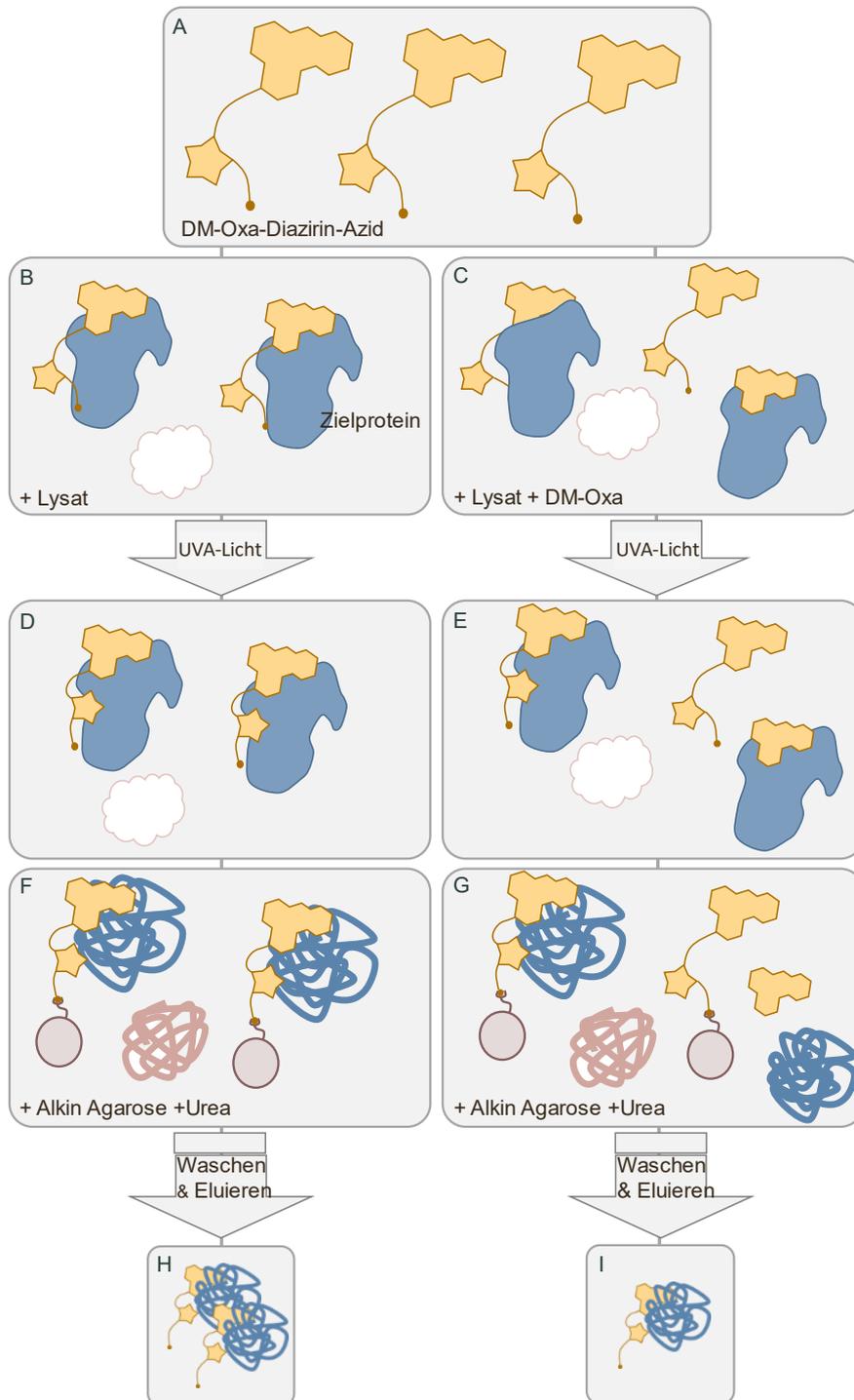


Abbildung 36 Schematischer Ablauf des Pulldowns an Alkin Dde Agarose mit DM-Oxa-Diazirin-Azid. Ausgangspunkt für diesen Versuch ist das von Nina Vierengel synthetisierte DM-Oxa-Diazirin-Azid (A). Dieses wurde zunächst mit Lysat aus BEAS-2B-Zellen inkubiert (B). Zu einem Teil der Proben wurde zusätzlich freies DM-Oxa hinzugefügt, um durch die kompetitive Wirkung eine Verdrängung des Zielproteins vom DM-Oxa-Diazirin-Azid zu erreichen (C). Durch UVA-Licht in einem Wellenlängenbereich um ~ 360 nm wurde das

Diazirin aktiviert und konnte kovalent an nahegelegene Proteine binden (D). Das gebundene Protein sollte im Falle der erfolgreichen Interaktion das Zielprotein sein, wobei dieses durch Verdrängung weniger oft gebunden werden sollte (E). Nach der Kopplung erfolgt der Pulldown an Dde-Alkin Agarose unter denaturierenden Bedingungen durch Click-Chemie (F&G). Nach mehreren Waschschritten kann der Komplex aus Zielprotein und DM-Oxa-Diazirin durch Spaltung an der Dde Schnittstelle mit Hydrazin eluiert werden (H&I). Um unspezifisch bindende Protein zu identifizieren, wurde der Versuch identisch durchgeführt, allerdings ohne die Zugabe des DM-Oxa-Diazirin-Azids. Die angereicherten Proteine können dann massenspektrometrisch analysiert werden.

Dazu wurde der Versuch wie zuvor mittels fluoreszierender Sonde durchgeführt, allerdings wurden hier 2 mg Proteinextrakt eingesetzt und alle weiteren Komponenten dementsprechend skaliert.

In einem Vortest konnte beobachtet werden, dass die Kopplung an Alkin-funktionalisierte Agarose nur unter denaturierenden Bedingungen funktioniert. Dazu wurde der Versuch in kleinerem Maßstab durchgeführt und zu einem Teil der Proben nach Aktivierung des Diazirins 6 M Urea hinzugefügt. Für Proben mit Urea konnten in der SDS-PAGE Banden beobachtet werden, für Proben ohne Urea waren keine Banden sichtbar. Für den hier gezeigten Versuch wurde daher die Zugabe von Urea übernommen.

Die Kopplung erfolgte durch Kupfer-katalysierte Click-Chemie an Alkin-funktionalisierte Agarose. Diese enthielt zusätzlich eine Dde-Schnittstelle, sodass die gebundenen Proteine durch Zugabe von Hydrazin abgelöst werden konnten. Nach Entfernung aller ungebundenen Proteine und Elution der potenziellen Zielproteine wurden diese durch TCA-Zugabe gefällt und in ein SDS-Gel einlaufen gelassen. So konnte eine in-Gel Aufbereitung für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse durchgeführt werden. Die weitere Analyse der Daten erfolgte durch eine Signifikanzanalyse basierend auf zweiseitigen Welch-Tests, wobei potenzielle Zielproteine wie zuvor durch den Vergleich von Proben ohne und mit hohem Überschuss an freiem DM-Oxa identifiziert wurden. Nach Korrektur der p-Werte auf multiples Testen, wurde das Signifikanzniveau auf eine FDR von 0,05 festgelegt. Zehn Proteine, die durch DM-Oxa Zugabe signifikant verdrängt wurden, konnten so identifiziert werden (Abbildung 37).

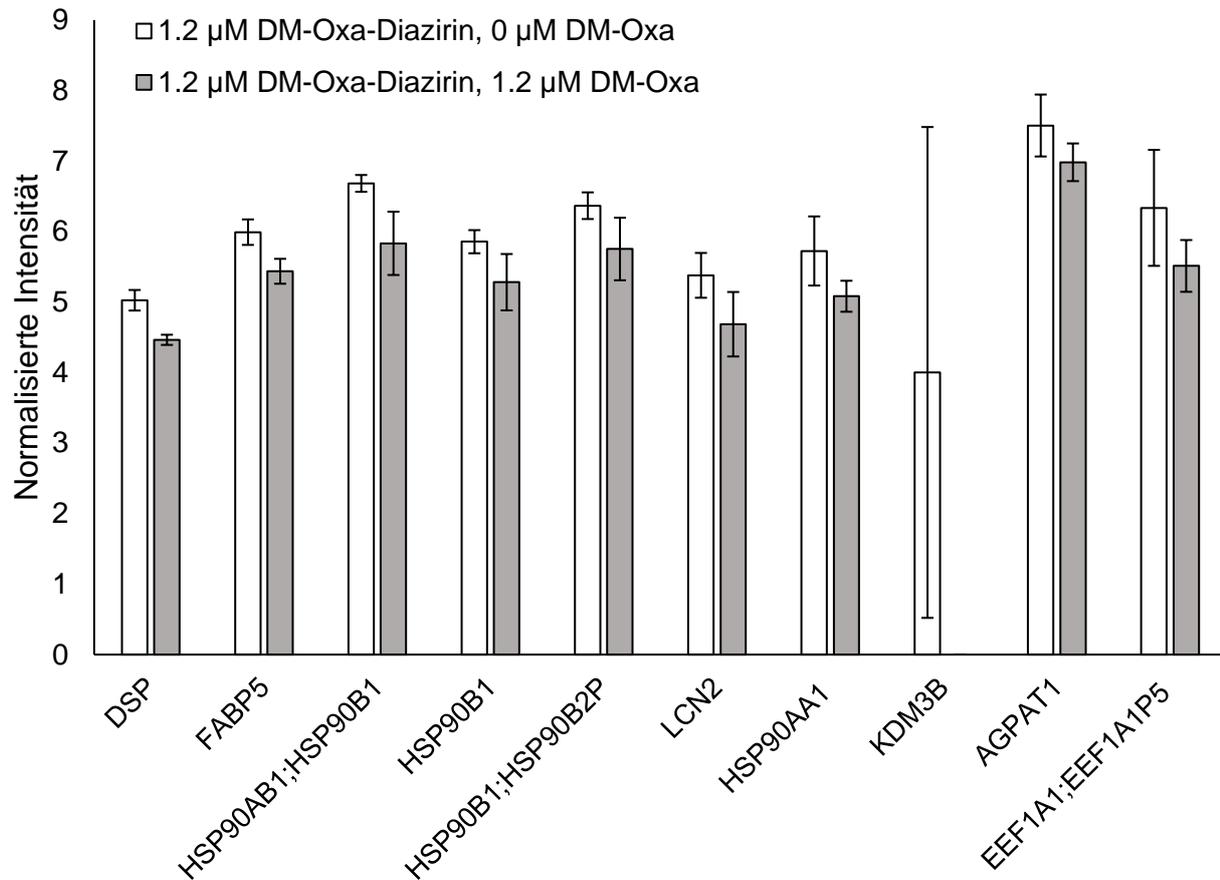


Abbildung 37 Proteine die durch Verdrängung signifikant weniger quantifiziert wurden. Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert, wie zuvor mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 induziert und lysiert. Das Lysat wurde zunächst bei 37 °C mit DM-Oxa-Diazirin inkubiert, um die Bindung von Zielproteinen zu ermöglichen. Ein Pulldown wurde mittels Click-Chemie an Dde-Alkin funktionalisiertem Säulenmaterial durchgeführt. Alle eluierten Proteine wurden dann massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu finden, die spezifisch gebunden sind, wurde zusätzlich eine Verdrängung mit der gleichen Menge an nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Multiple Welch-Tests (alpha-level = 0,05), mit anschließender Korrektur der multiplen Tests, zeigen an, ob Proteine durch die Verdrängung signifikant weniger an DM-Oxa-Diazirin gebunden waren. Peptide, die nicht eindeutig einem Protein zugeordnet werden können (nicht-proteotypische Peptide) führen zu mehrdeutigen Proteingruppen. Dargestellt sind die  $\log_e(x+1)$ -transformierten, normalisierten Intensitäten ohne und mit Verdrängung durch freies DM-Oxa.

Eine tabellarische Aufzählung aller signifikant reduzierten und damit spezifisch gebundenen Proteine kann in Tabelle 6 eingesehen werden. Auffällig ist dabei, dass auch in diesem Ansatz HSP90 Proteine gefunden wurden, darunter auch HSP90A. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Vorversuchs, in dem Peptide des Proteins mit Fragmenten des verwendeten DM-Oxa-PAL co-eluierten.

Tabelle 6 Signifikant veränderte Proteine nach Induktion mit TGF- $\beta$ 1 und Pulldown von DM-Oxa-Diazirin gekoppelten Proteinen an Dde Alkin Säulenmaterial. Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert, wie zuvor mit 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 induziert und lysiert. Das Lysat wurde zunächst bei 37 °C mit DM-Oxa-Diazirin inkubiert, um die Bindung von Zielproteinen zu ermöglichen. Ein Pulldown wurde mittels Click-Chemie an Dde-Alkin funktionalisiertem Säulenmaterial durchgeführt. Alle eluierten Proteine wurden dann massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert. Um Proteine zu finden, die spezifisch gebunden sind, wurde zusätzlich eine Verdrängung mit der gleichen Menge an nichtkonjugiertem DM-Oxa durchgeführt. Eine t-Test basierte Signifikanzanalyse zeigte an, ob Proteine durch die Verdrängung signifikant weniger an DM-Oxa-Diazirin gebunden waren. Außerdem wurde die Funktion der jeweiligen Proteine nach der Ontologie des Gene Ontology Projects aufgeführt (The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine 2021).

UniProt ID	Funktion (Gene Ontology)	Gen Name	Masse [kDa]
<b>P15924</b>	cell adhesive protein binding involved in bundle of His cell-Purkinje myocyte communication; protein kinase C binding; RNA binding; scaffold protein binding; structural constituent of cytoskeleton; structural molecule activity	DSP	331,77
<b>Q01469</b>	fatty acid binding; identical protein binding; lipid binding; long-chain fatty acid transporter activity; retinoic acid binding	FABP5	15,16
<b>P08238</b>	ATP binding; ATP hydrolysis activity; ATP-dependent protein binding; cadherin binding; CTP binding; dATP binding; disordered domain specific binding; DNA polymerase binding; double-stranded RNA binding; GTP binding; heat shock protein binding; histone deacetylase binding; histone methyltransferase binding; identical protein binding; kinase binding; MHC class II protein complex binding; nitric-oxide synthase regulator activity; peptide binding; protein dimerization activity; protein folding chaperone; protein homodimerization activity; protein kinase binding; protein kinase regulator activity; RNA binding; sulfonyleurea receptor binding; tau protein binding; TPR domain binding; transmembrane transporter binding; ubiquitin protein ligase binding; unfolded protein binding; UTP binding	HSP90AB1	83,26
<b>P14625</b>	ATP binding; ATP hydrolysis activity; calcium ion binding; low-density lipoprotein particle receptor binding; protein phosphatase binding; RNA binding; unfolded protein binding	HSP90B1	92,47
<b>Q58FF3</b>	ATP binding; ATP hydrolysis activity; protein kinase binding; unfolded protein binding	HSP90B2P	45,86
<b>P80188</b>	enterobactin binding; identical protein binding; iron ion binding; small molecule binding	LCN2	22,59
<b>P07900</b>	ATP binding; ATP hydrolysis activity; CTP binding; dATP binding; disordered domain specific binding; DNA polymerase binding; GTP binding; GTPase binding; histone deacetylase binding; identical protein binding; MHC class II protein complex binding; mRNA binding; nitric-oxide synthase regulator activity; protein folding chaperone; protein homodimerization activity; protein phosphatase binding; protein tyrosine kinase binding; Rho GDP-dissociation inhibitor binding; RNA binding; scaffold protein binding; sulfonyleurea receptor binding; tau protein binding; TPR domain binding; transmembrane transporter binding; ubiquitin protein ligase binding; unfolded protein binding; UTP binding	HSP90AA1	84,66
<b>Q7LBC6</b>	chromatin DNA binding; histone H3-di/monomethyl-lysine-9 demethylase activity; histone H3-methyl-lysine-9 demethylase activity; metal ion binding; transcription coregulator activity	KDM3B, (C5orf7)	191,58
<b>Q99943</b>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase activity	AGPAT1	31,717
<b>P68104</b>	calmodulin binding; GTP binding; GTPase activity; kinase binding; protein kinase binding; RNA binding; translation elongation factor activity; tRNA binding	EEF1A1	50,14
<b>Q5VTE0</b>	GTP binding; GTPase activity; translation elongation factor activity	EEF1A1P5	50,19

Insgesamt konnten elf Proteine identifiziert werden, die durch die Verdrängung signifikant weniger gebunden waren. Um die Reproduzierbarkeit unter den Replikaten zu kontrollieren und damit eine

Aussage über die Qualität des Experiments zu tätigen, wurden erneut die Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet (Abbildung 38). Es zeigt sich, dass die Replikate in diesem Versuch mittlere Korrelationskoeffizienten aufweisen, was auf eine ausreichende Reproduzierbarkeit hinweist.

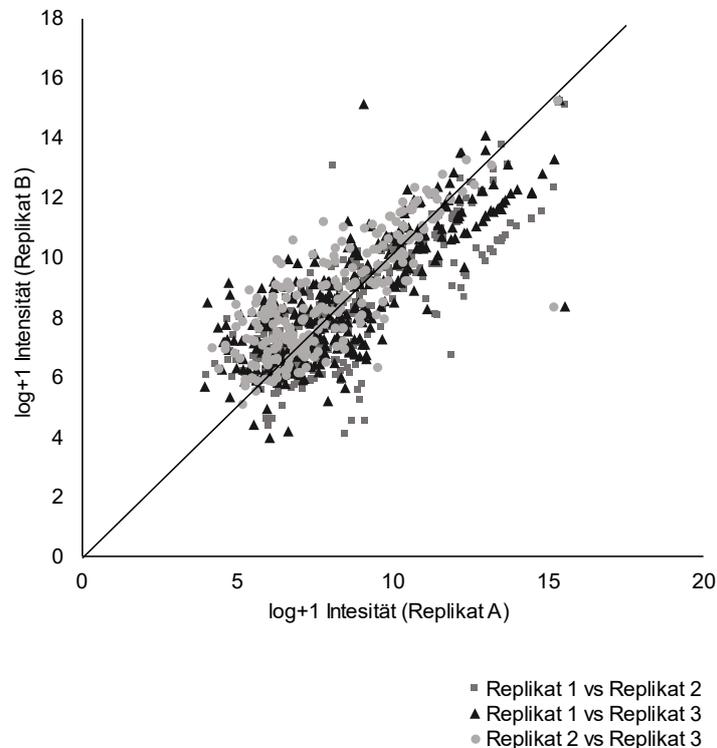


Abbildung 38 Korrelation der drei gemessenen Replikate. Proteinintensitäten wurden  $\log_e(x+1)$ -transformiert und je zwei Replikate gegeneinander aufgetragen. Um die Korrelation der Intensitäten zwischen Replikaten zu ermitteln, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt, wobei ein Wert von 1 eine perfekte Korrelation und ein Wert von 0 eine fehlende Korrelation beschreibt. Eine hohe Reproduzierbarkeit führt zu geringen Abständen zur Winkelhalbierenden. Alle drei Replikate wurden jeweils paarweise miteinander verglichen. Die so berechneten Korrelationskoeffizienten sind: Replikat 1 zu Replikat 2 = 0,82, Replikat 1 zu Replikat 3 = 0,81, Replikat 2 zu Replikat 3 = 0,81

#### 4.4. Einfluss von DM-Oxa auf mRNA

*Zur besseren Vergleichbarkeit und um Verwechslungen auszuschließen werden für alle Elemente die Namen des zugehörigen Gens angegeben.*

Eine wichtige Information, um die Wirkung einer Substanz auf zellulärer Ebene zu erfassen und damit den genauen Wirkort eingrenzen zu können ist die Auswirkung der Substanz auf das Transkriptom. Dabei bietet die Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung Vorteile wie beispielsweise eine hohe Auflösung, hohe Sensitivität und einfache Anwendbarkeit (Yang et al. 2020). Über diese Methode können differenziell exprimierte Gene (DEG) und davon ausgehend auch Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die nach Behandlung der Zellen mit DM-Oxa spezifisch beeinflusst werden. Zusätzlich sollte dieser Ansatz Erkenntnisse darüber liefern, ob die in den Proteom-basierten Assays gefundenen Proteine tatsächlich als Kandidaten verifiziert werden können. In diesem Fall sollte die Expression der von den Kandidaten *downstream* kontrollierten Gene beeinflusst werden.

Der Versuch wurde sowohl für die normale Bronchialepithelzelle BEAS-2B als auch für die Krebszelllinie HepG2 durchgeführt. Letztere wurde genutzt, da diese Zelllinie in der Vergangenheit häufig verwendet wurde, um Oxa und Oxa-Derivate zu charakterisieren (z.B. Richter et al. 2015; Tauber et al. 2015). BEAS-2B-Zellen wurden in den vorhergehenden Versuch zur biologischen Aktivität erfolgreich eingesetzt. Der Vergleich der Ergebnisse beider Zelllinien am Ende soll sicherstellen, dass die beobachteten Effekte nicht exklusiv für eine Zellart sind. Zudem könnten unterschiedliche Wirkung auf Krebs- und normale Zellen Hinweise auf mögliche Anwendungsmöglichkeiten bei Tumorerkrankungen liefern.

Für den Versuch wurden zunächst BEAS-2B und HepG2-Zellen ausgesät. Bei ca. 70 % Konfluenz wurde das zur Aussaat verwendete Vollmedium durch Minimalmedium ersetzt und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Es erfolgte dann zunächst eine einstündige Vorinkubation mit 1  $\mu$ M DM-Oxa, dann die Applikation der Induktoren (vgl. Abbildung 39). Mit dem Ziel Signalwege, die durch DM-Oxa beeinflusst werden, möglichst sicher zu identifizieren, wurden drei Induktoren gewählt, die keine erwartbare Überlappung zeigen. Neben den Unterschieden in der Wirkung auf die verschiedenen Zelllinie können so auch Unterschiede von stimulierten zu unstimulierten Zellen identifiziert werden. Insgesamt ergaben sich durch die vier unterschiedlichen Bedingungen in jeweils zwei Zelllinien acht mögliche Vergleiche zwischen unbehandelten und DM-Oxa behandelten Zellen. Nach fünfständiger Inkubation mit DM-Oxa wurde das Medium entfernt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach mechanischer Ablösung der Zellen in PBS und Pelletieren (1000 x g, 10 min, 4 °C), wurde die RNA wie zuvor beschrieben isoliert (vgl. 3.15.1). Um sicherzustellen, dass die so erhaltene RNA eine zur Sequenzierung geeignete Qualität aufweist, wurde der RQN-Wert bestimmt. Dieser Wert gibt an, ob RNA degradiert oder intakt vorliegt. Eine RQN von 10 repräsentiert vollständig intakte RNA, eine RQN von 1 impliziert vollständig abgebaute RNA. Zur Sequenzierung wurde durch den

ausgewählten Dienstleister (Genewiz Germany) RNA mit einer RQN von mindestens 6,0 angefordert. Die Analyse mittels Fragment-Analyzer (Qsep 1, Nippon Genetics) zeigte, dass alle Proben RQN Werte über 8,0 aufwiesen und somit für die Sequenzierung geeignet sind. Die Sequenzierung erfolgte mit Illumina NovaSeq, einer Leselänge von je zweimal 150 bp und insgesamt 10 Millionen Lese paaren.

	uninduziert	TGF-β1	IL-4	TNF-α, IL-β1, IFN-γ
unbehandelt				
+ 1 μM DM-Oxa				

Abbildung 39 Konditionen für die mRNA-Sequenzierung. Der Versuch wurde sowohl für BEAS-2B als auch HepG2 durchgeführt. Zellen wurden zunächst mit DM-Oxa vorinkubiert und anschließend mit verschiedenen Stimuli induziert. Uninduzierte Zellen und Zellen ohne DM-Oxa Behandlung dienten als Kontrolle. Der gesamte Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt.

#### 4.4.1. Vorbereitung und Qualität der Daten

Die initiale Verarbeitung der Daten erfolgte über Galaxy EU (Afgan et al. 2018). Als Referenz wurde das humane Genom GRCh38.p13 und die zugehörige Annotation „gencode.v41.basic.annotation“ über Gencode bezogen (Harrow et al. 2012). Die verwendeten Algorithmen und Verarbeitungsschritte sind in Abbildung 40 dargestellt.

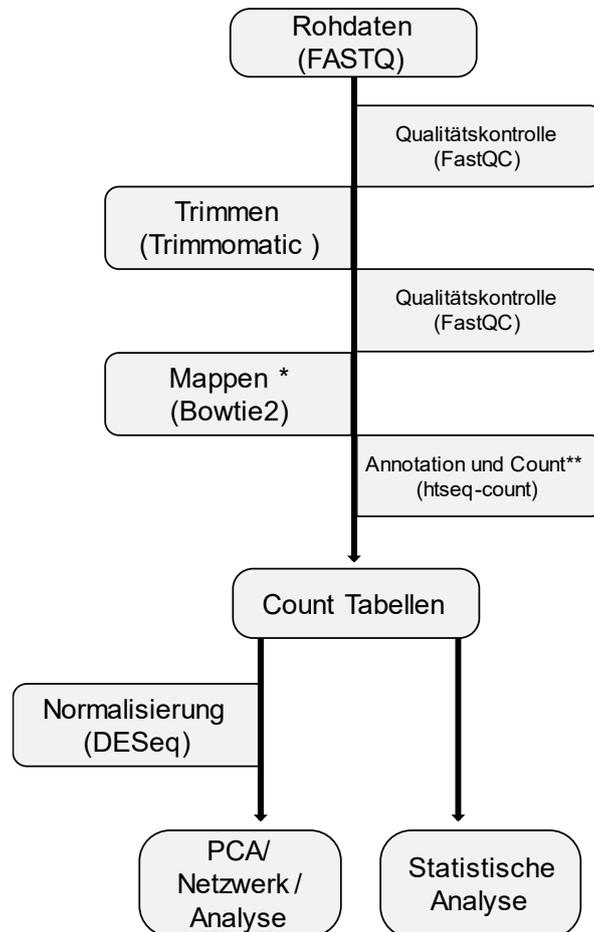


Abbildung 40 Initiale Verarbeitung der Sequenzierungsdaten. Die Rohdaten wurden auf den Galaxy Europe Server geladen und wie gezeigt bearbeitet. Die so erstellten Count Tabellen wurden zur weiteren Datenanalyse verwendet. Die statistische Analyse der Daten erfolgte über das BioJupies Notebook (Torre et al. 2018). Die Isolation der differenziell exprimierten Gene erfolgte dort mittels limma-voom. Zur weiteren Analyse der Daten über Hauptkomponenten- (PCA) und Korrelationsnetzwerkanalysen wurde über DESeq2 eine *median-of-ratios* Normalisierung der Count-Tabellen durchgeführt. \* = an dieser Stelle wurde das Referenzgenom GRCh38.p13 verwendet. \*\* = an dieser Stelle wurde die Gencode Annotation für Homo sapiens, Version 41, verwendet. (Bolger et al. 2014; Love et al. 2014; Langmead and Salzberg 2012; Anders et al. 2015; Ritchie et al. 2015; Andrews et al. 2010)

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) aller gemessenen Proben für die beiden verwendeten Zelllinien zeigt eine hohe Korrelation der Replikate (Abbildung 41). Besonders hervor stechen die mit einem Mix aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  behandelten Zellen. Außerdem clustern erwartungsgemäß jeweils die unbehandelten und mit DM-Oxa behandelten Proben. Insgesamt zeigt die PCA keine drastischen Abweichungen der Replikate voneinander und bestätigt daher ein erwartbares Verhalten der einzelnen Proben.

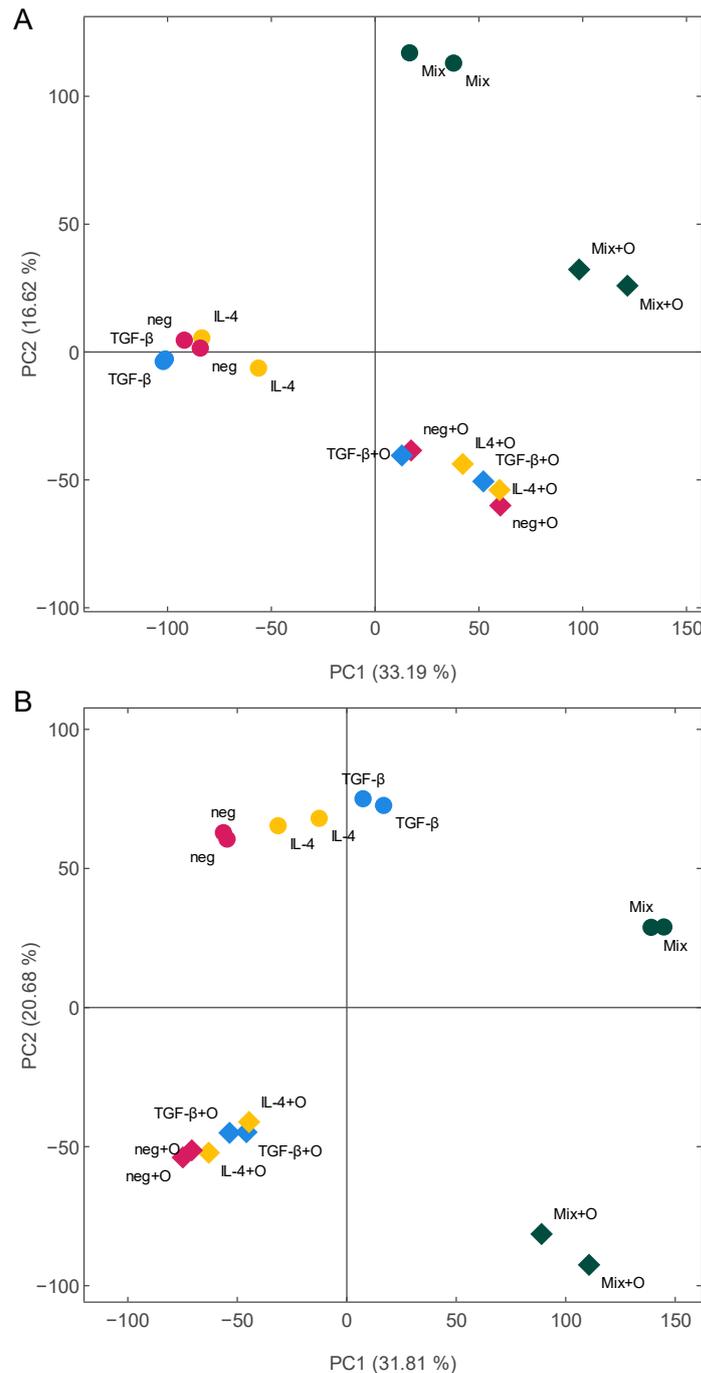


Abbildung 41 Hauptkomponentenanalyse aller gemessener Proben für HepG2 (A) und BEAS-2B (B). Die PCA erfolgte mittels Singulärwertzerlegung (SVD). Die Genexpressions-Matrix wurde vorher zentriert, sodass alle Intensitäten eines Transkripts einen Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1 haben. Dargestellt sind für beide Zelllinien die uninduzierten (neg) sowie die mit TGF- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ), IL-4 (IL-4) oder mit einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Mix) induzierten Proben jeweils unbehandelt und nach Applikation von 1  $\mu$ M DM-Oxa (+O). PC1 und PC2 beschreiben die Hauptkomponenten durch die prozentual die höchste Varianz erklärt wird.

Die verwendeten Zellen wurden durch verschiedene Zytokine bzw. ein Gemisch aus Zytokinen behandelt. Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob durch die drei unterschiedlichen Induktionen eine Veränderung im Expressionslevel ausgewählter, relevanter Gene festgestellt werden kann. Eine erfolgreiche Induktion der Zellen durch die unterschiedlichen Zytokine ist

essenziell und ermöglicht in nachfolgenden Schritten die differenzierte Betrachtung der einzelnen Behandlungen.

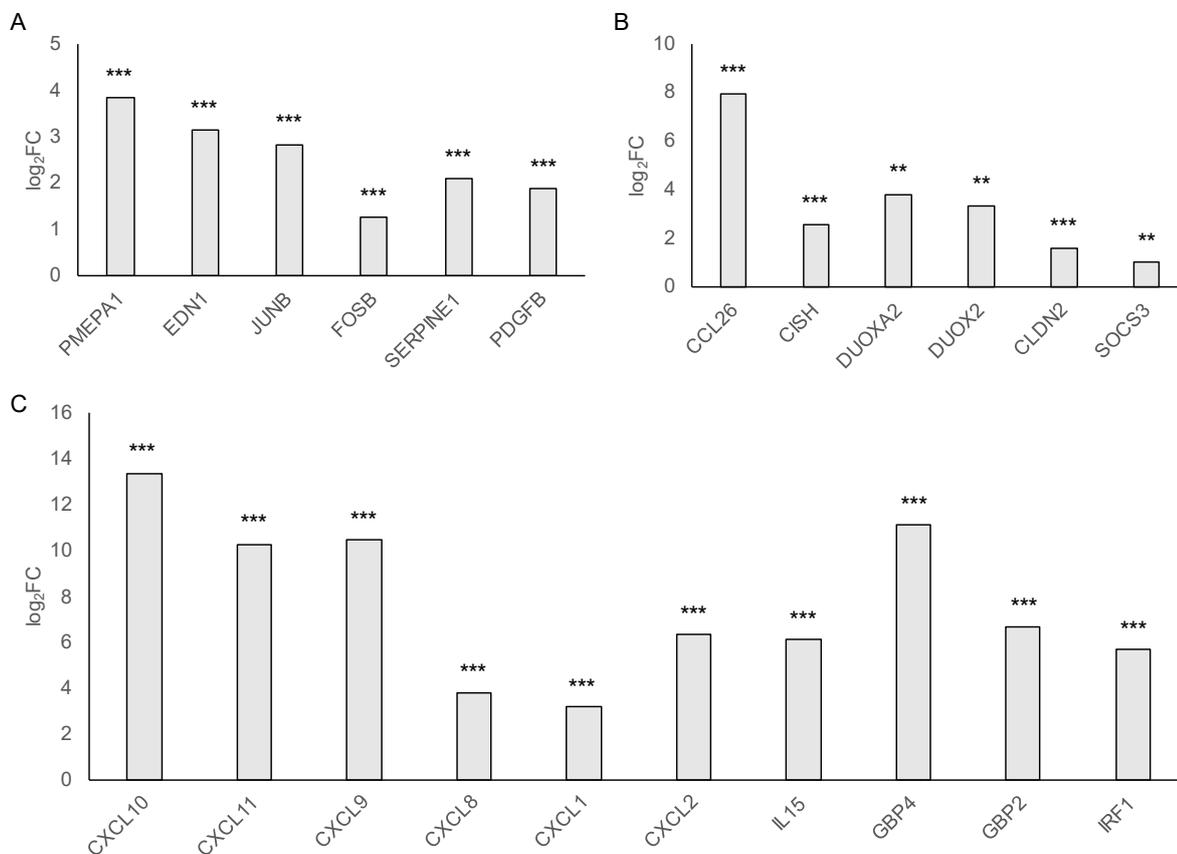


Abbildung 42 Überprüfung der Induktion. Relative Änderung in der Expression ausgewählter Gene nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 (A), IL-4 (B) oder einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (C) in HepG2-Zellen im Vergleich zu unbehandelten HepG2-Zellen. Sternchen implizieren die FDR mit \* $<0,05$ , \*\* $<0,01$ , \*\*\* $<0,001$ . Die ausgewählten Gene werden nachweislich durch die jeweiligen Induktoren beeinflusst (Watanabe et al. 2010; Levy and Hill 2005; Moustakas and Heldin 2012; Samarakoon et al. 2009; Han et al. 2015; Hebenstreit et al. 2005; Zhang et al. 2008; Raad et al. 2013; van den Bossche et al. 2012; Canfield et al. 2005; Pawliczak et al. 2005; Kamohara et al. 2007; Burke et al. 2014; Xu et al. 2020).

Eine Überprüfung der Induktion anhand der Expression ausgewählter relevanter Gene wurde sowohl für die Sequenzierungsdaten aus HepG2 (Abbildung 42) als auch aus BEAS-2B (Abbildung 43) durchgeführt. Für beide Zelllinien konnte so eine deutliche Induktion nachgewiesen werden. Die stärkste Veränderung in der Induktion relevanter Gene wurde für beide Zelllinien nach Behandlung mit einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beobachtet, was mit den Ergebnissen der PCA übereinstimmt. Die geringste Änderung konnte nach Applikation des Zytokins IL-4 festgestellt werden. Da die Induktion für alle drei Behandlungen hochsignifikant ist, wird mit allen Datensätzen weitergearbeitet.

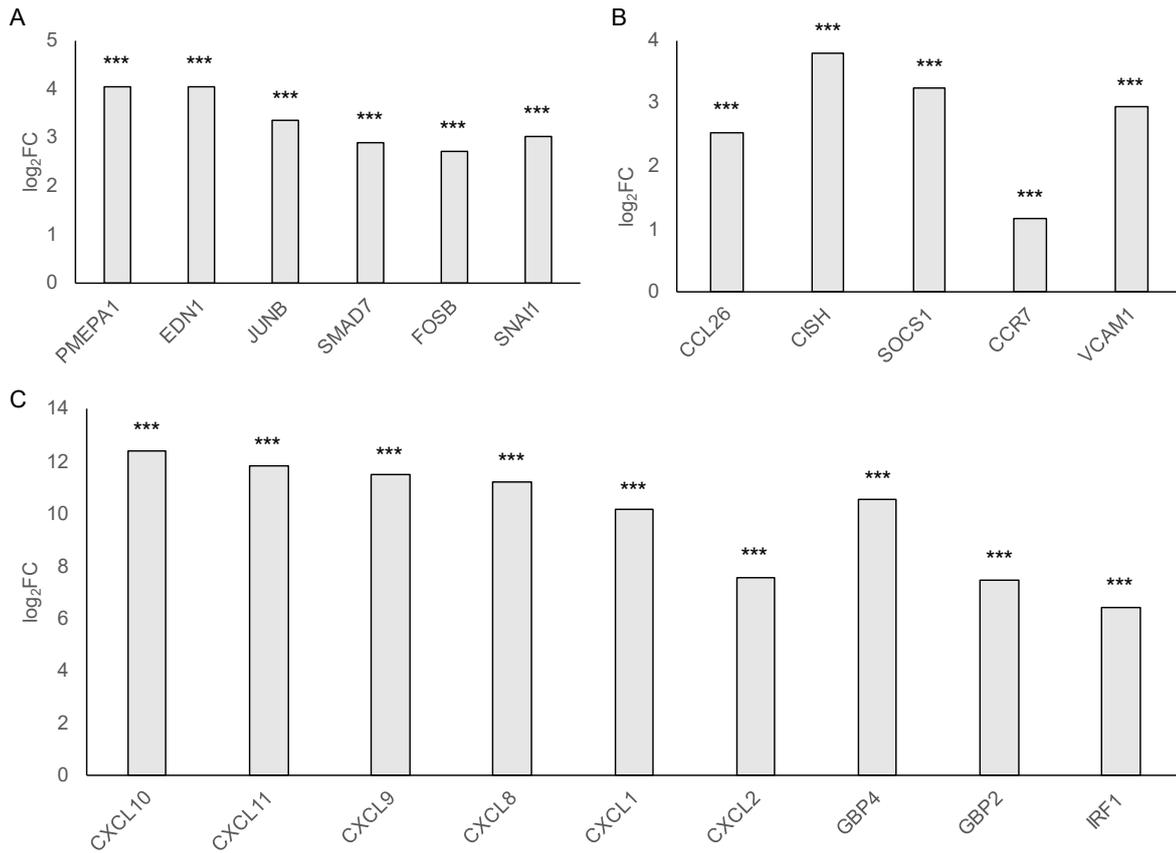


Abbildung 43 Überprüfung der Induktion. Relative Änderung in der Expression ausgewählter Gene nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 (A), IL-4 (B) oder einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (C) in BEAS-2B-Zellen im Vergleich zu unbehandelten BEAS-2B-Zellen. Sternchen implizieren die FDR mit \* $<0,05$ , \*\* $<0,01$ , \*\*\* $<0,001$ . Die ausgewählten Gene werden nachweislich durch die jeweiligen Induktoren beeinflusst (Watanabe et al. 2010; Levy and Hill 2005; Nakao et al. 2002; Moustakas and Heldin 2012; Cho et al. 2007; Hebenstreit et al. 2005; Zhang et al. 2008; Hebenstreit et al. 2006; Seneviratne et al. 2007; Hoshino et al. 2004; Pawliczak et al. 2005; Kamohara et al. 2007; Lo et al. 2014; Maeda et al. 2015; Xu et al. 2020).

#### 4.4.2. Identifikation differenziell exprimierter Gene (DEG)

Nachdem eine erfolgreiche Induktion durch die applizierten Zytokine festgestellt werden konnte, wurden als nächstes innerhalb der jeweiligen Induktionen bzw. der nicht induzierten Proben paarweise Vergleiche durchgeführt, um DEG zu identifizieren. Dazu wurden die Zellen, die mit DM-Oxa behandelt wurden mit denen, die nicht behandelt wurden, über das Online-Tool BioJupies unter Standardparametern verglichen (Torre et al. 2018). So konnten DEG gefunden werden, die nur durch Applikation von DM-Oxa beeinflusst wurden.

Insgesamt konnten zwischen ~14.500 und ~17.000 Transkripte gemessen und für die Analyse verwendet werden. Durch DM-Oxa-Behandlung signifikant hochreguliert wurde je nach Stimulus die Expression von bis zu 2.780 Genen, runterreguliert bis zu 1.798 Gene (Abbildung 44).

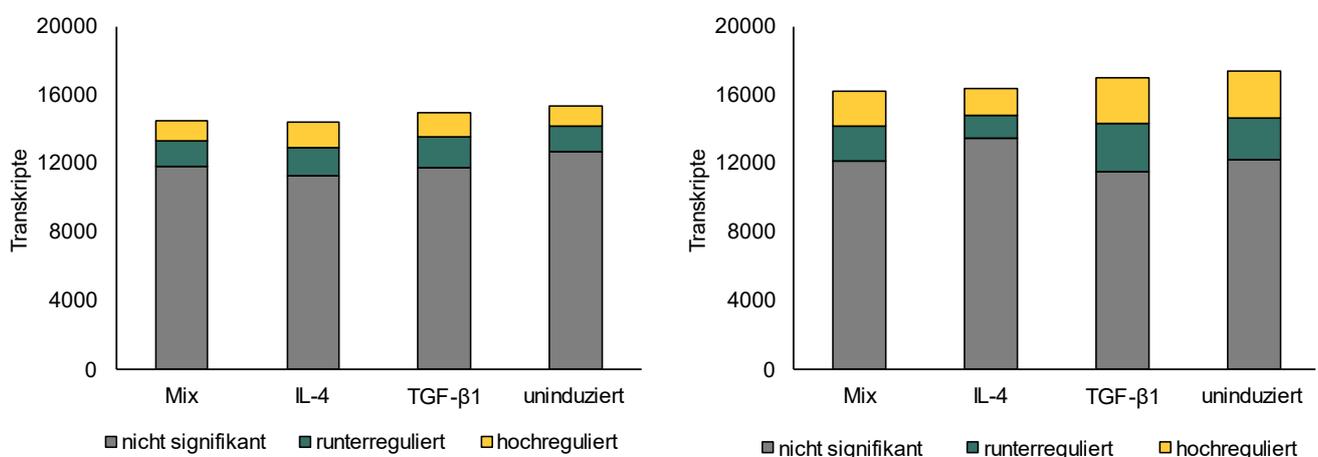


Abbildung 44 Anzahl detektierter und signifikant veränderter Transkriptmengen nach Behandlung mit DM-Oxa für HepG2 (A) und BEAS-2B (B). Dargestellt ist die Anzahl der in den Counttabellen vorliegenden Gene die zur Erstellung der Volcano-Plots verwendet wurden. Signifikant sind dabei alle Gene mit  $FDR < 0,05$ . Mix = Induziert mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ .

Zur Visualisierung der DEG wurde die relative Änderung gegen die Signifikanz aufgetragen. So können besonders stark regulierte Gene schnell identifiziert werden. Die relative Änderung wird  $\log_2$  transformiert dargestellt. Dadurch entspricht ein x-Achsenabschnitt von 1 einer Verdopplung, bzw. einer Halbierung der Transkriptmenge. Die Falscherkennungsrate wird  $-\log_{10}$  transformiert dargestellt. Damit entspricht ein Wert von über 1,3 einer signifikanten Änderung mit einem Signifikanzlevel von 0,05. Dies wurde zunächst für die aus HepG2 erhobenen Daten durchgeführt (Abbildung 45). Auffällig ist dabei, dass trotz unterschiedlicher Induktionsstimuli die DEG eine hohe Schnittmenge aufweisen. So ist beispielsweise induktionsunabhängig die Expression von CYP1A1 durch DM-Oxa Behandlung stark reduziert, die von HSPA6 stark erhöht.

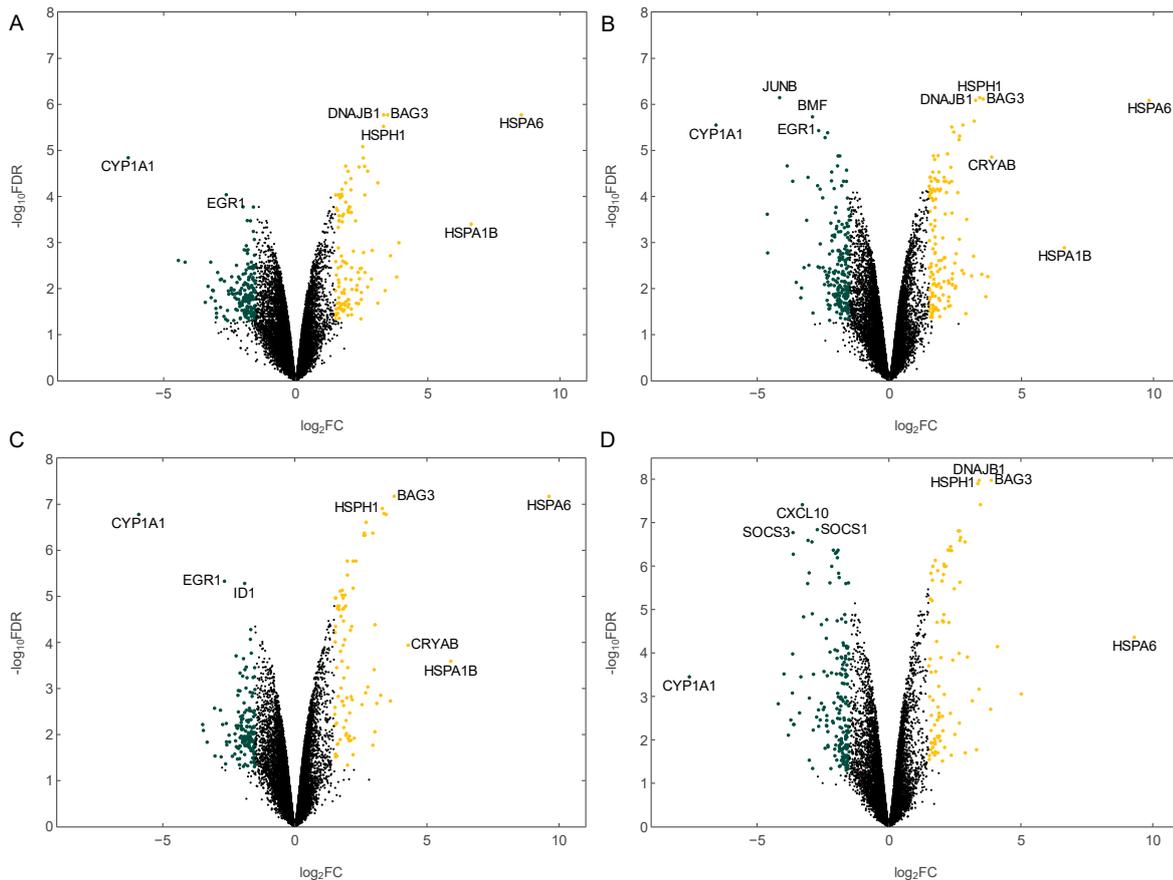


Abbildung 45 Differenziell exprimierte Gene in HepG2 nach Behandlung mit DM-Oxa. Der Logarithmus zur Basis 2 der relativen Änderung ( $\log_2FC$ ) zwischen den betrachteten Konditionen wurde gegen den jeweiligen negativen dekadischen Logarithmus der FDR ( $-\log_{10}FDR$ ) aufgetragen. mRNA aus uninduzierten (A), TGF- $\beta$  induzierten (B), IL-4 induzierten (C) und mit einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzierten (D) HepG2-Zellen. Signifikant veränderte Transkripte sind farblich markiert.

Auch für die Zelllinie BEAS-2B wurden die DEG wie oben beschrieben dargestellt (Abbildung 46). Auch hier zeigt sich, dass einige Gene induktionsunabhängig eine stark veränderte Expression nach Behandlung mit DM-Oxa aufweisen (z.B. HSPH1). Zudem wird im Vergleich sichtbar, dass einige der hochregulierten Gene sowohl in BEAS-2B als auch in HepG2 hervorstechen, dabei handelt es sich vor allem um Hitzeschockproteine wie beispielsweise HSPA6.

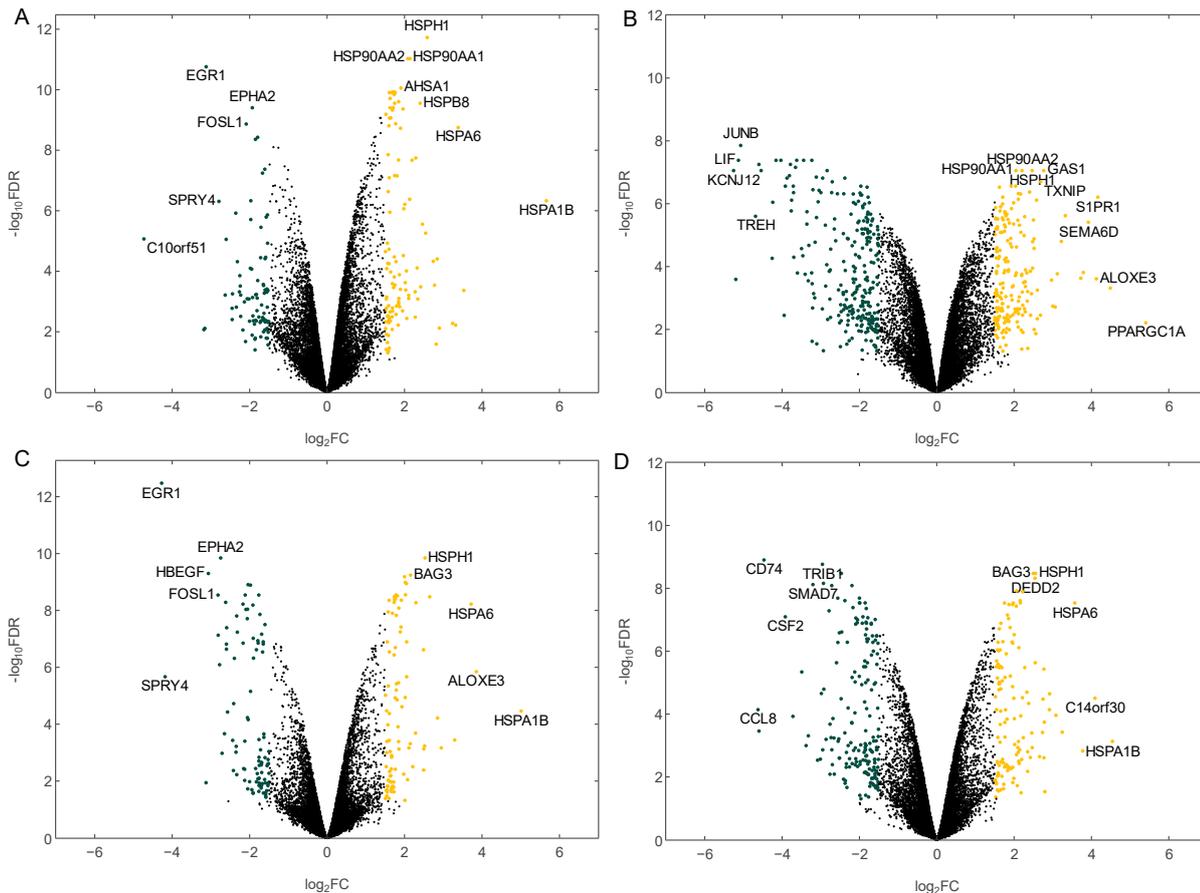


Abbildung 46 Differenziell exprimierte Gene in BEAS-2B nach Behandlung mit DM-Oxa. Der Logarithmus zur Basis 2 der relativen Änderung ( $\log_2FC$ ) zwischen den betrachteten Konditionen wurde gegen den jeweiligen negativen dekadischen Logarithmus der FDR ( $-\log_{10}FDR$ ) aufgetragen. mRNA aus uninduzierten (A), TGF- $\beta$ 1 induzierten (B), IL-4 induzierten (C) und mit einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzierten (D) BEAS-2B-Zellen. Signifikante sind farbig markiert.

Sowohl für HepG2 als auch für BEAS-2B konnten bereits anhand der Abbildungen Gene identifiziert werden, deren Expression unabhängig vom Induktionsstimulus durch die Applikation von DM-Oxa signifikant hoch- und herunterreguliert wurden. Diese Beobachtung ist in Abbildung 47 verdeutlicht. Hier wird sichtbar, dass zwischen 11,9 % und 21,5 % der durch DM-Oxa signifikant regulierten Gene, unabhängig vom Stimulus, für die jeweiligen Zelllinien übereinstimmen.

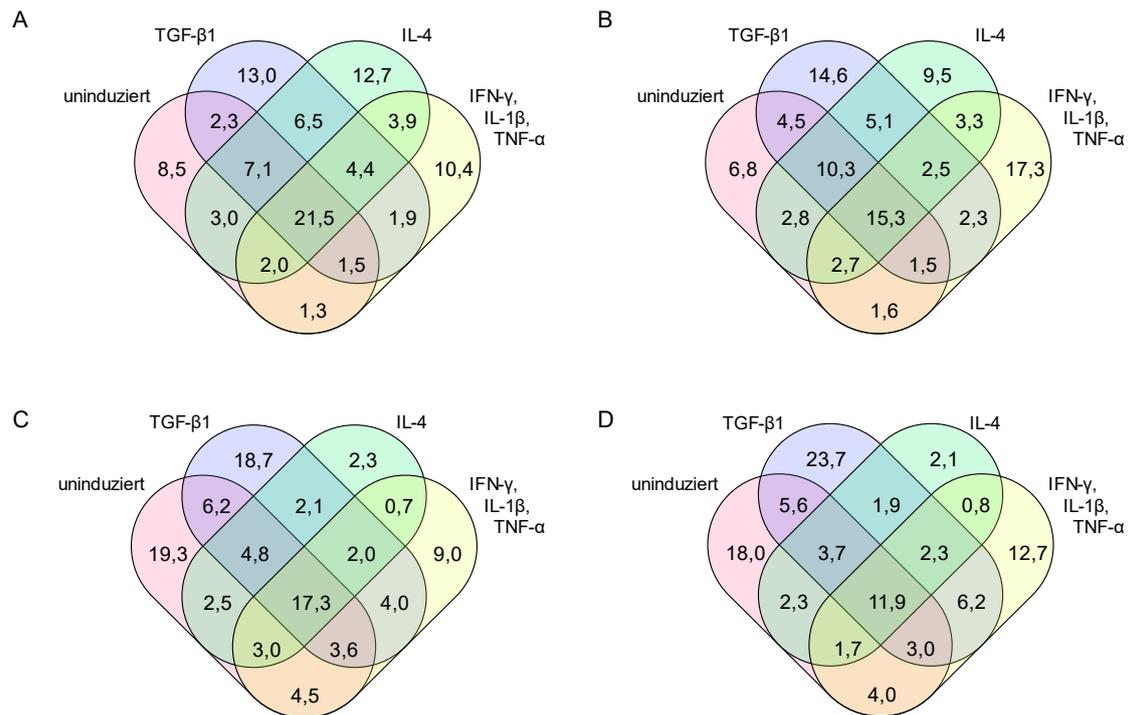


Abbildung 47 Schnittmenge der DEG nach DM-Oxa Behandlung. Dargestellt ist die prozentuale Anzahl der signifikant veränderten mRNA für HepG2 (A und B) und BEAS-2B (C und D). Dabei wurde eine erhöhte (A und C) und verringerte (B und D) Expression nach DM-Oxa Behandlung separat betrachtet.

Dies könnte beispielsweise auf eine Grundinduktion bestimmter Gene hindeuten, die dann durch DM-Oxa herunterreguliert werden. Es könnte aber auch auf eine Runterregulation von Genen hindeuten, die nicht durch den Stimulus beeinflusst werden und somit auch nicht krankheitsassoziiert sind. Eine starke Beeinflussung solcher Gene, besonders wenn diese essenziell für das Überleben von Zellen sind, könnte einer längerfristigen Anwendung im Organismus widersprechen. Problematisch könnte beispielsweise die Beeinflussung von Genen sein, die den Zellzyklus oder Apoptose regulieren. Daher wurde im nächsten Schritt eine Enrichment-Analyse auf Gene durchgeführt, deren Expression in uninduzierten Zellen durch DM-Oxa signifikant verändert wurde. Dazu wurde die Ontologie des Gene Ontology Projects verwendet (The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine 2021; Ashburner et al. 2000). Signifikant veränderte Ontologie-Terme weisen auf eine Überrepräsentation der jeweils enthaltenen Gene hin. Sowohl für HepG2 als auch für BEAS-2B konnten Prozesse identifiziert werden, die signifikant hoch bzw. runterreguliert sind (Abbildung 48 und Abbildung 49). Für beide Zelllinien waren besonders Prozesse hochreguliert, die mit der Proteinfaltung assoziiert sind. Dies folgt der Beobachtung aus Abbildung 45 und Abbildung 46, in denen einige Chaperone, besonders Hitzeschockproteine, nach Applikation von DM-Oxa auffällig stark verändert sind. Für HepG2-Zellen konnte zusätzlich eine signifikant veränderte Regulation apoptotischer Prozesse detektiert werden. Es ist allerdings zu beachten, dass eine Veränderung der mRNA Menge nur bedingt auf eine Änderung der Proteinmenge rückschließen lässt (Liu et al. 2016; Bauernfeind and Babbitt 2017).

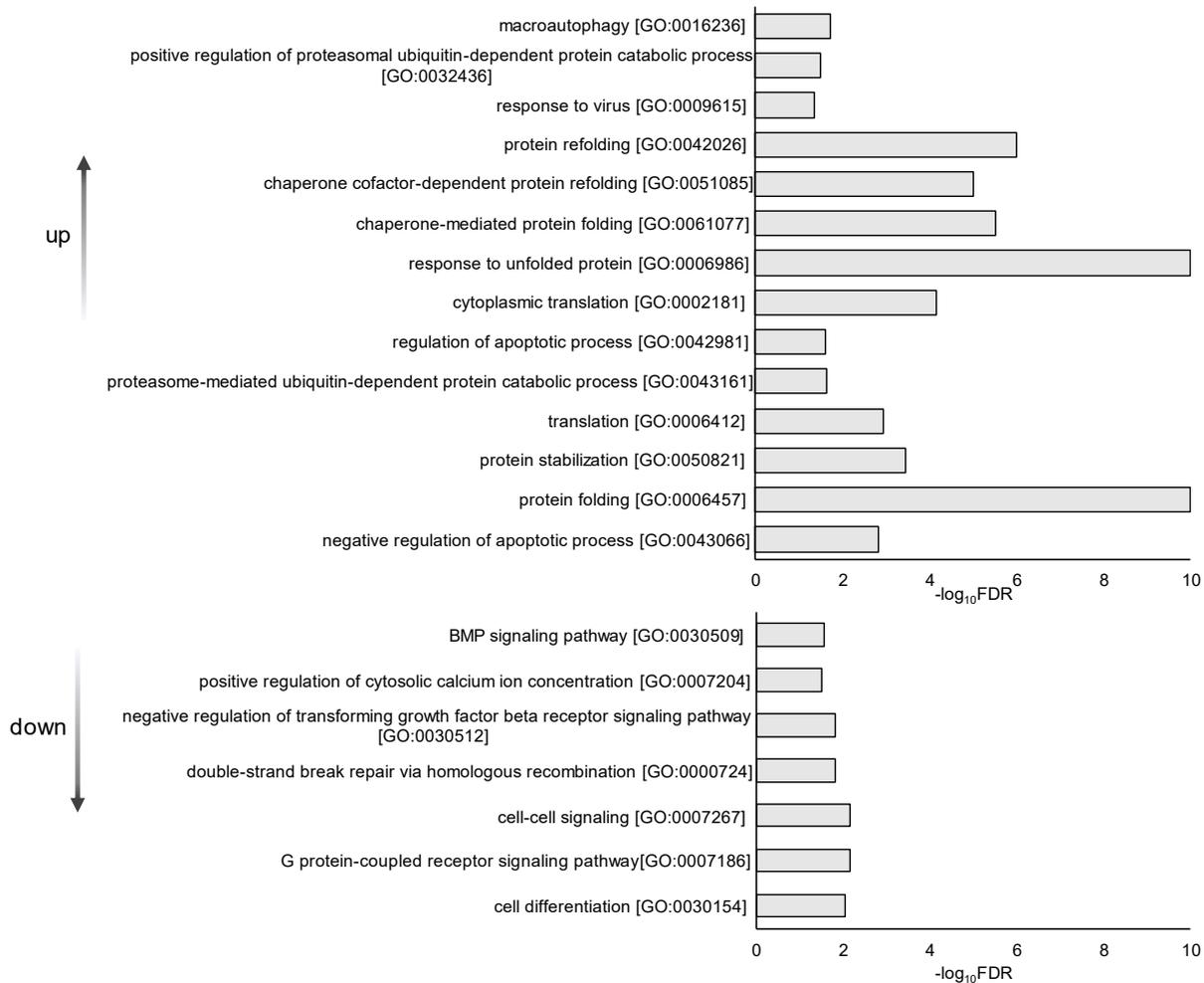


Abbildung 48 Durch DM-Oxa signifikant regulierte zelluläre Prozesse in uninduzierten HepG2-Zellen. Durch DM-Oxa Applikation differenziell exprimierte Gene aus uninduzierten HepG2-Zellen wurden nach der Ontologie des Gene Ontology Projects (Ashburner et al. 2000) auf biologische Prozesse angereichert. Dargestellt sind signifikant herunter- und hochregulierte Prozesse mit  $\text{FDR} < 0,05$ . Es wurden nur Prozesse berücksichtigt, die mit mindestens zehn Genen signifikant verändert sind.

Für die Zelllinie BEAS-2B konnte eine signifikante Verringerung von nur zwei Prozessen festgestellt werden, der inflammatorischen Antwort und der negativen Regulation der ERK1 und ERK2 Kaskade (Abbildung 49). Wie erwartet zeigte die Analyse einen geringeren Einfluss auf die normale Zelllinie BEAS-2B als auf die Krebszelllinie HepG2. Allerdings muss bei der Bewertung dieser Daten beachtet werden, dass es sich um immortalisierte Zellen handelt, eine gewisse Abweichung von normalen Primärzellen ist demnach zu erwarten.

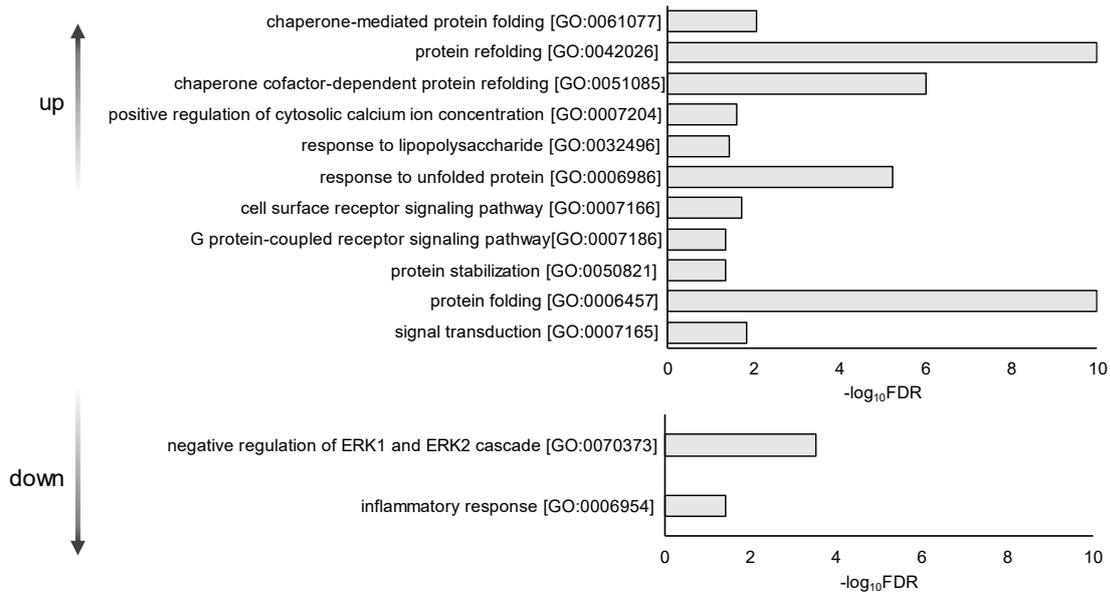


Abbildung 49 Durch DM-Oxa signifikant regulierte zelluläre Prozesse in uninduzierten BEAS-2B-Zellen. Durch DM-Oxa Applikation differenziell exprimierte Gene aus uninduzierten BEAS-2B-Zellen wurden nach der Ontologie des Gene Ontology Projects (Ashburner et al. 2000) auf biologische Prozesse angereichert. Dargestellt sind signifikant herunter und hochregulierte Prozesse mit FDR < 0,05. Es wurden nur Prozesse berücksichtigt, die mit mindestens zehn Genen signifikant verändert sind.

Übereinstimmend für beide Zelllinien kann aus Abbildung 48 und Abbildung 49 abgeleitet werden, dass durch Applikation von DM-Oxa hauptsächlich die Expression von Genen induziert wird, die mit Proteinfaltung zusammenhängen. Passend dazu befinden sich unter den zehn am stärksten hochregulierten Genen (höchste *fold change*, bei FDR < 0,05) auch nach Induktion mit TGF- $\beta$ 1, IL-4 bzw. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  viele Chaperone (Abbildung 50 und Abbildung 51). Für HepG2 sind unabhängig vom Induktionsstimulus sechs der zehn am stärksten hochregulierten Gene Chaperone (HSPA6, HSPA1B, CRYAB, BAG3, DNAJB1, HSPH1). Auch für BEAS-2B sind zwei Chaperone unabhängig vom Stimulus unter den zehn am stärksten hochregulierten Genen zu finden (HSPA6 und HSPA1B), zwei weitere sind nach Stimulation durch IL-4 in dieser Liste zu finden (HSPB8 und HSPH1). Die Produkte der genannten Gene gehören hauptsächlich zu den Hitzeschock-Proteinen (HSPA6, HSPA1B, HSPH1, HSPB8, CRYAB) oder sind mit diesen assoziiert (BAG3, DNAJB1). Auffällig ist auch, dass die Übereinstimmung besonders für die am stärksten hochregulierten mRNA gegeben ist. Bei den runterregulierten mRNA unterscheiden sich die am stärksten veränderten sowohl zwischen den Zelllinien als auch zwischen den verschiedenen Stimuli deutlich.

Unter den am stärksten herunterregulierten Expressionen fällt für HepG2 CYP1A1 auf. Dieses Protein ist eine Cytochrom P450 Monooxygenase und metabolisiert somit verschiedene Xenobiotika sowie exogene und endogene Verbindungen (Badal and Delgoda 2014). Die Expression des Proteins wird durch einen Transkriptionsfaktor bestehend aus dem AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) und ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) kontrolliert. Eine Überexpression konnte in verschiedenen Krebsarten wie beispielsweise in bestimmten Brustkrebs- und Leberkrebsarten festgestellt werden (Go et al. 2015).

Die Expression von JUNB in TGF- $\beta$ 1 induzierten HepG2 und BEAS-2B wurde durch DM-Oxa Behandlung stark reduziert. JUNB bildet als Transkriptionsfaktor zusammen mit Proteinen der FOS Familie den AP-1 Komplex (Verrecchia et al. 2001). Es wird durch TGF- $\beta$  induziert und eine erhöhte Expression ist Teil der EMT und Karzinogenese (Gervasi et al. 2012; Sundqvist et al. 2018).

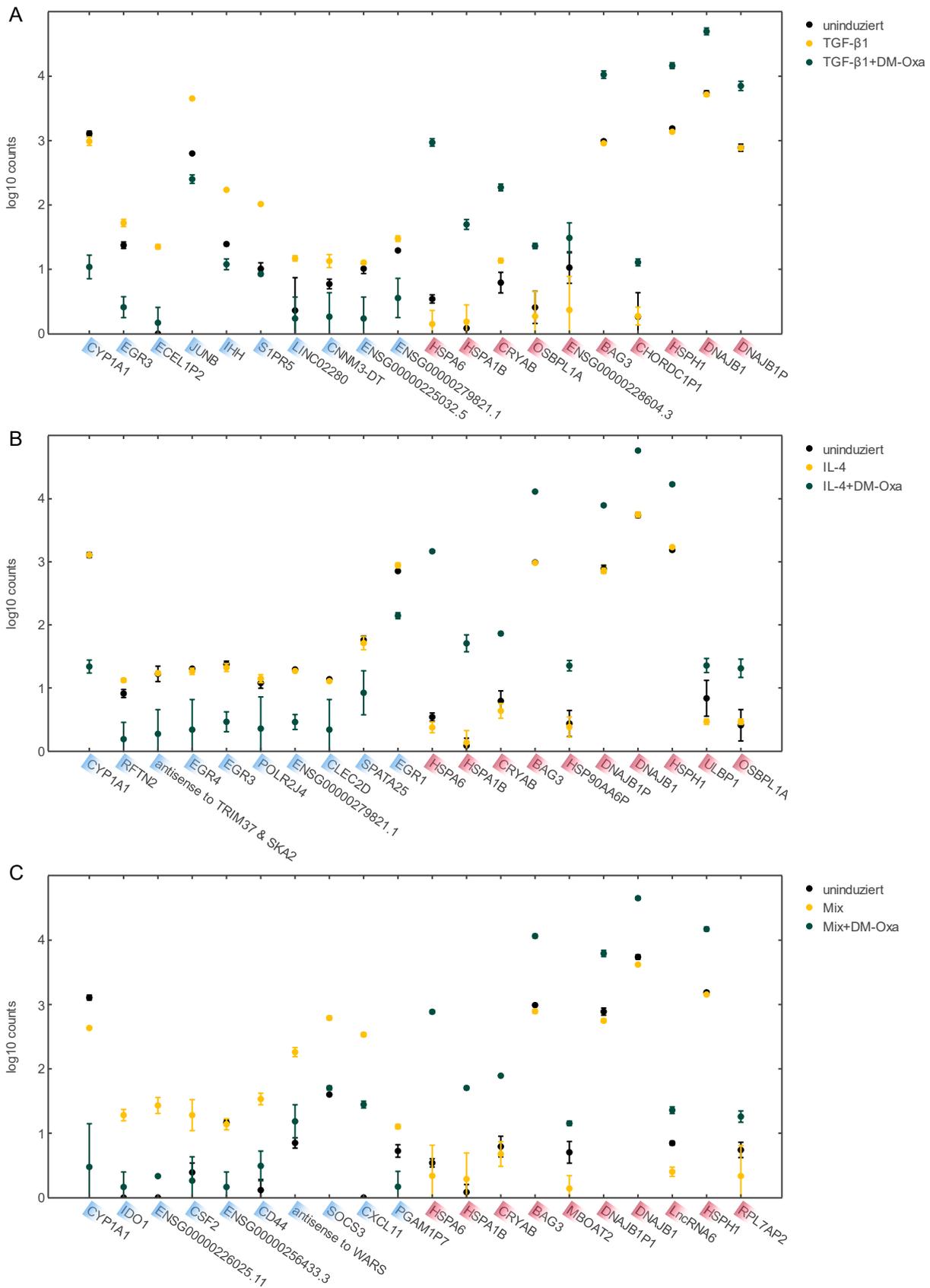


Abbildung 50 Expression der am stärksten durch DM-Oxa regulierten Gene in uninduzierten, induzierten und in zusätzlich mit DM-Oxa behandelten HepG2. Für jeden Stimulus, also TGF-β1 (A), IL-4 (B) und das Gemisch IFN-γ, TNF-α und IL-1β (Mix, C) wurden die zehn am stärksten herunter- (links, blau) und hoch- (rechts, rot) regulierten Gene dargestellt mit FDR>0,05. Es wurden einige nicht codierende RNA identifiziert, deren Funktion unbekannt ist. An diesen Stellen sind die Gennummern des entsprechenden Gens eingetragen, wie in

## Ergebnisse

der Ensembl Datenbank hinterlegt (Cunningham et al. 2022). Werte sind angegeben als dekadischer Logarithmus der Counts. Fehlerbalken implizieren die Standardabweichung.

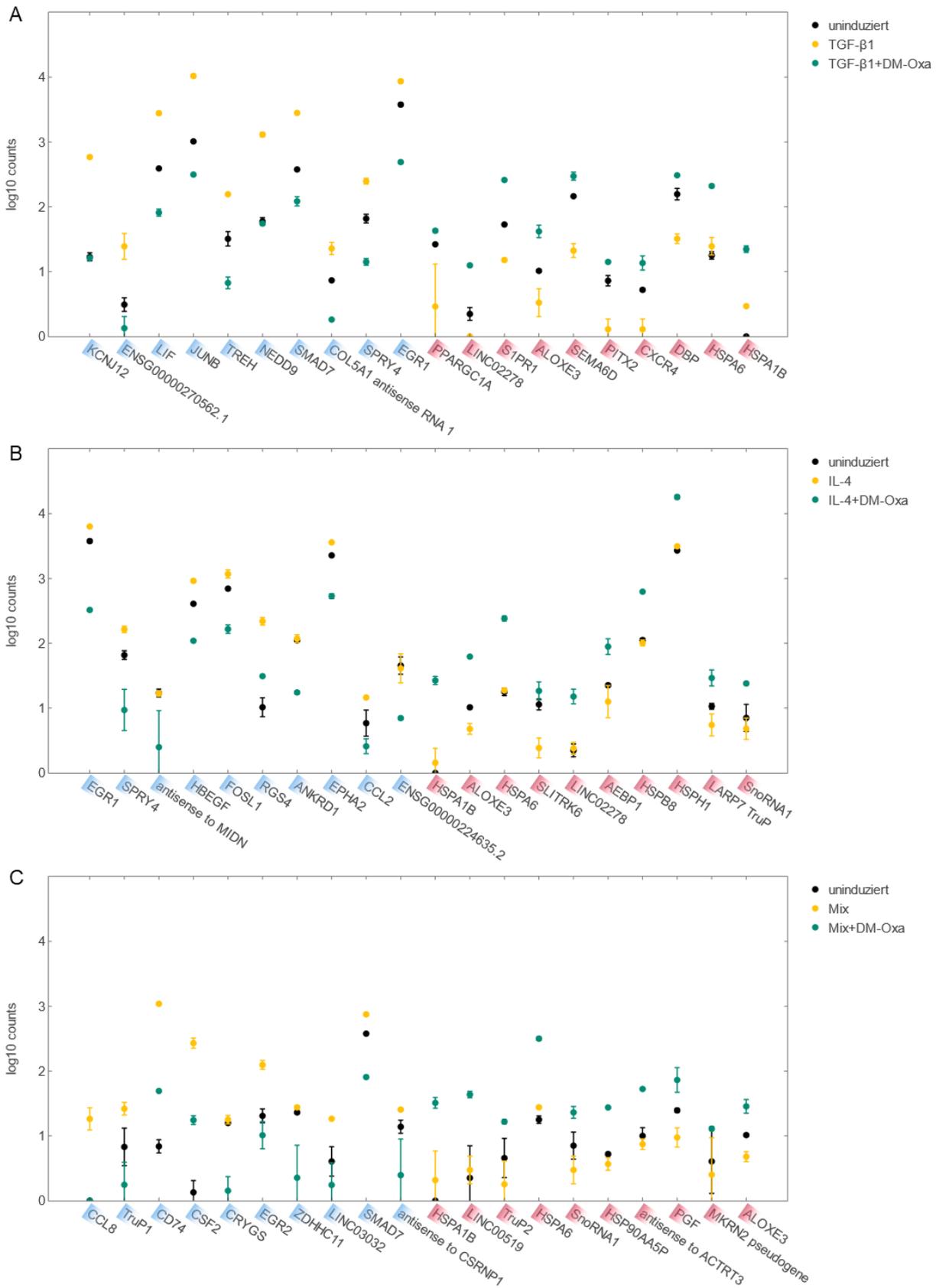


Abbildung 51 Expression der am stärksten durch DM-Oxa regulierten Gene in uninduzierten, induzierten und in zusätzlich mit DM-Oxa behandelten BEAS-2B. Für jeden Stimulus, also TGF-β1 (A), IL-4 (B) und das Gemisch IFN-γ, TNF-α und IL-1β (Mix, C) wurden die zehn am stärksten herunter- (links, blau) und hoch- (rechts, rot) regulierten Gene dargestellt. Es wurden einige nicht codierende RNA identifiziert, deren Funktion unbekannt ist. An diesen Stellen sind die Gennummern des entsprechenden Gens eingetragen, wie in der

Ensembl Datenbank hinterlegt (Cunningham et al. 2022). Werte sind angegeben als dekadischer Logarithmus der Counts. Fehlerbalken implizieren die Standardabweichung.

#### 4.4.3. Angereicherte Signalwege nach DM-Oxa Behandlung

Aus allen nach DM-Oxa Behandlung signifikant veränderten mRNA wurde als nächstes ein Pathway-Enrichment durchgeführt, um signifikant veränderte Signalwege zu identifizieren. Dazu wurde die KEGG Ontologie für humane Signalwege verwendet (Kanehisa et al. 2022; Kanehisa and Goto 2000). Signifikant verändert exprimierte Gene ausgewählter Signalwege sind in Abbildung 52 und Abbildung 53 dargestellt.

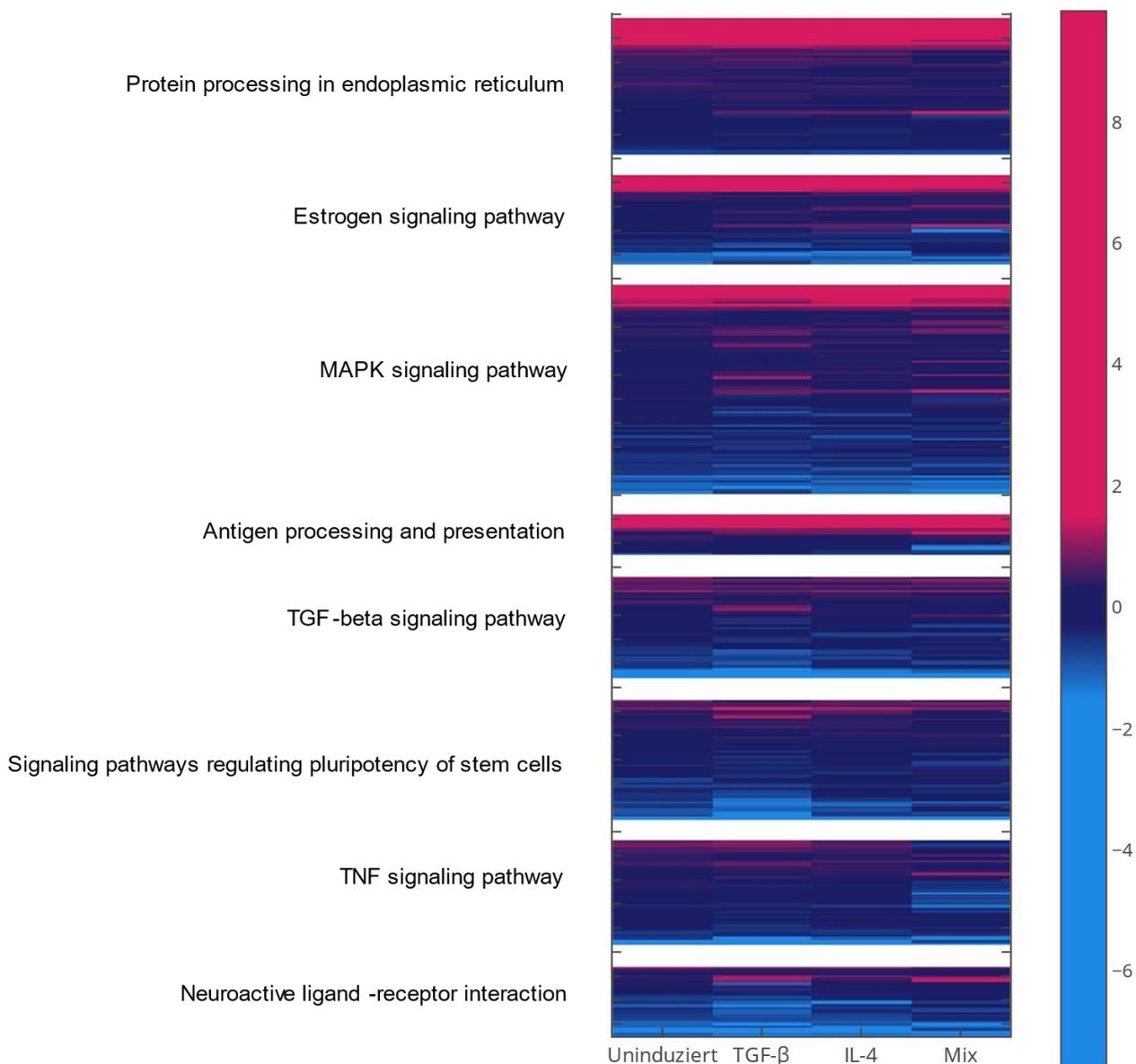


Abbildung 52 Signifikant veränderte Signalwege nach Applikation von DM-Oxa auf HepG2-Zellen. Dargestellt sind die logarithmierten Änderungen ( $\log_2FC$ ) nach Applikation von 1  $\mu M$  DM-Oxa und falls zutreffend Induktion mit TGF- $\beta$ 1, IL-4 oder einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Mix). Signifikant ( $FDR < 0.05$ ) veränderte Gene sind farbig markiert. Dargestellt sind Signalwege die mindestens 30 Einträge in der KEGG-Datenbank haben, sofern mindestens fünf der assoziierten Gene im Datensatz nach Applikation von DM-Oxa signifikant verändert sind.

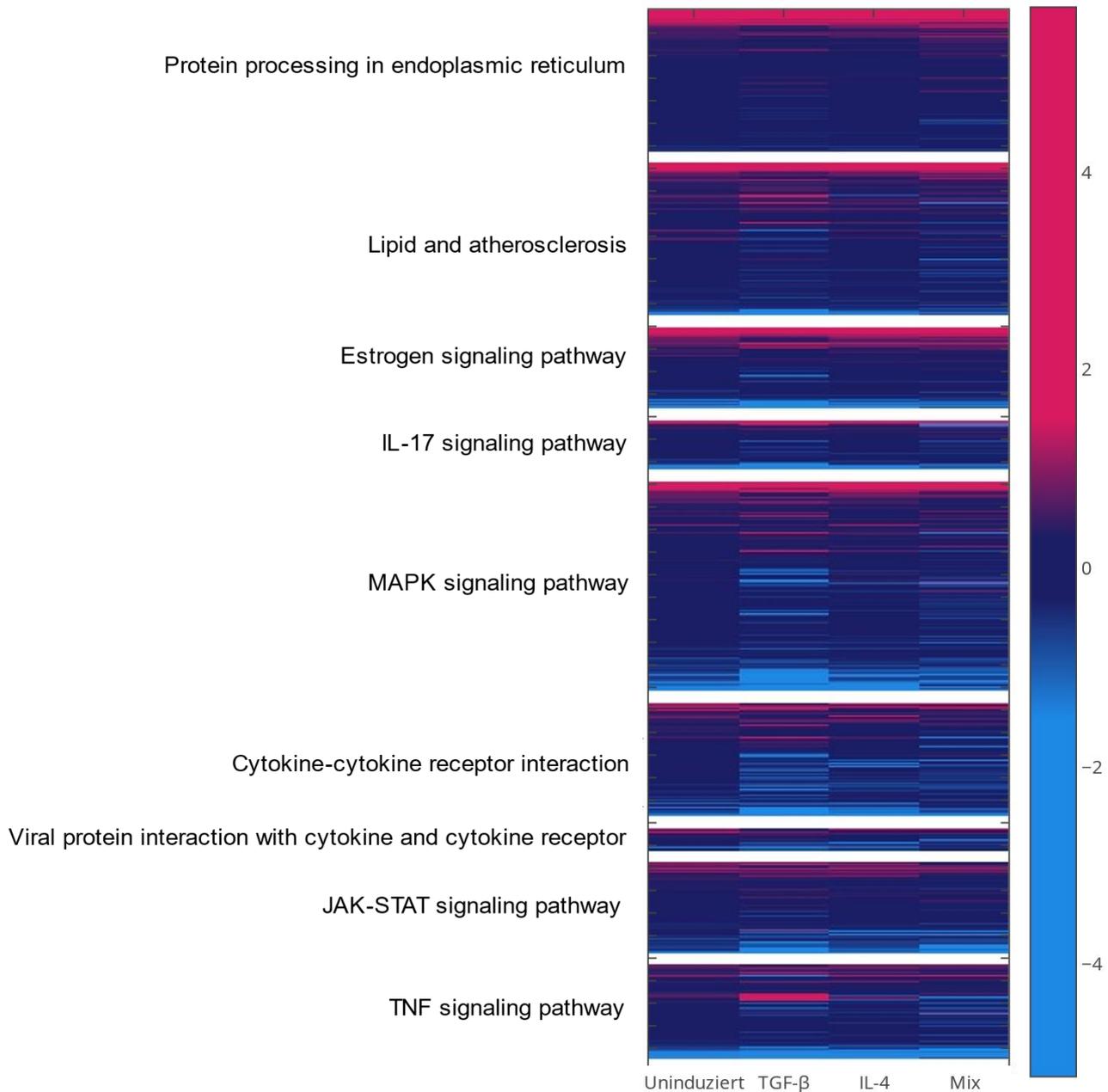


Abbildung 53 Signifikant veränderte Signalwege nach Applikation von DM-Oxa auf BEAS-2B-Zellen. Dargestellt sind die logarithmierten Änderungen nach Applikation von 1  $\mu$ M DM-Oxa und falls zutreffend Induktion mit TGF- $\beta$ 1, IL-4 oder einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Mix). Signifikant (FDR<0.05) veränderte Gene sind farbig markiert. Dargestellt sind Signalwege die mindestens 30 Einträge in der KEGG-Datenbank haben, sofern mindestens fünf der assoziierten Gene im Datensatz nach Applikation von DM-Oxa signifikant verändert sind.

Es wird sichtbar, dass sich die veränderten Signalwege zwischen beiden Zelllinien unterscheiden. Übereinstimmend ist für beide Linien die Anreicherung der Signalwege „*Protein processing in endoplasmic reticulum*“, „*Estrogen signaling pathway*“ und „*TNF signaling pathway*“ zu erkennen. Dabei sind für das Enrichment der ersten zwei genannten besonders hochregulierte Chaperone verantwortlich wie HSPH1, HSPA4L, HSPA6, HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA1B. Für das Enrichment des TNF-Signalwegs verantwortlich sind hingegen Änderungen in der Expression von insgesamt 23

Genen: EDN1, MMP3, NOD2, CXCL3, CXCL1, IL1B, CX3CL1, BCL3, TRAF1, CCL2, LIF, CSF2, JUNB, SOCS3, IL6, JUN, VCAM1, MAP2K3, FOS, IL18R1, CXCL2, IRF1, CXCL10.

Besonders bei den hochregulierten Genen kann eine starke Übereinstimmung zwischen allen vier betrachteten Stimuli beobachtet werden. Wie bereits mehrfach zuvor aufgefallen ist, sind hierfür hauptsächlich die genannten Chaperone verantwortlich.

#### 4.4.4. Korrelationsnetzwerk zur Identifikation relevanter Transkriptionsfaktoren

Im nächsten Schritt wurde in der Visualisierungssoftware Gephi (Bastian et al. 2009) ein Korrelationsnetzwerk aus allen zuvor identifizierten mRNA erstellt (Abbildung 54). So können co-regulierte Gene identifiziert werden, da angenommen wird, dass sich diese über alle Konditionen gleich verhalten. Diese Analyse ermöglicht daher, selektive Effekte, die allein durch DM-Oxa Behandlung verursacht werden, herauszustellen. Zur Korrelationsanalyse wurden ausschließlich Transkripte verwendet, die in allen Proben gemessen werden konnten. Nach *median-of-ratios* Normierung der Count-Daten wurden Duplikate gemittelt (Love et al. 2014). Pro Zelllinie waren somit acht Intensitäten verfügbar (drei Induktionen, uninduziert, jeweils mit und ohne DM-Oxa-Behandlung). Transkripte die globale Veränderungen gezeigt haben wurden durch eine ANOVA identifiziert und weiter berücksichtigt. Für jedes Transkript wurden pro Zelllinie z-Scores der Transkriptintensitäten bestimmt. Dafür wurde für jedes Transkript der Mittelwert der Intensitäten auf 0 und deren Standardabweichung auf 1 gesetzt. Anschließend wurden die beiden skalierten Signale in einen finalen Vektor geschrieben. Aus den 6.139 verbliebenen Transkript-Vektoren konnte so eine Korrelationsmatrix erstellt werden, die auf paarweisen Pearson-Korrelationskoeffizienten beruht (Pearson 1895). Für die Erstellung eines so genannten Gen-Co-Expressions-Netzwerks muss ein Schwellenwert einer minimalen Korrelation bestimmt werden, damit ein echtes, modulares Netzwerk gebildet werden kann (Barabási and Bonabeau 2003). Zwischen Transkript-Paaren, die eine höhere Korrelation bzw. niedrigere Anti-Korrelation aufweisen, wird im Netzwerk eine Kante gezeichnet. Transkript-Paare, deren Korrelation niedriger ist erhalten keine Verbindung, da deren Ähnlichkeit im Expressionsprofil zu gering ist. Der Korrelations-Schwellenwert wurde mithilfe der *random matrix theory* auf 0,925 festgelegt (Luo et al. 2007; Venn et al. 2022). Die entstandenen Knoten (Transkripte) und Kanten (Verbindungen durch hohe (Anti-) Korrelation) wurden anschließend in die Netzwerk-Visualisierungssoftware Gephi geladen und ForceAtlas2 als Layoutalgorithmus verwendet (Jacomy et al. 2014; Bastian et al. 2009).

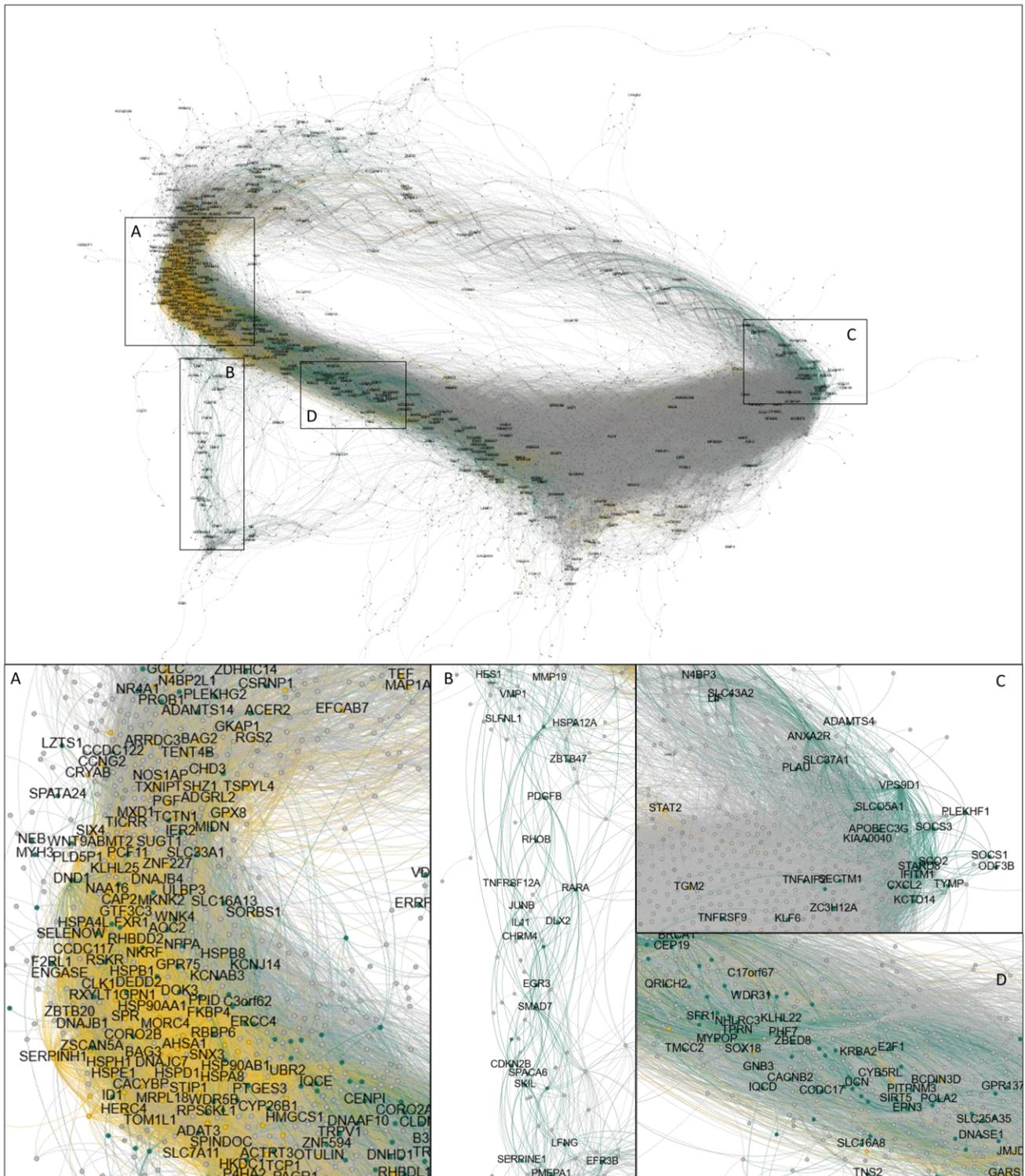


Abbildung 54 Korrelationsnetzwerk normierter Transkriptdaten. Die Korrelationen nach Pearson wurde paarweise für alle normierten Transkript-Daten berechnet und das entstandene Netzwerk in Gephi visualisiert (Bastian et al. 2009; Jacomy et al. 2014). Die Knotengröße wurde aufgrund des Counts aus der STITCH Datenbank bestimmt (STITCH-Count: Anzahl der Verbindungen, die das Gen als Target haben, berücksichtigt wurde nur Einträge mit einer Konfidenz > 0,8). Große Knoten weisen somit auf bereits bekannte Targets hin. Durch statistische Tests zwischen Proben ohne und mit DM-Oxa-Behandlung konnten DEG für jede Zelllinie und Induktion identifiziert werden. Insgesamt gibt es acht solcher Vergleiche (Zwei Zelllinien und vier Stimulationen). Transkripte, die in mindestens drei von acht Vergleichen verändert waren, wurden grün (in Oxa Proben runterreguliert), bzw. gelb (in Oxa Proben hochreguliert) eingefärbt. Einige Bereiche sind zur besseren Visualisierung größer dargestellt.

Um zu untersuchen, welche Transkriptionsfaktoren unter den eingefärbten Knoten überrepräsentiert sind, wurden Enrichment-Analysen durchgeführt. Als Background wurden dazu alle im Netzwerk vorhandenen Transkripte genutzt. Informationen zu durch Transkriptionsfaktoren regulierten Genen wurde die Datenbank TFLink verwendet, die kuratierte Informationen über Transkriptionsfaktor-Zielgen Interaktionen enthält (Liska et al. 2022). Durch diese Vorgehensweise konnten elf Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Tabelle 7). Drei der Transkriptionsfaktoren können dem AP-1 Komplex zugeordnet werden (JUN, JUND, FOS), einem zentralen Transkriptionsfaktor des TNF-Signalwegs. Zusätzlich fällt auf, dass zwei Proteine des SMAD-Komplexes (SMAD3 und SMAD4) als möglicherweise beteiligte Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden. Der SMAD-Komplex wird durch Applikation von TGF- $\beta$  aktiviert. Die von diesem Komplex regulierten Gene scheinen durch DM-Oxa gesammelt beeinflusst worden zu sein. Nur zwei der gefundenen Transkriptionsfaktoren sind auch nach Berücksichtigung des multiplen Testens signifikant verändert (FDR<0,05). Diese sind FOXO3 und ETS2.

Tabelle 7 Transkriptionsfaktoren, die durch Analyse co-regulierter DEG identifiziert wurden. Fett markierte sind FDR <0,05

<b>Name</b>	<b>p-Wert</b>
<b>ETS2</b>	<b>0.0002</b>
<b>FOXO3</b>	<b>0.0013</b>
SMAD4	0.0038
SMAD3	0.0092
JUND	0.0093
HDAC1	0.0126
FOXO1	0.0152
KLF6	0.0241
TP73	0.0246
FOS	0.0277
JUN	0.0469

Die Aktivierung verschiedener Kinasen, z.B. ERK oder AKT, kann zu einer Aktivierung von FOXO3 führen. Es reguliert grundlegende Prozesse wie Apoptose, Autophagie und Seneszenz über teilweise noch unbekannte Mechanismen (Brunet et al. 1999; Stefanetti et al. 2018). Eine verringerte Aktivität des Transkriptionsfaktors FOXO3 steht in Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferationsrate und Fibrose (Al-Tamari et al. 2018).

FOXO3 reguliert außerdem die Aktivität des ebenfalls zentralen Transkriptionsfaktors MYC: Wird FOXO3 phosphoryliert, so induziert es die Expression bestimmter Mikro-RNA (miRNA-34a-c), die wiederum zu einer erhöhten Aktivität von MYC führen (Kress et al. 2011; Kalfert et al. 2020). Bereits in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Expression von z.B. miRNA-34a durch Oxa induziert werden kann (Jung 2012). MYC ist an der Regulation von bis zu 15 % aller menschlichen Gene beteiligt (Dang et al. 2006). Einige davon wurden auch im vorliegenden Expressionsnetzwerk

signifikant reguliert. Anteilig an der Anzahl der gefundenen mRNA die durch diesen Transkriptionsfaktor reguliert werden könnten, wurde die MYC beeinflusste Genexpression nicht als signifikant verändert identifiziert.

ETS2 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der in essenzielle zelluläre Prozesse involviert ist. Durch Regulation der Genexpression beeinflusst ETS2 die Angiogenese, Apoptose sowie Zelldifferenzierung und -proliferation (Fry and Inoue 2018). Es wurde nachgewiesen, dass ETS2 mit dem zentralen Transkriptionsfaktor AP-1 interagiert (Basuyaux et al. 1997). Nach TGF- $\beta$  Induktion konnte gezeigt werden, dass ETS2 die Expression von JUNB induziert und so die EMT fördert (Yao et al. 2020). Aktiviert wird ETS2, wie auch FOXO3 durch den MAPK Signalweg über ERK (Foulds et al. 2004).

#### 4.5. Einfluss von DM-Oxa auf das Proteom

Nach der vorhergehenden Analyse der Auswirkungen von DM-Oxa auf das Transkriptom sollte als nächstes die Änderung des Proteoms durch DM-Oxa in TGF- $\beta$ 1 induzierten BEAS-2B-Zellen analysiert werden. Die globale Analyse der Änderungen im Proteom nach Applikation von DM-Oxa soll Aufschluss über mögliche Zielproteine aber auch den *mode-of-action* des Moleküls geben. Zudem können die Änderungen auf mRNA-Ebene, mit denen auf Proteom-Ebene verglichen werden. Von einer Korrelation zwischen Transkriptmenge und Proteinmenge kann außerdem nicht zwingend ausgegangen werden (Bauernfeind and Babbitt 2017; Liu et al. 2016).

BEAS-2B-Zellen wurden ausgesät und bei Erreichen von 70 % Konfluenz das Vollmedium durch Minimalmedium ersetzt. Nach weiteren 16-20 h wurde das Medium durch Minimalmedium mit 1  $\mu$ M DM-Oxa ersetzt. Nach einer Stunde wurden zusätzlich 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne DM-Oxa und Stimulation und Zellen die nur mit TGF- $\beta$ 1 behandelt wurden. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit den mRNA-Sequenzierungsdaten zu erreichen, wurden die Zellen eine Stunde länger mit DM-Oxa inkubiert (hier insgesamt 7 h, vorher insgesamt 6 h). Eine vergleichende Analyse zu Änderungen im Transkriptom und Proteom in Säugetierzellen nach Stressinduktion zeigte, dass Änderungen im Proteom etwas später auftreten als im Transkriptom (Cheng et al. 2016).

##### 4.5.1. Vorbereitung und Qualität der Daten

Die Analyse der Rohdaten aus der datenunabhängigen Akquisition erfolgte mithilfe der Software DIA-NN, die dazu tiefe neuronale Netzwerke nutzt sowie Methoden zur Korrektur von Signalerfassung und Quantifizierung enthält (Demichev et al. 2020). Die so erhaltenen Quantifizierungsdaten wurde über eine *median-of-ratios* Normalisierung angeglichen (Love et al. 2014).

Wie bereits bei der Transkriptomanalyse, wurde auch für die Proteom-Daten die Reproduzierbarkeit der Replikate durch eine Hauptkomponentenanalyse gezeigt. Diese zeigt drei abgrenzbare Gruppen, die aus den vier Replikaten der unbehandelten Zellen, der TGF- $\beta$ 1 behandelten und der zusätzlich mit DM-Oxa behandelten Zellen bestehen. Am stärksten abgegrenzt finden sich die mit DM-Oxa behandelten Zellen.

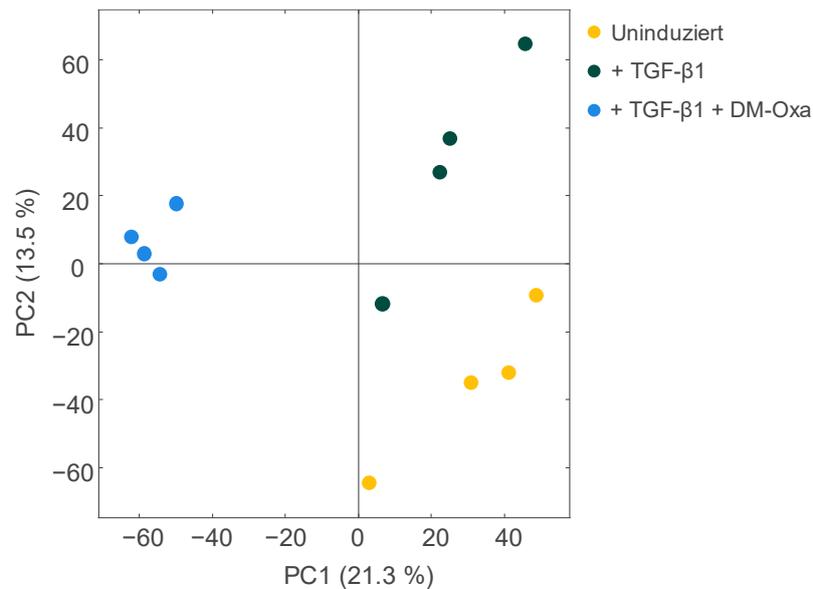


Abbildung 55 Hauptkomponentenanalyse aller gemessener Proben für BEAS-2B nach Applikation von DM-Oxa. Die PCA erfolgte mittels Singulärwertzerlegung (SVD). Dargestellt sind die Replikate der uninduzierten, mit TGF-β1 induzierten sowie der zusätzlich mit 1 μM DM-Oxa behandelten Zellen. PC1 und PC2 beschreiben die Hauptkomponenten durch die prozentual die höchste Varianz erklärt wird.

Es folgte eine permutationsbasierte Signifikanzanalyse (Tusher et al. 2001). Dabei wurde zunächst die Änderung zwischen uninduzierten und TGF-β1 induzierten Zellen analysiert. So wurde die erfolgreiche Induktion mit TGF-β1 überprüft. Dazu wurden nachweislich durch TGF-β hochregulierte Proteine betrachtet. So konnte eine signifikante Induktion detektiert werden (Abbildung 56).

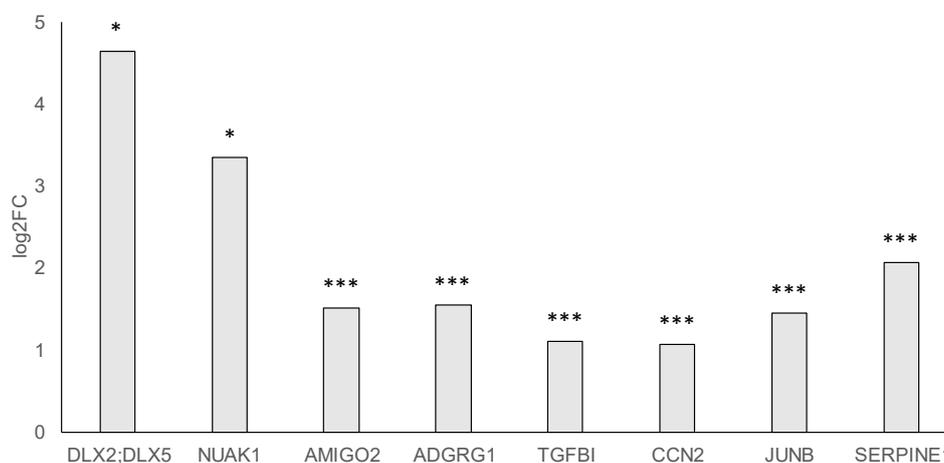


Abbildung 56 Überprüfung der Induktion. Relative Änderung in der Abundanz ausgewählter Proteine nach Behandlung mit TGF-β1 in BEAS-2B-Zellen im Vergleich zu unbehandelten BEAS-2B-Zellen. Sternchen implizieren die FDR mit \* $<0,05$ , \*\*\* $<0.001$ . Die ausgewählten Proteine werden nachweislich durch TGF-β1 beeinflusst (van de Vis et al. 2021; Yilmaz et al. 2011; D'Souza et al. 2014; Hsiao et al. 2021; Thapa et al. 2007; Nakerakanti et al. 2011; Massagué and Wotton 2000; Jiang et al. 2020).

Die erfolgreiche Induktion der Zellen ermöglicht die weitere Analyse der Daten und den Vergleich mit den zuvor erhobenen mRNA-Daten für TGF-β1 induzierte BEAS-2B-Zellen.

#### 4.5.2. Identifikation signifikant veränderter Proteine

Nachdem eine Induktion durch das Zytokin TGF- $\beta$ 1 gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt eine weitere SAM-Analyse zur Identifikation von signifikant veränderten Proteinen durchgeführt. Dazu wurden induzierte Zellen mit denen verglichen, die zusätzlich mit 1  $\mu$ M DM-Oxa behandelt wurden (Abbildung 57). So konnten aus 8830 identifizierten Proteinen 712 signifikant runter- und 577 signifikant hochregulierte Proteine gefunden werden. Am signifikantesten hochreguliert sind die Proteine HSPA1A;HSPA1B, DNAJB1, BAG3, HSPH1 und CENPF. Wie bereits im vorhergehenden Experiment stechen auch hier unter den hochregulierten Proteinen einige Chaperone bzw. Hitzeschockproteine heraus (HSPA1A;HSPA1B, DNAJB1, HSPH1). Am signifikantesten runterreguliert sind CDK11B, FASN, JAK1, SERPINE1 und NR3C1.

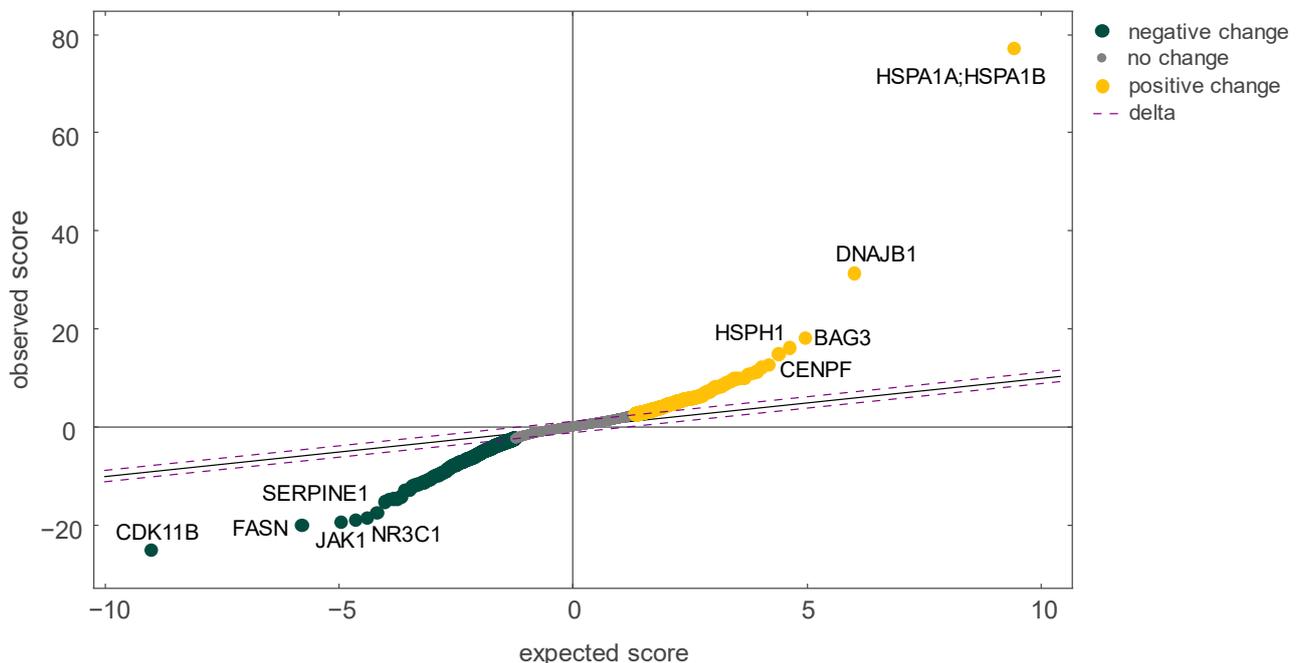


Abbildung 57 Permutationsbasierte Signifikanzanalyse aller gemessenen Proteine. Verglichen wurden die Intensität aller identifizierten Proteine ohne und mit Behandlung durch DM-Oxa in TGF- $\beta$ 1 induzierten BEAS-2B-Zellen. Signifikant hoch- bzw. runterregulierte Proteine mit  $q < 0,05$  sind farbig markiert.

Neben den signifikantesten wurde auch die Proteine betrachtet, die die stärkste Abundanz-Änderung nach Applikation von DM-Oxa zeigen (Abbildung 58). Unter den am stärksten hochregulierten Proteinen finden sich auch hier einige Chaperone, wie HSPA1L, HSPA1A;HSPA1B, HSPA6, DNAJB1 und das Co-Chaperon BAG3.

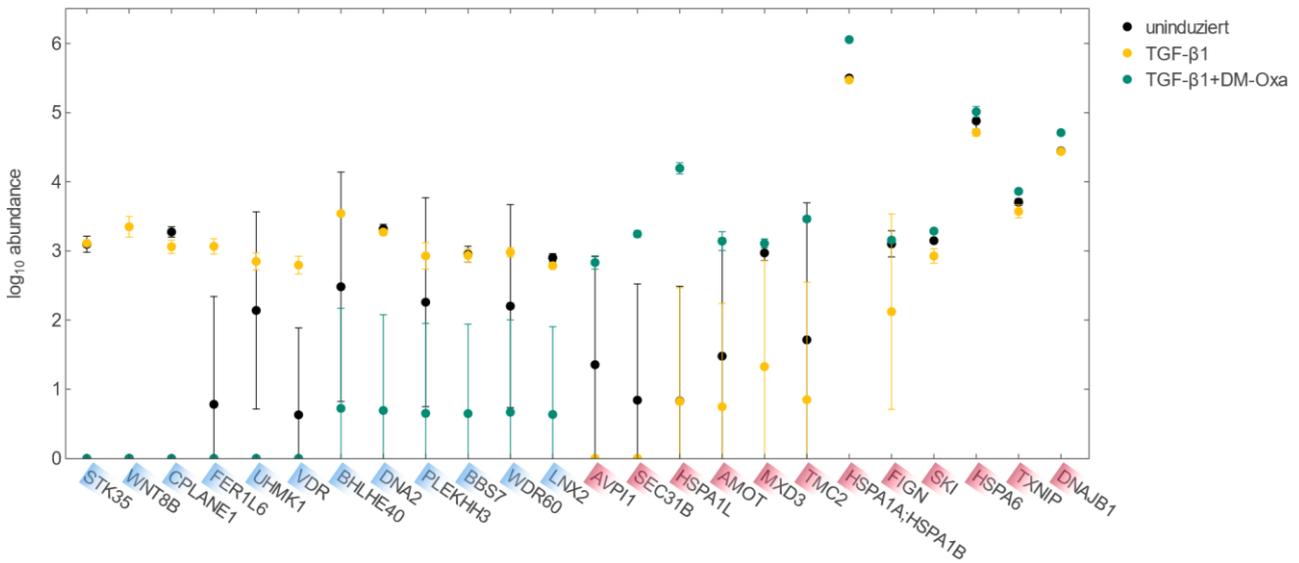


Abbildung 58 Abundanz der am stärksten durch DM-Oxa regulierten Proteine. Für die zwölf am stärksten runter (blau, links) bzw. hoch (rot, rechts) regulierten Proteine nach Applikation von 1 µM DM-Oxa ist zusätzlich die Abundanz ohne Induktion sowie nach Applikation von TGF-β1 aufgetragen. Fehlerbalken implizieren die Standardabweichung zwischen den vier Replikaten. Werte sind angegeben als dekadischer Logarithmus der Abundanz.

#### 4.5.3. Angereicherte Signalwege nach DM-Oxa Behandlung

Von allen signifikant hoch- bzw. runterregulierten Proteinen wurde nachfolgend ein Ontologie-Enrichment durchgeführt. Dazu wurde wie zuvor die KEGG-Ontologie verwendet und nur physiologische Signalwege berücksichtigt (Abbildung 59).

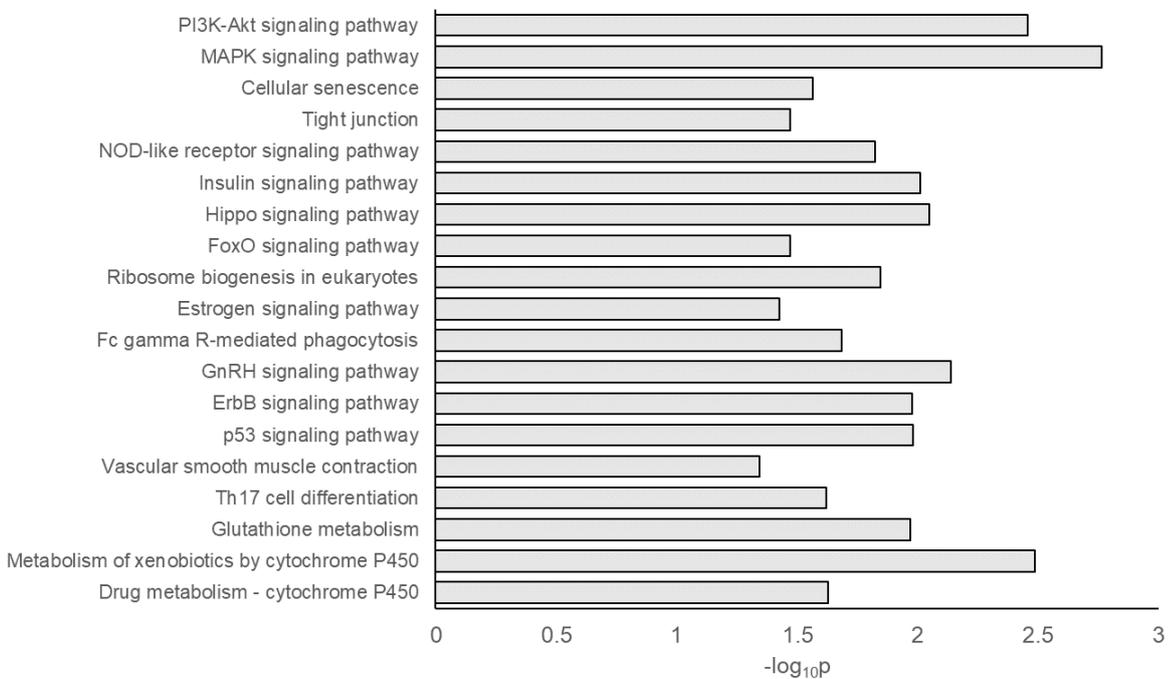


Abbildung 59 Signifikant angereicherte Signalwege nach Applikation von DM-Oxa auf TGF-β1 induzierte BEAS-2B-Zellen. Dargestellt sind Signalwege nach KEGG-Ontologie, die in Proteom-Daten signifikant angereichert sind. Als Input dienten alle nach Oxa Behandlung von TGF-β1 induzierten BEAS-2B signifikant regulierten Proteine. Berücksichtigt wurden nur physiologische Signalwege mit mindestens 30 Einträgen und mindestens fünf signifikant veränderten Proteinen.

Am signifikantesten angereichert zeigt sich hier der MAPK-Signalweg. Für diesen Signalweg wurden 38 Proteine durch DM-Oxa Behandlung differenziell reguliert. Die regulierten Proteine sind MKNK1, STK4, JUND, HSPA6, CRKL, MAPK14, PAK2, HSPA1L, HSPA8, HSPB1, EPHA2, RAF1, PDGFRB, MAP4K4, MET, EGFR, ERBB2, IGF1R, ARAF, MAP3K6, IKBKB, JUN, TGFBR1, FGFR1, MAP3K4, MAP2K3, AKT1, MAP4K3, TGFBR2, TAOK1, NF1, TAOK2, MAP3K2, MYD88, MAP3K11, CHUK, MAP2K1, IRAK1. Neben zahlreichen MAP-Kinasen finden sich auch hier wieder Hitzeschockproteine wie HSPA6, HSPA1L und HSPA8.

#### 4.6. Vergleichende Betrachtung von Transkript- und Proteom-Daten

Die zuvor gesammelten Proteom- und mRNA-Daten für TGF- $\beta$ 1 induzierte BEAS-2B-Zellen nach DM-Oxa Behandlung werden im folgenden Abschnitt vergleichend analysiert.

Zunächst wurden die signifikant veränderten Gene bzw. Proteine verglichen, da eine signifikante Regulation auf mRNA-Basis nicht zwingend auch eine signifikante Regulation auf Proteinebene zur Folge hat. Für beide Datensätze wurden zuvor die 10-12 am stärksten regulierten Gene bzw. Proteine dargestellt. Teilweise stimmen die am stärksten veränderten Proteine mit den am stärksten regulierten mRNA überein (vgl. Abbildung 58 und Abbildung 51). Die am stärksten runterregulierten Proteine zeigen hingegen keine Übereinstimmung zu den mRNA-Daten. Betrachtet man allerdings die Gesamtheit der signifikant hoch- bzw. runterregulierten Gene/Proteine zeigt sich dennoch eine hohe Übereinstimmung. Insgesamt wurde von ca. der Hälfte aller signifikant hochregulierten Proteine auch die entsprechende mRNA signifikant hochreguliert. Von ungefähr einem Viertel aller signifikant runterregulierten Proteine ist auch die entsprechende mRNA signifikant runterreguliert (Abbildung 60).

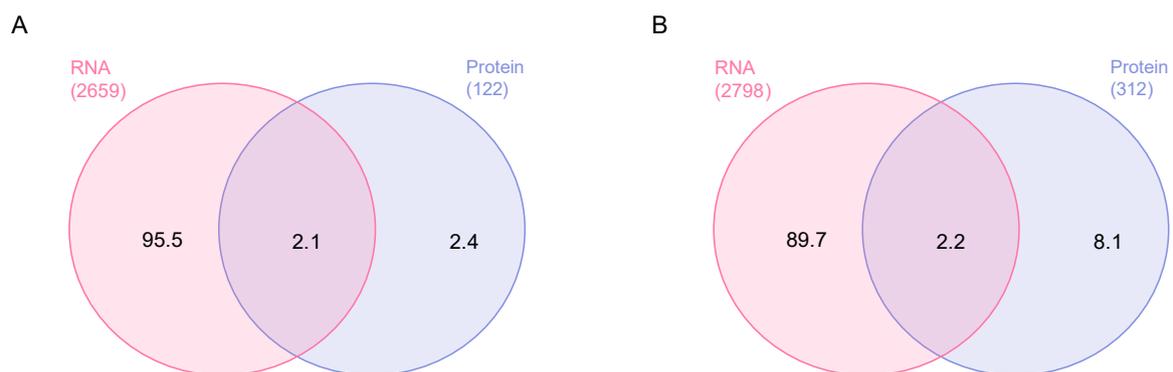


Abbildung 60 Übereinstimmung zwischen signifikant hochregulierten (A) bzw. runterregulierten (B) Proteinen und der entsprechenden mRNA. Die Anzahl der insgesamt hoch- bzw. runterregulierten Elemente ist in Klammern angegeben. Die Angaben innerhalb der Diagramme entsprechen den prozentualen Angaben.

Um aus dieser Beobachtung abzuleiten, in welchen Prozessen die Übereinstimmungen zwischen mRNA-Expression und Proteinabundanz besonders signifikant sind, wurden über ein KEGG-Enrichment Signalwege gesucht, deren Komponenten sowohl in mRNA als auch Protein-Daten angereichert sind. Dazu wurden nur Elemente berücksichtigt, die sowohl als mRNA als auch als Protein identifiziert wurden. Diese Analyse zeigt, welche Signalwege durch DM-Oxa am stärksten beeinflusst sind, da sie sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene verändert sind (Abbildung 61).

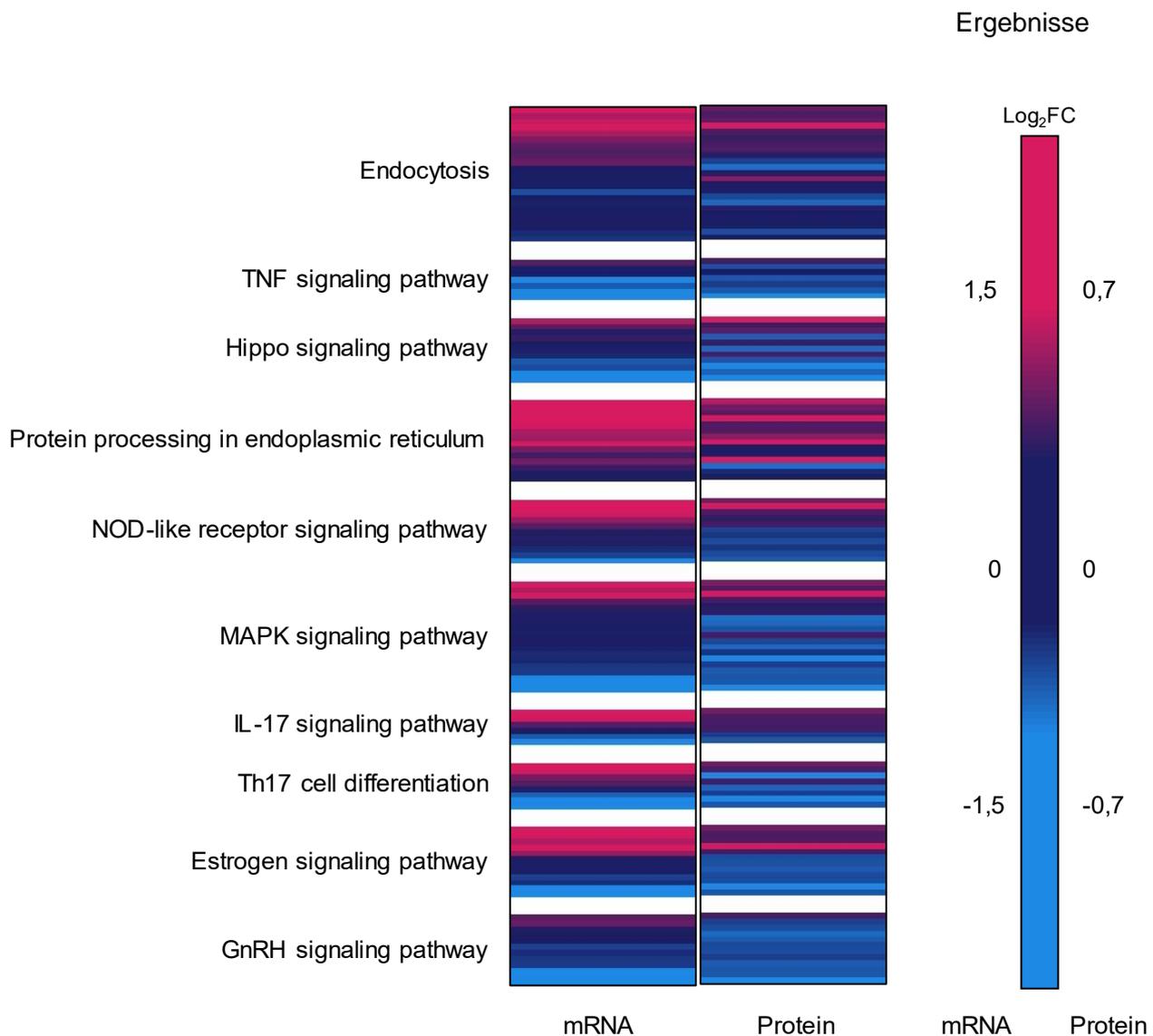


Abbildung 61 Signalwege, die auf mRNA und Proteinebene nach Applikation von DM-Oxa auf BEAS-2B-Zellen signifikant angereichert waren. Die relative Änderung der jeweiligen mRNA bzw. Proteine ist farbcodiert ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ). Dargestellt sind Signalwege nach KEGG-Ontologie die mindestens 30 Einträge haben, sofern mindestens fünf der assoziierten Gene und Proteine im Datensatz nach Applikation von DM-Oxa signifikant verändert sind.

Es zeigt sich, dass auch hier der TNF-Signalweg und die Proteinprozessierung im ER signifikant beeinflusst sind. Des Weiteren wurde auch der MAPK Signalweg sowohl auf Protein- als auch auf transkriptioneller Ebene signifikant beeinflusst.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Zielproteine von Oxacyclododecindion und dessen Derivaten zu finden. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Informationen über bekannte Targets aus der Datenbank STITCH (Kuhn et al. 2008) extrahiert und alle signifikant veränderten mRNA nach den daraus extrahierten Informationen gewichtet. In dieser Datenbank ist die Interaktion zwischen chemischen Verbindungen und deren Targets hinterlegt. Die Gewichtung erfolgte unter der Annahme, dass Gene/Proteine, die häufig Targets sind, auch mit höherer Wahrscheinlichkeit Target für weitere Verbindungen sind. Außerdem zeigt ein STITCH Eintrag für das jeweilige Gen/Protein, dass das betreffende Gen/Protein nachweislich durch Substanzen ansteuerbar ist. Zudem ist bekannt, dass nur in ungefähr 8 % der Fälle die Bindung eines Wirkstoffs an sein Target die

Expression desselben Targets signifikant verändert (Iskar et al. 2010). Häufiger kommt es dazu, dass durch Bindung eines Wirkstoffs an sein Target die Expression naher Interaktionspartner signifikant verändert wird (Isik et al. 2015). So wurde basierend auf dem STITCH-Count (Anzahl der Verbindungen, die das Gen als Target haben) und basierend auf der Anzahl der Konditionen, unter denen ein Gen signifikant verändert war, eine Tabelle erstellt (Tabelle 8 und Tabelle 9). Die Einträge in diesen Tabellen könnten demnach entweder Targets oder aber unmittelbare Interaktionspartner von Targets darstellen. Daten aus der Proteom-Analyse nach Applikation von DM-Oxa auf TGF- $\beta$ 1 induzierte BEAS-2B-Zellen wurde den ausgewählten Einträgen hinzugefügt. Die ungekürzte Tabelle kann im Anhang eingesehen werden.

Auffällig ist auch die Anwesenheit vieler Chaperone wie Hitzeschockproteinen unter den Kandidaten für hochregulierte Targets oder Target-Interaktoren. Insgesamt können zehn Kandidaten zur Kategorie der Proteine gezählt werden, die ungefaltete Proteine binden (GO: „*Unfolded protein binding*“), also beispielsweise Hitzeschockproteine. Zusätzlich finden sich Chaperon-bindende Proteine wie BAG3 oder AHSA1 in der Liste. Unter den Chaperonen auffallend sind dabei besonders HSPA1B und HSPA6, die in allen Konditionen in beiden Zelllinien stark hochreguliert sind. Einige Kandidaten sind nur in einer der Zelllinien stark reguliert, wie beispielsweise das Chaperon CRYAB in HepG2.

## Ergebnisse

Tabelle 8 Analyse möglicher Targets oder Target-Interaktoren, die aufgrund hochregulierter mRNA bzw. Proteine gefunden wurden. Dazu wurden zunächst für uninduzierte, TGF- $\beta$ 1 induzierte, IL-4 induzierte und mit einem Gemisch aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IFN- $\gamma$  (Mix) induzierte Zellen, die nach DM-Oxa Behandlung signifikant hochregulierten Transkriptmengen betrachtet. Waren diese in mindestens zwei Stimuli reguliert und wiesen zusätzlich einen STITCH Count über 25 auf, wurden sie als mögliches Target berücksichtigt (STITCH-Count: Anzahl der Verbindungen, die das Gen als Target haben, berücksichtigt wurde nur Einträge mit einer Konfidenz > 0,8). Gene mit widersprüchlichen Regulationsmustern wurden nicht berücksichtigt. Gene, die in allen acht betrachteten Gruppen, also über beide Zelllinien in induzierten und uninduzierten Zellen runterreguliert wurden, sind unabhängig vom STITCH-Count aufgeführt. Signifikante Hochregulation in Proteinproben aus BEAS-2B, die mit TGF- $\beta$ 1 behandelt wurden, wurde nachträglich eingetragen, hatte jedoch keine Einwirkung auf die Auswahl der potenziellen Targets. Fahne = FDR >0,05 und <0,1. Die Farbskala gibt die relative Veränderung an (*fold change*, FC), je intensiver die Farbe, desto stärker ist die relative Änderung. Eine Farbänderung ist nur für signifikant veränderte Expressionen/Abundanz mit FDR<0,05 angegeben. Da Transkriptmengen eine deutlich stärkere Änderung erfahren als Proteinmengen, muss für eine Farbänderung der Transkriptmenge mindestens eine Verdopplung zutreffen ( $\log_2FC=1$ ). Bei Proteinmengen reicht eine geringere Abundanzänderung von 10 % für eine farblicher Markierung ( $\log_2FC=0,138$ ).

StitchCount	ID	BEAS-2B				Prot. TGF- $\beta$ 1	HepG2			
		Uninduziert	TGF- $\beta$ 1	IL-4	Mix		Uninduziert	TGF- $\beta$ 1	IL-4	Mix
1289	AGTR1									
477	HSP90AA1									
472	HMOX1									
406	S1PR1									
317	PDE4B									
152	ACKR3									
113	TXNRD1									
98	RGS2									
90	HSP90AB1									
89	UBB									
88	AKR1B10									
83	DUSP1									
79	HSPB1									
78	FGFR2									
77	HSPA8									
74	AKR1C1									
66	UBC									
63	CTH									
60	PDE3A									
52	SPR									
52	AKR1C2									
50	PSMC1									
46	HSPA1B									
45	TGM2					▶				
44	FAXDC2									
42	CACNA1G									
42	HPD									
34	FKBP4									
32	PGF									
26	HSPA6									
14	DNAJB1									
14	HSPH1									
12	DEDD2									
9	CRYAB									
6	STIP1									
6	HSPD1									
6	DNAJB4									
2	HSPA4L									
2	BAG3									
2	HSPB8					▶				
0	AHSA1									
0	HSPE1					▶				
0	ACTRT3									

RNA 1   $\geq 4$

Protein 0,138   $\geq 1$

Auch für runterregulierte Proteine wurden Kandidaten als Target oder direkte Target-Interaktoren gefunden. Dabei wird im Vergleich deutlich, dass die Veränderung der runterregulierten Kandidaten durchschnittlich schwächer ausfällt als für die der hochregulierten Kandidaten.

Tabelle 9 Analyse möglicher Targets oder Target-Interaktoren, die aufgrund runterregulierter mRNA bzw. Proteine gefunden wurden. Dazu wurden zunächst für uninduzierte, TGF-β1 induzierte, IL-4 induzierte und mit einem Gemisch aus TNF-α, IL-1β, und IFN-γ (Mix) induzierte Zellen, die nach DM-Oxa Behandlung signifikant runterregulierten Transkriptmengen betrachtet. Waren diese in mindestens zwei Stimuli reguliert und wiesen zusätzlich einen STITCH Count über 25, wurden sie als mögliches Target berücksichtigt (STITCH-Count: Anzahl der Verbindungen, die das Gen als Target haben, berücksichtigt wurde nur Einträge mit einer Konfidenz > 0,8). Gene mit widersprüchlichen Regulationsmustern wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Gene, die in allen acht betrachteten Gruppen, also über beide Zelllinien in induzierten und uninduzierten Zellen runterreguliert wurden, sind unabhängig vom STITCH-Count aufgeführt. Signifikante Hochregulation in Proteinproben aus BEAS-2B, die mit TGF-β1 behandelt wurden, wurde nachträglich eingetragen, hatte jedoch keine Einwirkung auf die Auswahl der potenziellen Targets. Die Farbskala gibt die relative Veränderung an (*fold change*, FC), je intensiver die Farbe, desto stärker ist die relative Änderung. Eine Farbänderung ist nur für signifikant veränderte Expressionen/Abundanz mit FDR<0,05 angegeben. Da Transkriptmengen eine deutlich stärkere Änderung erfahren als Proteinmengen, muss für eine Farbänderung der Transkriptmenge mindestens eine Halbierung zutreffen (log<sub>2</sub>FC=1). Bei Proteinmengen reicht eine geringere Abundanzänderung von 10 % für eine farblicher Markierung (log<sub>2</sub>FC=-0,138).

StitchCount	ID	BEAS-2B					HepG2			
		Uninduziert	TGF-β1	IL-4	Mix	Prot TGF-β1	Uninduziert	TGF-β1	IL-4	Mix
596	TRPV1									
500	ADRA1D									
483	FOS									
464	EGFR									
447	CYP1A1									
376	CHRM4									
271	PLAU									
182	VDR									
176	ADCY3									
167	GRM4									
156	CCR7									
156	CXCL2									
156	CXCL9									
152	CXCL11									
152	CXCL3									
138	EGR1									
134	F3									
92	P2RY6									
74	QRFP									
66	NR4A1									
60	VIPR1									
58	TYMP									
57	IDO1									
52	AOC2									
51	ATF3									
48	EPHA2									
43	GDF15									
43	RARA									
37	AANAT									
35	SOCS3									
32	HBEGF									
32	POLA2									
32	GADD45A									
30	CACNB2									
29	ANGPTL4									
27	PDGFB									
26	RHOB									
26	HAMP									
26	GP1BA									
26	SLC6A19									
16	ID1									
8	WNK4									
2	JUNB									

RNA ≤ -3  -1

Protein ≤ -1  -0,138

Fast alle Kandidaten können der Kategorie der Protein-bindenden Proteine zugeordnet werden (31 von 43, GO: „*Protein binding*“). Darunter können 15 Kandidaten in die funktionale Gruppe der rezeptor-bindenden Proteine (GO: „*signaling receptor binding*“) eingeordnet werden, dazu gehören beispielsweise die Zytokine CXCL11, CXCL3, CXCL9 und CXCL2.

Außerdem sind auch hier Kandidaten sichtbar, deren Änderung bzw. Detektion stark abhängig von der Zelllinie ist, wie CYP1A1 für HepG2 und EPHA2 für BEAS-2B.

Besonders auffällig unter den runterregulierten Kandidaten sind EGR1, ID1 und JUNB, die in allen betrachteten Konditionen und Zelllinien signifikant verändert sind. Deren Protein-Abundanz wurde auch in TGF- $\beta$ 1 induzierten BEAS-2B-Zellen durch DM-Oxa Behandlung signifikant runterreguliert. Sie können daher als Kandidaten für potenzielle Zielproteine angesehen werden.

JUNB ist Teil des AP-1 Transkriptionsfaktors, dessen Relevanz bereits zuvor beschrieben wurde (Abbildung 4).

EGR1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Entstehung von Fibrose eine Rolle spielt. Dabei reguliert EGR1 die TGF- $\beta$  induzierte Genexpression über einen SMAD-unabhängigen Weg (Bhattacharyya et al. 2011). Die Regulation dieses Proteins erfolgt nicht durch Modifikation, sondern auf transkriptioneller Ebene, was Änderungen in der mRNA und Proteinabundanz besonders relevant macht.

ID1 ist ein sogenanntes helix-loop-helix Protein, welches Heterodimere mit bestimmten Transkriptionsfaktoren bildet, die Ebenfalls zur helix-loop-helix Kategorie gehören. Da ID1 selbst keine DNA-Bindedomäne enthält, kann es so deren Bindung an die DNA verhindert (Benezra et al. 1990). Es gibt zudem eine direkte Verbindung zwischen der Aktivität des Transkriptionsfaktors ID1 und MYC, welches ebenfalls ein helix-loop-helix Protein ist: Bei Knockdown von MYC wurde auch eine Runterregulation von ID1 beobachtet, bei Knockdown von ID1 ein verringertes MYC-Level, was für einen Feedback-Mechanismus spricht (Sharma et al. 2016). Passend dazu wird MYC, wie bereits zuvor beschrieben (Abschnitt 4.4.4), auch durch FOXO3 negativ beeinflusst.

#### 4.7. Co-Immunpräzipitation mit HSP90

Sowohl in Pulldown-Versuchen als auch in der Analyse von mRNA und Proteom Daten konnte das Hitzeschockprotein HSP90 übereinstimmend gefunden werden. Daher wurde im Folgenden versucht, dieses Protein als mögliches Targetprotein von DM-Oxa zu analysieren. Dazu wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Nach Lyse der BEAS-2B-Zellen wurden die Zellextrakte zu magnetischen Beads gegeben, die kovalent mit HSP90 Antikörpern funktionalisiert waren. Die nach dem Waschen eluierten Proteine wurden dann in Lösung durch Proteasen verdaut und für die Messung im Massenspektrometer vorbereitet. Die Analyse der Rohdaten aus der datenunabhängigen Akquisition erfolgte wie zuvor mithilfe der Software DIA-NN. Die erhaltenen Daten wurden über eine *median-of-ratios* Normalisierung angepasst und Welch-Tests unterzogen. Ziel dieses Versuchs war es, über die veränderte Abundanz von HSP90 Interaktionspartnern eine mögliche Bindung von DM-Oxa an das Protein nachzuweisen. Ist die Interaktion von HSP90 mit anderen Proteinen gestört, beispielsweise durch die Blockade von Bindestellen durch DM-Oxa, würde das zu einer Veränderung assoziierter Signalwege führen. Informationen über bekannte physikalische Interaktionen mit den cytosolischen HSP90 Isoformen HSP90AA1 und HSP90AB1 wurden aus der STRING Datenbank (Szklarczyk et al. 2021) übernommen. In Cytoscape (Shannon et al. 2003) konnte mit Hilfe der STRING Applikation ein Netzwerk erstellt werden, das alle HSP90AA1 und HSP90AB1 Interaktoren zeigt, die durch Oxa-Behandlung signifikant verändert quantifiziert wurden (Abbildung 62). Darunter sind 15 hochregulierte und 85 runterregulierte Proteine.

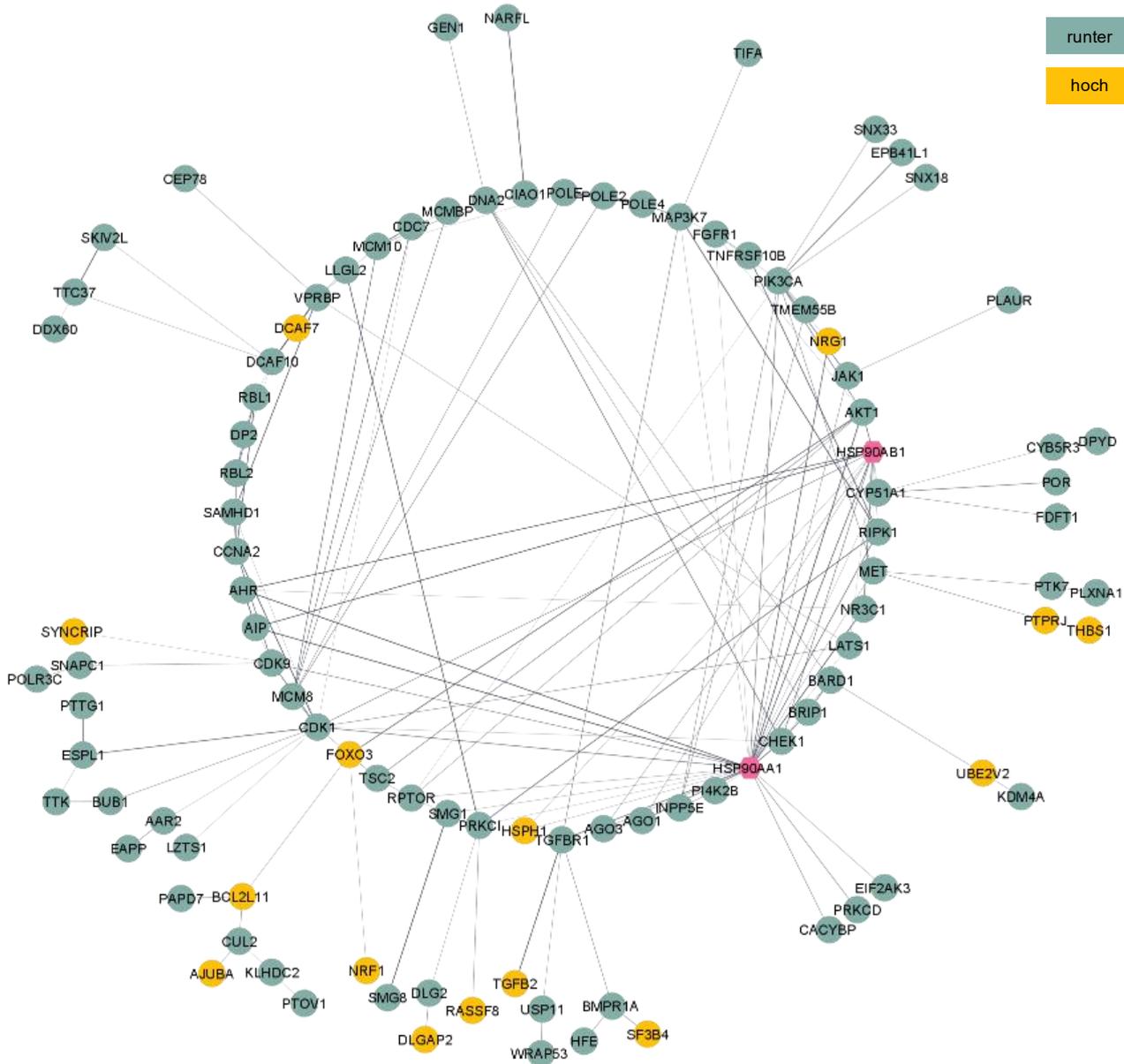


Abbildung 62 Interaktionsnetzwerk von HSP90AA1 und HSP90AB1 und durch Oxa-Behandlung signifikant veränderten Proteinen. BEAS-2B-Zellen wurden in Minimalmedium inkubiert und mit TGF- $\beta$ 1 bzw. mit TGF- $\beta$ 1 und DM-Oxa behandelt. Nach Immunpräzipitation mit HSP90 Antikörpern wurden signifikant veränderte Proteine ( $p < 0,05$ ) auf eine bekannte Interaktion mit HSP90AA1 oder HSP90AB1 abgeglichen. Aus diesen wurde ein Interaktionsnetzwerk erstellt. Hoch- bzw. runterregulierte sind farbig codiert.

Es konnte signifikante Änderungen in HSP90 assoziierten Proteinen detektiert werden. Diese können aufgrund einer Blockade von Bindestellen an HSP90 durch DM-Oxa entstehen. Alternativ könnten Änderungen auch auf eine Aktivierung HSP90 assoziierter Proteine durch Bindung eines Liganden hindeuten.

Insgesamt sind 24 der signifikant veränderten Proteine Kinasen: AKT1, BMPR1A, BUB1, CDC7, CDK1, CDK9, CHEK1, DLG2, EIF2AK3, FGFR1, JAK1, LATS1, MAP3K7, MET, PI4K2B, PIK3CA, PRKCD, PRKCI, PTK7, RIPK1, SMG1, TGFB1, TTK, VPRBP

Insgesamt 11 der 100 Proteine können dem PI3K-AKT Signalweg zugeordnet werden: AKT1, BCL2L11, FGFR1, FOXO3, JAK1, MET, PIK3CA, RBL2, RPTOR, THBS1, TSC2. Damit liegt eine hochsignifikante Anreicherung von Proteinen des PI3K-AKT Signalwegs vor ( $p$ -Wert:  $2,24 \cdot 10^{-6}$ ).

## 4.8. Charakterisierung von Perylenchinonen

### 4.8.1. Isolation und Strukturaufklärung

Neben Oxacyclododecindion wurden weitere aus Pilzen gewonnene Naturstoffe im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Auch diese wurden durch eine phänotypische Suche identifiziert und gehören zur Gruppe der Perylenchinone. Die zu charakterisierenden Perylenchinone werden durch einen Pilz produziert, der aus Pflanzenmaterial des ährigen Christophskraut (*Actaea spicata*) isoliert wurde. Der Pilz zeichnet sich durch eine hellgraue bis weiße Farbe des Luftmycel aus, die sich mit zunehmendem Alter dunkler färbt.

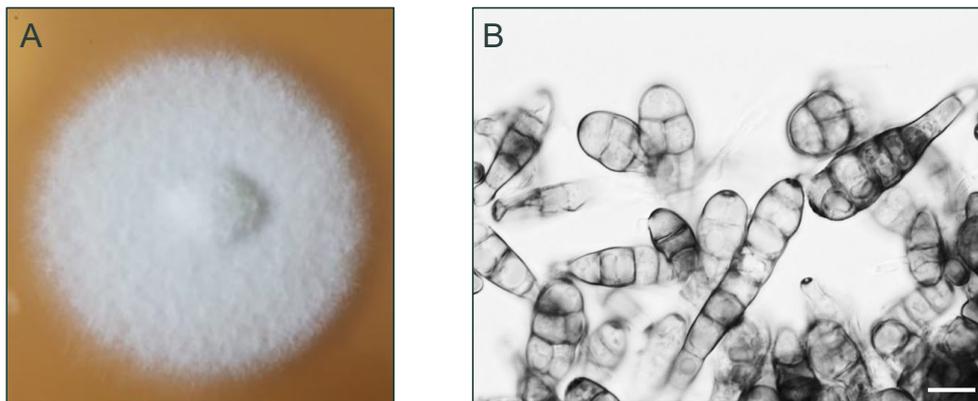


Abbildung 63 Morphologie des Pilzes aus *Actaea spicata*. Der Pilz wächst auf HA-Agar mit weißem Luftmycel (A). Sporenbildung konnte nur nach Induktion durch UV-nahes Licht beobachtet werden. Die Sporenform ist charakteristisch für Pilze der Gattung *Alternaria* (B). Der weiße Balken indiziert 10 µm.

Eine Sporenbildung konnte bei standardmäßiger Kultivierung auf HA-Festmedium bei Raumtemperatur nicht beobachtet werden, aber durch Bestrahlung mit UV-nahem Licht induziert werden. Diese Methode wurde beschrieben, um für Pilze der Gattung *Alternaria* die Sporulation zu induzieren (Wei et al. 1985). Die Form der beobachteten Sporen, birnenförmig mit deutlich sichtbaren Segmentierungen, stimmt ebenfalls mit der für *Alternaria* typischen Form überein (Abbildung 63 B). Die Vermutung, dass der Pilz zur Gattung *Alternaria* gehört wurde durch Sequenzierung des ITS Bereichs (Altschul et al. 1990) und nachfolgendem Abgleich mit der NCBI Datenbank (National Center for Biotechnology Information) bestätigt. So konnte eine 99-100 % Übereinstimmung der DNA-Sequenz mit verschiedenen *Alternaria* Spezies gefunden werden. Die höchste Übereinstimmung zeigte der sequenzierte Bereich mit *Alternaria rosae* und *Alternaria triticina*.

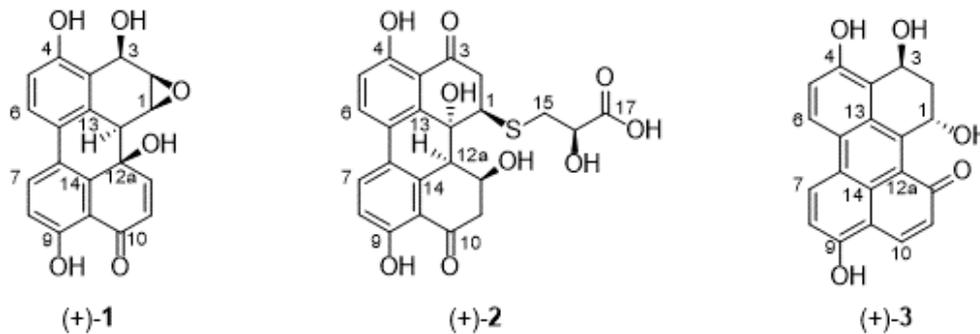


Abbildung 64 Strukturformeln der drei neuen Perylenchinone aus *Alternaria sp.* Die Aufklärung der Struktur erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Till Opatz (Organische Chemie, Johannes Gutenberg Universität Mainz).

Zur Isolation der Substanzen wurde der Pilz in 1 L HA-Flüssigmedium angezogen und eine aktivitätsgeleitete Aufreinigung mittels präparativer HPLC durchgeführt. Dabei wurde die Wirkung des Rohextrakts und der Fraktionen auf die ARE-Aktivität durch Reporterassays untersucht. Dieses Element ist die Bindestelle für Nrf2 und damit essenziell für die Regulation antioxidativer Prozesse. So konnten verschiedene neue Reinsubstanzen isoliert werden (Abbildung 64), die in aktiven

Fraktionen vorlagen. Da Substanz 2 nur in sehr geringer Menge einmalig isoliert werden konnte, waren Folgeexperimente nicht möglich. Substanz 1 und Substanz 3, sowie das ebenfalls aus diesem Pilz isolierte Altertoxin I (ATX-I, Abbildung 65) konnten in ausreichender Menge isoliert und so im folgenden Kapitel charakterisiert werden. Die Strukturaufklärung wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Till Opatz (Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität in Mainz) durchgeführt. Chromatogramme der

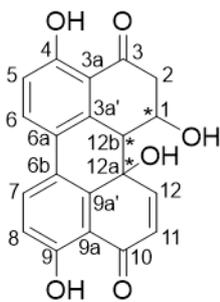


Abbildung 65 Altertoxin I

aufgereinigten Substanzen sowie die jeweiligen Absorptionsspektren sind im Anhang dargestellt.

Alle Substanzen gehören zur Gruppe der Perylenchinone, welche häufig in Pilzen der Gattung *Alternaria* gefunden werden (Geris et al. 2022). Die drei zu charakterisierenden Substanzen zeigen sich als hellgelbes (ATX-I), oranges (Substanz 1) oder rotes (Substanz 3) Pulver.

#### 4.8.2. Biologische Aktivität

##### 4.8.2.10. Zytotoxizität

Um mögliche zytotoxische Effekte durch die Substanzen zu analysieren, wurde ein XTT Zellviabilitäts-Versuch in BEAS-2B-Zellen durchgeführt (Abbildung 66). So kann die Dosis berechnet werden, bei der im Vergleich zur Positivkontrolle nur die Hälfte an viablen Zellen detektierbar ist ( $LC_{50}$ ).

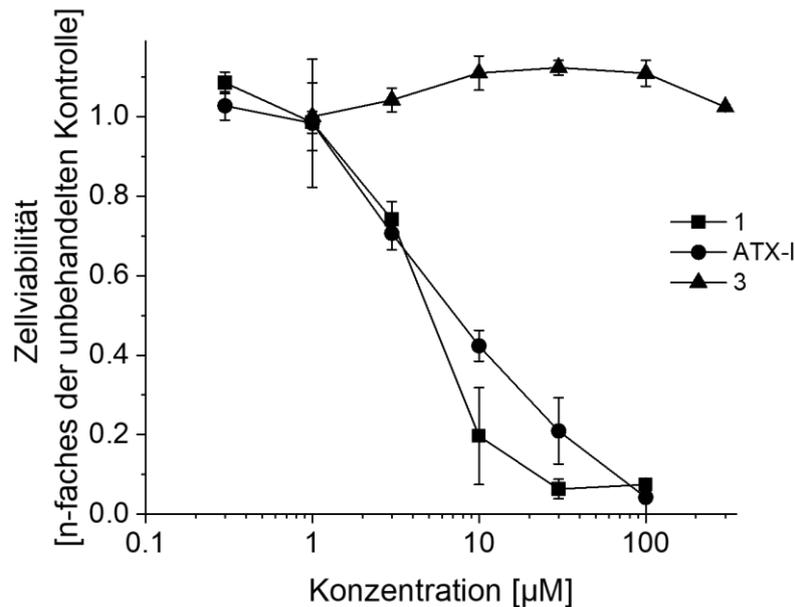


Abbildung 66 Zytotoxische Effekte der Substanz 1, ATX-I und 3 auf BEAS-2B-Zellen. Dazu wurden bis zu 300 µM der jeweiligen Substanzen auf BEAS-2B-Zellen appliziert und für 24 h inkubiert. Danach wurde die Viabilität der Zellen durch Applikation des Mono-Tetrazolium-Salzes XTT gemessen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle, angegeben ist der Mittelwert  $\pm$ SEM von drei unabhängigen Replikaten.

Den stärksten Effekt zeigte dabei die Applikation von Substanz 1 mit einer  $LC_{50}$  von  $3.8 \pm 0.13$  µM. Ähnlich toxisch wirkte ATX-I mit einer  $LC_{50}$  von  $6.43 \pm 0.86$  µM. Keine zytotoxische Wirkung konnte nach Applikation von bis zu 300 µM Substanz 3 festgestellt werden. Höhere Konzentrationen konnten nicht getestet werden, da damit das Löslichkeitsprodukt überschritten wäre.

Da einige Perylenchinone dafür bekannt sind, nach Bestrahlung eine deutlich verringerte  $LC_{50}$  vorzuweisen, wurde dies für die bisher nicht toxisch wirkende Substanz 3 getestet. Eine solche Wirkung könnte auf die Verwendbarkeit der Substanz für die photodynamische Therapie (PDT) hinweisen. PDT ist eine von der FDA anerkannte Methode zur Behandlung verschiedener Krebsarten (Xiao et al. 2018). Dabei wird Patienten eine Substanz verabreicht und nur der abzutötende Bereich bestrahlt. So können gezielt und lokal Krebszellen abgetötet werden, ohne den gesamten Organismus durch eine möglicherweise hoch-toxische Substanz zu belasten. In der Praxis wird dazu Licht verschiedener Wellenlängenbereiche verwendet (UV-Licht, Rotes Licht, Infrarot-nahes Licht) (Baskaran et al. 2018). Im vorliegenden Versuch wurde kurzwelligeres Licht mit Wellenlängen zwischen 315 und 400 nm verwendet, da hier ein Absorptionsmaximum des Moleküls detektiert wurde. Die Eindringtiefe ist in diesem Versuch kein limitierender Faktor. Da die Substanz unter Normalbedingungen keine toxische Wirkung zeigt, wäre es besonders vielversprechend, wenn diese durch Bestrahlung induziert werden könnte.

Um dies zu testen wurden BEAS-2B-Zellen in Vollmedium ausgesät und 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Testsubstanz wurde dann appliziert und nach drei Stunden

Vorinkubation die Bestrahlung durchgeführt. Dies erfolgt für 15 min bei Raumtemperatur. Kontrollen wurden gleichbehandelt aber nicht bestrahlt. Nach Bestrahlung wurden die Zellen für weitere 20 h inkubiert, bevor ein XTT-Zellviabilitäts-Versuch durchgeführt wurde. Nach dieser Behandlung konnte keine Abweichung in der zytotoxischen Wirkung von bestrahlten Zellen im Vergleich zu nicht-bestrahlten Zellen beobachtet werden.

#### 4.8.2.11. Reporter-Genversuche

Da der Rohextrakt des hier beschriebenen Pilzes eine Modulation der ARE-Reporteraktivität bewirkte, wurden die isolierten Reinsubstanzen mit demselben Versuch getestet. So soll gezeigt werden welche Substanzen für die zuvor detektierte Aktivität verantwortlich sind. Das Reporterplasmid pTA-3xARE wurde dazu in BEAS-2B-Zellen transfiziert und die Substanzen appliziert. Nach 24 h wurde die Luciferaseaktivität detektiert. Um die Funktionalität des Versuchs zu zeigen, wurden Zellen mit 1,4-Benzochinon behandelt, welches nachweislich in BEAS-2B die Nrf2 vermittelte Aktivierung des ARE bewirkt (Rubio et al. 2011). Mit 1,4-Benzochinon behandelte Zellen dienen daher in den weiteren Versuchen als Kontrolle. Zudem kann die Hemmung des durch diese Substanz ausgelösten Stresses durch Substanz 3 getestet werden.

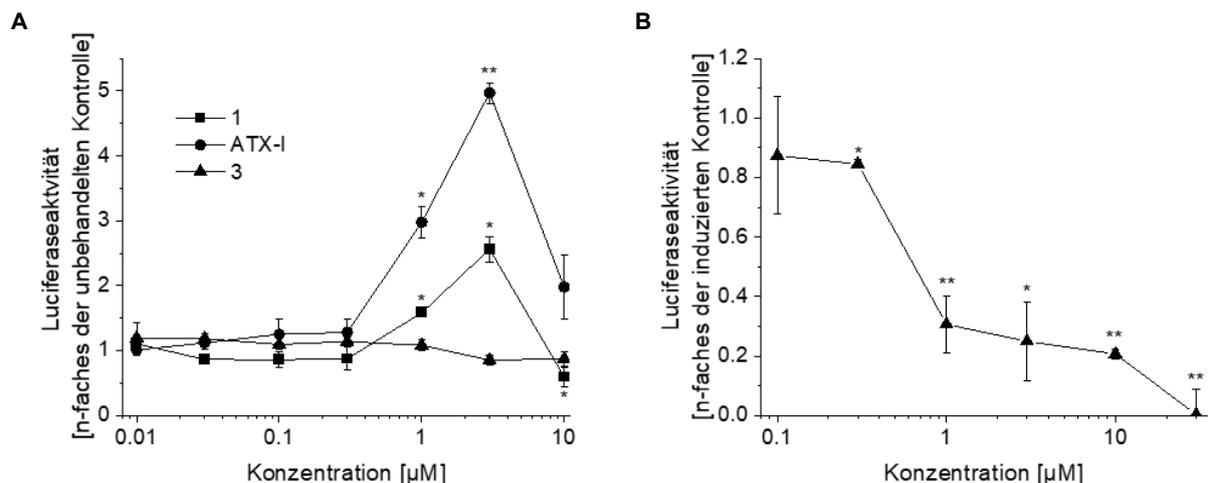


Abbildung 67 Reporter-Genversuche mit pTA-3xARE und den drei isolierten Reinsubstanzen. BEAS-2B wurden zunächst mit dem Reporterplasmid pTA-3xARE transient transfiziert und für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Auslesung der Luciferaseaktivität. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen und mit 30 µM 1,4-Benzochinon behandelte Zellen herangezogen (A). BEAS-2B wurden nach Transfektion mit pTA-3xARE mit 30 µM 1,4-Benzochinon behandelt und für 24 h mit Substanz 3 co-inkubiert, um eine potenzielle antioxidative Wirkung zu erfassen. Als Referenz dienten hier Zellen, die mit 30 µM 1,4-Benzochinon behandelt wurden (B). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$ SEM von drei unabhängigen Replikaten. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$

Die Substanzen 1 und ATX-I bewirken einen signifikanten Anstieg der Luciferaseaktivität ab einer Konzentration von 1 µM (Abbildung 67). Ab einer Konzentration von 10 µM zeigt sich eine deutliche Reduktion der Luciferaseaktivität, welche sich auf zytotoxische Effekte zurückführen lässt. Substanz 3 hingegen bewirkt keine statistisch signifikante Änderung in der Luciferaseaktivität bis zu einer Konzentration von 10 µM. Allerdings ließ sich hier dennoch eine leichte Reduktion der Luciferaseaktivität detektieren, die auf eine mögliche antioxidative Wirkung schließen lässt. Dies

wurde näher untersucht, indem ein weiterer Versuch durchgeführt wurde: Der Reportervektor pTA-3xARE wurde transient in BEAS-2B-Zellen transfiziert und nach 24 h die oxidative Antwort und somit die ARE-Aktivität durch 30  $\mu\text{M}$  1,4-Benzochinon induziert. Gleichzeitig wurde Substanz 3 in aufsteigender Konzentration von 0,1 bis 30  $\mu\text{M}$  appliziert. Nach 24 h zeigte sich, dass die Substanz die Luciferaseaktivität bereits ab einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  signifikant verringert. Bei der maximalen applizierten Konzentration lag die durchschnittliche Luciferaseaktivität bei dem 0,03-fachen der Kontrolle. Als Referenz dienten hier Zellen, die ausschließlich mit 30  $\mu\text{M}$  1,4-Benzochinon behandelt wurde.

Da die Aktivierung des ARE auch über NF- $\kappa\text{B}$  erfolgen kann, wurde eine potenzielle biologische Aktivität zusätzlich auf anti-inflammatorische Signalwege mittels Reporter-Gen-Versuchen überprüft. NF- $\kappa\text{B}$  kann durch verschiedene inflammatorische Signalwege aktiviert werden, hier wurde zur Induktion ein Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  verwendet. Zur Evaluation der NF- $\kappa\text{B}$  Aktivität wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, das den CXCL10 Promotor enthält. Dieser Promotor hat Bindestellen für verschiedene pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren, darunter auch NF- $\kappa\text{B}$  (Jung et al. 2011).

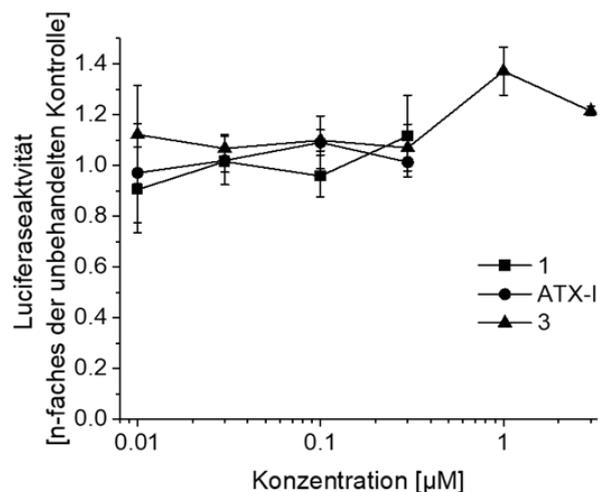


Abbildung 68 CXCL10 Reporteraktivität nach Applikation der drei Perylenchinone aus *Alternaria sp.*. BEAS-2B-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid pgl4.11-IP10pro-Luc transfiziert und für 24 h inkubiert. Die drei Substanzen wurde dann in Minimalmedium mit einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gelöst und zu den Zellen gegeben. Als Referenz dienten Zellen ohne Behandlung und solche, die nur mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  behandelt wurden. Da Substanz 3 keine zytotoxischen Effekte hervorruft, wurde von dieser Substanz bis zu 3  $\mu\text{M}$  appliziert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Replikaten.

Bis zu einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  für die Substanzen 1 und ATX-I bzw. 3  $\mu\text{M}$  konnte kein Hinweis auf eine Inhibition der CXCL10 Reporteraktivität gefunden werden (Abbildung 68). Höhere Konzentrationen von Substanz 1 und ATX-I wurden nicht getestet, da zytotoxische Effekte zu erwarten sind, die die Aussagekraft des Reporter-Gen-Versuchs beeinträchtigen könnten. Durch Substanz 3 konnte eine geringe Induktion der Promotoraktivität erreicht werden.

## 4.8.2.12. Oxidative Wirkung

Da die Reporter-genversuche auf eine Modulation des anti-oxidativen Antwort hindeuteten, sollten diese Effekte mit weiteren Versuchen näher charakterisiert werden. So wurde zunächst der Redox-Status von BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit den drei Perylenchinonen über 2,7-Dichlorhydrofluorescein bewertet (Abbildung 69). Als Vergleichssubstanz wurde hier wie bereits zuvor 30  $\mu$ M 1,4-Benzochinon appliziert.

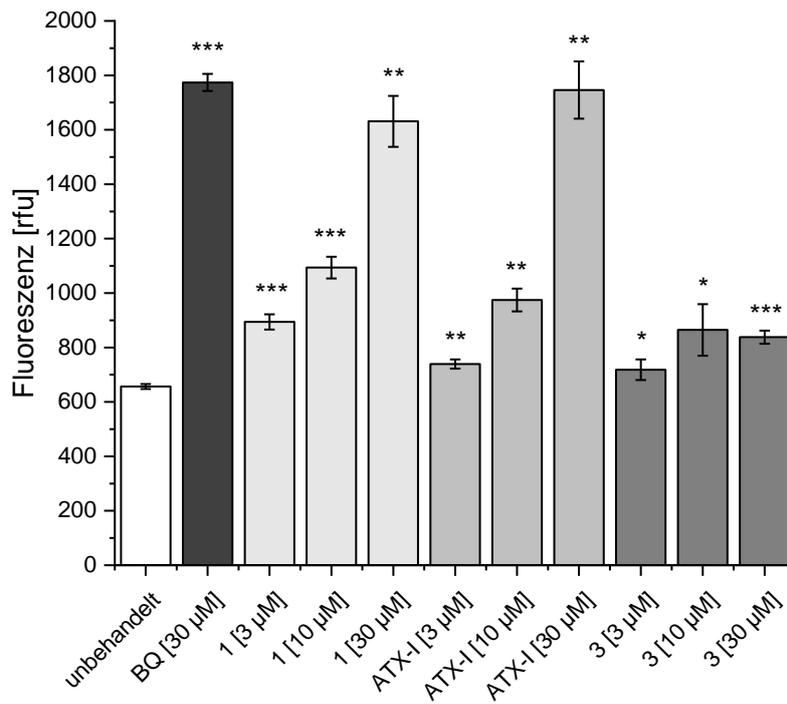


Abbildung 69 Einfluss der drei Perylenchinone aus *Alternaria* sp. auf den Redox-Status von BEAS-2B-Zellen. 2,7-Dichlorhydrofluorescein haltiges Medium wurde auf BEAS-2B-Zellen appliziert. Nach 30 Minuten wurde das Medium durch serumfreies Medium mit und ohne Testsubstanzen ersetzt. Als Positivkontrolle wurde 30  $\mu$ M 1,4-Benzochinon (BQ) appliziert. Nach 60 Minuten wurde die Fluoreszenz detektiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$ SEM von drei biologischen Replikaten. Die statistische Signifikanz wurde durch einen t-Test im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt mit \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Es wird deutlich, dass alle drei getesteten Perylenchinone eine signifikante Änderung im Redox-Status der Zelle bewirken. Allerdings zeigt sich auch, dass die Wirkung von Substanz 3 deutlich geringer ausfällt als die von Substanz 1 und ATX-I. Der anti-oxidative Effekt von Substanz 3 konnte hier nicht bestätigt werden. Stattdessen zeigt sich eine leichte Erhöhung der Fluoreszenz, was für eine Erhöhung der oxidativen Prozesse spricht.

Da die Aussagekraft von 2,7-Dichlorhydrofluorescein zur Bewertung des Redox-Status von Zellen Limitationen aufweist (Kalyanaraman et al. 2012), wurde zusätzlich ein Comet-Assay durchgeführt (Abbildung 70). Dieser Versuch ermöglicht es, die Schädigung von DNA einzelner Zellen beispielsweise durch radikale Sauerstoffspezies zu visualisieren. Dazu werden Zellen nach Behandlung mit Testsubstanzen in Agarosegele eingegossen, lysiert und fragmentierte DNA durch Elektrophorese aufgetrennt. Die DNA wird durch Propidiumiodid angefärbt, welches in die DNA

interkaliert. Intakte DNA bleibt aufgrund ihrer Größe von der Elektrophorese unbeeinflusst, sodass sich eine Auftrennung in Kopf (intakte DNA) und Schwanz (fragmentierte DNA) darstellt.

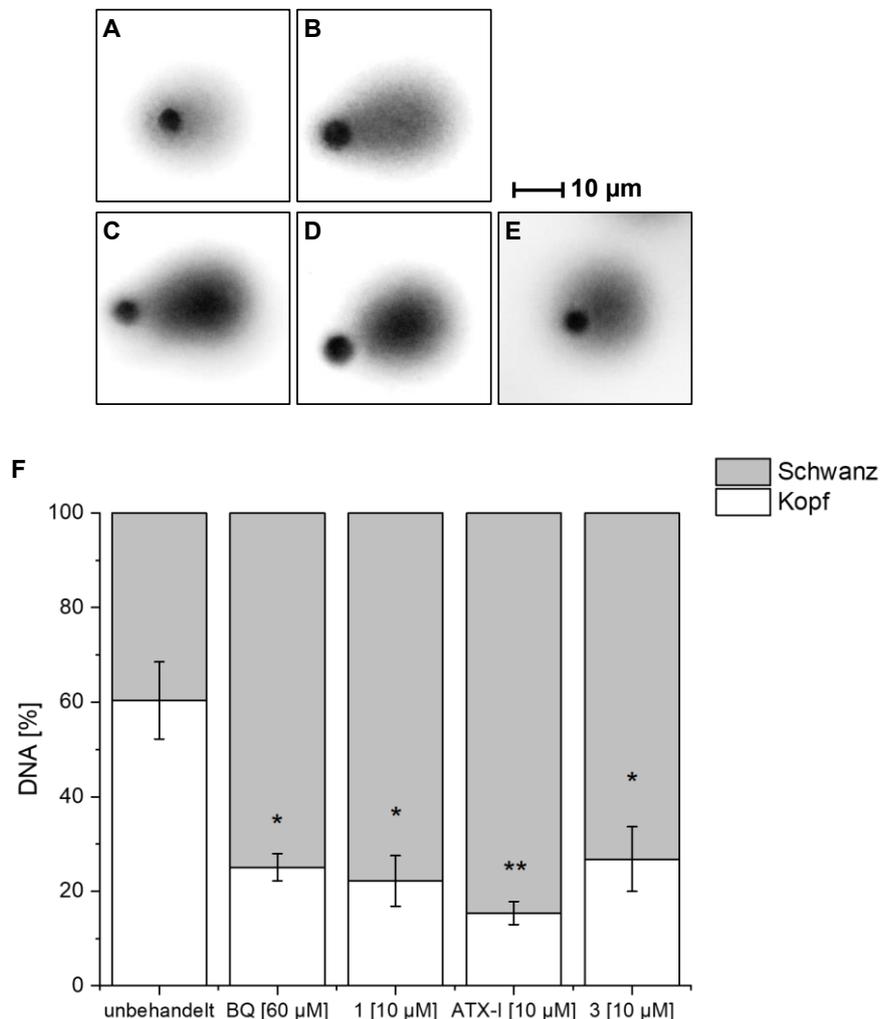


Abbildung 70 Comet Assay zur Erfassung von DNA-Schädigungen nach Behandlung von BEAS-2B-Zellen mit Perylenchinonen. Die Zellen wurden für drei Stunden mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert, dann mechanisch abgelöst und in kaltem PBS auf  $2 \cdot 10^4$  Zellen/mL eingestellt. Die Zellsuspension wurde dann in 1 % Agarose auf vorbehandelte Objektträger aufgetragen. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Elektrophorese  $0,6 \text{ V/cm}^2$ . Die DNA wurde dann mit Propidiumiodid angefärbt. Gezeigt sind beispielhaft typische Fluoreszenzmuster für unbehandelte Zellen (A) sowie Zellen die mit 1,4-Benzochinon (B) Substanz 1 (C) ATX-I (D) und Substanz 3 (E) behandelt wurden. Die Änderung der DNA-Verteilung von Kopf zu Schwanz durch Behandlung mit den Substanzen wurde aus je 20 Zellen in zwei biologischen Replikaten berechnet (F). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$ SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Zellen mit 1,4-Benzochinon behandelt, was einen signifikanten Anstieg der DNA im Schwanzbereich bewirkt. Auch durch Behandlung mit Substanz 1, ATX-I und Substanz 3 ergeben sich signifikante Verschiebungen des DNA-Verhältnisses in Kopf und Schwanz. Es zeigt sich ein Anstieg an fragmentierter DNA. Auch hier bewirkte die Behandlung mit Substanz 3 die geringsten Veränderungen.

Um die oxidative Antwort der Zellen nach Behandlung mit den drei aus *Alternaria sp.* isolierten Perylenchinonen auf mRNA-Ebene zu charakterisieren wurde eine qPCR auf einige ARE regulierte

mRNA durchgeführt (Abbildung 71). Dazu wurde Zellen für 8 h bzw. 16 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Als Vergleichssubstanz wurde 1,4-Benzochinon appliziert.

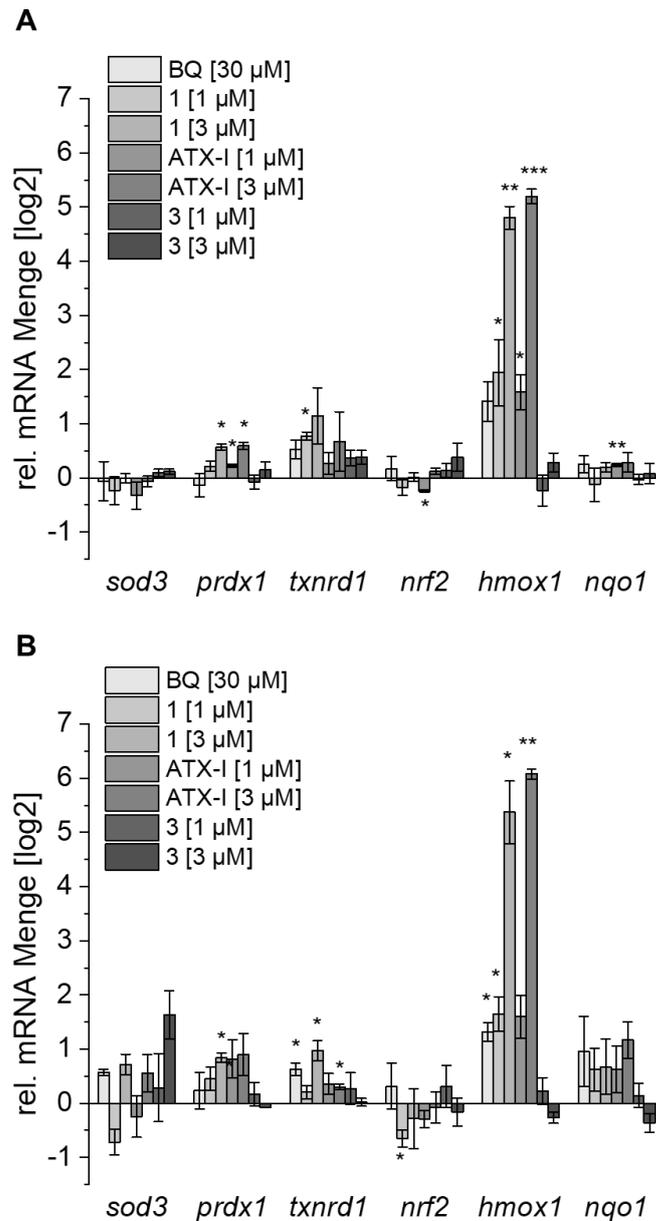


Abbildung 71 Wirkung der drei aus *Alternaria* sp. isolierten Perylenchinonen auf die Expression verschiedener ARE regulierter Gene. BEAS-2B-Zellen wurden ausgesät und 24 h inkubiert, bevor die Testsubstanzen appliziert wurden. Die Isolation der RNA erfolgte nach 8 h (A) bzw. 16 h (B). Als Vergleichssubstanz wurden Zellen mit 1,4-Benzochinon behandelt. Als Referenz diente die *gapdh* mRNA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde durch einen Einproben t-Test im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Sternchen zeigen FDR mit \* $<0,05$ , \*\* $<0,01$  \*\*\* $<0,001$ .

Es konnten sowohl nach 8 h als auch nach 16 h eine signifikante Erhöhung der *hmox1* mRNA-Menge nach Applikation von Substanz 1 und ATX-I festgestellt werden. Für *txnrd1* und *prdx1* wurde eine signifikante, konzentrationsabhängige Änderung des mRNA-Levels nach Applikation von Substanz 1 beobachtet werden. Der Einfluss der Substanzen auf verschiedener Redox Proteine wurde nachfolgend zusätzlich durch SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abbildung 72). Hier konnte

durch Applikation von ATX-1 und Substanz 1 eine signifikante Beeinflussung der Expression von HMOX1 nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen der qPCR, bei der ebenfalls der stärkste Effekt auf die *hmox1* mRNA beobachtet werden konnte. Die Applikation von 30  $\mu$ M Benzochinon bewirkte zwar eine Induktion von *hmox1*, jedoch keine erhöhte Abundanz von HMOX1 auf Proteinebene. Eine densitometrische Auswertung zeigte keine signifikante Änderung in der Abundanz der Proteine Nrf2, TXNRD1 und NQO1.

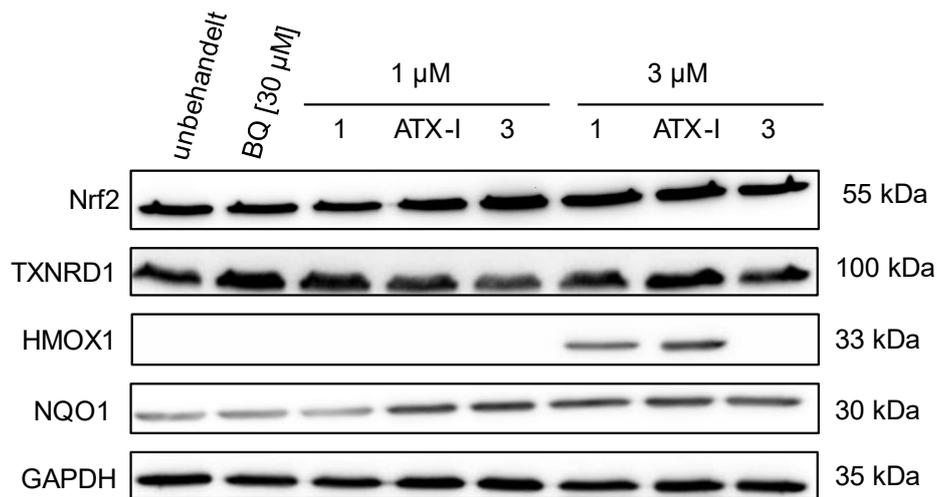


Abbildung 72 Western Blot Analyse der Wirkung von Substanz 1, ATX-I und Substanz 3 auf Nrf-2, TrxR1, HMOX1 und Nqo1. BEAS-2B wurden für 16 h mit den Perylenchinonen behandelt. Die Zellen wurden dann lysiert und nach Entfernung unlöslicher Zellbestandteile mittels 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Lysate von unbehandelten Zellen und Zellen, die mit 30  $\mu$ M Benzochinon (BQ) behandelt wurden, dienen als Kontrolle. Die Analyse wurde in Triplikaten durchgeführt, dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Replikats.

Da zuvor in Reporterassays eine hemmende Wirkung von Substanz 3 auf die Benzochinon induzierte ARE-abhängige Reporterexpression gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 67 B), wurde entsprechend eine qPCR auf Redox-relevante mRNA durchgeführt. Zusätzlich wurden die mRNA Level von zwei Cytochrom P450 Proteinen (*cyp1a1* und *cyp1a2*) analysiert, deren Induzierbarkeit in BEAS-2B nachgewiesen wurden (Garcia-Canton et al. 2013). Bestimmte Alternaria Toxine, wie das mit den hier untersuchten Molekülen verwandte Alternaria Toxin II (ATX-II), wurden in der Vergangenheit als Substrat für Cyp1 Monooxygenasen beschrieben (Pahlke et al. 2016). Pahlke et al. zeigten zudem eine signifikante Erhöhung der relativen *cyp1a1* mRNA-Menge nach Applikation von 0,1  $\mu$ M ATX-II.

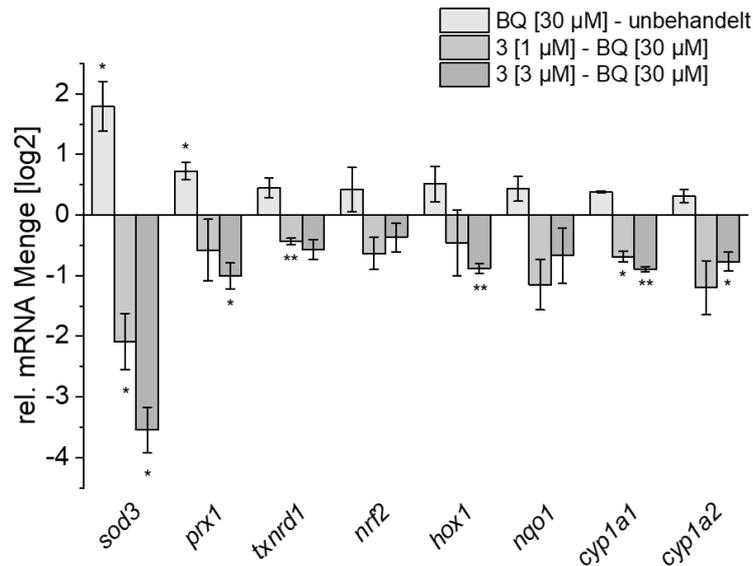


Abbildung 73 Wirkung der Substanz 3 auf die Expression verschiedener ARE regulierter Gene nach Induktion mit 1,4-Benzochinon. BEAS-2B-Zellen wurden ausgesät und 24 h inkubiert bevor die Testsubstanzen zusammen mit 30 µM 1,4-Benzochinon (BQ) appliziert wurden. Als Referenz wurden unbehandelte Zellen und Zellen die ausschließlich mit 30 µM 1,4-Benzochinon behandelt wurden herangezogen. Die Isolation der RNA erfolgte nach 16 h. Als Referenz diente *gapdh*. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Signifikanz der relativen Änderung wurde durch einen Einproben t-Test bestimmt mit \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

Korrespondierend zu den Ergebnissen der Reporterassays, konnte auch auf mRNA-Ebene eine inhibitorische Wirkung von Substanz 3, nach Induktion von oxidativem Stress durch Benzochinon, nachgewiesen werden (Abbildung 73). Der stärkste Einfluss konnte dabei auf die Expression des Superoxid-Dismutase 3 (*sod3*) mRNA beobachtet werden. Aber auch die Expression von *prx1*, *txnrd1*, *hox1* und der *cyp1* Proteine wurde signifikant verringert.

Alles in allem konnte eine deutlich oxidative Wirkung des neuen Perylenchinons Substanz 1 nachgewiesen werden. Die ebenfalls neue Substanz 3 zeigte hingegen nur eine schwache oxidative Wirkung. Ob dies Substanzen eine inhibitorische Wirkung auf den CXCL10 Promotor haben, wurde untersucht, es konnte jedoch keine Wirkung detektiert werden. Substanz 1 zeigt allerdings eine deutliche Toxizität, die leicht unter der der bekannten Substanz Alertoxin I liegt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Struktur-Wirkungsbeziehungen von Oxacyclododecindion Derivaten

Ausgehend vom makrozyklischen Lacton Oxacyclododecindion konnten bereits in der Vergangenheit einige Derivate synthetisch hergestellt und hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität mit dem Naturstoff verglichen werden (Tabelle 10). Die biologische Aktivität der Moleküle wurde verglichen, indem für jedes der Derivate und für verwandte Makrolactone die Inhibition der TGF- $\beta$  induzierten, SMAD2/3 vermittelten Signaltransduktion und der IL-4 induzierten, STAT6 vermittelten Signaltransduktion getestet wurde. Je stärker die beobachtete Inhibition, desto stärker wurde im Vergleich auch die biologische Aktivität des betreffenden Moleküls eingestuft. Diese Versuche wurden in der Zelllinie HepG2 durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die biologische Aktivität von fünf weiteren Derivaten evaluiert werden. Die so erhobenen Daten geben zum einen Aufschluss darüber, ob diese durch die getesteten Derivatisierungen im Vergleich zu bekannten Derivaten noch verbessert werden kann. Zum anderen können daraus Erkenntnisse über Struktur-Wirkungsbeziehungen gewonnen werden. Es zeigt sich, dass die Aktivität aller in dieser Arbeit getesteten Derivate unter der des Naturstoffs Oxa liegt. Die höchste Aktivität unter den hier getesteten zeigt das Derivat **20** (Abbildung 74). Derivat **19** und **20** sind bis auf die unterschiedliche Ausrichtung der Stereozentren identisch, was dafür spricht, dass auch für diese Derivatisierung die Konfiguration der Stereozentren ein wichtiger Faktor für die Aktivität ist. Ähnliches wurde bereits für das Derivat 14-Deoxyoxacyclododecindion herausgefunden (Tauber et al. 2016). Auch hier hat die Konfiguration der Stereozentren an Position 14 und 15 einen massiven Einfluss auf die biologische Aktivität: bei 14S,15R Konfiguration ist das Molekül ca. 20-fach aktiver als bei 14R,15S Ausrichtung. Übereinstimmend damit zeigt sich für das hier getestete 13-Hydroxy-14-deoxyoxacyclododecindion (**19**, **20**) ebenfalls die 14S,15R Konfiguration (**20**) als die Aktivere. Das 14S,15S konfigurierte Derivat (**19**) ist hingegen weniger aktiv. Auffällig ist aber, dass die Aktivität vor allem auf die STAT6 vermittelte Signaltransduktion deutlich verringert ist. Die SMAD2/3 vermittelte Aktivität ist fast identisch. Ein Derivat mit 14R,15S Konfiguration liegt bisher nicht vor, folgt es jedoch den bekannten Ergebnissen sollte es eine geringere Aktivität als das hier getestete 14S,15R Derivat (**20**) aufweisen. Die Einführung einer Hydroxygruppe an Position 13 ersetzt zudem nicht die für den Naturstoff charakteristische Hydroxylierung an Position 14, die bisher synthetisch nicht realisierbar war.

Tabelle 10 Anti-inflammatorische Aktivität natürlicher und synthetischer Makrolactone. Die Makrolactone sind nach biologischer Aktivität absteigend sortiert. Um die anti-inflammatorische Aktivität zu analysieren, wurden die Verbindungen mittels Reportergergenassays auf die TGF- $\beta$  induzierte, SMAD2/3 vermittelte Reportergergenaktivität sowie die IL-4 induzierte, STAT6 vermittelte Reportergergenaktivität getestet. Dargestellt sind die IC<sub>50</sub> Werte der Verbindungen, also die Konzentration, bei der nur 50 % der Aktivität im Vergleich zur induzierten Kontrolle gemessen werden konnte. Die neue Derivate 16-20 sind farbig markiert.

Verbindung	SMAD2/3 vermittelte Promotoraktivität IC <sub>50</sub> [nM]	STAT6 vermittelte Promotoraktivität IC <sub>50</sub> [nM]
14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>11</b> )	30,0	79,1
(14S,15R)-14-Deoxyoxacyclododecindion ( <b>5</b> )	90,1	20,1
14-Deoxyoxacyclododecindion ( <b>4</b> )	137,9	58,4
Oxacyclododecindion ( <b>1</b> )	135,6	67,8
(14S,15S)-14-Deoxyoxacyclododecindion ( <b>6</b> )	198,2	140
<b>(13R,14S,15R)-13-Hydroxy-14-deoxyoxacyclododecindion (20)</b>	<b>235,6</b>	<b>56,4</b>
4-Dechloro-14-deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>9</b> )	87,2	264,7
4-Bromo-4-dechloro-14-deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>13</b> )	381,7	177,5
14-Deoxy-10-ethyl-14-methyloxacyclododecindion ( <b>10</b> )	519,9	105
4-Dechloro-14-deoxyoxacyclododecindion ( <b>8</b> )	521,4	138,52
4,6-Dibromo-4-dechloro-14-deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>14</b> )	852,7	379,4
<b>(13R,14S,15S)-13-Hydroxy-14-deoxyoxacyclododecindion (19)</b>	<b>239,2</b>	<b>1024,1</b>
4-Dechloro-14-deoxy-4-fluoro-14-methyloxacyclododecindion ( <b>12</b> )	1264	442,4
(14R,15S)-14-Deoxyoxacyclododecindion ( <b>7</b> )	2400	343
10,11-Dehydrocurvularin ( <b>3</b> )	1700	3400
6-Chloro-14-deoxy-14-methyloxacyclododecindion ( <b>15</b> )	4623	1017
(S)-Curvularin ( <b>2</b> )	3420	unbekannt
<b>7-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (16)</b>	<b>Keine Aktivität</b>	<b>Keine Aktivität</b>
<b>5-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (17)</b>	<b>Keine Aktivität</b>	<b>Keine Aktivität</b>
<b>Dimethoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (18)</b>	<b>Keine Aktivität</b>	<b>Keine Aktivität</b>

Für die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit getesteten Derivate 7-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**16**), 5-Methoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**17**) und Dimethoxy-14-deoxy-14-methoxyoxacyclododecindion (**18**) konnte bis zu einer Konzentration von 3000 nM kein Hinweis auf eine biologische Aktivität gefunden werden. Die Moleküle hatten keinen inhibitorischen Einfluss auf die getesteten Reporter. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die

Hydroxygruppe an Position 5 und 7 essenziell für die Aktivität von Oxacyclododecindion und Derivaten sind. Dieses Ergebnis ist besonders auffällig, da für den strukturell nah verwandten Stoff 10,11-Dehydrocurvularin (**3**) eine Click-Funktionalisierung mit einem Alkin-Rest an Position 5 durchgeführt wurde, um Zielproteine dieses Wirkstoffs zu identifizieren (Deng et al. 2019). Das Makrolacton 10,11-Dehydrocurvularin enthält ebenfalls Hydroxygruppen an Position 5 und 7, die sich für die Aktivität von Oxa als essenziell herausstellten (Abbildung 74). Durch die Funktionalisierung mit einer Alkingruppe an Position 5 konnte von Deng et al die ATP-Citrat-Lyase (ACLY) als Zielprotein von 10,11-Dehydrocurvularin identifiziert werden. ACLY ist ein cytosolisches Protein, was die Produktion von Acetyl-CoA aus Citrat unter Hydrolyse von ATP zu ADP katalysiert (Chypre et al. 2012). Acetyl-CoA ist ein grundlegender Faktor im Fett- und Cholesterinstoffwechsel. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen, dass für Oxa-Derivate eine Funktionalisierung an Position 5 oder 7 nicht in Frage kommt. Da die Wirkung von Oxa und Oxa-Derivaten durch Veränderung an diesen Stellen nicht mehr nachzuweisen ist, ist auch anzunehmen, dass eine Interaktion mit ACLY nicht die Ursache für deren biologische Aktivität auf die betrachteten Signalwege ist. Ob die biologische Aktivität von 10,11-Dehydrocurvularin auf die TGF- $\beta$  induzierte, SMAD2/3 vermittelte Signaltransduktion und die IL-4 induzierte, STAT6 vermittelte Signaltransduktion aufgrund der Interaktion mit ACLY zustande kommt, ist ebenfalls fraglich. Derartige Effekte wurden zwar nach Applikation von ACLY-Inhibitoren beobachtet, ein direkter Zusammenhang ist jedoch umstritten. Eher wird vermutet, dass dies auf off-Target Effekte der verwendeten Inhibitoren rückschließen lässt (Namgaladze et al. 2018). Auch der Effekt einer ACLY-Inhibition auf die TGF- $\beta$  bzw. SMAD2/3 induzierte Genexpression ist bisher ungeklärt. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass eine Inhibition von ACLY zu einer erhöhten Expression von TGF- $\beta$  in ACLY defizienten Mäusen führt und die ACLY Aktivität während der Differenzierung von T-Zellen durch TGF- $\beta$  Exposition verringert wird (Baardman et al. 2020; Tian et al. 2021). Andererseits konnte ein Zusammenhang zwischen ACLY Translokation in den Nucleus und der Aktivität von NF- $\kappa$ B hergestellt werden, wodurch eine pro-inflammatorische Wirkung nachgewiesen wurde (Santarsiero et al. 2021). Eine erhöhte NF- $\kappa$ B Aktivität wiederum kann zur erhöhten Aktivität von SMAD7 führen, ein Inhibitor des SMAD2/3 Signalwegs (Freudlsperger et al. 2013).

Alles in allem ist es unwahrscheinlich, dass die für Oxa und Oxa-Derivate beobachteten Effekte auf eine Inhibition der ACLY zurückzuführen sind. Ausschlaggebend für diese Beurteilung ist vor allem die mangelnde biologische Aktivität nach Derivatisierung an Position 5. Die im Rahmen dieser Arbeit für die Target-Identifikation verwendeten Derivate mit Funktionalisierung an Position 15 scheinen unter Einbezug dieser Ergebnisse für Oxa und Oxa-Derivate nach wie vor die beste Wahl zu sein.

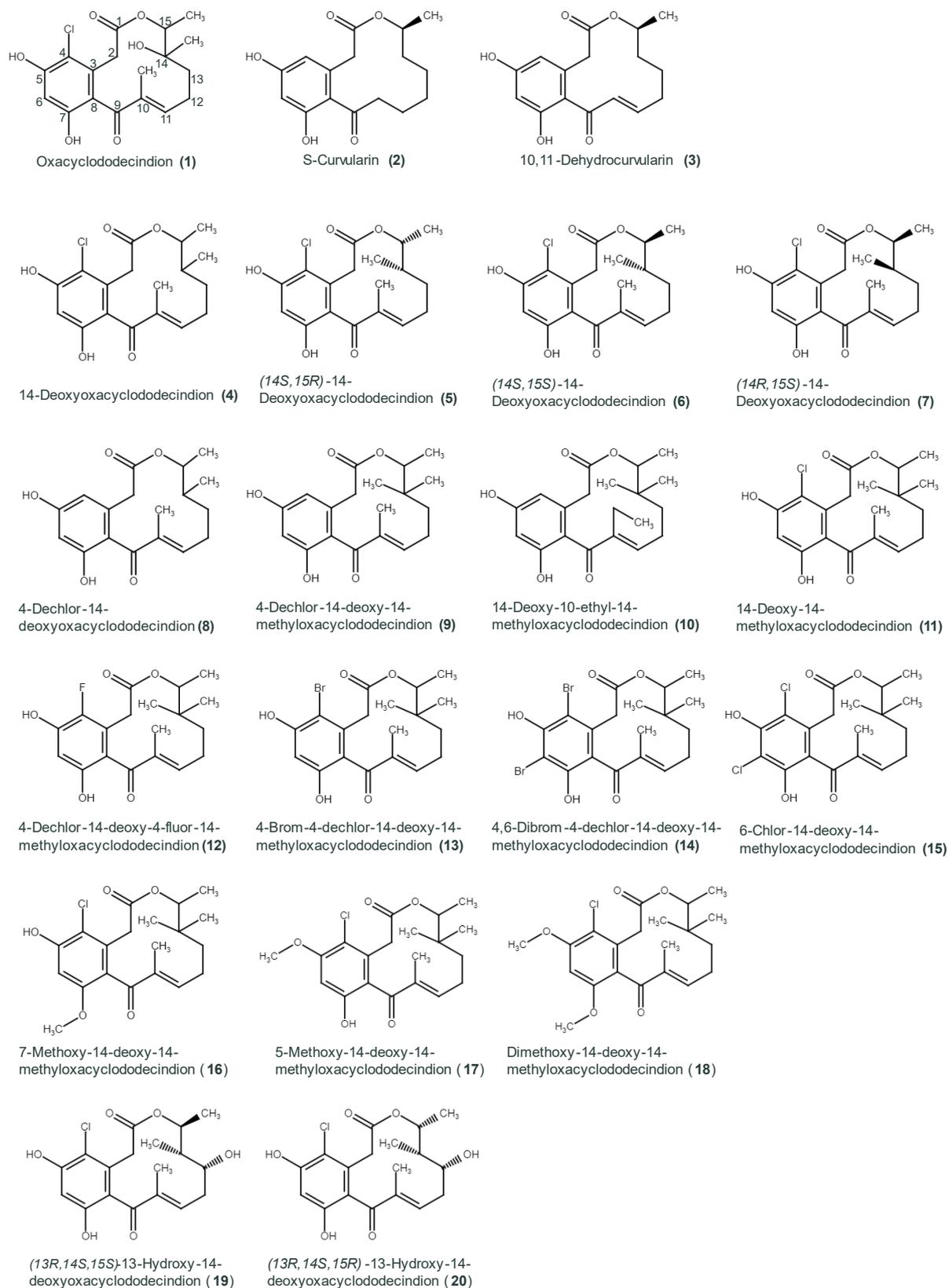


Abbildung 74 Die natürlichen Makrolactone S-Curvularin, Dehydrocurvularin und Oxacyclododecindion (mit Nummerierung der Kohlenstoffe im Grundgerüst) sowie dessen synthetische Derivate (Munro et al. 1967; Erkel et al. 2008; Tauber et al. 2015; Weber et al. 2020; Tauber et al. 2016; Elzner et al. 2008). Zusätzlich aufgeführt sind die in dieser Arbeit getesteten Derivate 16-20.

## 5.2. Biologische Aktivität von DM-Oxa in BEAS-2B-Zellen

Für die Identifikation von Targetproteinen von Oxacyclododecindion wurde das synthetische Oxa-Derivat 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion (DM-Oxa) verwendet, da es eine besonders starke biologische Aktivität zeigt (Tabelle 10). Außerdem ist dieses Derivat strukturell weitestgehend identisch zum Naturstoff Oxa, lediglich die Hydroxygruppe an Position 14 ist durch eine Methylgruppe ausgetauscht. Da die Zelllinie BEAS-2B für Versuche zur Target-Identifikation verwendet werden sollte, wurde die inhibitorische Wirkung von DM-Oxa auf die TGF- $\beta$  induzierte, SMAD2/3 vermittelte Signaltransduktion und die IL-4 induzierte, STAT6 vermittelte Signaltransduktion in BEAS-2B getestet. BEAS-2B wurde ausgewählt, da sie im Gegensatz zu HepG2 keine Tumorzelllinie. Tumorzelllinien haben häufig Mutationen, die den Phänotyp der Zellen deutlich beeinflussen. So enthalten HepG2 Zellen eine Mutation im  $\beta$ -Catenin-Gen (Carruba et al. 1999). Außerdem ist bekannt, dass BEAS-2B-Zellen durch TGF- $\beta$ 1-Stimulation Merkmale der EMT zeigen (Doerner and Zuraw 2009). Die Inhibition der ausgewählten Signaltransduktionen ist in HepG2 und BEAS-2B-Zellen ähnlich. Auch auf die CXCL10-Promotor-Aktivität konnte die inhibitorische Wirkung von DM-Oxa nachgewiesen werden. Der in dem verwendeten Reportervektor verwendete Promotor enthält Bindestellen für NF- $\kappa$ B, AP-1 und verschiedene STAT-Dimere (STAT1/2 Heterodimer, STAT1 Homodimer) (Spurrell et al. 2005; Jung et al. 2011). Nach Stimulation mit einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , was einem inflammatorischen Stimulus entspricht, konnte die Aktivität des CXCL10-Promotors vollständig durch DM-Oxa gehemmt werden. Übereinstimmend damit konnte auch eine Inhibition der Expression entzündungsrelevanter Gene nachgewiesen werden. Somit können BEAS-2B-Zellen als geeignetes Modell für weitere Untersuchungen angesehen werden.

Tabelle 11 Biologische Aktivität des Oxa-Derivats 14-Deoxy-14-methyloxacyclododecindion in den Zelllinien HepG2 und BEAS-2B. Um die anti-inflammatorische Aktivität zu analysieren, wurden die Verbindungen mittels Reporterassays auf die TGF- $\beta$  induzierte, SMAD2/3 vermittelte Reporteraktivität sowie die IL-4 induzierte, STAT6 vermittelte Reporteraktivität getestet. Dargestellt sind die IC<sub>50</sub> Werte der Verbindungen, also die Konzentration, bei der nur 50 % der Aktivität im Vergleich zur induzierten Kontrolle gemessen werden konnte.

Zelllinie	SMAD2/3 vermittelte Promotoraktivität IC <sub>50</sub> [nM]	STAT6 vermittelte Promotoraktivität IC <sub>50</sub> [nM]
HepG2	30,0	79,1
BEAS-2B	58,45	47,41

Die erhöhte Migrationsfähigkeit der BEAS-2B-Zellen konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation mittels 2D-Scratch-Assays festgestellt werden (Abbildung 17). Die Applikation von DM-Oxa verringerte dieses Verhalten, was erneut die Wirksamkeit der Substanz in BEAS-2B-Zellen bestätigt, und mit den Beobachtungen auf mRNA-Ebene übereinstimmt. Dort konnte durch Applikation von DM-Oxa eine Inhibition TGF- $\beta$  induzierter Genexpression erreicht werden.

Weitere Reporterassays sollten die Aktivität von DM-Oxa auf die  $\beta$ -Catenin vermittelte Signaltransduktion analysieren. Hier konnte eine inhibitorische Wirkung auf den entsprechenden Reporter mit einer Restaktivität von ca. 20 % festgestellt werden. Der  $\beta$ -Catenin Signalweg ist in BEAS-2B Zellen, wie auch unter physiologischen Bedingungen ohne Ligand ausgeschaltet. Zur Induktion wurde ein GSK3-Inhibitor verwendet, der dazu führt, dass  $\beta$ -Catenin auch ohne Bindung eines Liganden frei wird und so im Kern die Transkription über TCF/LEF regulieren kann (Abbildung 3). An welcher Stelle DM-Oxa dies inhibiert bleibt aufgrund des Blackbox-Charakters von Reporterassays unklar. Weitere Analysen dazu müssen also noch folgen.

### 5.3. Zielproteine von Oxacyclododecindion

#### 5.3.1. Pulldown Versuche

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Targets von Oxa und Oxa-Derivaten zu identifizieren. Dazu wurden verschiedene Chemoproteomik-Ansätze ausgewählt, um eine direkte Identifikation von DM-Oxa bindenden Proteine durchzuführen. Alle Versuche wurden zell-frei in Proteinextrakten durchgeführt. So kann eine Limitation durch eine begrenzte Zellmembranpermeabilität verhindert werden. Dies ist besonders relevant bei Funktionalisierung mit großem Linker, wie DM-Oxa-PAL (Abbildung 75). Für Versuche mit DM-Oxa funktionalisierten Agarosebeads wäre die Verwendung intakter Zellen ebenfalls nicht möglich gewesen.

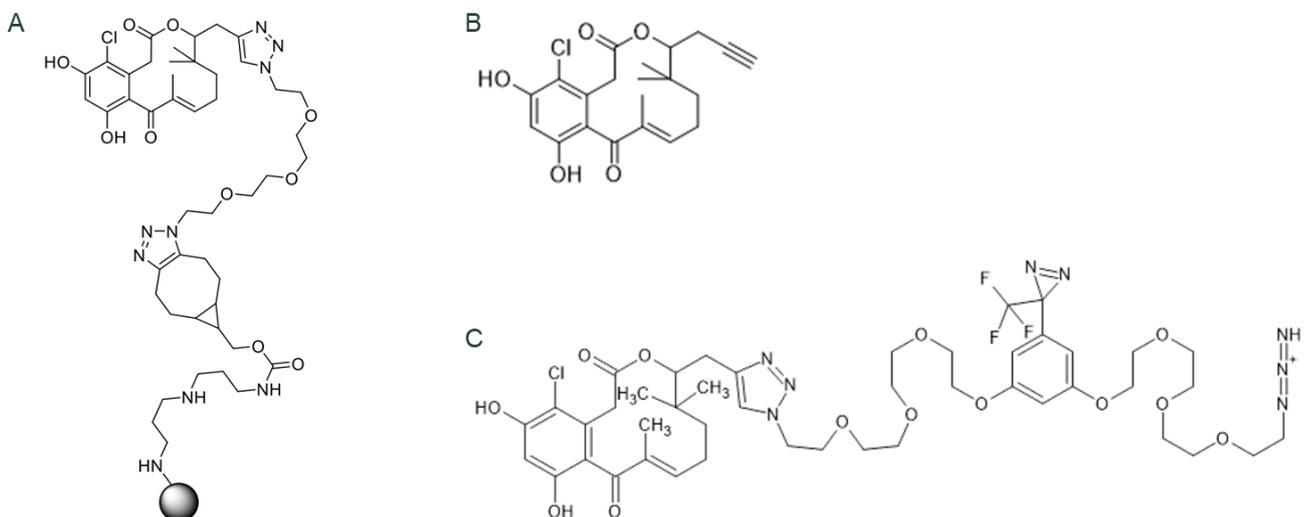


Abbildung 75 Für die Identifikation möglicher Zielproteine verwendete DM-Oxa Derivate: DM-Oxa funktionalisierte Agarosebeads (A), DM-Oxa-Alkin zur Kopplung an Biotin (B), DM-Oxa-Diazirin-Azid (DM-Oxa-PAL) zur Kopplung an eine fluoreszierende Sonde oder Alkinbeads (C).

Vergleicht man die Ergebnisse aller drei Pulldown-Ansätze, so fällt auf, dass es keine Übereinstimmung zwischen den in den Versuchen identifizierten Proteinen gibt. Es ist abzuwägen, welcher der drei Pulldown-Versuche glaubwürdige Kandidaten hervorbringt. Bei der Bewertung von Chemoproteomik-basierten Pulldown-Versuchen sind einige mögliche Fallgruben zu beachten. Dazu

gehören auch Herausforderungen die mit massenspektrometrischen Messungen einhergehen, wie beispielsweise, dass gering abundante Proteine oder solche mit wenigen proteotypischen Peptiden unter Umständen nicht detektiert werden (Fricker 2015). Zudem ist nicht festzustellen, ob die für die Identifikation eines Proteins notwendigen proteotypischen Peptide nicht vorhanden oder einfach nur nicht identifiziert wurden. Beim Vergleich zweier Konditionen könnten so Kandidaten gefunden werden, die auf Messfehlern beruhen, da sie in einer Probe identifiziert, in der nächsten aber nicht identifiziert werden konnten. Allerdings ist auch zu beachten, dass ein massiver Linker die Bindung an Zielproteine verhindern könnte. Bereits durch die Funktionalisierung mit dem vergleichsweise kleinen Alkinrest wurde die Aktivität von DM-Oxa um das zehnfach reduziert. Größere Moleküle konnten in Zellen nicht getestet werden, da eine mangelnde Membrangängigkeit anzunehmen ist. Außerdem ist unklar, ob DM-Oxa eine kovalente Bindung mit dem Zielprotein eingeht. Daher ist es sinnvoll, Ansätze zu wählen, die nicht von der Art der Bindung zwischen Zielprotein und DM-Oxa beeinflusst werden. Weil eine kovalente Bindung im Falle der DM-Oxa gekoppelten Agarosebeads (Abbildung 75 A) die Elution von Zielproteinen verhindern würde und weil die Reproduzierbarkeit der damit gewonnenen Ergebnisse im Vergleich am schlechtesten abschnitt, wird diesem Versuch die geringste Relevanz zugeordnet (Abbildung 76). Eine deutlich bessere Reproduzierbarkeit zeigten die Ansätze unter Verwendung eines DM-Oxa Alkins bzw. eines DM-Oxa-Diazirin-Azids. Zudem wurde in beiden Fällen nur Proteine als mögliche Kandidaten ausgewählt, die durch Zugabe einer hohen Menge an nicht-funktionalisiertem DM-Oxa signifikant weniger abundant waren. Dies deutet auf eine Verdrängung des DM-Oxa-Alkins bzw. des DM-Oxa-Diazirin-Azids weg vom Zielprotein hin, da es mit der hohen Menge an nicht-funktionalisiertem DM-Oxa konkurriert. Ein solches Verhalten ist ein Hinweis auf eine spezifische Bindung zwischen Oxa und dem jeweiligen Protein, da nur bei direkter Konkurrenz eine Beeinflussung durch die hohe Menge an DM-Oxa beobachtet werden sollte. Unspezifisch bindende Proteine können so besser ausgeschlossen werden. Am unabhängigsten von der Art der Bindung zwischen DM-Oxa und Zielproteinen ist die Verwendung des DM-Oxa-Diazirin-Azids, da hier eine kovalente Kopplung erreicht werden kann. Außerdem bietet dieser Ansatz den Vorteil, dass auch unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet werden kann. Das eliminiert eine weitere mögliche Fallgrube: Wird der Teil der Sonde durch ein Zielprotein verdeckt, der an das Säulenmaterial bindet, so kann unter nativen Bedingungen keine Anreicherung des Zielproteins erreicht werden. Dies könnte ein mögliches Problem bei der Verwendung des DM-Oxa-Alkins in Verbindung mit Biotin sein.

Pull-down an DM-Oxa funktionalisierter Agarose	Biotin-Streptavidin Pull-down mit DM-Oxa Alkin	Pull-down an Alkin-Beads mit DM-Oxa-Diazirin-Azid
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sehr großer Linker</li> <li>• Keine kovalente Kopplung an Protein</li> <li>• Schlechte Reproduzierbarkeit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nur Alkin-Rest</li> <li>• Keine kovalente Kopplung an Protein</li> <li>• Bessere Reproduzierbarkeit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sehr großer Linker</li> <li>• Kovalente Kopplung durch Diazirin</li> <li>• Bessere Reproduzierbarkeit</li> </ul>
<p>Gefundene Kandidaten:</p> <p>NUCB1 ERLIN1 CNN3 DNAJC9 AHNAK RPLP1</p>	<p>Gefundene Kandidaten:</p> <p>RPL7A EFTUD2 BSG</p>	<p>Gefundene Kandidaten:</p> <p>DSP FABP5 HSP90AB1 HSP90B1 HSP90B2P LCN2 HSP90AA1 KDM3B (C5orf7) AGPAT1 EEF1A1 EEF1A1P5</p>

Abbildung 76 Vergleich der drei durchgeführten Pull-down-Versuche. Die Unterschiede der drei Versuche ergeben sich durch die dazu verwendeten DM-Oxa Derivate. Die Verwendung einer DM-Oxa funktionalisierten Agarose führte zur Identifikation von sechs möglichen Zielproteinen. Allerdings muss beachtet werden, dass es hier zur sterischen Hinderung der Bindung von DM-Oxa an Zielproteine durch den massiven Linker kommen könnte. Da hier keine Kopplung durchgeführt wurde, werden nicht-kovalent gebundene Zielproteine unter Umständen verloren. Ein weiterer Ansatz involvierte Alkin-funktionalisiertes DM-Oxa, das nach Bindung möglicher Zielproteine über Kupfer-katalysierte Click-Chemie an Biotin gekoppelt wurde. So konnte ein Pull-down an Streptavidinbeads durchgeführt werden. Darüber konnten drei mögliche Zielproteine identifiziert werden. Hier wurde außerdem erstmals eine Verdrängung durch unverändertes DM-Oxa durchgeführt, um spezifische Bindungen identifizieren zu können. Vorteil dieses Ansatzes ist, dass kein großer Linker benötigt wird. Dieser wird erst nach Bindung von DM-Oxa an Zielproteine durch eine Click-Reaktion eingeführt. Als Drittes wurde ein DM-Oxa Derivat verwendet, das neben einer Gruppe für die Kupfer-katalysierte Click-Chemie einen photoaktivierbaren Linker in Form eines Diazirins enthält. Nach Pull-down an Hydrazin-spaltbarer Alkin-Agarose konnten zwölf Proteine identifiziert werden. Obwohl auch hier ein massiver Linker notwendig ist, birgt dieser Ansatz Vorteile durch die kovalente Kopplung an das Zielprotein und an die Beads. Dadurch können zahlreiche Waschschritte durchgeführt werden. Auch die Reproduzierbarkeit der Replikat zeigte eine gute Übereinstimmung. Auch hier wurde mit einer Verdrängung durch unverändertes DM-Oxa gearbeitet, um spezifisch-bindende Proteine zu identifizieren.

Unter Verwendung des DM-Oxa-Diazirin-Azids konnten zwölf Proteine identifiziert werden. Darunter sind zwei Pseudogene (HSP90B2P, EEF1A1P5). Pseudogene sind Gene, die vermutlich im Laufe der Evolution ihre Funktion durch Mutationen oder Silencing verloren haben (Troskie et al. 2021). Da Pseudogene eine hohe Homologie zu den entsprechenden funktionalen Proteinen aufweisen können, ist eine falsche Zuordnung der Peptide eine mögliche Ursache für deren Identifikation. Allerdings ist auch bekannt, dass einige Pseudogene intakte *reading frames* enthalten und daher auch die entsprechenden Proteine oder Proteinfragmente gefunden werden können (Troskie et al. 2021; Chen et al. 2020b). Auffällig wird bei Betrachtung der identifizierten Proteine, dass drei Isoformen von HSP90 gefunden wurde. Auch bei der Analyse markierter Proteine nach Kopplung von DM-Oxa-

Diazirin und Kupfer-katalysierter Bindung an eine fluoreszierende AF647-Sonde wurden HSP90 Peptide gefunden (Abbildung 35). Sie co-eluierten mit Massen, die durch *in silico* Fragmentierung des DM-Oxa-Diazirin-AF647 Komplexes gemessen werden konnten. Als fluoreszierende Komponente der ausgeschnittenen Gelbande wurde aufgrund der hohen Abundanz in Zellen HSP90 angenommen. HSP90 kann ca. 1-2 % des Proteoms ausmachen (Hoter et al. 2018) und ist daher möglicherweise als einziges Protein in diesem Versuch identifizierbar. Eine hohe Abundanz des Proteins bedingt auch eine hohe Abundanz der DM-Oxa-Diazirin-AF647 Fragmente, wodurch diese detektierbar waren. Dementsprechend kann durch die Identifikation von DM-Oxa-Diazirin-AF647 Fragmenten also kein Protein ausgeschlossen, da sowohl die Sichtbarkeit im Gel als auch die Identifikation mittels Massenspektrometrie durch eine geringe Abundanz von Zielproteinen verhindert sein könnte. Dennoch bestätigt die Identifikation von HSP90 Peptiden den Status des Proteins als mögliches Target von DM-Oxa.

Aufgrund der nicht übereinstimmenden Ergebnisse zwischen den verschiedenen Pulldown Versuchen müssen jedoch letztendlich weitere Ergebnisse, wie die der mRNA-Sequenzierung und der Proteom-Analyse berücksichtigt werden.

### 5.3.2. Wirkung auf Proteom und mRNA-Expression

Die Analyse der mRNA-Expression und des Proteoms mit und ohne Zugabe von Oxa ermöglicht es nicht nur Informationen über mögliche Targets, sondern auch Erkenntnisse über den generellen Einfluss von Oxa auf die Zelle zu gewinnen. Die Sequenzierung der mRNA erfolgte in zwei Zelllinien, HepG2 und BEAS-2B sowie mit drei unterschiedlichen Stimulationen und ohne Stimulation. Die erfolgreiche Induktion durch die ausgewählten Zytokine konnte nachgewiesen werden. Die PCA zeigte außerdem eine hohe Übereinstimmung der Replikate. Im Rahmen der Untersuchung der Genexpression konnte gezeigt werden, dass auch ohne vorherige Stimulation der Zellen bestimmte Prozesse angereichert sind. Bei Betrachtung der angereicherten Prozesse zeigen sich Unterschiede zwischen den Zelllinien. So ist beispielsweise für die Krebszelllinie HepG2 unter den signifikant veränderten Transkriptmengen eine Anreicherung von mRNA zu finden, die die Apoptose regulieren. Bei der Betrachtung dieser Daten muss allerdings berücksichtigt werden, dass die hier verwendeten Zelllinien durchaus auch Unterschiede zu Primärzellen aufweisen (Ekstrand-Hammarström et al. 2012; Han et al. 2020).

Es werden aber auch Übereinstimmungen zwischen den Zelllinien sichtbar: Am stärksten hochreguliert zeigten sich für beide Zelllinien Prozesse, die mit der Proteinfaltung zusammenhängen. Passend dazu gehören viele der am stärksten hochregulierten mRNA zu Hitzeschockproteinen (Abbildung 50 und Abbildung 51).

Dieses Bild wird auch durch ein Enrichment auf KEGG-Signalwege bestätigt. Dort ist vor allem der Prozess „*protein processing in endoplasmic reticulum*“ angereichert. Dies ist für beide Zelllinien der

Fall und kann auch nach Stimulation fast unverändert beobachtet werden (Abbildung 52 und Abbildung 53). Diese Anreicherung ist in Abbildung 77 für TGF- $\beta$ 1 induzierte BEAS-2B-Zellen stellvertretend visualisiert. Proteine, deren entsprechende Genexpression durch DM-Oxa Applikation signifikant verändert wurde, sind farbig markiert.

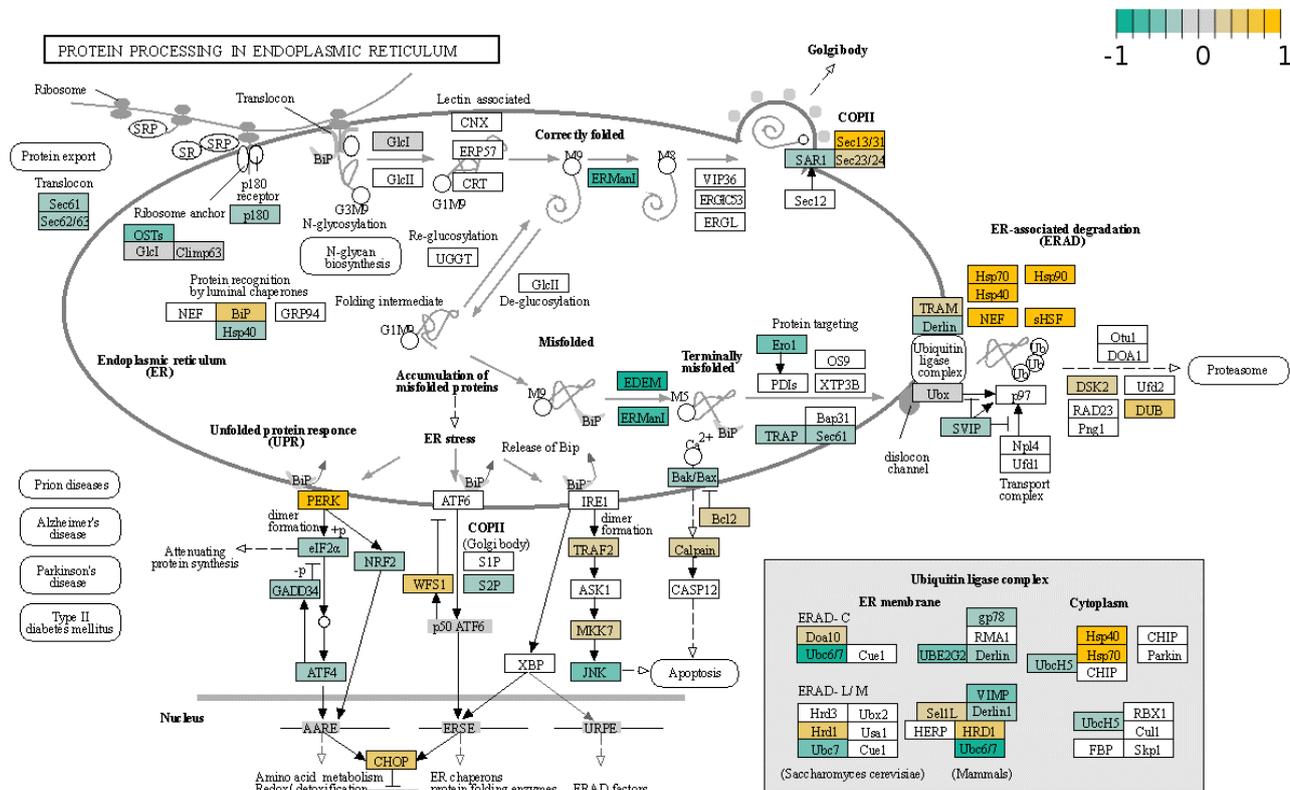


Abbildung 77 Einfluss von DM-Oxa auf die mRNA von Proteinen, die für die Proteinfaltung im ER relevant sind. Markiert sind Proteine, von denen die Expression des zugehörigen Gens durch DM-Oxa Applikation in TGF-induzierten BEAS-2B signifikant verändert wurde. Die Grafik zeigt den KEGG Signalweg hsa04141, erstellt mit pathview (Luo and Brouwer 2013). Die Farbintensität impliziert die relative Änderung durch DM-Oxa Applikation (log<sub>2</sub>FC).

Veränderungen auf mRNA Ebene müssen nicht mit Änderungen auf Proteinebene einhergehen (Bauernfeind and Babbitt 2017; Liu et al. 2016). Allerdings zeigt sich bei Betrachtung der Proteomdaten aus TGF- $\beta$ 1 induzierten BEAS-2B durch Applikation von DM-Oxa ein ähnliches Bild. Aufgrund der geringeren Auflösung von Proteom-Analysen sind erwartungsgemäß insgesamt weniger Proteine signifikant verändert, als es bei der Analyse der mRNA der Fall war.

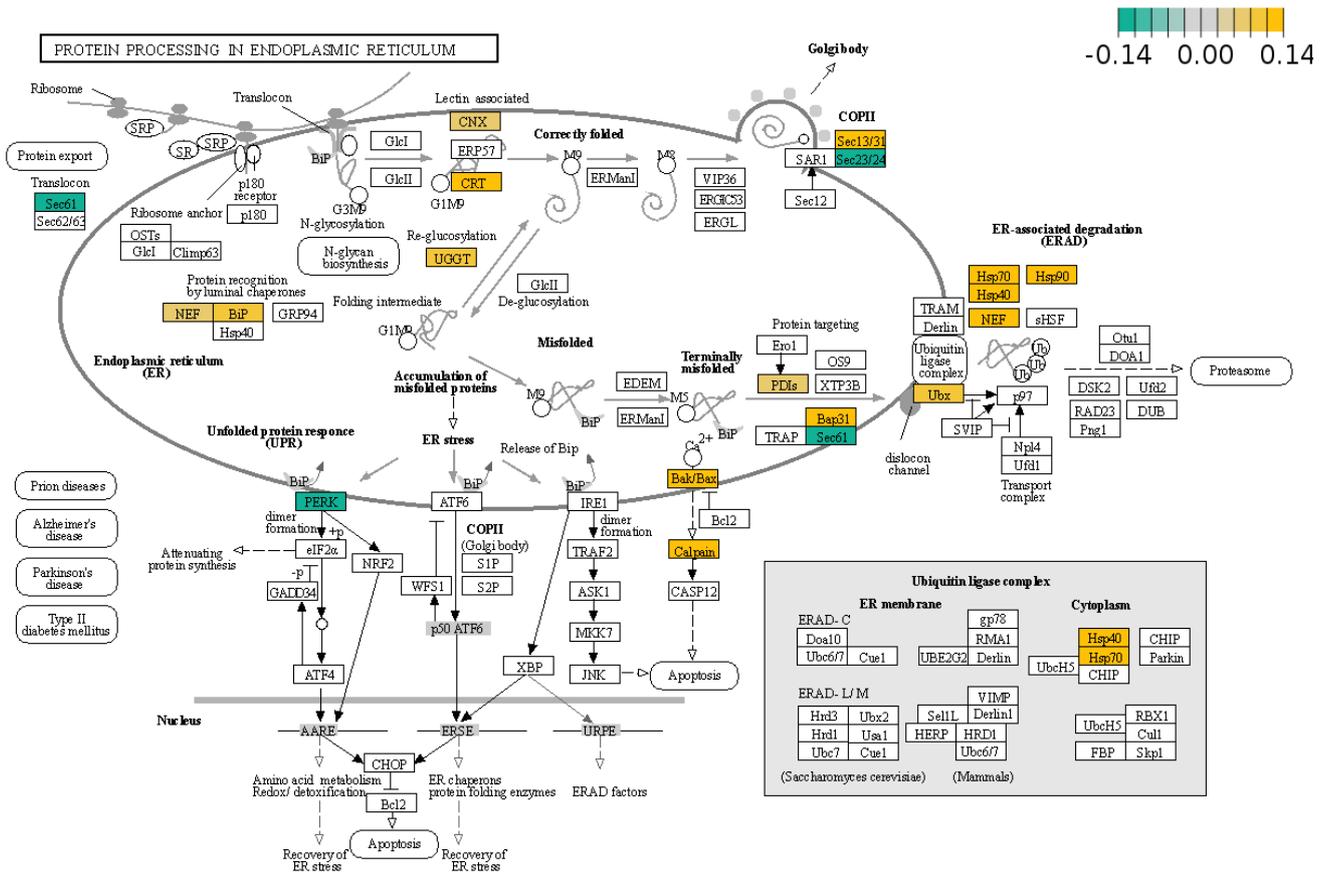


Abbildung 78 Einfluss von DM-Oxa auf die Proteinfaltung im ER in TGF- $\beta$ 1 stimulierten BEAS-2B. Markiert sind Proteine, deren Abundanz durch DM-Oxa Applikation signifikant verändert wurde. Die Grafik zeigt den KEGG Signalweg hsa04141, erstellt mit pathview (Luo and Brouwer 2013; Kanehisa and Goto 2000). Die Farbintensität impliziert die relative Änderung durch DM-Oxa Applikation ( $\log_2FC$ ).

Es ist bekannt, dass die Hochregulation von Hitzeschockproteinen durch bestimmte chemische Verbindungen als Teil der Stressantwort ausgelöst werden kann (Gupta et al. 2010). Reguliert wird die Expression vieler Hitzeschockproteine unter anderem durch die Faktoren HSF1 und HSF2 (*heat shock factor*) über das HSE (*heat shock element*). Die Expression des stress-induzierten HSP90AA1 kann beispielsweise ebenfalls über NF- $\kappa$ B erfolgen (Lang et al. 2021). HSF1 wurde nicht als potenziell beeinflusster Transkriptionsfaktor identifiziert: Die Abundanz des HSF1 Proteins wurde durch Applikation von DM-Oxa nicht signifikant verändert, auch die Transkriptmenge blieb unbeeinflusst. In der Vergangenheit wurde bereits mithilfe eines Reportervektors, der ein synthetisches Bindeelement für Hitzeschockfaktoren enthält, eine mögliche Aktivierung von HSF durch Oxa getestet. In diesem Versuch konnte keine erhöhte Aktivität von HSF in HepG2-Zellen festgestellt werden (Rohr 2019). Für HSF2 konnte hingegen in dieser Arbeit eine signifikante, aber geringe Induktion ( $FC=1,51$ ;  $FDR=0,004$ ) der Expression durch DM-Oxa Behandlung festgestellt werden. Eine ähnliche Veränderung wurde auch auf Proteinebene gemessen, wenn auch nicht signifikant ( $FC=1,35$ ;  $FDR=0,095$ ). Eine Erhöhung der HSF2 Proteinmenge könnte durch N-terminale HSP90-Inhibition bedingt werden (Prince et al. 2018). Die Erhöhung der HSF2 Expression und Translation muss jedoch nicht mit einer erhöhten Aktivität einhergehen, da die Aktivierung von HSF

ein komplexer Mechanismus ist, der auf verschiedenen Leveln reguliert wird (Gomez-Pastor et al. 2018). Die leichte Hochregulation von HSF2 könnte also ein erneuter Hinweis darauf sein, dass DM-Oxa mit HSP90 interagiert.

Neben der Hochregulation von Chaperonen und Co-Chaperonen konnten auch inhibitorische Effekte auf die Genexpression und Proteinabundanz durch DM-Oxa Behandlung beobachtet werden. In HepG2 war hier die starke Hemmung der CYP1A1 Expression auffällig, die unabhängig vom Stimulus der Zellen auftrat. Auch dieser Effekt könnte mit einer Inhibition von HSP90 zusammenhängen: Die Regulation der Expression von CYP1A1 erfolgt über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR). Dieser ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl an biologischen Prozessen reguliert. Der Rezeptor wird als hochrelevant für die Erhaltung der Gewebemöbilität angesehen (Rothhammer and Quintana 2019). Im inaktiven Zustand liegt AHR an HSP90 gebunden vor. Bei Aktivierung durch einen Liganden kommt es zu einer Dissoziation dieses Komplexes und zur Translokation von AHR in den Nucleus, wo es die Expression von unter anderem CYP1A1 und CYP1B1 induziert (Rothhammer and Quintana 2019). Eine Inhibition von HSP90 kann die AHR Aktivität verringern und so die Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 verhindern (Mohebati et al. 2012). In BEAS-2B wurde keine signifikante Hemmung der CYP1A1 Expression festgestellt, was wahrscheinlich durch die vergleichsweise geringe Abundanz von CYP1A1 Proteinen und mRNA in dieser Zelllinie begründet liegt. Es wurde allerdings durch DM-Oxa Behandlung in BEAS-2B eine signifikante Reduktion der CYP1B1-Abundanz auf Proteinebene festgestellt.

Insgesamt wurden für beide Zelllinien übereinstimmend der TNF-Signalweg durch DM-Oxa Behandlung signifikant verändert. Auch auf Proteinebene konnte Gleiches beobachtet werden. Beispielhaft dargestellt wurde hier die Änderung durch DM-Oxa Applikation auf TGF- $\beta$ 1 induzierte BEAS-2B-Zellen (Abbildung 79 und Abbildung 80).

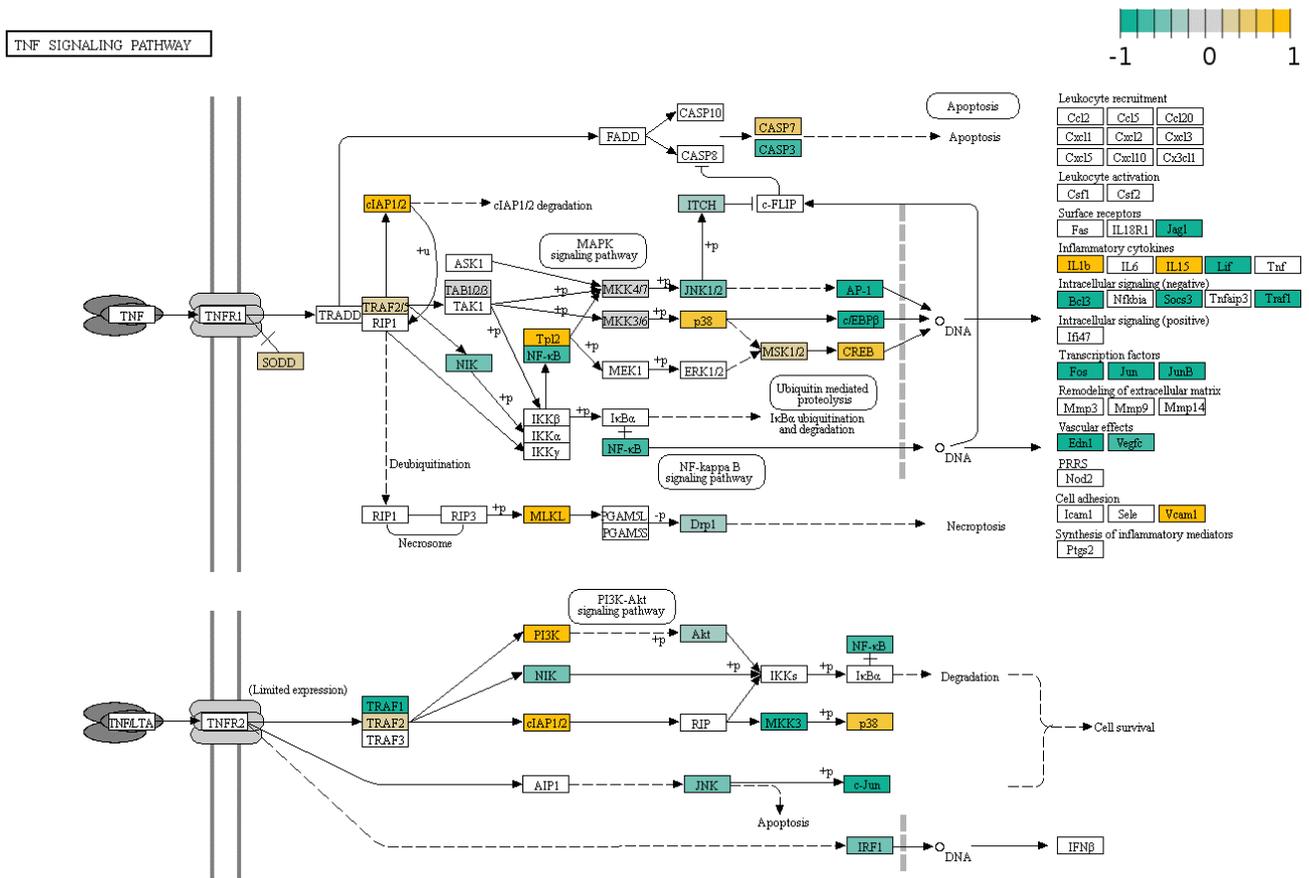
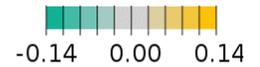


Abbildung 79 Einfluss von DM-Oxa auf die mRNA von Proteinen, die im TNF-Signalweg relevant sind. Markiert sind Proteine, von denen die Expression des zugehörigen Gens durch DM-Oxa Applikation in TGF-induzierten BEAS-2B signifikant verändert wurde. Die Grafik zeigt den KEGG Signalweg hsa04668, erstellt mit pathview (Luo and Brouwer 2013; Kanehisa and Goto 2000). Die Farbintensität impliziert die relative Änderung durch DM-Oxa Applikation ( $\log_2FC$ ).

Diese Ergebnisse decken sich mit den initialen Reportergergenversuchen der das Design dieser Versuchsreihe motivierte. Erwartungsgemäß sind Änderungen auf mRNA-Ebene stärker und zahlreicher als auf Proteinebene. Änderungen die wichtige Transkriptionsfaktoren betreffen bleiben jedoch auch auf Proteinebene sichtbar, sofern die Auflösung des Massenspektrometers die initiale Identifikation zulässt. So wird beispielsweise die Expression und Abundanz der Transkriptionsfaktoren JUN und JUNB signifikant reduziert. Diese sind Teil des zentralen Transkriptionsfaktors AP-1. Eine geringe, aber signifikante Induktion von p38 wird außerdem auch auf Proteinebene sichtbar ( $FC=1,17$ ). Diese ist auch auf mRNA-Ebene zu beobachten. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung und damit Aktivierung von p38 nach Induktion mit einem Gemisch aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in HMC (Humane mesangiale Zellen) Zellen durch DM-Oxa gehemmt wird (Rohr 2019).



TNF SIGNALING PATHWAY

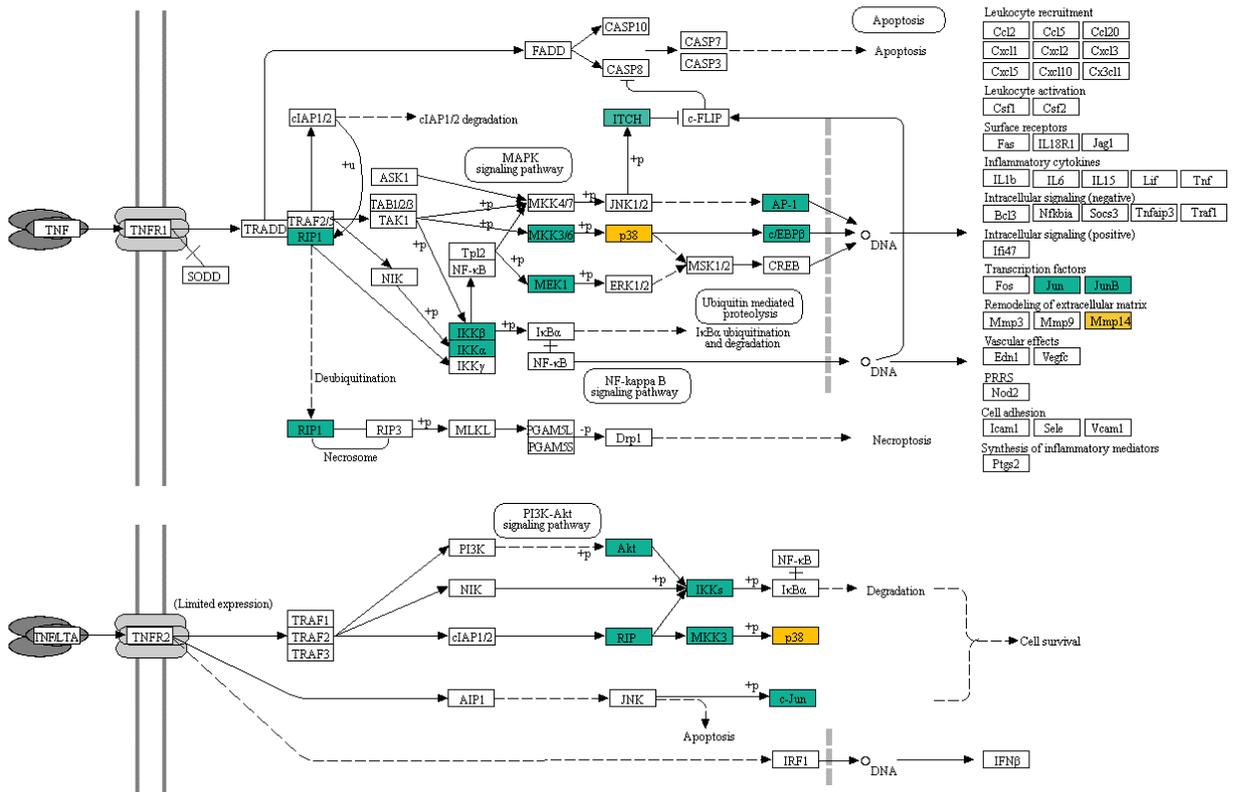


Abbildung 80 Einfluss von DM-Oxa auf Komponenten des TNF Signalweg in TGF-β1 stimulierten BEAS-2B. Markiert sind Proteine, deren Abundanz durch DM-Oxa Applikation signifikant verändert wurde. Die Grafik zeigt den KEGG Signalweg hsa04668, erstellt mit pathview (Luo and Brouwer 2013; Kanehisa and Goto 2000). Die Farbintensität impliziert die relative Änderung durch DM-Oxa Applikation (log<sub>2</sub>FC).

Über ein Korrelationsnetzwerk wurde ermittelt, welche Transkriptionsfaktoren für die Änderungen verantwortlich sein könnten, die auf mRNA-Ebene beobachtet wurden. Dazu wurde die Datenbank TFLink verwendet (Liska et al. 2022). Im Rahmen dieser Analyse fielen besonders die beiden Transkriptionsfaktoren FOXO3 und ETS2 auf. Diese regulieren einige besonders auffällige Transkripte bzw. Proteine, wie z.B. JUN. Ein direkter Einfluss auf die Hochregulation von Hitzeschockproteinen ist für diese Transkriptionsfaktoren jedoch nicht bekannt. Dies deutet darauf hin, dass DM-Oxa vermutlich mehrere Targets hat, denn durch die Interaktion mit nur einem Target lässt sich die sehr breite Wirkung von DM-Oxa kaum erklären. Außerdem wurden potenzielle Kandidaten unter Einbezug der STITCH Datenbank identifiziert. Neben zahlreichen Hitzeschockproteinen, die alle hochreguliert waren, wurden folgende Kandidaten auffällig stark runterreguliert: EGR1, ID1 und JUNB. Diese drei Proteine und die Transkriptionsfaktoren FOXO3 und JUNB können daher als interessante Kandidaten für weitere Versuche angesehen werden.

### 5.3.3. HSP90 Interaktion

HSP90 zeigte sich sowohl in Pulldown-Versuchen als auch in mRNA und Proteom Analysen als potenzielles Target von DM-Oxa. Daher wurde eine Co-Immunpräzipitation mit HSP90 Antikörpern durchgeführt. So konnte analysiert werden, ob die Bindung bestimmter Proteine an das Hitzeschockprotein verändert wird. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Blockade dieser Bindestelle durch DM-Oxa sein. Über 400 zelluläre Proteine interagieren mit HSP90, darunter zahlreiche Kinase und über 20 Co-Chaperone (Taipale et al. 2010). Nach Applikation von Oxa konnten eine signifikante Änderung von 100 Interaktoren festgestellt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass auch die Aktivierung bestimmter Proteine zu einer Dissoziation von HSP90 führt. Diese Aktivierung kann durch die Applikation von DM-Oxa erfolgen, unabhängig von einer Blockade von Bindestellen an HSP90.

Auffällig ist, dass nach der Co-Immunpräzipitation an HSP90 die Mehrzahl der Veränderungen Verringerungen der Proteinabundanz darstellen. Nur wenige Proteine werden nach DM-Oxa Behandlung zahlreicher gefunden. Häufiger gefunden wurde beispielsweise der Transkriptionsfaktor FOXO3, der auch in der Untersuchung der mRNA-Expression bereits als co-regulierender Transkriptionsfaktor identifiziert wurde. Zudem konnte eine erhöhte Abundanz des Hitzeschockprotein HSPH1 detektiert werden. Eine hochsignifikante Hochregulation der HSPH1 Transkriptmenge und Proteinabundanz konnte auch bereits zuvor detektiert werden und könnte die erhöhte Abundanz in diesem Versuch erklären.

Besonders interessant ist die signifikant verringerte Abundanz des Glucocorticoidrezeptors NR3C1: Der Liganden-aktivierte Glucocorticoidrezeptor NR3C1 reguliert als Transkriptionsfaktor essenzielle Prozesse, zusammenhängend mit Inflammation, Proliferation und Differenzierung (Fryer and Archer 1998). Für die korrekte Faltung dieses Proteins ist HSP90 essenziell. Erst durch die Interaktion mit HSP90 kann NR3C1 zu einer Liganden-zugänglichen Form maturieren (Aoyagi and Archer 2005). Nach Bindung eines Liganden an NR3C1 dissoziiert der Komplex und das Protein transloziert als Dimer in den Nucleus, wo es als Transkriptionsfaktor die Genexpression reguliert. Die Aktivierung dieses Prozesses hat anti-inflammatorische Wirkung, unter anderem durch die Repression pro-inflammatorischer Prozesse wie beispielsweise der NF- $\kappa$ B induzierten Genexpression (Gerber et al. 2021). Die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors erfolgt durch Glucocorticoide. Diese gehören zu den stärksten anti-inflammatorischen Medikamenten und werden in der Behandlung zahlreicher Krankheiten verwendet (Hardy et al. 2020; McMaster and Ray 2008). Eine Aktivierung von NR3C1 durch DM-Oxa ist unwahrscheinlich, da Liganden dieses Rezeptors Glucocorticoide sind. Die veränderte Abundanz scheint also eher auf eine Blockade der Bindestelle hinzuweisen.

Ein weiteres Protein, das im Kontext besonders heraussticht, ist der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor. Wie zuvor beschrieben induziert dieser die Expression von CYP1A1 und CYP1A2 und war durch DM-Oxa Applikation signifikant geringer abundant. Betrachtet man jedoch die Daten der mRNA-Sequenzierung, so erkennt man eine hochsignifikante Reduktion der CYP1A1-mRNA in HepG2. In

BEAS-2B-Zellen wurde eine signifikante Reduktion der CYP1B1-Proteinabundanz durch DM-Oxa Behandlung festgestellt. Dies spricht also für eine geringere Aktivität der AHR, die beispielsweise durch eine Inhibition der Bindung an HSP90 begründet sein könnte. Die Bindung an HSP90 erhält die aktive Form dieses Rezeptors.

Insgesamt gibt es zahlreiche Veränderungen der HSP90-Interaktoren durch Applikation von DM-Oxa. Zudem gibt eine *in silico* Analyse mögliche Bindestellen von DM-Oxa an HSP90 Hinweise auf eine mögliche Interaktion. Trotz aller Indizien bleiben zusätzliche Versuche, die die Interaktion direkt nachweisen weiterhin notwendig.

#### 5.4. Charakterisierung von Perylenchinonen aus *Alternaria* sp.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Substanzen aus der Gruppe der Perylenchinone auf biologische Aktivität untersucht. Perylenchinone sind bioaktive Pigmente, die häufig aus Pilzen isoliert werden, beispielsweise aus Pilzen der Gattung *Alternaria* (Weiss et al. 1987). Viele dieser Pilze leben als Pathogen auf Pflanzen, es gibt aber auch saprophytische Arten (Kück and Nowrousian 2009). *Alternaria* ist dafür bekannt, potente Toxine, wie verschiedene Alertoxine und Alternariol, zu produzieren (Fleck et al. 2012). Da *Alternaria*-Arten häufig auf pflanzlichen Lebensmitteln zu finden sind und auch Wände befallen können, ist die Einschätzung der Toxizität von *Alternaria*-Metaboliten von hohem Interesse (Patriarca 2016). Aufgrund der geringen Datenlage werden *Alternaria*-Toxine durch die European Food Safety Authority als sogenannte „*emerging toxins*“ eingestuft, es existieren daher diesbezüglich keine verbindlichen Regularien (Aichinger et al. 2021). Einige Perylenchinone werden, wie bereits in 4.8.2 beschrieben, zur Behandlung bestimmter Krebsarten eingesetzt, da sie nach Bestrahlung zur Apoptose behandelter Zellen führen.

Die hier getesteten Perylenchinone zeigen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Alertoxinen. Alertoxin I und Substanz 1 zeigten eine deutliche Toxizität, während Substanz 3 keine toxischen Effekte hervorruft. Substanz 2 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden, da sie nicht in ausreichender Menge durch den Pilz hergestellt wird. Die Produktionsmenge könnte möglicherweise durch Anpassung der Kulturbedingungen verbessert werden (Bode et al. 2002).

Substanz 1 und ATX-1 zeigen eine deutliche Induktion des ARE-Reporters in BEAS-2B Zellen. Die Aktivierung des ARE durch ATX-I wurde in CHO Zellen hingegen nicht beobachtet (Jarolim et al. 2017). Dies könnte jedoch durch die höhere Sensibilität der Lungenepithel-Zelllinie BEAS-2B, begründet sein. Da bekannt ist, dass einige Alertoxine die Inhibition von NF- $\kappa$ B bewirken (Cuadrado et al. 2019; Del Favero et al. 2020), wurde dies zusätzlich untersucht. Es konnte jedoch kein Einfluss auf den verwendeten Reporter beobachtet werden. Die oxidative Wirkung von Substanz 1 und ATX-1 konnte in verschiedenen weiteren Versuchen bestätigt werden. Auch die deutlich erhöhte Detektion der HMOX1 mRNA und die entsprechend erhöhte Abundanz des Proteins nach Applikation von Substanz 1 und ATX-1 deutet auf eine Hochregulation der antioxidativen Antwort hin. Die Ursache

hierfür liegt wohl im Versuch der Bewältigung des oxidativen Stresses, der durch die Naturstoffe ausgelöst wird.

Im Gegensatz zu ATX-I und Substanz 1, zeigte Substanz 3 keine Induktion der ARE-abhängigen Luciferase-Expression. Wurde der Nrf2-ARE Signalweg jedoch durch Applikation von 1,4-Benzochinon induziert, so konnte eine Inhibition der ARE-Aktivität beobachtet werden. Dennoch konnte nach Applikation von Substanz 3 eine leichte Erhöhung des oxidativen Stresses in Comet- und 2,7-Dichlorhydrofluorescein-Versuchen nachgewiesen werden. Durch Applikation von Substanz 3 konnte eine signifikante Reduktion der SOD3 mRNA beobachtet werden. Womöglich führt die verringerte Abundanz des antioxidativen Proteins SOD3 zu erhöhtem oxidativem Stress, der in den zuvor erwähnten Versuchen nachgewiesen werden konnte.

## 5.5. Ausblick

### 5.5.1. Oxacyclododecindion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse sowohl über Struktur-Wirkungsbeziehungen als auch über mögliche Targets von Oxa und Oxa-Derivaten gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Funktionalisierung an Position 5 zur Identifikation von Interaktoren im Falle von Oxa nicht geeignet ist (Abbildung 81). Stattdessen wurde eine Funktionalisierung an Position 15 bevorzugt. Obwohl inzwischen viel über Struktur Wirkungsbeziehungen von Oxa bekannt ist, wäre die Testung eines 13-Hydroxy-Derivats mit 14R, 15S Konformation interessant, um zu bestätigen, dass die optimale Konformation dieser Stereozentren essenziell für die Aktivität von DM-Oxa ist.

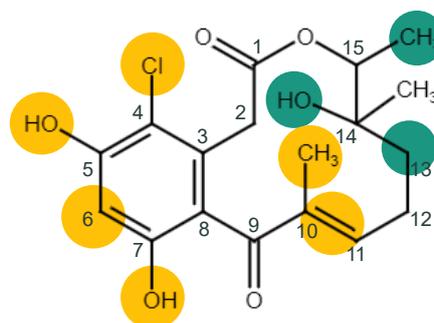


Abbildung 81 Der Naturstoff Oxacyclododecindion. Gelb markiert sind Reste, deren Änderung zu einem deutlichen Verlust der biologischen Aktivität führt. Grün markiert sind Reste, deren Änderung keinen massiven Verlust der Aktivität zur Folge hat. Zu beachten ist besonders an Position 13 und 14 jedoch die Ausrichtung der Stereozentren.

Es konnten einige Kandidaten als mögliche Targets von DM-Oxa identifiziert werden, die näher untersucht werden sollen. Darunter vor allem FOXO3, da es auch in SLE, einer Krankheit, auf die DM-Oxa einen positiven Effekt zeigt relevant ist: In SLE ist dieser Transkriptionsfaktor runterreguliert, eine höhere FOXO3 Aktivität zeigte sich vorteilhaft in SLE (Kim et al. 2022; Lu et al. 2016). Auch besonders stark veränderte Signalwege, wie der TNF-Signalweg sollten in der Zukunft näher

betrachtet werden. Da die Signaltransduktion häufig auf der Aktivität von Kinasen beruht, sollten Änderungen in der Phosphorylierung analysiert werden. Dazu eignet sich z.B. die Methode der Phosphoproteomik: Hier werden Änderungen im Phosphorylierungsstatus von Proteinen massenspektrometrisch erfasst. Zuvor kann eine Anreicherung von Phosphopeptiden erfolgen (Bekker-Jensen et al. 2020). Die Probenaufbereitung für diese Analyse ist jedoch komplex und erfordert eine vorherige Optimierung. Die erfolgreiche Analyse des Phosphoproteoms ermöglicht dann im Optimalfall die weitere Analyse des *mode-of-action*, die Vorhersage von toxischen Effekten und die Identifikation von Targets (Morris et al. 2014).

Zieht man in Betracht, dass die Anzahl an Proteinen, mit denen ein Wirkstoff interagiert laut Datenbanken durchschnittlich bei ca. sechs liegt, aber auch in den dreistelligen Bereich gehen kann, ist die Bestätigung von Kandidaten eine komplexe Aufgabe (Hu et al. 2014; Hu et al. 2015; Wang et al. 2015). Die Identifikation der Zielproteine ist zwar nicht unbedingt für die Zulassung eines Wirkstoffs nötig, die Kenntnis darüber ist jedoch vorteilhaft, um off-Target Effekte abschätzen zu können. Methoden zum direkten Nachweis einer Interaktion, wie beispielsweise der *thermal shift assay* (TSA) oder die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) sind dabei zu bevorzugen, da sie ohne oder mit minimaler Funktionalisierung des Wirkstoffs auskommen:

1. SPR: Bei dieser Methode wird einer der zwei zu untersuchenden Interaktionspartner an eine Oberfläche gebunden. Dies kann über verschiedene Methoden erfolgen, wie hydrophobe Wechselwirkungen oder kovalente Kopplung (z.B. durch Click-Chemie). Der zweite Interaktionspartner, meistens der zu untersuchende Wirkstoff, wird über die Oberfläche transportiert. So kann nicht nur beantwortet werden ob eine Bindung stattfindet, sondern auch die Affinität der beiden Interaktionspartner zueinander analysiert werden (Jadhav et al. 2020). Außerdem kann SPR Imaging in Kombination mit Protein Microarrays verwendet werden, um die Bindung von Wirkstoffen an Zielproteine zu detektieren, ohne diese vorher funktionalisieren zu müssen (Zhou et al. 2018).
2. TSA: Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass die Bindung eines Moleküls an ein Protein, dessen thermodynamische Eigenschaften verändert. Dies ist durch eine Änderung in der Schmelzkurve detektierbar. Eine Änderung in der Schmelzkurve eines Proteins deutet auf die Bindung des Wirkstoffs hin. Die Methode kann auch in Zellen oder komplexen Proteingemischen angewendet werden und wird dann als *cellular thermal shift assay* (CETSA) bezeichnet (Martinez Molina et al. 2013). Eine Funktionalisierung der Leitstruktur ist in dieser Methode nicht erforderlich. Einem Zellextrakt oder Proteingemisch wird ein Wirkstoff zugegeben und das Gemisch bei aufsteigender Temperatur inkubiert. Nach jeder Temperaturerhöhung erfolgt die Trennung von löslichem und unlöslichem Protein durch Zentrifugation oder Filtration. In der löslichen Fraktion können dann entweder durch

Massenspektrometrie oder, bei bekannten Kandidaten, durch Western Blot Änderungen detektiert werden (Jafari et al. 2014). Es gibt allerdings auch Proteine, deren Schmelzkurve durch Bindung eines Stoffs nicht beeinflusst wird. Außerdem sagt eine Änderung in der Temperatursensitivität nichts über die Bindeaffinität von Protein und Wirkstoff aus (Friman 2020). Diese muss zusätzlich bestimmt werden.

Sowohl CETSA als auch SPR könnten im Falle von DM-Oxa zur Validierung von Target Kandidaten angewendet werden. Das zur Bindung an eine SPR-Matrix benötigte Oxa-Derivat läge bereits vor: DM-Oxa-Alkin könnte einfach über Kupfer-katalysierte Click-Chemie an eine Azid-funktionalisierte Matrix gebunden werden. Allerdings können für diese Methode auch die möglichen Targetproteine an die Matrix gebunden werden. Durch CETSA könnte beispielsweise eine Bindung an HSP90 über Western Blot nachgewiesen werden, ohne dass dazu ein spezielles Gerät benötigt wird. Auch andere in dieser Arbeit identifizierten Kandidaten, wie JUNB, ID1, EGR1 und FOXO3 könnten über die genannten Methoden auf eine direkte Interaktion hin untersucht werden.

#### 5.5.2. HSP90 als therapeutisches Target

HSP90 ist essenziell für die zelluläre Proteostase. Eine abnorme Funktion oder Abundanz von HSP90 hat daher weitreichende Folgen für die Zelle. Es überrascht daher nicht, dass dieses Protein in hohen Mengen in der Zelle vorliegt und essenziell für die normale Zellfunktion ist. Erhöhte HSP90-Level können häufig in Krebserkrankungen beobachtet werden (Birbo et al. 2021). Aufgrund dieser Eigenschaften ist HSP90 ein vielerforschtes Target in der Behandlung verschiedener Erkrankungen. Obwohl bereits einige HSP90 Inhibitoren bekannt sind, gibt es bisher keine zugelassene Monotherapie mit HSP90 Inhibitoren (Birbo et al. 2021). Dennoch gibt es nach wie vor vielversprechende Ansätze, bekannte Inhibitoren zu modifizieren oder neue zu finden, die in Zukunft zur Therapie eingesetzt werden können (Sanchez et al. 2020; Bickel and Gohlke 2019; Wang et al. 2023).

HSP90 ist hauptsächlich aus drei konservierten Domänen aufgebaut: die N-terminale Domäne, die C-terminale Domäne und die Mitteldomäne. Während die N-terminale Domäne ATP-Bindestellen enthält, ist die C-terminale Domäne für die Dimerisierung notwendig (Hoter et al. 2018).

Ein bekannter Inhibitor von HSP90, Geldanamycin, bindet die N-terminale Domäne des Proteins und verhindert so die Bindung von ATP. Eine Inhibition der N-terminalen ATP-Bindedomäne führt dazu, dass interagierende Proteine nicht gefaltet werden können und daher im Proteasom degradiert werden (Mendillo et al. 2020). Zusätzlich dazu führt die Applikation von Geldanamycin und anderen N-terminalen Inhibitoren zu einer Induktion der Hitzeschutzantwort durch HSF-1 und HSF-2 (Kim et al. 1999; Prince et al. 2018). Die Hitzeschutzantwort hat jedoch eine zytoprotektive Wirkung und ist

daher für die Behandlung von Krebserkrankungen, in denen der Zelltod veränderter Zellen herbeigeführt werden soll, kontraproduktiv.

Auch die Inhibition der C-terminalen Domäne des Proteins könnte therapeutisch Anwendung finden, da so die Faltung von interagierenden Proteinen verhindert wird, ohne die Hitzeschockantwort auszulösen (Bickel and Gohlke 2019). Je nach Anwendungsbereich wurden auch Inhibitoren entwickelt, die die Faltung von Interaktoren nicht beeinflussen, aber die Hitzeschockantwort auslösen. Diese sind hilfreich, wenn eine zytoprotektive Wirkung gewünscht ist, wie beispielsweise im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen (Mendillo et al. 2020).

Abgesehen von N- und C-terminalen Inhibitoren von HSP90, sind bestimmte Naturstoffe bekannt, die die Interaktion des Chaperons mit Co-Chaperonen unterbrechen. Über den genauen Mechanismus dieser relativ neuen, alternativen HSP90 Inhibitoren ist jedoch noch wenig bekannt (Bickel and Gohlke 2019).

Sollte HSP90 sich also als Target von Oxa und Oxa-Derivaten herausstellen, so sollte herausgefunden werden, an welcher Stelle des Chaperons die Bindung stattfindet. Dazu könnte eine Kristallstrukturanalyse durchgeführt werden, wie es in der Vergangenheit auch für den HSP90 Inhibitor Geldanamycin publiziert wurde (Stebbins et al. 1997). Eine Induktion der Hitzeschutzantwort konnte für DM-Oxa zwar beobachtet werden, diese involviert jedoch anscheinend nicht HSF-1 bzw. HSF-2, wie es für N-terminale Inhibitoren typisch ist, da keine erhöhte Aktivität des HSE festgestellt werden konnte. Dies sollte in Zukunft näher evaluiert werden.

### 5.5.3. Perylenchinone

Obwohl Modulatoren des Nrf2-ARE Signalwegs potenziell klinische Anwendung finden könnten, zeigen die hier getesteten Perylenchinone keine Eigenschaften, die eine Eignung für diesen Einsatz vermuten lassen. Substanz 3, die zwar keine signifikanten toxischen Effekte induzierte, scheint am interessantesten für eine weitere Untersuchung zu sein. Die unspezifische Induktion oxidativer Prozesse könnte beispielsweise näher evaluiert werden. Dennoch ist auch hier das Potenzial für eine klinische Anwendung insgesamt gering.

Die hier erhobenen Daten zur Zytotoxizität zeigen erneut, dass durch *Alternaria* produzierte Toxine potenziell die Sicherheit kontaminierter Nahrungsmittel einschränken. Die zugrundeliegenden Mechanismen für die starke zytotoxische Wirkung der Perylenchinone ist daher von großem Interesse und sollte zukünftig näher analysiert werden (Aichinger et al. 2021).



## 6. Quellenverzeichnis

- Abdel-Rahman, W. M.; Nair, V.; Al-khayyal, N. (2018): PO-206 Calponin 3 (CNN3) promotes epithelial to mesenchymal transition and drug resistance of colon cancer cells. In *ESMO Open* 3, A100-A101. DOI: 10.1136/esmooopen-2018-EACR25.241.
- Afgan, Enis; Baker, Dannon; Batut, Bérénice; van den Beek, Marius; Bouvier, Dave; Cech, Martin et al. (2018): The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. In *Nucleic acids research* 46 (W1), W537-W544. DOI: 10.1093/nar/gky379.
- Ahmed, Syed Minhaj Uddin; Luo, Lin; Namani, Akhileshwar; Wang, Xiu Jun; Tang, Xiuwen (2017): Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. In *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863 (2), pp. 585–597. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
- Aichinger, Georg; Del Favero, Giorgia; Warth, Benedikt; Marko, Doris (2021): Alternaria toxins-Still emerging? In *Comprehensive reviews in food science and food safety* 20 (5), pp. 4390–4406. DOI: 10.1111/1541-4337.12803.
- Alex, Alexander (2016): Attrition in the pharmaceutical industry. Reasons, implications, and pathways forward. With assistance of C. John Harris, Dennis A. Smith. 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley et Sons. Available online at <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=4435614>.
- Allen, Felicity; Pon, Allison; Wilson, Michael; Greiner, Russ; Wishart, David (2014): CFM-ID: a web server for annotation, spectrum prediction and metabolite identification from tandem mass spectra. In *Nucleic acids research* 42 (Web Server issue), W94-9. DOI: 10.1093/nar/gku436.
- Al-Tamari, Hamza M.; Dabral, Swati; Schmall, Anja; Sarvari, Pouya; Ruppert, Clemens; Paik, Jihye et al. (2018): FoxO3 an important player in fibrogenesis and therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis. In *EMBO molecular medicine* 10 (2), pp. 276–293. DOI: 10.15252/emmm.201606261.
- Altschul, Stephen F.; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene W.; Lipman, David J. (1990): Basic local alignment search tool. In *Journal of Molecular Biology* 215 (3), pp. 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Anders, Simon; Pyl, Paul Theodor; Huber, Wolfgang (2015): HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. In *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (2), pp. 166–169. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu638.
- Andrews, Simon; Krueger, Felix; Segonds-Pichon, Anne; Biggins, Laura; Krueger, Christel; Montgomery, Jo (2010): FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.

- Babraham Bioinformatics (2019). Available online at <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, checked on 12.2022.
- Aoyagi, Sayura; Archer, Trevor K. (2005): Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation. In *Trends in cell biology* 15 (11), pp. 565–567. DOI: 10.1016/j.tcb.2005.09.003.
- Arras, Lesly de; Laws, Rebecca; Leach, Sonia M.; Pontis, Kyle; Freedman, Jonathan H.; Schwartz, David A.; Alper, Scott (2014): Comparative genomics RNAi screen identifies Eftud2 as a novel regulator of innate immunity. In *Genetics* 197 (2), pp. 485–496. DOI: 10.1534/genetics.113.160499.
- Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M. et al. (2000): Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. In *Nature genetics* 25 (1), pp. 25–29. DOI: 10.1038/75556.
- Baardman, Jeroen; Verberk, Sanne G. S.; van der Velden, Saskia; Gijbels, Marion J. J.; van Roomen, Cindy P. P. A.; Sluimer, Judith C. et al. (2020): Macrophage ATP citrate lyase deficiency stabilizes atherosclerotic plaques. In *Nature communications* 11 (1), p. 6296. DOI: 10.1038/s41467-020-20141-z.
- Badal, S.; Delgoda, R. (2014): Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. In *Journal of applied toxicology : JAT* 34 (7), pp. 743–753. DOI: 10.1002/jat.2968.
- Barabási, Albert-László; Bonabeau, Eric (2003): Scale-free networks. In *Scientific American* 288 (5), pp. 60–69. DOI: 10.1038/scientificamerican0503-60.
- Barriere, Guislaine; Fici, Pietro; Gallerani, Giulia; Fabbri, Francesco; Rigaud, Michel (2015): Epithelial Mesenchymal Transition: a double-edged sword. In *Clinical and translational medicine* 4, p. 14. DOI: 10.1186/s40169-015-0055-4.
- Baskaran, Rengarajan; Lee, Junghan; Yang, Su-Geun (2018): Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. In *Biomaterials research* 22, p. 25. DOI: 10.1186/s40824-018-0140-z.
- Bastian, Mathieu; Heymann, Sebastien; Jacomy, Mathieu (2009): Gephi : An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. Available online at <http://www.aiai.org/ocs/index.php/ICWSM/09/paper/view/154>.
- Basuyaux, J. P.; Ferreira, E.; Stéhelin, D.; Buttice, G. (1997): The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner. In *The Journal of biological chemistry* 272 (42), pp. 26188–26195. DOI: 10.1074/jbc.272.42.26188.

- Bauernfeind, Amy L.; Babbitt, Courtney C. (2017): The predictive nature of transcript expression levels on protein expression in adult human brain. In *BMC genomics* 18 (1), p. 322. DOI: 10.1186/s12864-017-3674-x.
- Becker, Jochen; Villinger, Thomas R. (Eds.) (2017): Life Science Venturing. Herausforderung - Spezifika - Prozess. Wiesbaden: Springer Gabler.
- Bekker-Jensen, Dorte B.; Bernhardt, Oliver M.; Hogrebe, Alexander; Martinez-Val, Ana; Verbeke, Lynn; Gandhi, Tejas et al. (2020): Rapid and site-specific deep phosphoproteome profiling by data-independent acquisition without the need for spectral libraries. In *Nature communications* 11 (1), p. 787. DOI: 10.1038/s41467-020-14609-1.
- Benezra, R.; Davis, R. L.; Lockshon, D.; Turner, D. L.; Weintraub, H. (1990): The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. In *Cell* 61 (1), pp. 49–59. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90214-y.
- Benjamini, Yoav; Hochberg, Yosef (2000): On the Adaptive Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing With Independent Statistics. In *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 25 (1), pp. 60–83. DOI: 10.3102/10769986025001060.
- Bhattacharyya, Swati; Wu, Minghua; Fang, Feng; Tourtellotte, Warren; Feghali-Bostwick, Carol; Varga, John (2011): Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. In *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 30 (4), pp. 235–242. DOI: 10.1016/j.matbio.2011.03.005.
- Bickel, David; Gohlke, Holger (2019): C-terminal modulators of heat shock protein of 90 kDa (HSP90): State of development and modes of action. In *Bioorganic & medicinal chemistry* 27 (21), p. 115080. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115080.
- Birbo, Bereket; Madu, Elechi E.; Madu, Chikezie O.; Jain, Aayush; Lu, Yi (2021): Role of HSP90 in Cancer. In *International journal of molecular sciences* 22 (19). DOI: 10.3390/ijms221910317.
- Bode, Helge Björn; Bethe, Barbara; Höfs, Regina; Zeeck, Axel (2002): Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. In *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 3 (7), pp. 619–627. DOI: 10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9.
- Bolger, Anthony M.; Lohse, Marc; Usadel, Bjoern (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. In *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (15), pp. 2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

- Bonfa, E.; Golombek, S. J.; Kaufman, L. D.; Skelly, S.; Weissbach, H.; Brot, N.; Elkon, K. B. (1987): Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. In *The New England journal of medicine* 317 (5), pp. 265–271. DOI: 10.1056/NEJM198707303170503.
- Brabletz, Simone; Schuhwerk, Harald; Brabletz, Thomas; Stemmler, Marc P. (2021): Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. In *The EMBO journal* 40 (18), e108647. DOI: 10.15252/emj.2021108647.
- Brabletz, Thomas; Kalluri, Raghu; Nieto, M. Angela; Weinberg, Robert A. (2018): EMT in cancer. In *Nature reviews. Cancer* 18 (2), pp. 128–134. DOI: 10.1038/nrc.2017.118.
- Brandes, Mikah S.; Gray, Nora E. (2020): NRF2 as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases. In *ASN neuro* 12, 1759091419899782. DOI: 10.1177/1759091419899782.
- Browman, Duncan T.; Resek, Mary E.; Zajchowski, Laura D.; Robbins, Stephen M. (2006): Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. In *Journal of cell science* 119 (Pt 15), pp. 3149–3160. DOI: 10.1242/jcs.03060.
- Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S. et al. (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. In *Cell* 96 (6), pp. 857–868. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4.
- Burke, Susan J.; Lu, Danhong; Sparer, Tim E.; Masi, Thomas; Goff, Matthew R.; Karlstad, Michael D.; Collier, J. Jason (2014): NF- $\kappa$ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. In *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 306 (2), E131-49. DOI: 10.1152/ajpendo.00347.2013.
- Canfield, Stephen; Lee, Youngnam; Schröder, Andreas; Rothman, Paul (2005): Cutting edge: IL-4 induces suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells by a mechanism dependent on activation of p38 MAPK. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (5), pp. 2494–2498. DOI: 10.4049/jimmunol.174.5.2494.
- Carruba, G.; Cervello, M.; Miceli, M. D.; Farruggio, R.; Notarbartolo, M.; Virruso, L. et al. (1999): Truncated form of beta-catenin and reduced expression of wild-type catenins feature HepG2 human liver cancer cells. In *Annals of the New York Academy of Sciences* 886, pp. 212–216. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09419.x.
- Chen, Xiao; Wang, Yutong; Ma, Nan; Tian, Jing; Shao, Yurou; Zhu, Bo et al. (2020a): Target identification of natural medicine with chemical proteomics approach: probe synthesis, target fishing and protein identification. In *Signal transduction and targeted therapy* 5 (1), p. 72. DOI: 10.1038/s41392-020-0186-y.

- Chen, Xu; Wan, Lin; Wang, Wei; Xi, Wen-Jin; Yang, An-Gang; Wang, Tao (2020b): Re-recognition of pseudogenes: From molecular to clinical applications. In *Theranostics* 10 (4), pp. 1479–1499. DOI: 10.7150/thno.40659.
- Cheng, Zhe; Teo, Guoshou; Krueger, Sabrina; Rock, Tara M.; Koh, Hiromi W. L.; Choi, Hyungwon; Vogel, Christine (2016): Differential dynamics of the mammalian mRNA and protein expression response to misfolding stress. In *Molecular systems biology* 12 (1), p. 855. DOI: 10.15252/msb.20156423.
- Cho, Hee Jun; Baek, Kyoung Eun; Saika, Shizuya; Jeong, Moon-Jin; Yoo, Jiyun (2007): Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. In *Biochemical and biophysical research communications* 353 (2), pp. 337–343. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.035.
- Chypre, Melanie; Zaidi, Nousheen; Smans, Karine (2012): ATP-citrate lyase: a mini-review. In *Biochemical and biophysical research communications* 422 (1), pp. 1–4. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.04.144.
- Copple, Ian M.; Dinkova-Kostova, Albena T.; Kensler, Thomas W.; Liby, Karen T.; Wigley, W. Christian (2017): NRF2 as an Emerging Therapeutic Target. In *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, p. 8165458. DOI: 10.1155/2017/8165458.
- Cragg, Gordon M.; Newman, David J. (2013): Natural products: a continuing source of novel drug leads. In *Biochimica et biophysica acta* 1830 (6), pp. 3670–3695. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- Crompton, Tessa; Outram, Susan V.; Hager-Theodorides, Ariadne L. (2007): Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation. In *Nature reviews. Immunology* 7 (9), pp. 726–735. DOI: 10.1038/nri2151.
- Cuadrado, Antonio; Rojo, Ana I.; Wells, Geoffrey; Hayes, John D.; Cousin, Sharon P.; Rumsey, William L. et al. (2019): Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. In *Nature reviews. Drug discovery* 18 (4), pp. 295–317. DOI: 10.1038/s41573-018-0008-x.
- Cui, Miao; Cheng, Chao; Zhang, Lanjing (2022): High-throughput proteomics: a methodological mini-review. In *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 102 (11), pp. 1170–1181. DOI: 10.1038/s41374-022-00830-7.
- Cunningham, Fiona; Allen, James E.; Allen, Jamie; Alvarez-Jarreta, Jorge; Amode, M. Ridwan; Armean, Irina M. et al. (2022): Ensembl 2022. In *Nucleic acids research* 50 (D1), D988-D995. DOI: 10.1093/nar/gkab1049.

- Dang, Chi V.; O'Donnell, Kathryn A.; Zeller, Karen I.; Nguyen, Tam; Osthus, Rebecca C.; Li, Feng (2006): The c-Myc target gene network. In *Seminars in cancer biology* 16 (4), pp. 253–264. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.07.014.
- Davis, Ronald L. (2020): Mechanism of Action and Target Identification: A Matter of Timing in Drug Discovery. In *iScience* 23 (9), p. 101487. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101487.
- Del Favero, Giorgia; Hohenbichler, Julia; Mayer, Raphaela Maria; Rychlik, Michael; Marko, Doris (2020): Mycotoxin Alvertoxin II Induces Lipid Peroxidation Connecting Mitochondrial Stress Response to NF- $\kappa$ B Inhibition in THP-1 Macrophages. In *Chemical research in toxicology* 33 (2), pp. 492–504. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00378.
- Demichev, Vadim; Messner, Christoph B.; Vernardis, Spyros I.; Lilley, Kathryn S.; Ralser, Markus (2020): DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. In *Nature methods* 17 (1), pp. 41–44. DOI: 10.1038/s41592-019-0638-x.
- Deng, Zhangshuang; Wong, Nai-Kei; Guo, Zhiyong; Zou, Kun; Xiao, Youli; Zhou, Yiqing (2019): Dehydrocurvularin is a potent antineoplastic agent irreversibly blocking ATP-citrate lyase: evidence from chemoproteomics. In *Chemical communications (Cambridge, England)* 55 (29), pp. 4194–4197. DOI: 10.1039/C9CC00256A.
- Disney, Matthew D. (2019): Targeting RNA with Small Molecules To Capture Opportunities at the Intersection of Chemistry, Biology, and Medicine. In *Journal of the American Chemical Society* 141 (17), pp. 6776–6790. DOI: 10.1021/jacs.8b13419.
- Doerner, Astrid M.; Zuraw, Bruce L. (2009): TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. In *Respiratory research* 10 (1), p. 100. DOI: 10.1186/1465-9921-10-100.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In *Cytotherapy* 8 (4), pp. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- D'Souza, Rochelle C. J.; Knittle, Anna M.; Nagaraj, Nagarjuna; van Dinther, Maarten; Choudhary, Chunaram; Dijke, Peter ten et al. (2014): Time-resolved dissection of early phosphoproteome and ensuing proteome changes in response to TGF- $\beta$ . In *Science signaling* 7 (335), rs5. DOI: 10.1126/scisignal.2004856.
- Ekstrand-Hammarström, Barbro; Akfur, Christine M.; Andersson, Per Ola; Lejon, Christian; Osterlund, Lars; Bucht, Anders (2012): Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. In *Nanotoxicology* 6 (6), pp. 623–634. DOI: 10.3109/17435390.2011.598245.

- Elzner, Stephan; Schmidt, Denise; Schollmeyer, Dieter; Erkel, Gerhard; Anke, Timm; Kleinert, Hartmut et al. (2008): Inhibitors of inducible NO synthase expression: total synthesis of (S)-curvularin and its ring homologues. In *ChemMedChem* 3 (6), pp. 924–939. DOI: 10.1002/cmdc.200800022.
- Erkel, Gerhard; Belahmer, Hanane; Serwe, Annegret; Anke, Timm; Kunz, Horst; Kolshorn, Heinz et al. (2008): Oxacyclododecindione, a novel inhibitor of IL-4 signaling from *Exserohilum rostratum*. In *The Journal of antibiotics* 61 (5), pp. 285–290. DOI: 10.1038/ja.2008.40.
- Fintha, Attila; Gasparics, Ákos; Rosivall, László; Sebe, Attila (2019): Therapeutic Targeting of Fibrotic Epithelial-Mesenchymal Transition-An Outstanding Challenge. In *Frontiers in pharmacology* 10, p. 388. DOI: 10.3389/fphar.2019.00388.
- Fleck, Stefanie C.; Burkhardt, Britta; Pfeiffer, Erika; Metzler, Manfred (2012): *Alternaria* toxins: Altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. In *Toxicology letters* 214 (1), pp. 27–32. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.08.003.
- Foulds, Charles E.; Nelson, Mary L.; Blaszcak, Adam G.; Graves, Barbara J. (2004): Ras/mitogen-activated protein kinase signaling activates Ets-1 and Ets-2 by CBP/p300 recruitment. In *Molecular and cellular biology* 24 (24), pp. 10954–10964. DOI: 10.1128/MCB.24.24.10954-10964.2004.
- Freudlsperger, C.; Bian, Y.; Contag Wise, S.; Burnett, J.; Coupar, J.; Yang, X. et al. (2013): TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. In *Oncogene* 32 (12), pp. 1549–1559. DOI: 10.1038/onc.2012.171.
- Fricker, Lloyd D. (2015): Limitations of Mass Spectrometry-Based Peptidomic Approaches. In *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 26 (12), pp. 1981–1991. DOI: 10.1007/s13361-015-1231-x.
- Friedl, Peter; Gilmour, Darren (2009): Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (7), pp. 445–457. DOI: 10.1038/nrm2720.
- Friman, Tomas (2020): Mass spectrometry-based Cellular Thermal Shift Assay (CETSA®) for target deconvolution in phenotypic drug discovery. In *Bioorganic & medicinal chemistry* 28 (1), p. 115174. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115174.
- Fröhlich, Klemens; Brombacher, Eva; Fahrner, Matthias; Vogele, Daniel; Kook, Lucas; Pinter, Niko et al. (2022): Benchmarking of analysis strategies for data-independent acquisition proteomics using a large-scale dataset comprising inter-patient heterogeneity. In *Nature communications* 13 (1), p. 2622. DOI: 10.1038/s41467-022-30094-0.

- Fry, Elizabeth A.; Inoue, Kazushi (2018): Aberrant expression of ETS1 and ETS2 proteins in cancer. In *Cancer reports and reviews* 2 (3). DOI: 10.15761/CRR.1000151.
- Fryer, C. J.; Archer, T. K. (1998): Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. In *Nature* 393 (6680), pp. 88–91. DOI: 10.1038/30032.
- Ganesh Yerra, Veera; Negi, Geeta; Sharma, Shyam S.; Kumar, Ashutosh (2013): Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways in diabetic neuropathy. In *Redox biology* 1 (1), pp. 394–397. DOI: 10.1016/j.redox.2013.07.005.
- Garcia-Canton, Carolina; Minet, Emmanuel; Anadon, Arturo; Meredith, Clive (2013): Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example. In *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 27 (6), pp. 1719–1727. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.05.001.
- Garcia-Marcos, Mikel; Kietrsunthorn, Patrick S.; Wang, Honghui; Ghosh, Pradipta; Farquhar, Marilyn G. (2011): G Protein binding sites on Calnuc (nucleobindin 1) and NUCB2 (nucleobindin 2) define a new class of G( $\alpha$ )i-regulatory motifs. In *The Journal of biological chemistry* 286 (32), pp. 28138–28149. DOI: 10.1074/jbc.M110.204099.
- Gerber, Anthony N.; Newton, Robert; Sasse, Sarah K. (2021): Repression of transcription by the glucocorticoid receptor: A parsimonious model for the genomics era. In *The Journal of biological chemistry* 296, p. 100687. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100687.
- Geris, Regina; Pinho, Matheus A.; Boffo, Elisangela F.; Simpson, Thomas J. (2022): Naturally Occurring Partially Reduced Perylenequinones from Fungi. In *Journal of natural products* 85 (9), pp. 2236–2250. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.2c00368.
- Gervasi, Megan; Bianchi-Smiraglia, Anna; Cummings, Michael; Zheng, Qiao; Wang, Dan; Liu, Song; Bakin, Andrei V. (2012): JunB contributes to Id2 repression and the epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor- $\beta$ . In *The Journal of cell biology* 196 (5), pp. 589–603. DOI: 10.1083/jcb.201109045.
- Ghanem, Carolina I.; Pérez, María J.; Manautou, José E.; Mottino, Aldo D. (2016): Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. In *Pharmacological research* 109, pp. 119–131. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.02.020.
- Go, Ryeo-Eun; Hwang, Kyung-A; Choi, Kyung-Chul (2015): Cytochrome P450 1 family and cancers. In *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 147, pp. 24–30. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.11.003.

- Gomez-Pastor, Rocio; Burchfiel, Eileen T.; Thiele, Dennis J. (2018): Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 19 (1), pp. 4–19. DOI: 10.1038/nrm.2017.73.
- Gonzalez, David M.; Medici, Damian (2014): Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. In *Science signaling* 7 (344), re8. DOI: 10.1126/scisignal.2005189.
- Gonzalez-Sanchez, Ester; Vaquero, Javier; Fernández-Barrena, Maite G.; Lasarte, Juan José; Avila, Matías A.; Sarobe, Pablo et al. (2021): The TGF- $\beta$  Pathway: A Pharmacological Target in Hepatocellular Carcinoma? In *Cancers* 13 (13). DOI: 10.3390/cancers13133248.
- Gupta, Subash C.; Sharma, Anurag; Mishra, Manish; Mishra, Ranjit K.; Chowdhuri, Debapratim K. (2010): Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? In *Life sciences* 86 (11-12), pp. 377–384. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.12.015.
- Hammond, Colin M.; Bao, Hongyu; Hendriks, Ivo A.; Carraro, Massimo; García-Nieto, Alberto; Liu, Yanhong et al. (2021): DNAJC9 integrates heat shock molecular chaperones into the histone chaperone network. In *Molecular cell* 81 (12), 2533-2548.e9. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.03.041.
- Han, Chaofeng; Chen, Taoyong; Li, Nan; Yang, Mingjin; Wan, Tao; Cao, Xuetao (2007): HDJC9, a novel human type C DnaJ/HSP40 member interacts with and cochaperones HSP70 through the J domain. In *Biochemical and biophysical research communications* 353 (2), pp. 280–285. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.013.
- Han, Jianfeng; Alvarez-Breckenridge, Christopher A.; Wang, Qi-En; Yu, Jianhua (2015): TGF- $\beta$  signaling and its targeting for glioma treatment. In *American Journal of Cancer Research* 5 (3), pp. 945–955.
- Han, Xiaoyan; Na, Tao; Wu, Tingting; Yuan, Bao-Zhu (2020): Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. In *PloS one* 15 (1), e0227174. DOI: 10.1371/journal.pone.0227174.
- Hardy, Rowan S.; Raza, Karim; Cooper, Mark S. (2020): Therapeutic glucocorticoids: mechanisms of actions in rheumatic diseases. In *Nature reviews. Rheumatology* 16 (3), pp. 133–144. DOI: 10.1038/s41584-020-0371-y.
- Harrow, Jennifer; Frankish, Adam; Gonzalez, Jose M.; Tapanari, Electra; Diekhans, Mark; Kokocinski, Felix et al. (2012): GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. In *Genome research* 22 (9), pp. 1760–1774. DOI: 10.1101/gr.135350.111.
- Hebenstreit, Daniel; Luft, Petra; Schmiedlechner, Angela; Duschl, Albert; Horejs-Hoock, Jutta (2005): SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IL-4 and IL-13 induced activation of Eotaxin-3/CCL26 gene

expression in HEK293 cells. In *Molecular immunology* 42 (3), pp. 295–303. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.09.004.

Hebenstreit, Daniel; Wirnsberger, Gerald; Horejs-Hoeck, Jutta; Duschl, Albert (2006): Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. In *Cytokine & growth factor reviews* 17 (3), pp. 173–188. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2006.01.004.

Henke, Jenny; Erkel, Gerhard; Brochhausen, Christoph; Kleinert, Hartmut; Schwarting, Andreas; Menke, Julia; Pautz, Andrea (2014): The fungal lactone oxacyclododecindione is a potential new therapeutic substance in the treatment of lupus-associated kidney disease. In *Kidney international* 86 (4), pp. 780–789. DOI: 10.1038/ki.2014.109.

Holbrook, Jonathan; Lara-Reyna, Samuel; Jarosz-Griffiths, Heledd; McDermott, Michael F. (2019): Tumour necrosis factor signalling in health and disease. In *F1000Research* 8. DOI: 10.12688/f1000research.17023.1.

Holzbeierlein, Jeffrey M.; Windsperger, Andrew; Vielhauer, George (2010): Hsp90: a drug target? In *Current oncology reports* 12 (2), pp. 95–101. DOI: 10.1007/s11912-010-0086-3.

Hong, Keun-Seok; Kim, Hyemin; Kim, Seon-Hee; Kim, Minju; Yoo, Jiyun (2019): Calponin 3 Regulates Cell Invasion and Doxorubicin Resistance in Gastric Cancer. In *Gastroenterology research and practice* 2019, p. 3024970. DOI: 10.1155/2019/3024970.

Horejs, Christine-Maria (2016): Basement membrane fragments in the context of the epithelial-to-mesenchymal transition. In *European journal of cell biology* 95 (11), pp. 427–440. DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.06.002.

Hoshino, Akihiko; Tsuji, Takemasa; Matsuzaki, Junko; Jinushi, Takafumi; Ashino, Shigeru; Teramura, Takashi et al. (2004): STAT6-mediated signaling in Th2-dependent allergic asthma: critical role for the development of eosinophilia, airway hyper-responsiveness and mucus hypersecretion, distinct from its role in Th2 differentiation. In *International immunology* 16 (10), pp. 1497–1505. DOI: 10.1093/intimm/dxh151.

Hoter, Abdullah; El-Sabban, Marwan E.; Naim, Hassan Y. (2018): The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. In *International journal of molecular sciences* 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092560.

Hsiao, Cheng-Chih; Kragten, Natasja A. M.; Piao, Xianhua; Hamann, Jörg; van Gisbergen, Klaas P. J. M. (2021): The Inhibitory Receptor GPR56 (Adgrg1) Is Specifically Expressed by Tissue-Resident Memory T Cells in Mice But Dispensable for Their Differentiation and Function In Vivo. In *Cells* 10 (10). DOI: 10.3390/cells10102675.

- Hu, Chaojun; Huang, Wei; Chen, Hua; Song, Guang; Li, Ping; Shan, Qiang et al. (2015): Autoantibody profiling on human proteome microarray for biomarker discovery in cerebrospinal fluid and sera of neuropsychiatric lupus. In *PLoS one* 10 (5), e0126643. DOI: 10.1371/journal.pone.0126643.
- Hu, Ye; Gupta-Ostermann, Disha; Bajorath, Jürgen (2014): Exploring compound promiscuity patterns and multi-target activity spaces. In *Computational and structural biotechnology journal* 9, e201401003. DOI: 10.5936/csbj.201401003.
- Huber, Michael D.; Vesely, Paul W.; Datta, Kaustuv; Gerace, Larry (2013): Erlins restrict SREBP activation in the ER and regulate cellular cholesterol homeostasis. In *The Journal of cell biology* 203 (3), pp. 427–436. DOI: 10.1083/jcb.201305076.
- Iizuka, H.; Kubota, T.; Satake, F.; Hirokawa, G.; Miura, K.; Kurosawa, Y. et al. (1997): Enhanced expression of nucleobindin in lymphatic organs of lupus-prone mice. In *Lupus* 6 (4), pp. 365–370. DOI: 10.1177/096120339700600404.
- Isik, Zerrin; Baldow, Christoph; Cannistraci, Carlo Vittorio; Schroeder, Michael (2015): Drug target prioritization by perturbed gene expression and network information. In *Scientific reports* 5, p. 17417. DOI: 10.1038/srep17417.
- Iskar, Murat; Campillos, Monica; Kuhn, Michael; Jensen, Lars Juhl; van Noort, Vera; Bork, Peer (2010): Drug-induced regulation of target expression. In *PLoS computational biology* 6 (9). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000925.
- Jacomy, Mathieu; Venturini, Tommaso; Heymann, Sebastien; Bastian, Mathieu (2014): ForceAtlas2, a continuous graph layout algorithm for handy network visualization designed for the Gephi software. In *PLoS one* 9 (6), e98679. DOI: 10.1371/journal.pone.0098679.
- Jadhav, Gopal P.; Prathipati, Pavan Kumar; Chauhan, Harsh (2020): Surface plasmon resonance, Orbitrap mass spectrometry and Raman advancements: exciting new techniques in drug discovery. In *Expert opinion on drug discovery* 15 (7), pp. 739–743. DOI: 10.1080/17460441.2020.1745771.
- Jafari, Rozbeh; Almqvist, Helena; Axelsson, Hanna; Ignatushchenko, Marina; Lundbäck, Thomas; Nordlund, Pär; Martinez Molina, Daniel (2014): The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. In *Nature protocols* 9 (9), pp. 2100–2122. DOI: 10.1038/nprot.2014.138.
- Jarolim, Katharina; Del Favero, Giorgia; Pahlke, Gudrun; Dostal, Victoria; Zimmermann, Kristin; Heiss, Elke et al. (2017): Activation of the Nrf2-ARE pathway by the *Alternaria alternata* mycotoxins altertoxin I and II. In *Archives of toxicology* 91 (1), pp. 203–216. DOI: 10.1007/s00204-016-1726-7.
- Jiang, Jian-Li; Tang, Juan (2007): CD147 and its interacting proteins in cellular functions. In *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 59 (4), pp. 517–523.

- Jiang, Zhonglin; Lu, Lina; Liu, Yuwei; Zhang, Si; Li, Shuxian; Wang, Guanyu et al. (2020): SMAD7 and SERPINE1 as novel dynamic network biomarkers detect and regulate the tipping point of TGF- $\beta$  induced EMT. In *Science Bulletin* 65 (10), pp. 842–853. DOI: 10.1016/j.scib.2020.01.013.
- Jung, Mathias (2012): Modulation der Genexpression von CXCL10 und immunrelevanter MicroRNAs durch neue Wirkstoffe aus Pilzen. Doktorarbeit. Technische Universität Kaiserslautern. Fachbereich Biologie.
- Jung, Mathias; Liermann, Johannes C.; Opatz, Till; Erkel, Gerhard (2011): Ganodermycin, a novel inhibitor of CXCL10 expression from *Ganoderma applanatum*. In *The Journal of antibiotics* 64 (10), pp. 683–686. DOI: 10.1038/ja.2011.64.
- Kalfert, David; Ludvikova, Marie; Pesta, Martin; Ludvik, Jaroslav; Dostalova, Lucie; Kholová, Ivana (2020): Multifunctional Roles of miR-34a in Cancer: A Review with the Emphasis on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Thyroid Cancer with Clinical Implications. In *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 10 (8). DOI: 10.3390/diagnostics10080563.
- Kalluri, Raghu; Neilson, Eric G. (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. In *The Journal of clinical investigation* 112 (12), pp. 1776–1784. DOI: 10.1172/JCI20530.
- Kalluri, Raghu; Weinberg, Robert A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. In *The Journal of clinical investigation* 119 (6), pp. 1420–1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- Kalyanaraman, Balaraman; Darley-USmar, Victor; Davies, Kelvin J. A.; Dennery, Phyllis A.; Forman, Henry Jay; Grisham, Matthew B. et al. (2012): Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. In *Free radical biology & medicine* 52 (1), pp. 1–6. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030.
- Kamohara, Hidenobu; Takahashi, Masashi; Ishiko, Takatoshi; Ogawa, Michio; Baba, Hideo (2007): Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor- $\alpha$  and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. In *International journal of oncology*. DOI: 10.3892/ijo.31.3.627.
- Kanehisa, M.; Goto, S. (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. In *Nucleic acids research* 28 (1), pp. 27–30. DOI: 10.1093/nar/28.1.27.
- Kanehisa, Minoru; Furumichi, Miho; Sato, Yoko; Kawashima, Masayuki; Ishiguro-Watanabe, Mari (2022): KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. In *Nucleic acids research*. DOI: 10.1093/nar/gkac963.
- Katsuno, Yoko; Derynck, Rik (2021): Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- $\beta$  family. In *Developmental cell* 56 (6), pp. 726–746. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.02.028.

- Khanna, Ish (2012): Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. In *Drug Discovery Today* 17 (19-20), pp. 1088–1102. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.05.007.
- Khurana, Nidhi; Bhattacharyya, Sunanda (2015): Hsp90, the concertmaster: tuning transcription. In *Frontiers in oncology* 5, p. 100. DOI: 10.3389/fonc.2015.00100.
- Kim, Byung-Gyu; Malek, Ehsan; Choi, Sung Hee; Ignatz-Hoover, James J.; Driscoll, James J. (2021): Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- $\beta$  pathway. In *Journal of hematology & oncology* 14 (1), p. 55. DOI: 10.1186/s13045-021-01053-x.
- Kim, H. R.; Kang, H. S.; Kim, H. D. (1999): Geldanamycin induces heat shock protein expression through activation of HSF1 in K562 erythroleukemic cells. In *IUBMB life* 48 (4), pp. 429–433. DOI: 10.1080/713803536.
- Kim, Jeong-Eun; You, Dong-Joo; Lee, Cheolju; Ahn, Curie; Seong, Jae Young; Hwang, Jong-Ik (2010): Suppression of NF-kappaB signaling by KEAP1 regulation of IKKbeta activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. In *Cellular signalling* 22 (11), pp. 1645–1654. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.06.004.
- Kim, Mi Eun; Kim, Dae Hyun; Lee, Jun Sik (2022): FoxO Transcription Factors: Applicability as a Novel Immune Cell Regulators and Therapeutic Targets in Oxidative Stress-Related Diseases. In *International journal of molecular sciences* 23 (19). DOI: 10.3390/ijms231911877.
- Kolb, Hartmuth C.; Sharpless, K. Barry (2003): The growing impact of click chemistry on drug discovery. In *Drug Discovery Today* 8 (24), pp. 1128–1137. DOI: 10.1016/s1359-6446(03)02933-7.
- Kress, Theresia R.; Cannell, Ian G.; Brenkman, Arjan B.; Samans, Birgit; Gaestel, Matthias; Roepman, Paul et al. (2011): The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. In *Molecular cell* 41 (4), pp. 445–457. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.01.023.
- Kubota, Kazuishi; Funabashi, Masanori; Ogura, Yuji (2019): Target deconvolution from phenotype-based drug discovery by using chemical proteomics approaches. In *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics* 1867 (1), pp. 22–27. DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.08.002.
- Kück, Ulrich; Nowrousian, Minou (2009): Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. With assistance of Jürgen Reiß, Minou Nowrousian, Birgit Hoff, Ines Engh. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available online at <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=428765>.
- Kuhn, Michael; Mering, Christian von; Campillos, Monica; Jensen, Lars Juhl; Bork, Peer (2008): STITCH: interaction networks of chemicals and proteins. In *Nucleic acids research* 36 (Database issue), D684-8. DOI: 10.1093/nar/gkm795.

- Lagraoui, M.; Gagnon, L. (1997): Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF-beta 1. In *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 43 (3), pp. 313–318.
- Lagundžin, Dragana; Krieger, Kimiko L.; Law, Henry C-H; Woods, Nicholas T. (2022): An optimized co-immunoprecipitation protocol for the analysis of endogenous protein-protein interactions in cell lines using mass spectrometry. In *STAR protocols* 3 (1), p. 101234. DOI: 10.1016/j.xpro.2022.101234.
- Lai, Ashton C.; Crews, Craig M. (2017): Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. In *Nature reviews. Drug discovery* 16 (2), pp. 101–114. DOI: 10.1038/nrd.2016.211.
- Lamouille, Samy; Xu, Jian; Derynck, Rik (2014): Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (3), pp. 178–196. DOI: 10.1038/nrm3758.
- Lang, Benjamin J.; Guerrero, Martin E.; Prince, Thomas L.; Okusha, Yuka; Bonorino, Cristina; Calderwood, Stuart K. (2021): The functions and regulation of heat shock proteins; key orchestrators of proteostasis and the heat shock response. In *Archives of toxicology* 95 (6), pp. 1943–1970. DOI: 10.1007/s00204-021-03070-8.
- Lang, Florian; Brandes, Ralf; Schmidt, Robert F. (2019): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Langmead, Ben; Salzberg, Steven L. (2012): Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. In *Nature methods* 9 (4), pp. 357–359. DOI: 10.1038/nmeth.1923.
- Levy, Laurence; Hill, Caroline S. (2005): Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. In *Molecular and cellular biology* 25 (18), pp. 8108–8125. DOI: 10.1128/MCB.25.18.8108-8125.2005.
- Lichtman, Michael K.; Otero-Vinas, Marta; Falanga, Vincent (2016): Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis. In *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 24 (2), pp. 215–222. DOI: 10.1111/wrr.12398.
- Ling, Hua-Zhi; Xu, Shu-Zhen; Leng, Rui-Xue; Wu, Jun; Pan, Hai-Feng; Fan, Yin-Guang et al. (2020): Discovery of new serum biomarker panels for systemic lupus erythematosus diagnosis. In *Rheumatology (Oxford, England)* 59 (6), pp. 1416–1425. DOI: 10.1093/rheumatology/kez634.
- Liska, Orsolya; Bohár, Balázs; Hidas, András; Korcsmáros, Tamás; Papp, Balázs; Fazekas, Dávid; Ari, Eszter (2022): TFLink: an integrated gateway to access transcription factor-target gene interactions for multiple species. In *Database : the journal of biological databases and curation* 2022. DOI: 10.1093/database/baac083.

- Liu, D.; Coloe, S.; Baird, R.; Pederson, J. (2000): Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. In *Journal of clinical microbiology* 38 (1), p. 471. DOI: 10.1128/JCM.38.1.471-471.2000.
- Liu, Yansheng; Beyer, Andreas; Aebersold, Ruedi (2016): On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. In *Cell* 165 (3), pp. 535–550. DOI: 10.1016/j.cell.2016.03.014.
- Lo, Huey-ming; Lai, Tsung-hsuan; Li, Chih-hung; Wu, Wen-bin (2014): TNF- $\alpha$  induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. In *Acta pharmacologica Sinica* 35 (3), pp. 339–350. DOI: 10.1038/aps.2013.182.
- Lounkine, Eugen; Keiser, Michael J.; Whitebread, Steven; Mikhailov, Dmitri; Hamon, Jacques; Jenkins, Jeremy L. et al. (2012): Large-scale prediction and testing of drug activity on side-effect targets. In *Nature* 486 (7403), pp. 361–367. DOI: 10.1038/nature11159.
- Love, Michael I.; Huber, Wolfgang; Anders, Simon (2014): Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. In *Genome biology* 15 (12), p. 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lovisa, Sara (2021): Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Fibrosis: Concepts and Targeting Strategies. In *Frontiers in pharmacology* 12, p. 737570. DOI: 10.3389/fphar.2021.737570.
- Lu, Mudan; Xu, Wei; Gao, Bo; Xiong, Sidong (2016): Blunting Autoantigen-induced FOXO3a Protein Phosphorylation and Degradation Is a Novel Pathway of Glucocorticoids for the Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. In *The Journal of biological chemistry* 291 (38), pp. 19900–19912. DOI: 10.1074/jbc.M116.728840.
- Luo, Feng; Yang, Yunfeng; Zhong, Jianxin; Gao, Haichun; Khan, Latifur; Thompson, Dorothea K.; Zhou, Jizhong (2007): Constructing gene co-expression networks and predicting functions of unknown genes by random matrix theory. In *BMC bioinformatics* 8, p. 299. DOI: 10.1186/1471-2105-8-299.
- Luo, Weijun; Brouwer, Cory (2013): Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. In *Bioinformatics (Oxford, England)* 29 (14), pp. 1830–1831. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt285.
- Mackinnon, Andrew L.; Taunton, Jack (2009): Target Identification by Diazirine Photo-Cross-linking and Click Chemistry. In *Current protocols in chemical biology* 1, pp. 55–73. DOI: 10.1002/9780470559277.ch090167.
- Maeda, Aya; Bandow, Kenjiro; Kusuyama, Joji; Kakimoto, Kyoko; Ohnishi, Tomokazu; Miyawaki, Shouichi; Matsuguchi, Tetsuya (2015): Induction of CXCL2 and CCL2 by pressure force requires IL-1 $\beta$ -MyD88 axis in osteoblasts. In *Bone* 74, pp. 76–82. DOI: 10.1016/j.bone.2015.01.007.

- Marconi, Guya D.; Fonticoli, Luigia; Rajan, Thangavelu Soundara; Pierdomenico, Sante D.; Trubiani, Oriana; Pizzicannella, Jacopo; Diomede, Francesca (2021): Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. In *Cells* 10 (7). DOI: 10.3390/cells10071587.
- Martinez Molina, Daniel; Jafari, Rozbeh; Ignatushchenko, Marina; Seki, Takahiro; Larsson, E. Andreas; Dan, Chen et al. (2013): Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. In *Science (New York, N.Y.)* 341 (6141), pp. 84–87. DOI: 10.1126/science.1233606.
- Masoud, Farzaneh; Mehrotra, Pavni; Nowak, Romana (2009): The Cytokine Interleukin 1beta Induces Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Peritoneal Mesothelial Cells Through Direct and Indirect Effects Involving Basigin. In *Biology of Reproduction* 81 (Suppl\_1), p. 606. DOI: 10.1093/biolreprod/81.s1.606.
- Massagué, J.; Wotton, D. (2000): Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. In *The EMBO journal* 19 (8), pp. 1745–1754. DOI: 10.1093/emboj/19.8.1745.
- McMaster, Andrew; Ray, David W. (2008): Drug insight: selective agonists and antagonists of the glucocorticoid receptor. In *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* 4 (2), pp. 91–101. DOI: 10.1038/ncpendmet0745.
- Mechanism matters (2010). In *Nature medicine* 16 (4), p. 347.
- Mendillo, Marc Laurence; Pincus, David; Scherz-Shouval, Ruth (2020): HSF1 and Molecular Chaperones in Biology and Cancer. Cham: Springer International Publishing (1243).
- Miyata, Yoshihiko; Nakamoto, Hitoshi; Neckers, Len (2013): The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. In *Current pharmaceutical design* 19 (3), pp. 347–365. DOI: 10.2174/138161213804143725.
- Mohebati, Arash; Guttenplan, Joseph B.; Kochhar, Amit; Zhao, Zhong-Lin; Kosinska, Wieslawa; Subbaramaiah, Kotha; Dannenberg, Andrew J. (2012): Carnosol, a constituent of Zyflamend, inhibits aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of CYP1A1 and CYP1B1 transcription and mutagenesis. In *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 5 (4), pp. 593–602. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0002.
- Monneaux, Fanny (2001): Autoreactive T cells respond to nucleobindin. In *Arthritis Res Ther* 3 (1). DOI: 10.1186/ar-2001-66886.
- Moon, Eui Jung; Giaccia, Amato (2015): Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: possible implications in cancer treatment. In *Free radical biology & medicine* 79, pp. 292–299. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.009.

- Morris, Melody K.; an Chi; Melas, Ioannis N.; Alexopoulos, Leonidas G. (2014): Phosphoproteomics in drug discovery. In *Drug Discovery Today* 19 (4), pp. 425–432. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.10.010.
- Moustakas, Aristidis; Heldin, Carl-Henrik (2012): Induction of epithelial-mesenchymal transition by transforming growth factor  $\beta$ . In *Seminars in cancer biology* 22 (5-6), pp. 446–454. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.04.002.
- Munro, H. D.; Musgrave, O. C.; Templeton, Richard (1967): Curvularin. Part V. The compound C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>,  $\alpha\beta$ -dehydrocurvularin. In *Journal of the Chemical Society C: Organic*, pp. 947–948.
- Musa, Aliyu; Ghoraie, Laleh Soltan; Zhang, Shu-Dong; Glazko, Galina; Yli-Harja, Olli; Dehmer, Matthias et al. (2018): A review of connectivity map and computational approaches in pharmacogenomics. In *Briefings in bioinformatics* 19 (3), pp. 506–523. DOI: 10.1093/bib/bbw112.
- Nair, Vidhya A.; Al-Khayyal, Noura A.; Sivaperumal, Sivaramakrishnan; Abdel-Rahman, Wael M. (2019): Calponin 3 promotes invasion and drug resistance of colon cancer cells. In *World journal of gastrointestinal oncology* 11 (11), pp. 971–982. DOI: 10.4251/wjgo.v11.i11.971.
- Nakao, Atsuhito; Okumura, Ko; Ogawa, Hideoki (2002): Smad7: a new key player in TGF-beta-associated disease. In *Trends in molecular medicine* 8 (8), pp. 361–363. DOI: 10.1016/S1471-4914(02)02376-6.
- Nakerakanti, Sashidhar S.; Bujor, Andreea M.; Trojanowska, Maria (2011): CCN2 is required for the TGF- $\beta$  induced activation of Smad1-Erk1/2 signaling network. In *PLoS one* 6 (7), e21911. DOI: 10.1371/journal.pone.0021911.
- Namgaladze, Dmitry; Zukunft, Sven; Schnütgen, Frank; Kurrle, Nina; Fleming, Ingrid; Fuhrmann, Dominik; Brüne, Bernhard (2018): Polarization of Human Macrophages by Interleukin-4 Does Not Require ATP-Citrate Lyase. In *Frontiers in immunology* 9, p. 2858. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02858.
- Neilson, Lee E.; Quinn, Joseph F.; Gray, Nora E. (2020): Peripheral Blood NRF2 Expression as a Biomarker in Human Health and Disease. In *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (1). DOI: 10.3390/antiox10010028.
- Newman, David J.; Cragg, Gordon M. (2020): Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. In *Journal of natural products* 83 (3), pp. 770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- Nieto, M. Angela; Huang, Ruby Yun-Ju; Jackson, Rebecca A.; Thiery, Jean Paul (2016): EMT: 2016. In *Cell* 166 (1), pp. 21–45. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028.

- Nusspaumer, G.; Remacha, M.; Ballesta, J. P. (2000): Phosphorylation and N-terminal region of yeast ribosomal protein P1 mediate its degradation, which is prevented by protein P2. In *The EMBO journal* 19 (22), pp. 6075–6084. DOI: 10.1093/emboj/19.22.6075.
- Olive, Peggy L.; Banáth, Judit P. (2006): The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. In *Nature protocols* 1 (1), pp. 23–29. DOI: 10.1038/nprot.2006.5.
- Pacheco-Fernandez, Natalia; Pakdel, Mehrshad; Blank, Birgit; Sanchez-Gonzalez, Ismael; Weber, Kathrin; Tran, Mai Ly et al. (2020): Nucleobindin-1 regulates ECM degradation by promoting intra-Golgi trafficking of MMPs. In *The Journal of cell biology* 219 (8). DOI: 10.1083/jcb.201907058.
- Pahlke, G.; Tiessen, C.; Domnanich, K.; Kahle, N.; Groh, I. A. M.; Schreck, I. et al. (2016): Impact of *Alternaria* toxins on CYP1A1 expression in different human tumor cells and relevance for genotoxicity. In *Toxicology letters* 240 (1), pp. 93–104. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.10.003.
- Patriarca, Andrea (2016): *Alternaria* in food products. In *Current Opinion in Food Science* 11, pp. 1–9. DOI: 10.1016/j.cofs.2016.08.007.
- Pawliczak, Rafal; Logun, Carolea; Madara, Patricia; Barb, Jennifer; Suffredini, Anthony F.; Munson, Peter J. et al. (2005): Influence of IFN-gamma on gene expression in normal human bronchial epithelial cells: modulation of IFN-gamma effects by dexamethasone. In *Physiological genomics* 23 (1), pp. 28–45. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00011.2005.
- Pearson, Karl (1895): VII. Note on regression and inheritance in the case of two parents. In *Proc. R. Soc. Lond.* 58 (347-352), pp. 240–242. DOI: 10.1098/rspl.1895.0041.
- Pei, Duanqing; Shu, Xiaodong; Gassama-Diagne, Ama; Thiery, Jean Paul (2019): Mesenchymal-epithelial transition in development and reprogramming. In *Nature cell biology* 21 (1), pp. 44–53. DOI: 10.1038/s41556-018-0195-z.
- Peng, Dandan; Fu, Minyang; Wang, Manni; Wei, Yuquan; Wei, Xiawei (2022): Targeting TGF- $\beta$  signal transduction for fibrosis and cancer therapy. In *Molecular cancer* 21 (1), p. 104. DOI: 10.1186/s12943-022-01569-x.
- Phaniendra, Alugoju; Jestadi, Dinesh Babu; Periyasamy, Latha (2015): Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. In *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 30 (1), pp. 11–26. DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- Prince, Thomas; Ackerman, Andrew; Cavanaugh, Alice; Schreiter, Brielle; Juengst, Brendon; Andolino, Chaylen et al. (2018): Dual targeting of HSP70 does not induce the heat shock response and synergistically reduces cell viability in muscle invasive bladder cancer. In *Oncotarget* 9 (66), pp. 32702–32717. DOI: 10.18632/oncotarget.26021.

- Prole, David L.; Taylor, Colin W. (2019): Structure and Function of IP3 Receptors. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 11 (4). DOI: 10.1101/cshperspect.a035063.
- Puisieux, Alain; Brabletz, Thomas; Caramel, Julie (2014): Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. In *Nature cell biology* 16 (6), pp. 488–494. DOI: 10.1038/ncb2976.
- Raad, Houssam; Eskalli, Zineb; Corvilain, Bernard; Miot, Françoise; Deken, Xavier de (2013): Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOXA2. In *Free radical biology & medicine* 56, pp. 216–225. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.003.
- Rappsilber, Juri; Mann, Matthias; Ishihama, Yasushi (2007): Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. In *Nature protocols* 2 (8), pp. 1896–1906. DOI: 10.1038/nprot.2007.261.
- Réda, Clémence; Kaufmann, Emilie; Delahaye-Duriez, Andrée (2020): Machine learning applications in drug development. In *Computational and structural biotechnology journal* 18, pp. 241–252. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.12.006.
- Richter, Julia; Sandjo, Louis P.; Liermann, Johannes C.; Opatz, Till; Erkel, Gerhard (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*. In *Bioorganic & medicinal chemistry* 23 (3), pp. 556–563. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.12.004.
- Ritchie, Matthew E.; Phipson, Belinda; Di Wu; Hu, Yifang; Law, Charity W.; Shi, Wei; Smyth, Gordon K. (2015): limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. In *Nucleic acids research* 43 (7), e47. DOI: 10.1093/nar/gkv007.
- Rix, Uwe; Superti-Furga, Giulio (2009): Target profiling of small molecules by chemical proteomics. In *Nature chemical biology* 5 (9), pp. 616–624. DOI: 10.1038/nchembio.216.
- Rohr, Markus (2019): Antiinflammatorische Wirkung isolierter Naturstoffe aus Pilzen in zellulären Modellen humaner Autoimmunerkrankungen. Doktorarbeit. Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern. Fachbereich Biologie.
- Rothhammer, Veit; Quintana, Francisco J. (2019): The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. In *Nature reviews. Immunology* 19 (3), pp. 184–197. DOI: 10.1038/s41577-019-0125-8.
- Rubio, Valentina; Zhang, Jiawei; Valverde, Mahara; Rojas, Emilio; Shi, Zheng-Zheng (2011): Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity. In

*Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25 (2), pp. 521–529. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.10.021.

Rudolph, Kristina; Serwe, Annegret; Erkel, Gerhard (2013): Inhibition of TGF- $\beta$  signaling by the fungal lactones (S)-curvularin, dehydrocurvularin, oxacyclododecindione and galiellalactone. In *Cytokine* 61 (1), pp. 285–296. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.10.011.

Sadava, David; Hillis, David M.; Heller, H. Craig; Hacker, Sally D. (2019): PURVES BIOLOGIE. 10. Aufl. 2019. Edited by Jürgen Markl. CHAM: SPRINGER. Available online at <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1588446>.

Samarakoon, Rohan; Higgins, Craig E.; Higgins, Stephen P.; Higgins, Paul J. (2009): TGF-beta1-Induced Expression of the Poor Prognosis SERPINE1/PAI-1 Gene Requires EGFR Signaling: A New Target for Anti-EGFR Therapy. In *Journal of oncology* 2009, p. 342391. DOI: 10.1155/2009/342391.

Sanchez, Jackee; Carter, Trever R.; Cohen, Mark S.; Blagg, Brian S. J. (2020): Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone. In *Current cancer drug targets* 20 (4), pp. 253–270. DOI: 10.2174/1568009619666191202101330.

Santarsiero, Anna; Convertini, Paolo; Todisco, Simona; Pierri, Ciro L.; Grassi, Anna de; Williams, Niamh C. et al. (2021): ACLY Nuclear Translocation in Human Macrophages Drives Proinflammatory Gene Expression by NF- $\kappa$ B Acetylation. In *Cells* 10 (11). DOI: 10.3390/cells10112962.

Saurin, Sabrina; Meineck, Myriam; Erkel, Gerhard; Opatz, Till; Weinmann-Menke, Julia; Pautz, Andrea (2022): Drug Candidates for Autoimmune Diseases. In *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 15 (5). DOI: 10.3390/ph15050503.

Schneider, Kevin; Venn, Benedikt; Mühlhaus, Timo (2022): Plotly.NET: A fully featured charting library for.NET programming languages. In *F1000Research* 11, p. 1094. DOI: 10.12688/f1000research.123971.1.

Seneviratne, Suranjith L.; Black, Antony P.; Jones, Louise; Di Gleria, Kati; Bailey, Abigail S.; Ogg, Graham S. (2007): Interleukin-4 promotes human CD8 T cell expression of CCR7. In *Immunology* 120 (1), pp. 66–72. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02478.x.

Sevin, Margaux; Girodon, François; Garrido, Carmen; Thonel, Aurélie de (2015): HSP90 and HSP70: Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms. In *Mediators of inflammation* 2015, p. 970242. DOI: 10.1155/2015/970242.

Shadel, Gerald S.; Horvath, Tamas L. (2015): Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. In *Cell* 163 (3), pp. 560–569. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.001.

- Shang, Yu; Xu, Xialian; Duan, Xiaolin; Guo, Junwei; Wang, Yinyin; Ren, Fangli et al. (2014): Hsp70 and Hsp90 oppositely regulate TGF- $\beta$  signaling through CHIP/Stub1. In *Biochemical and biophysical research communications* 446 (1), pp. 387–392. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.124.
- Shannon, Paul; Markiel, Andrew; Ozier, Owen; Baliga, Nitin S.; Wang, Jonathan T.; Ramage, Daniel et al. (2003): Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. In *Genome research* 13 (11), pp. 2498–2504. DOI: 10.1101/gr.1239303.
- Sharma, Bal Krishan; Kolhe, Ravindra; Black, Stephen M.; Keller, Jonathan R.; Mivechi, Nahid F.; Satyanarayana, Ande (2016): Inhibitor of differentiation 1 transcription factor promotes metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma cells. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (1), pp. 262–275. DOI: 10.1096/fj.15-277749.
- Sharpless, K. Barry; Manetsch, Roman (2006): In situ click chemistry: a powerful means for lead discovery. In *Expert opinion on drug discovery* 1 (6), pp. 525–538. DOI: 10.1517/17460441.1.6.525.
- Sies, Helmut; Berndt, Carsten; Jones, Dean P. (2017): Oxidative Stress. In *Annual review of biochemistry* 86, pp. 715–748. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
- Sisto, Margherita; Lorusso, Loredana; Ingravallo, Giuseppe; Tamma, Roberto; Ribatti, Domenico; Lisi, Sabrina (2018): The TGF- $\beta$ 1 Signaling Pathway as an Attractive Target in the Fibrosis Pathogenesis of Sjögren's Syndrome. In *Mediators of inflammation* 2018, p. 1965935. DOI: 10.1155/2018/1965935.
- Sisto, Margherita; Ribatti, Domenico; Lisi, Sabrina (2021): Organ Fibrosis and Autoimmunity: The Role of Inflammation in TGF $\beta$ -Dependent EMT. In *Biomolecules* 11 (2). DOI: 10.3390/biom11020310.
- Smith, Ewan; Collins, Ian (2015): Photoaffinity labeling in target- and binding-site identification. In *Future medicinal chemistry* 7 (2), pp. 159–183. DOI: 10.4155/FMC.14.152.
- Sohn, Mira; Shin, Sunmee; Yoo, Jung-Yeon; Goh, Yookyung; Lee, In Hye; Bae, Yun Soo (2018): Ahnak promotes tumor metastasis through transforming growth factor- $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition. In *Scientific reports* 8 (1), p. 14379. DOI: 10.1038/s41598-018-32796-2.
- Spurrell, Jason C. L.; Wiehler, Shahina; Zaheer, Raza S.; Sanders, Scherer P.; Proud, David (2005): Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection. In *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 289 (1), L85-95. DOI: 10.1152/ajplung.00397.2004.

- Stebbins, C. E.; Russo, A. A.; Schneider, C.; Rosen, N.; Hartl, F. U.; Pavletich, N. P. (1997): Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. In *Cell* 89 (2), pp. 239–250. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80203-2.
- Stefanetti, Renae J.; Voisin, Sarah; Russell, Aaron; Lamon, Séverine (2018): Recent advances in understanding the role of FOXO3. In *F1000Research* 7. DOI: 10.12688/f1000research.15258.1.
- Stone, Rivka C.; Pastar, Irena; Ojeh, Nkemcho; Chen, Vivien; Liu, Sophia; Garzon, Karen I.; Tomic-Canic, Marjana (2016): Epithelial-Mesenchymal Transition in Tissue Repair and Fibrosis. In *Cell and tissue research* 365 (3), pp. 495–506. DOI: 10.1007/s00441-016-2464-0.
- Storey, John D.; Tibshirani, Robert (2003): Statistical significance for genomewide studies. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16), pp. 9440–9445. DOI: 10.1073/pnas.1530509100.
- Suarez-Carmona, Meggy; Lesage, Julien; Cataldo, Didier; Gilles, Christine (2017): EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. In *Molecular oncology* 11 (7), pp. 805–823. DOI: 10.1002/1878-0261.12095.
- Sudo, Hitomi; Tsuji, Atsushi B.; Sugyo, Aya; Abe, Masaaki; Hino, Okio; Saga, Tsuneo (2014): AHNAK is highly expressed and plays a key role in cell migration and invasion in mesothelioma. In *International journal of oncology* 44 (2), pp. 530–538. DOI: 10.3892/ijo.2013.2183.
- Sun, Duxin; Gao, Wei; Hu, Hongxiang; Zhou, Simon (2022): Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? In *Acta pharmaceutica Sinica. B* 12 (7), pp. 3049–3062. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.02.002.
- Sundqvist, Anders; Morikawa, Masato; Ren, Jiang; Vasilaki, Eleftheria; Kawasaki, Natsumi; Kobayashi, Mai et al. (2018): JUNB governs a feed-forward network of TGF $\beta$  signaling that aggravates breast cancer invasion. In *Nucleic acids research* 46 (3), pp. 1180–1195. DOI: 10.1093/nar/gkx1190.
- Suzuki, Masayoshi; Tezuka, Kenta; Handa, Takumi; Sato, Risa; Takeuchi, Hina; Takao, Masaki et al. (2022): Upregulation of ribosome complexes at the blood-brain barrier in Alzheimer's disease patients. In *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 271678X221111602. DOI: 10.1177/0271678X221111602.
- Szklarczyk, Damian; Gable, Annika L.; Nastou, Katerina C.; Lyon, David; Kirsch, Rebecca; Pyysalo, Sampo et al. (2021): The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. In *Nucleic acids research* 49 (D1), D605–D612. DOI: 10.1093/nar/gkaa1074.

- Taguchi, Keiko; Yamamoto, Masayuki (2020): The KEAP1-NRF2 System as a Molecular Target of Cancer Treatment. In *Cancers* 13 (1). DOI: 10.3390/cancers13010046.
- Taipale, Mikko; Jarosz, Daniel F.; Lindquist, Susan (2010): HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (7), pp. 515–528. DOI: 10.1038/nrm2918.
- Tao, W. Andy; Zhang, Ying (Eds.) (2019): Mass spectrometry-based chemical proteomics. First edition. Hoboken, NJ: Wiley.
- Tauber, Johannes; Rohr, Markus; Walter, Thorsten; Erkel, Gerhard; Opatz, Till (2015): Total synthesis of two potent anti-inflammatory macrolactones of the oxacyclododecindione type. In *Organic & biomolecular chemistry* 13 (28), pp. 7813–7821. DOI: 10.1039/c5ob01044f.
- Tauber, Johannes; Rohr, Markus; Walter, Thorsten; Schollmeyer, Dieter; Rahn-Hotze, Karin; Erkel, Gerhard; Opatz, Till (2016): A surprising switch in absolute configuration of anti-inflammatory macrolactones. In *Organic & biomolecular chemistry* 14 (15), pp. 3695–3698. DOI: 10.1039/c6ob00430j.
- Tavakkoli, Alireza; Iranshahi, Mehrdad; Hasheminezhad, S. Hossein; Hayes, A. Wallace; Karimi, Gholamreza (2019): The neuroprotective activities of natural products through the Nrf2 upregulation. In *Phytotherapy research : PTR* 33 (9), pp. 2256–2273. DOI: 10.1002/ptr.6427.
- Tchórzewski, Marek (2002): The acidic ribosomal P proteins. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (8), pp. 911–915. DOI: 10.1016/S1357-2725(02)00012-2.
- Telkoparan-Akillilar, Pelin; Panieri, Emiliano; Cevik, Dilek; Suzen, Sibel; Saso, Luciano (2021): Therapeutic Targeting of the NRF2 Signaling Pathway in Cancer. In *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (5). DOI: 10.3390/molecules26051417.
- Thapa, Narendra; Lee, Byung-Heon; Kim, In-San (2007): TGFBIp/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (12), pp. 2183–2194. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.06.004.
- The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine (2021). In *Nucleic acids research* 49 (D1), D325-D334.
- Thirumurugan, Prakasam; Matosiuk, Dariusz; Jozwiak, Krzysztof (2013): Click chemistry for drug development and diverse chemical-biology applications. In *Chemical reviews* 113 (7), pp. 4905–4979. DOI: 10.1021/cr200409f.
- Tian, Miaomiao; Hao, Fengqi; Jin, Xin; Sun, Xue; Jiang, Ying; Wang, Yang et al. (2021): ACLY ubiquitination by CUL3-KLHL25 induces the reprogramming of fatty acid metabolism to facilitate iTreg differentiation. In *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.62394.

- Torre, Denis; Lachmann, Alexander; Ma'ayan, Avi (2018): BioJupies: Automated Generation of Interactive Notebooks for RNA-Seq Data Analysis in the Cloud. In *Cell systems* 7 (5), 556-561.e3. DOI: 10.1016/j.cels.2018.10.007.
- Trapotsi, Maria-Anna; Hosseini-Gerami, Layla; Bender, Andreas (2022): Computational analyses of mechanism of action (MoA): data, methods and integration. In *RSC chemical biology* 3 (2), pp. 170–200. DOI: 10.1039/d1cb00069a.
- Trapotsi, Maria-Anna; Barrett, Ian; Engkvist, Ola; Bender, Andreas (2020): Bioinformatic Approaches in the Understanding of Mechanism of Action (MoA ). In Alley T. Plowright (Ed.): Target discovery and validation. Methods and strategies for drug discovery. Weinheim, Germany: Wiley-VCH (Methods and Principles in Medicinal Chemistry, volume 78), pp. 323–363.
- Troskie, Robin-Lee; Jafrani, Yohaann; Mercer, Tim R.; Ewing, Adam D.; Faulkner, Geoffrey J.; Cheetham, Seth W. (2021): Long-read cDNA sequencing identifies functional pseudogenes in the human transcriptome. In *Genome biology* 22 (1), p. 146. DOI: 10.1186/s13059-021-02369-0.
- Trusheim, Mark R.; Berndt, Ernst R.; Douglas, Frank L. (2007): Stratified medicine: strategic and economic implications of combining drugs and clinical biomarkers. In *Nature reviews. Drug discovery* 6 (4), pp. 287–293. DOI: 10.1038/nrd2251.
- Tu, Mengxian; He, Lu; You, Yang; Li, Jinying; Yao, Nan; Qu, Chen et al. (2020): EFTUD2 maintains the survival of tumor cells and promotes hepatocellular carcinoma progression via the activation of STAT3. In *Cell death & disease* 11 (10), p. 830. DOI: 10.1038/s41419-020-03040-5.
- Tusher, V. G.; Tibshirani, R.; Chu, G. (2001): Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (9), pp. 5116–5121. DOI: 10.1073/pnas.091062498.
- van de Vis, Reinofke A. J.; Moustakas, Aristidis; van der Heide, Lars P. (2021): NUA1 and NUA2 Fine-Tune TGF- $\beta$  Signaling. In *Cancers* 13 (13). DOI: 10.3390/cancers13133377.
- van den Bossche, J.; Laoui, D.; Morias, Y.; Movahedi, K.; Raes, G.; Baetselier, P. de; van Genderachter, J. A. (2012): Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 genes differentially associate with distinct types of anti-inflammatory macrophages in vitro and with parasite- and tumour-elicited macrophages in vivo. In *Scandinavian journal of immunology* 75 (6), pp. 588–598. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2012.02689.x.
- Veeman, Michael T.; Slusarski, Diane C.; Kaykas, Ajamete; Louie, Sarah Hallagan; Moon, Randall T. (2003): Zebrafish Prickle, a Modulator of Noncanonical Wnt/Fz Signaling, Regulates Gastrulation Movements. In *Current Biology* 13 (8), pp. 680–685. DOI: 10.1016/S0960-9822(03)00240-9.

- Venn, Benedikt; Mühlhaus, Timo; Schneider, Kevin; Weil, Lukas; Zimmer, David (2022): fslaborg/FSharp.Stats: Release 0.4.9: Zenodo.
- Verrecchia, F.; Tacheau, C.; Schorpp-Kistner, M.; Angel, P.; Mauviel, A. (2001): Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. In *Oncogene* 20 (18), pp. 2205–2211. DOI: 10.1038/sj.onc.1204347.
- Vincent, Fabien; Nueda, Arsenio; Lee, Jonathan; Schenone, Monica; Prunotto, Marco; Mercola, Mark (2022): Phenotypic drug discovery: recent successes, lessons learned and new directions. In *Nature reviews. Drug discovery* 21 (12), pp. 899–914. DOI: 10.1038/s41573-022-00472-w.
- Wagner, Bridget K.; Schreiber, Stuart L. (2016): The Power of Sophisticated Phenotypic Screening and Modern Mechanism-of-Action Methods. In *Cell chemical biology* 23 (1), pp. 3–9. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.11.008.
- Wang, Fei; Liigand, Jaanus; Tian, Siyang; Arndt, David; Greiner, Russell; Wishart, David S. (2021): CFM-ID 4.0: More Accurate ESI-MS/MS Spectral Prediction and Compound Identification. In *Analytical chemistry* 93 (34), pp. 11692–11700. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c01465.
- Wang, Jigang; Zhang, Chong-Jing; Chia, Wan Ni; Loh, Cheryl C. Y.; Li, Zhengjun; Lee, Yew Mun et al. (2015): Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. In *Nature communications* 6, p. 10111. DOI: 10.1038/ncomms10111.
- Wang, Ruxuan; Zhang, Rentao; Yang, Haoran; Xue, Nina; Chen, Xiaoguang; Yu, Xiaoming (2023): Rational design, synthesis, and biological evaluation of novel C6-modified geldanamycin derivatives as potent Hsp90 inhibitors and anti-tumor agents. In *Chinese Chemical Letters* 34 (2), p. 107529. DOI: 10.1016/j.ccllet.2022.05.043.
- Watanabe, Yukihide; Itoh, Susumu; Goto, Toshiyasu; Ohnishi, Eriko; Inamitsu, Masako; Itoh, Fumiko et al. (2010): TMEPAI, a transmembrane TGF-beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling. In *Molecular cell* 37 (1), pp. 123–134. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.10.028.
- Weber, Carina; Vierengel, Nina; Walter, Thorsten; Behrendt, Torsten; Lucas, Tobias; Erkel, Gerhard; Opatz, Till (2020): Total synthesis and biological evaluation of seven new anti-inflammatory oxacyclododecandione-type macrolactones. In *Organic & biomolecular chemistry* 18 (30), pp. 5906–5917. DOI: 10.1039/D0OB00958J.
- Wei, Cheng-I; Swartz, Diane D.; Cornell, John A. (1985): Effects of Culture Media, Exposure Time and Temperature on Near-Ultraviolet-Induced Sporulation of *Alternaria alternata*. In *Journal of food protection* 48 (4), pp. 316–319. DOI: 10.4315/0362-028X-48.4.316.

- Weiss, U.; Merlini, L.; Nasini, G. (1987): Naturally occurring perylenequinones. In *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe = Progress in the chemistry of organic natural products. Progres dans la chimie des substances organiques naturelles* 52, pp. 1–71. DOI: 10.1007/978-3-7091-8906-1\_1.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990): AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In : PCR Protocols: Elsevier, pp. 315–322.
- Woodford, Mark R.; Sager, Rebecca A.; Marris, Elijah; Dunn, Diana M.; Blanden, Adam R.; Murphy, Ryan L. et al. (2017): Tumor suppressor Tsc1 is a new Hsp90 co-chaperone that facilitates folding of kinase and non-kinase clients. In *The EMBO journal* 36 (24), pp. 3650–3665. DOI: 10.15252/embj.201796700.
- Wright, Forrest A.; Bonzerato, Caden G.; Sliter, Danielle A.; Wojcikiewicz, Richard J. H. (2018): The erlin2 T65I mutation inhibits erlin1/2 complex-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination and phosphatidylinositol 3-phosphate binding. In *The Journal of biological chemistry* 293 (40), pp. 15706–15714. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004547.
- Wright, M. H.; Sieber, S. A. (2016): Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products. In *Natural product reports* 33 (5), pp. 681–708. DOI: 10.1039/C6NP00001K.
- Wu, Y.; Zhou, B. P. (2010): TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. In *British journal of cancer* 102 (4), pp. 639–644. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605530.
- Wynn, T. A. (2008): Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. In *The Journal of pathology* 214 (2), pp. 199–210. DOI: 10.1002/path.2277.
- Xiao, Qicai; Wu, Juan; Pang, Xin; Jiang, Yue; Wang, Pan; Leung, Albert W. et al. (2018): Discovery and Development of Natural Products and their Derivatives as Photosensitizers for Photodynamic Therapy. In *Current medicinal chemistry* 25 (7), pp. 839–860. DOI: 10.2174/0929867324666170823143137.
- Xu, Lai; Pelosof, Lorraine; Wang, Rong; McFarland, Hugh I.; Wu, Wells W.; Phue, Je-Nie et al. (2020): NGS Evaluation of Colorectal Cancer Reveals Interferon Gamma Dependent Expression of Immune Checkpoint Genes and Identification of Novel IFN $\gamma$  Induced Genes. In *Frontiers in immunology* 11, p. 224. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00224.
- Yang, Xiaonan; Kui, Ling; Tang, Min; Li, Dawei; Wei, Kunhua; Chen, Wei et al. (2020): High-Throughput Transcriptome Profiling in Drug and Biomarker Discovery. In *Frontiers in genetics* 11, p. 19. DOI: 10.3389/fgene.2020.00019.

- Yang, Yun; Ye, Wen-Long; Zhang, Ruo-Nan; He, Xiao-Shun; Wang, Jing-Ru; Liu, Yu-Xuan et al. (2021): The Role of TGF- $\beta$  Signaling Pathways in Cancer and Its Potential as a Therapeutic Target. In *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2021, p. 6675208. DOI: 10.1155/2021/6675208.
- Yao, Fang; Wang, Xiaojing; Cui, Zhong-Kai; Lan, Haibing; Ai, Xiaolan; Song, Qiancheng et al. (2020): ETS2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis by targeting JUNB transcription. In *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 100 (3), pp. 438–453. DOI: 10.1038/s41374-019-0331-9.
- Yilmaz, Mahmut; Maass, Dorothea; Tiwari, Neha; Waldmeier, Lorenz; Schmidt, Petra; Lehembre, François; Christofori, Gerhard (2011): Transcription factor Dlx2 protects from TGF $\beta$ -induced cell-cycle arrest and apoptosis. In *The EMBO journal* 30 (21), pp. 4489–4499. DOI: 10.1038/emboj.2011.319.
- Yu, H.; Shen, Y.; Hong, J.; Xia, Q.; Zhou, F.; Liu, X. (2015): The contribution of TGF- $\beta$  in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): Down-regulation of E-cadherin via snail. In *Neoplasma* 62 (1), pp. 1–15. DOI: 10.4149/neo\_2015\_002.
- Zhang, Miao; Zhang, Xiaoyan (2019): The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis. In *Archives of dermatological research* 311 (2), pp. 83–91. DOI: 10.1007/s00403-018-1879-8.
- Zhang, Wen Jie; Li, Ben Hui; Yang, Xian Zi; Li, Pin Dong; Yuan, Qin; Liu, Xiao Hong et al. (2008): IL-4-induced Stat6 activities affect apoptosis and gene expression in breast cancer cells. In *Cytokine* 42 (1), pp. 39–47. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.016.
- Zhao, Manyu; Wang, Liqun; Wang, Mengzhu; Zhou, Shijie; Lu, Ying; Cui, Huijie et al. (2022): Targeting fibrosis, mechanisms and cilinical trials. In *Signal transduction and targeted therapy* 7 (1), p. 206. DOI: 10.1038/s41392-022-01070-3.
- Zhou, Wenfei; Yang, Mo; Li, Shaopeng; Zhu, Jinsong (2018): Surface plasmon resonance imaging validation of small molecule drugs binding on target protein microarrays. In *Applied Surface Science* 450, pp. 328–335. DOI: 10.1016/j.apsusc.2018.04.072.
- Zhu, Chuanlong; Xiao, Fei; Hong, Jian; Wang, Kun; Liu, Xiao; Cai, Dachuan et al. (2015): EFTUD2 Is a Novel Innate Immune Regulator Restricting Hepatitis C Virus Infection through the RIG-I/MDA5 Pathway. In *Journal of virology* 89 (13), pp. 6608–6618. DOI: 10.1128/JVI.00364-15.

## 7. Anhang

Tabelle 12 Kandidaten, die Targets sind, oder mögliche direkte Interaktoren von Targets sein könnten. Stitch-Count: Anzahl der Verbindungen, die diesen Kandidat nachweislich als Target haben. Dabei wurden nur Einträge berücksichtigt, die nur einen Konfidenz Score von mindestens 800 haben. Ist der jeweilige Kandidat signifikant hochreguliert, so steht eine 1 in der entsprechenden Zeile. Bei signifikanter Runterregulation ist eine -1 eingetragen.

Label	Stitch-Count	Beas Neg	Beas TGF-b	Beas IL-4	Beas Mix	Hep Neg	Hep TGF-b	Hep IL-4	Hep Mix	(down,up)
HSP90AA1	477	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSP90AB1	90	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPB1	79	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPA8	77	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
SPR	52	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPA1B	46	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
FKBP4	34	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
PGF	32	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPA6	26	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
DNAJB1	14	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPH1	14	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
DEDD2	12	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
CRYAB	9	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
STIP1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPD1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
DNAJB4	6	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPA4L	2	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
BAG3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPB8	2	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
AHSA1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
HSPE1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
ACTRT3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	(0,8)
RGS2	98	1	1	1	1	1	1	1	0	(0,7)
DNAJA1	6	1	1	1	0	1	1	1	1	(0,7)
PPID	5	1	1	1	1	1	1	1	0	(0,7)
ENGASE	2	1	1	1	1	1	1	1	0	(0,7)
CACNA1G	42	1	0	1	0	1	1	1	1	(0,6)
MKNK2	30	0	1	1	0	1	1	1	1	(0,6)
P4HA2	14	1	0	0	1	1	1	1	1	(0,6)
ALOXE3	2	1	1	1	1	1	1	0	0	(0,6)
BMT2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	(0,6)
SLC40A1	16	0	1	1	0	1	0	1	1	(0,5)
MRPL18	12	0	0	0	1	1	1	1	1	(0,5)
TCP1	8	0	0	0	1	1	1	1	1	(0,5)
GTF3C3	8	0	0	0	1	1	1	1	1	(0,5)
OSBPL1A	6	0	0	0	1	1	1	1	1	(0,5)
CACYBP	4	0	0	0	1	1	1	1	1	(0,5)
CCNG2	4	0	1	1	1	1	0	0	1	(0,5)
SNX3	2	0	0	0	1	1	1	1	1	(0,5)
MAP1A	2	0	1	1	0	0	1	1	1	(0,5)
GPN1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	(0,5)
TCTN1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	(0,5)
AGTR1	1289	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
PDE4B	317	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
AKR1B10	88	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
FGFR2	78	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
UBC	66	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
CTH	63	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
PDE3A	60	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
AKR1C2	52	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
FAXDC2	44	1	1	1	0	0	0	0	1	(0,4)
CLK1	39	1	0	0	1	1	0	1	0	(0,4)
HIBCH	36	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
NPR3	34	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)

DIO2	33	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
CEBPA	28	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
DDIT4	28	0	1	0	1	1	0	1	0	(0,4)
MYO7A	23	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
SERPINH1	22	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
CYP39A1	22	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
SORBS1	16	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
ACER2	14	1	1	1	0	0	0	0	1	(0,4)
CHD3	12	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
GAL3ST1	10	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
VLDLR	8	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
ADGRL2	8	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
FGD3	6	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
WNT6	4	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
UBR2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
CAP2	2	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
GAS1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
TRIM54	2	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
H3C1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	(0,4)
TXNIP	0	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
CASTOR2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
BAG2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	(0,4)
DBP	0	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
PRLR	0	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
ABHD4	0	0	0	0	1	1	0	1	1	(0,4)
GPRASP2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
MXD1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	(0,4)
EFCAB7	0	1	1	1	0	0	0	1	0	(0,4)
CIART	0	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
SPINDOC	0	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
TM4SF1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
S100A14	0	0	0	0	0	1	1	1	1	(0,4)
NHS	0	1	1	1	1	0	0	0	0	(0,4)
TNFSF9	4	0	-1	0	0	1	1	1	1	(1,4)
UNC5B	0	0	-1	0	1	1	1	1	0	(1,4)
S1PR1	406	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
ACKR3	152	1	0	1	1	0	0	0	0	(0,3)
TXNRD1	113	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
UBB	89	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
DUSP1	83	0	0	0	0	1	0	1	1	(0,3)
AKR1C1	74	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
PSMC1	50	0	1	0	1	1	0	0	0	(0,3)
TGM2	45	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
HPD	42	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
SLC6A9	36	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
FTCD	35	0	0	0	0	0	1	1	1	(0,3)
NCF2	34	0	0	0	0	1	0	1	1	(0,3)
ADAMTS5	29	1	1	0	1	0	0	0	0	(0,3)
GATA3	24	1	0	1	1	0	0	0	0	(0,3)
PLK2	24	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
MTHFD2	21	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
ALDH1L2	21	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
ASNS	20	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
PDE7B	20	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
SLC7A11	18	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
PPP1R3C	12	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
NPPB	12	0	0	0	0	1	1	0	1	(0,3)
GAB2	9	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
PER1	8	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
BRF2	8	0	0	0	0	1	0	1	1	(0,3)
SUGT1	6	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
MGAT3	6	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
H2BC18	4	0	1	0	1	0	1	0	0	(0,3)
FXR1	4	0	0	0	0	1	0	1	1	(0,3)

TENT4B	4	0	0	0	0	0	1	1	1	(0,3)
BRD8	4	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
SEMA6D	4	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
FAT4	4	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
CECR2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
ULBP3	2	0	0	0	1	0	0	1	1	(0,3)
SLC51B	2	0	0	0	0	1	1	0	1	(0,3)
SH2D3C	2	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
CDH10	2	1	1	0	1	0	0	0	0	(0,3)
CDH6	2	1	1	0	1	0	0	0	0	(0,3)
ARRDC3	2	0	0	0	0	1	0	1	1	(0,3)
MKX	2	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
SOHLH1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
H2BC17	0	0	0	0	0	0	1	1	1	(0,3)
CITED2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	(0,3)
TEF	0	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
EVI2A	0	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
CLDN12	0	0	0	0	0	1	1	1	0	(0,3)
PLEKHG4B	0	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
ZNF473	0	0	0	0	0	0	1	1	1	(0,3)
CAVIN2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	(0,3)
PDZD2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	(0,3)
NAP1L2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	(0,3)
GKAP1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	(0,3)
KCP	0	0	1	1	1	0	0	0	0	(0,3)
CCN2	108	0	-1	-1	0	1	1	1	1	(2,4)
GPBR1	181	0	1	1	1	0	-1	0	0	(1,3)
PMAIP1	42	0	0	0	-1	1	1	1	0	(1,3)
BDKRB1	485	1	0	1	0	0	0	0	0	(0,2)
HMOX1	472	0	0	0	1	0	0	0	1	(0,2)
AR	430	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
PGR	327	1	1	0	0	0	0	0	0	(0,2)
OXTR	309	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
PDE4D	153	1	0	0	1	0	0	0	0	(0,2)
HEBP1	150	0	0	0	0	0	0	1	1	(0,2)
JAK3	127	0	1	1	0	0	0	0	0	(0,2)
AKR1C3	116	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
PPARGC1A	49	1	1	0	0	0	0	0	0	(0,2)
NPR1	48	1	0	1	0	0	0	0	0	(0,2)
SAT1	46	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
HKDC1	41	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
KLF4	40	0	0	0	0	0	1	1	0	(0,2)
BMP4	37	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
HMGCS1	35	0	0	0	0	1	0	1	0	(0,2)
MYLK3	30	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
GARS1	28	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
JMJD6	28	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
DNAJC6	25	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
GPX8	22	0	0	0	1	0	0	0	1	(0,2)
MBOAT2	22	0	0	0	0	0	1	0	1	(0,2)
FGF9	18	0	1	1	0	0	0	0	0	(0,2)
SLC47A2	16	0	1	1	0	0	0	0	0	(0,2)
SRXN1	15	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
IGFBP5	13	1	1	0	0	0	0	0	0	(0,2)
RGS9BP	13	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
OTULIN	12	0	0	0	0	0	0	1	1	(0,2)
PPME1	12	0	0	0	0	0	1	1	0	(0,2)
HELB	12	0	0	0	0	0	1	1	0	(0,2)
PTGES3	10	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
HRK	10	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
ATP8B3	10	1	1	0	0	0	0	0	0	(0,2)
RAB27B	10	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
STAT2	8	0	1	1	0	0	0	0	0	(0,2)
PLA2G12B	8	0	0	0	0	1	0	0	1	(0,2)

TET1	8	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
RRAD	8	0	0	0	0	1	0	1	0	(0,2)
MSX1	5	0	0	0	0	0	1	1	0	(0,2)
PRICKLE1	4	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
NUPR1	4	1	0	1	0	0	0	0	0	(0,2)
SMOC1	4	1	0	1	0	0	0	0	0	(0,2)
RGMA	3	0	1	0	0	1	0	0	0	(0,2)
MAP1LC3C	2	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
DAB2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	(0,2)
PAPPA	2	1	0	0	1	0	0	0	0	(0,2)
TOM1L1	2	0	1	0	0	0	1	0	0	(0,2)
LRRTM4	2	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
MMP19	2	0	0	0	0	1	0	0	1	(0,2)
TMPRSS2	2	0	0	0	0	0	1	0	1	(0,2)
MDM2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	(0,2)
KLHL25	0	0	0	0	0	0	0	1	1	(0,2)
NKRF	0	0	0	0	0	0	1	1	0	(0,2)
IFT172	0	0	0	1	1	0	0	0	0	(0,2)
NOS1AP	0	0	0	0	1	0	0	1	0	(0,2)
TICRR	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
H4C1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
H4C1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	(0,2)
H2BC4	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
SIX4	0	0	0	0	1	0	0	1	0	(0,2)
ABTB1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	(0,2)
FLRT3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	(0,2)
GLCCI1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
FOXD3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
ULBP1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	(0,2)
NAA16	0	0	0	0	1	1	0	0	0	(0,2)
DAW1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	(0,2)
DNAJC7	0	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
CABLES1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	(0,2)
ISX	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0,2)
SCHIP1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
FAM110B	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
FERMT3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	(0,2)
PHYHIP	0	0	0	0	0	1	0	0	1	(0,2)
MYOCD	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
RGCC	0	0	0	0	0	0	1	1	0	(0,2)
TENT5C	0	0	1	1	0	0	0	0	0	(0,2)
SLITRK5	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
FHIP1A	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
ZNF608	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
PSG1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	(0,2)
RBM24	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0,2)
TENT5A	0	0	1	0	0	0	1	0	0	(0,2)
TRIM22	0	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
SARG	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0,2)
MYCL	0	0	1	0	0	0	0	1	0	(0,2)
SELENOW	0	0	0	0	0	1	1	0	0	(0,2)
SP6	0	0	1	0	0	0	0	0	1	(0,2)
CCDC85A	0	0	1	0	1	0	0	0	0	(0,2)
JUN	227	-1	-1	-1	0	0	0	0	1	(3,1)
CHRM4	376	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
HTR7	310	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
ADORA2B	250	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
SSTR5	238	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
CCND1	229	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
CCL2	209	0	0	-1	-1	0	0	0	0	(2,0)
SERPINE1	201	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
CXCL10	196	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
LPAR2	194	0	0	0	0	0	-1	0	-1	(2,0)
ADCY6	178	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)

TLR4	165	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
CXCL2	156	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
CXCL9	156	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
CXCL11	152	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
CXCL3	152	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
PLAUR	92	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
NGF	86	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
F2RL1	76	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
NR4A1	66	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
TYMP	58	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
IDO1	57	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
TPH1	50	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
CSF2	43	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
BRCA1	40	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
SIRT5	38	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
SLC29A2	34	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
DPP7	33	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
SOX9	30	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
ANGPTL4	29	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
TERT	28	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
CD274	24	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
LGALS9	24	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
GFPT2	18	0	0	0	0	0	-1	0	-1	(2,0)
CDKN2B	17	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
CTRL	16	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
ETS1	16	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
SLC22A11	16	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
B3GNT2	16	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
CHST2	16	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
CBX7	15	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
VMP1	15	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
TBX21	14	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
IHH	14	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
ANTXR2	14	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
CHSY3	13	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
TP73	12	0	0	0	0	0	-1	0	-1	(2,0)
CHST3	12	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
GNB3	12	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
OAS2	12	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
GLYCTK	12	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
ICAM5	11	0	0	0	0	-1	0	0	-1	(2,0)
WNT11	10	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
E2F1	10	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
WNT10B	10	0	0	0	0	0	-1	0	-1	(2,0)
SERPING1	10	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
SPTBN5	10	-1	0	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
PLCH1	10	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
ARTN	10	-1	0	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
LZTS1	10	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
SLC43A2	10	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
EPOR	9	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
LIPG	8	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
RBBP6	8	-1	0	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
SHC3	8	-1	0	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
TREH	8	-1	-1	0	0	0	0	0	0	(2,0)
XAF1	8	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
RAB6B	8	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
CST7	8	0	-1	0	0	0	0	0	-1	(2,0)
KLF6	7	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
STC2	7	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
SCO2	6	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
DSE	6	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
FSTL3	6	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
STARD8	6	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)

RASD2	6	-1	-1	0	0	0	0	0	0	(2,0)
EREG	6	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
WNT7B	6	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
LFNG	6	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
APOBEC3G	6	0	0	0	0	-1	0	0	-1	(2,0)
NUMBL	6	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
UCN	6	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
SPRED1	4	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
CRYBB3	4	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
IRF8	4	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
TNFRSF12A	4	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
SPRED2	2	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
DTL	2	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
DLL4	2	0	0	0	-1	0	-1	0	0	(2,0)
TNFRSF25	2	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
ID4	2	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
TRIB1	2	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
PMEPA1	2	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
CRYGS	2	-1	0	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
SPIRE2	2	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
TBX19	2	0	0	0	0	-1	0	0	-1	(2,0)
ANGPTL2	2	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
MYO7B	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
DACT1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
DNAAF10	0	0	0	0	0	0	-1	0	-1	(2,0)
TNFRSF13C	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
STX1B	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
VASH1	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
RPP14	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
RPP25	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
KBTBD8	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
TSPAN32	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
NIPAL4	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
CYP27C1	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
NFKBIE	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
TYSND1	0	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
AREG	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
DNAH1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
WDR31	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
RAPSN	0	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
LRP12	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
EME2	0	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
IFITM1	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
TNFAIP2	0	0	0	0	0	0	-1	0	-1	(2,0)
ZFP36	0	0	0	0	-1	0	-1	0	0	(2,0)
PTX3	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
TMEM107	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
SARM1	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
DND1	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
TMCC2	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
PKDREJ	0	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
XIRP1	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
EFR3B	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
TRIM45	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
ZC3H10	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
SLCO5A1	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1	(2,0)
KIFC2	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	(2,0)
HMGA2	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
SNAI3	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
PITPNM3	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
TJP3	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
IQCE	0	0	0	0	-1	0	-1	0	0	(2,0)
IQCD	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
RPS6KL1	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)

CORO2A	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
SECTM1	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	(2,0)
CLDN2	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
ANKRD44	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
ZFP36L2	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
GOLGA7B	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	(2,0)
NTN3	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	(2,0)
LIPH	0	0	0	0	0	0	-1	0	-1	(2,0)
TMEM88	0	0	0	0	-1	0	-1	0	0	(2,0)
B3GNT9	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
LRRC45	0	0	0	0	0	-1	0	-1	0	(2,0)
NABP1	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	(2,0)
DRP2	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
CYB5RL	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	(2,0)
LRRC71	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
DYNLT4	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	(2,0)
SAMD11	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	(2,0)
PLEKHN1	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	(2,0)
CEP19	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	(2,0)
PAQR8	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	(2,0)
SLC35G1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	(2,0)
BMF	2	0	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	(5,2)
ANKRD1	10	-1	-1	-1	-1	0	0	0	1	(4,1)
EGFR	464	0	0	0	0	-1	-1	0	-1	(3,0)
ADCY3	176	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
GRM4	167	-1	0	0	-1	0	0	0	-1	(3,0)
P2RY6	92	0	-1	0	-1	0	-1	0	0	(3,0)
ATF3	51	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	(3,0)
RARA	43	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	(3,0)
AANAT	37	-1	-1	0	-1	0	0	0	0	(3,0)
POLA2	32	0	0	0	0	-1	-1	0	-1	(3,0)
GADD45A	32	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	(3,0)
CACNB2	30	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	(3,0)
GP1BA	26	-1	-1	0	-1	0	0	0	0	(3,0)
SLC6A19	26	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
PROZ	22	-1	-1	0	-1	0	0	0	0	(3,0)
SOCS1	20	0	0	-1	-1	0	0	0	-1	(3,0)
RYR3	20	-1	0	0	0	0	0	-1	-1	(3,0)
ABHD6	18	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
PLK3	16	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	(3,0)
PIGP	12	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	(3,0)
SPRY2	12	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	(3,0)
CENPI	12	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
CBX2	12	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
CISH	10	0	0	-1	-1	0	0	0	-1	(3,0)
UCN2	9	0	-1	0	0	0	-1	-1	0	(3,0)
TNS2	8	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
IL34	7	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	(3,0)
KCNJ12	6	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	(3,0)
ERRFI1	6	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	(3,0)
SLC20A2	4	-1	0	-1	-1	0	0	0	0	(3,0)
KCNC3	4	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
MAFF	2	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	(3,0)
TNS1	2	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
PCF11	2	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
CLEC2D	2	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
PHACTR1	2	0	0	0	0	-1	-1	0	-1	(3,0)
MFNG	1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	(3,0)
SLX4	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
ENC1	0	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	(3,0)
TPRN	0	0	0	0	0	-1	0	-1	-1	(3,0)
HSPA12A	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
DSN1	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
RHBDL1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	-1	(3,0)

RASL10A	0	-1	-1	0	-1	0	0	0	0	(3,0)
FBXO43	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
WNT9A	0	0	0	0	-1	0	-1	0	-1	(3,0)
RXYLT1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	-1	(3,0)
ANGPTL1	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
IRF2BPL	0	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	(3,0)
IRF2BP1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	-1	(3,0)
GPR161	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
BATF3	0	0	-1	-1	0	0	0	0	-1	(3,0)
ADAMTS10	0	0	-1	0	-1	0	-1	0	0	(3,0)
CILP2	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	(3,0)
SOX18	0	0	0	0	0	-1	-1	0	-1	(3,0)
OSGEPL1	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
RBM23	0	0	0	0	0	-1	0	-1	-1	(3,0)
GSDMB	0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	(3,0)
CLDN9	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
MYBL1	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
PRELID3A	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
LEKR1	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	(3,0)
TSPEAR	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
FAM161A	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
PHF7	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	(3,0)
SFR1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	-1	(3,0)
MFSD2A	0	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	(3,0)
ZC3H12A	0	0	-1	-1	0	0	0	0	-1	(3,0)
ADM5	0	0	0	0	0	-1	0	-1	-1	(3,0)
CCDC122	0	0	-1	0	-1	0	0	0	-1	(3,0)
FOS	483	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
CYP1A1	447	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
VDR	182	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
CCR7	156	0	0	-1	0	-1	-1	-1	0	(4,0)
F3	134	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
QRFP	74	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
VIPR1	60	-1	0	0	0	-1	-1	-1	0	(4,0)
EPHA2	48	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
GDF15	43	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
SOCS3	35	0	0	0	-1	0	-1	-1	-1	(4,0)
HBEGF	32	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
RHOB	26	0	-1	0	-1	0	-1	0	-1	(4,0)
HAMP	26	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
CYP26B1	21	0	-1	0	-1	-1	-1	0	0	(4,0)
EGR2	20	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
PHOSPHO2	16	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
SERPINB2	16	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
LIF	15	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
SLC16A8	14	0	0	0	-1	-1	-1	-1	0	(4,0)
FOSL1	10	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
GCNT4	10	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
ADAT3	8	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
HES1	6	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
DUSP5	6	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
PHLDA1	6	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
TLX2	6	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
BCL3	4	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
SPRY4	4	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
ZFP36L1	4	0	-1	-1	-1	0	-1	0	0	(4,0)
HEMK1	4	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
HAVCR1	3	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
KLF10	2	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
PPP1R3F	0	-1	-1	-1	0	-1	0	0	0	(4,0)
PPP1R3E	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
KLHL22	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
NAA80	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
BHLHE40	0	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)

EGR4	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1	0	(4,0)
TNS4	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
PAGR1	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
WDR5B	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
EPN3	0	-1	0	0	0	-1	-1	-1	0	(4,0)
UFSP1	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
DDN	0	-1	0	0	0	-1	0	-1	-1	(4,0)
ANXA2R	0	0	0	0	-1	0	-1	-1	-1	(4,0)
CCDC17	0	-1	0	0	0	-1	0	-1	-1	(4,0)
SPATA25	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
GPR3	0	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	(4,0)
ZBED8	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(4,0)
ADRA1D	500	-1	0	0	0	-1	-1	-1	-1	(5,0)
AOC2	52	-1	-1	-1	-1	0	0	0	-1	(5,0)
KDM4D	24	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	(5,0)
SMAD7	22	-1	-1	-1	-1	0	-1	0	0	(5,0)
DUSP6	21	-1	-1	-1	-1	0	0	0	-1	(5,0)
KLF2	18	-1	-1	-1	0	0	-1	-1	0	(5,0)
ADAMTS4	18	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	(5,0)
GDPGP1	12	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	(5,0)
SMAD6	4	0	-1	0	0	-1	-1	-1	-1	(5,0)
TRAF1	2	0	-1	-1	-1	-1	0	0	-1	(5,0)
MYH3	0	-1	-1	-1	-1	0	0	0	-1	(5,0)
SKIL	0	-1	-1	-1	-1	0	-1	0	0	(5,0)
QRICH2	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	(5,0)
KLF7	0	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	0	(5,0)
CEACAM19	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	(5,0)
PDGFB	27	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	(6,0)
NPPA	18	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	(6,0)
CLDN5	14	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	0	(6,0)
ERCC4	4	-1	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	(6,0)
NKD1	2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	(6,0)
KCNJ14	2	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	(6,0)
KCNAB3	2	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	(6,0)
ADAMTS14	0	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	0	(6,0)
TRPV1	596	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	(7,0)
PLAU	271	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	(7,0)
IL11	6	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	(7,0)
EGR3	2	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	(7,0)
DOK3	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	(7,0)
IER2	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	(7,0)
GPR75	0	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	(7,0)
EGR1	138	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	(8,0)
ID1	16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	(8,0)
WNK4	8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	(8,0)
JUNB	2	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	(8,0)

Tabelle 13 Proteine, die nach Immunpräzipitation mit HSP90-Antikörpern durch DM-Oxa Behandlung differenziell akkumuliert waren.

Genname	$-\log_{10}p\text{-Wert}$	$\log_2FC$
TIFA	3.78779991	-4.364
FAM111B	3.69313895	-0.393
CDC7	3.37334613	-1.109
CDK11B	3.13220459	-1.414
TTF2	2.87797057	-0.564
BRPF1	2.81003214	0.506
EID2	2.72956188	-10.856
SAMHD1	2.72002873	-0.498
HMGCR	2.70068039	-0.507
SPIDR	2.64667815	-9.728

PIGW	2.61935311	10.654
STIL	2.59050676	-1.184
EPB41L1	2.57746938	-0.156
RASA4	2.57256802	-3.164
ZNF451	2.54369538	-0.422
APBB1	2.54266876	-0.767
AKT1	2.50627536	-0.34
CDK11A	2.48585655	-1.345
MELK	2.39496438	-0.885
SPOUT1	2.35204013	0.543
ZNF317	2.34172725	3.076
WDR6	2.33495333	-0.653
TRIM60	2.32230793	9.552
DLGAP2	2.31418701	3.316
PCBD1	2.3075319	0.456
SLC12A4	2.29408723	-0.281
IFT140	2.29245819	-0.936
SPG11	2.25922561	-0.598
CHCHD2	2.25886425	-0.312
RASA3	2.22760235	-0.328
LRRC41	2.21983351	-1.497
ZSWIM9	2.20672568	-9.048
DPYD	2.20636835	-3.269
GON4L	2.20565503	-1.112
CHEK1	2.20538939	-0.807
TMED1	2.20196554	-0.284
DCAF1	2.19213531	-0.528
PRKCD	2.18551001	-0.276
TCF25	2.17778984	-0.4
FPGS	2.17332044	-0.781
AKAP2	2.17113931	0.203
REPS1	2.12000305	0.149
PTK7	2.10593858	-0.518
MMADHC	2.10311142	-0.667
GSTM1	2.10033811	-3.242
MOSPD2	2.0622562	-0.32
CYP51A1	2.05745321	-0.573
EPHX1	2.05740504	-0.4
BRIP1	2.05688987	-1.409
KRIT1	2.04984332	-0.86
NRF1	2.04944109	0.604
ARMCX5	2.0452341	-10.056
EPG5	2.03119803	-0.289
MET	2.02825977	-0.778
BUB1	2.0096129	-0.602
MEIS3P2	1.99961773	10.075
EHD2	1.99444579	-0.124
NDUFA1	1.98010668	9.805
EIF2AK3	1.97348205	-0.772
AGO1	1.96840992	-1.111
KLHDC2	1.96767198	-1.562
TIGD5	1.96690666	-2.787
STK35	1.96259414	-9.515
POLM	1.95894447	8.882
RIPK1	1.95094543	-0.645
PRAG1	1.94352923	2.859
HMGXB3	1.91962873	-2.006
TGFBR1	1.91436329	-0.958
COX20	1.91314228	-0.499
TBC1D2B	1.9019688	-0.771
HERC5	1.89854531	-2.994
ZNF592	1.89779153	-0.578
KIFBP	1.89377332	-0.727
TAF1C	1.88975988	-1.474

CLK3	1.87952302	-10.464
RP2	1.8786876	-0.532
DOCK5	1.87867425	-0.223
RBL2	1.87260898	-1.598
PNPLA2	1.85658026	-3.359
AP5Z1	1.84196854	-0.527
ADD3	1.84190293	0.186
CD320	1.83877005	-0.528
ZWILCH	1.83777985	-0.123
NEIL3	1.83519883	-1.905
MAST3	1.82692399	-2.664
THBS1	1.82544907	0.938
SLC25A6	1.82170024	-0.408
LATS1	1.82018151	-0.737
WDR44	1.81564875	-0.3
MYO1E	1.81419576	-0.326
CHML	1.80935389	-0.449
CPT1A	1.79318924	-0.458
JAK1	1.78036435	-1.034
CEP128	1.7722398	6.89
JARID2	1.76455235	2.627
UAP1	1.76197895	-0.315
TMEM263	1.76101525	-0.472
KDM4A	1.76035183	-0.446
PLEKHG4	1.75546476	-2.089
BCL2L11	1.75366844	1.863
SMG8	1.74680532	-0.704
URGCP	1.73008851	-0.673
SEPSECS	1.72983695	-3.238
SEC11C	1.72726887	8.438
SKIV2L	1.72549152	-0.208
FDFT1	1.71122424	-0.344
DYNC2H1	1.71039366	-0.413
SNX14	1.70936507	-2.775
PJA1	1.70907381	-2.087
SNAPC1	1.70805324	-0.487
CCZ1	1.70727655	-0.447
FBXL3	1.70632115	-1.88
PGBD1	1.70582846	-9.827
PKN3	1.69846007	-0.991
CLNS1A	1.69338406	-0.539
ITM2A	1.68913135	-1.799
HJURP	1.68600165	-1.535
PRSS23	1.68320492	0.427
TRMT2A	1.68311454	-0.667
RAB1A	1.67955745	-0.299
PLXNA1	1.67791755	-0.189
CHCHD6	1.67612849	0.202
DIS3L2	1.67337809	-0.304
KDM5D	1.66913283	-0.817
TDRD7	1.65566778	-0.167
SCAMP3	1.65520536	-0.455
TTC37	1.64925944	-0.296
RPTOR	1.64480709	-0.23
DCTPP1	1.64344791	3.494
SQOR	1.64298097	-0.571
CEP57	1.63794823	-1.778
POLE	1.63747217	-0.96
GNB5	1.63313538	-1.762
FLAD1	1.63112408	0.562
SLC39A11	1.62684657	11.938
OTUD5	1.62039422	-2.61
JRKL	1.61797377	-0.835
LLGL2	1.61780513	-0.535

CDK9	1.61296633	-1.138
TNFRSF10B	1.61115018	-0.848
C5orf34	1.60992608	-10.643
FGFR1	1.60796067	-0.76
METTL3	1.60359612	-0.303
POLE4	1.60333097	-0.49
DDX11	1.60250963	-1.526
CEP78	1.60222609	-0.985
IFT172	1.60074152	-0.483
RPS6KA5	1.5981657	-0.275
VPS26C	1.59155513	0.417
MCM10	1.58592659	-1.545
SARNP	1.58519413	0.159
PDCD2	1.58353451	-0.823
RIC1	1.58284637	-0.89
TMX1	1.58122445	-0.374
CIAO3	1.58095202	-0.533
MAZ	1.57818992	0.309
TTC26	1.57387456	-1.446
RIMKLB	1.57217033	2.435
MCMBP	1.57075709	-0.317
USP11	1.56933619	-0.688
CHMP4B	1.56801274	-0.288
THAP11	1.56766252	0.574
SKI	1.56548815	8.295
NKIRAS2	1.56376473	-0.458
KLHL26	1.56350562	-1.827
INPP5E	1.56241411	-2.68
PLAUR	1.56219698	-2.433
ESPL1	1.56122715	-0.934
YY1AP1	1.55723941	-1.57
PIP4P1	1.55237362	-0.164
AAR2	1.55196653	-0.61
NUDCD3	1.5499332	-1.823
DENND5B	1.54922829	-0.748
CCNA2	1.54845806	-0.827
NTHL1	1.54792269	0.308
CIAO1	1.5435977	-0.342
TACSTD2	1.54329976	0.548
DNA2	1.54109685	-11.88
INTS6	1.53509353	-0.514
MID1	1.53189372	0.353
PTPRJ	1.52394298	0.412
MTR	1.52138412	-1.225
POMGNT1	1.52056649	-0.269
CLIP2	1.51489048	0.187
TIGD1	1.51480384	-8.475
TGFB2	1.51340849	10.072
PCDH1	1.51265957	-0.661
ANK2	1.51207707	-13.982
REXO5	1.51135899	-10.571
FOXO3	1.51070995	0.264
DYNC2I2	1.51002557	-0.996
GK	1.50978315	-0.7
SEMA4A	1.5080019	-12.063
SEC13	1.50588701	0.382
PHYKPL	1.50060604	-3.002
TAF9	1.4991822	-0.268
RBL1	1.49464594	-3.906
MCM8	1.49180441	-1.556
CENPH	1.48898671	-0.421
FNBP1	1.48894446	-0.191
LRRC42	1.48640465	-3.493
TSC2	1.48490351	-0.479

MKS1	1.48443983	-1.676
NRG1	1.47947816	8.742
NCAPG2	1.47932381	-0.597
RAB3B	1.47609372	-0.224
TCAF1	1.47600633	-1.762
HERC4	1.47597291	-0.542
SNRPGP15	1.47096327	0.904
SLU7	1.46906387	-0.116
RNASEH2A	1.46650465	-0.409
STARD13	1.46627948	2.503
F8A1;	1.465248	0.482
IFT122	1.46302305	-1.395
SNX33	1.46155507	-0.28
ACSL5	1.45774618	-0.492
PRKCI	1.45665207	-0.342
SLC44A1	1.45196092	-1.006
CDK1	1.45038907	-0.593
AJUBA	1.45001943	0.898
SF3B4	1.44873111	0.43
LYSMD3	1.44846556	8.228
PRR14L	1.44691552	-2.106
SSX2IP	1.44522677	0.371
RNASEL	1.43714824	-0.904
MTBP	1.43691783	-2.407
DNAJB14	1.43377462	-0.31
CUL2	1.4320767	-0.232
TAF1B	1.431615	-1.776
C1orf109	1.43034901	2.363
EAPP	1.4291563	-0.87
LTA4H	1.42570071	-0.355
STX12	1.42413889	-0.26
NR3C1	1.42402302	-2.365
WDR19	1.42347817	-0.693
SCCPDH	1.42249175	-0.328
AGO3	1.42245248	-0.537
UBR7	1.42057798	-0.278
DMWD	1.41687894	-9.959
DIP2A	1.41389328	-0.58
MOSPD1	1.41069682	-0.573
HECTD1	1.4093328	-0.283
BICRA	1.4048505	0.514
DDR2	1.40198427	-1.646
DONSON	1.40095797	-0.636
ENOSF1	1.40006905	-1.776
GOLM2	1.39967944	-0.164
PTTG1	1.39230611	-0.401
PHKA2	1.390723	-0.577
CACYBP	1.39029562	-2.037
ARID5B	1.39008869	1.561
DDX60	1.38610491	-0.929
PI4K2B	1.38580335	-1.42
CFAP298	1.38442243	-0.973
HSPH1	1.38296208	0.298
CHID1	1.38148563	0.515
AHR	1.38033924	-11.34
CYB5R3	1.37928347	-0.211
EHD3	1.37747758	-0.264
SGMS1	1.37705573	-2.479
TUBGCP5	1.37702905	-0.879
TRPM4	1.3758887	-1.547
GNAS	1.37569292	-0.383
SNX18	1.3728675	-0.769
HAUS8	1.37158752	-0.229
KDM5B	1.36905062	-9.637

PARP4	1.36876382	-0.461
ALDH3B1	1.36480565	-1.038
GEN1	1.36446596	-0.73
POLE2	1.36436989	-0.385
BMPR1A	1.36300776	-0.796
PIK3CA	1.35977793	-0.314
RASSF8	1.35754311	9.679
MASTL	1.35634732	-0.634
TTC8	1.35529499	-1.632
POLR3C	1.35070975	-0.28
TFDP2	1.35022653	-2.274
DCBLD2	1.35001548	-0.145
TYW5	1.34932219	-2.387
DHRS7	1.34808825	-0.453
TENT4A	1.3478762	-1.145
BARD1	1.34640274	-0.424
C2CD3	1.34596884	-1.562
EIF2AK4	1.34508956	-0.365
KIAA1586	1.34452469	-4.76
DLG2	1.34264359	-0.187
PTPRZ1	1.342401	11.11
LZTS1	1.340695	-1.714
MTMR12	1.33961884	-0.685
TTK	1.33895695	-0.224
COA6	1.33755564	-0.345
KIF18A	1.33439192	-1.175
POR	1.33423403	-0.26
REPIN1	1.33308644	0.514
KLHL13	1.33245941	-0.558
TRIM62	1.32783234	-1.543
HLA-H	1.32744995	-0.942
UBE2V2	1.3254277	0.265
NEK4	1.32492493	-0.86
TP53RK	1.32473844	-0.178
EFL1	1.32386573	-0.148
DCAF7	1.32266487	0.143
ARMC6	1.32264036	-0.456
FKBP15	1.32238268	0.173
DENND3	1.32135869	-0.886
SMG1	1.32051207	-0.147
PARP14	1.31875825	-0.419
MAP3K7	1.31845246	-0.271
MAP4K5	1.31525782	-0.25
MRFAP1L1	1.31505641	-0.54
SYNCRIP	1.31385864	0.271
VPS50	1.31359605	0.19
AIP	1.31212101	-0.865
PANK4	1.31184725	-0.611
PTOV1	1.31102891	-1.791
SLC39A10	1.31066775	-0.684
GPRASP2	1.30955092	2.21
HAUS5	1.30876615	-0.654
UCKL1	1.30814363	-1.629
UBQLN1	1.30745288	-0.302
MED25	1.30634843	-0.953
ZNF384	1.30493221	0.578
DCAF10	1.30316034	-2.992
EIF1AY	1.30255474	-0.459
WRAP53	1.30006106	-0.379

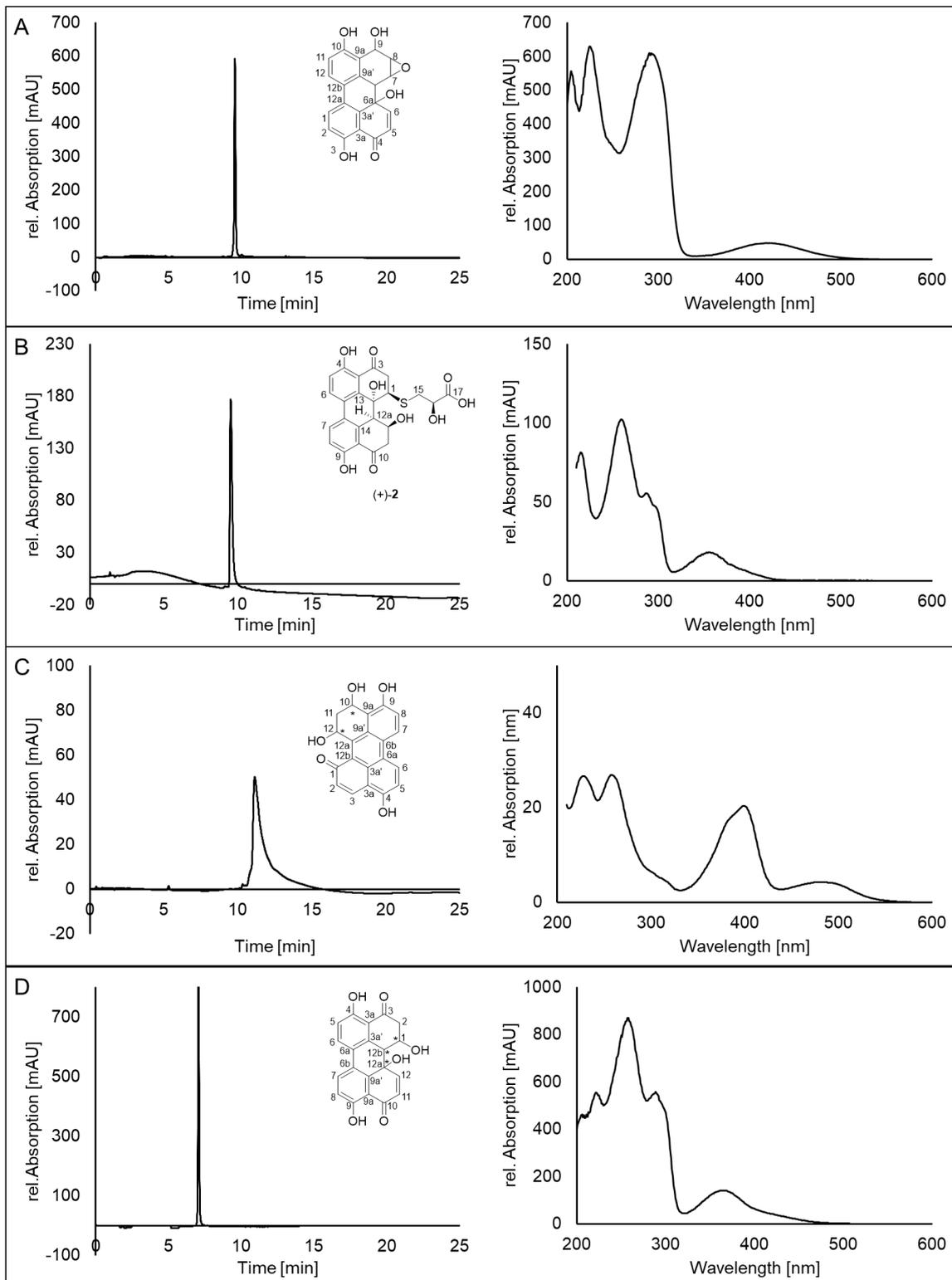


Abbildung 82 Chromatogramme (links) und Spektren (rechts) der aufgereinigten Perylenchinone. Gemessen wurde mit einer Lichrospher 100 RP18 Säule (125 x 4 mm, 5  $\mu$ m, Macherey-Nagel) mit Wasser und Acetonitril als Eluenten. Der Lauf wurde begonnen mit 99% Wasser and 1% Acetonitril, graduell erhöhend auf 100 % Acetonitril in 20 min, dann 5 min auf 100 % Acetonitril. A-C sind Substanzen 1-3, D ist Alvertoxin I.

## 8. Lebenslauf

Anna Maria Kiefer

07/2019 - 01/2023	<b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin</b> Technische Universität Kaiserslautern Abteilung Molekulare Biotechnologie und Systembiologie
10/2016 - 06/2019	<b>Master of Science</b> Technische Universität Kaiserslautern Microbial and Plant Biotechnology Masterarbeit „Isolation and characterization of bioactive compounds from Jordanian medicinal plants and endophytic fungi“
10/2013 - 09/2016	<b>Bachelor of Science</b> Technische Universität Kaiserslautern Bachelorarbeit: „Suche nach antiinflammatorisch wirksamen Substanzen in pilzlichen Endophyten und Konstruktion eines Reportervektors“
2005 - 2013	<b>Abitur</b> Gymnasium Saarburg