

**Immunmodulatorische, anti-inflammatorische und
antineoplastische Wirkungen der Naturstoffe aus
Ganoderma lucidum, *Tremella aurantia lba* und
*Sargassum graminifolium***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kai Zhang

aus Shanxi, China

Berlin 2017

Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der
Charité-Universitätsmedizin Berlin,
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Tauber / AG Hua Fan angefertigt.

1. Gutachter Priv. Doz. Dr. rer. nat. Hua Fan

 Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie

 Charité-Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter Prof. Dr. Matthias F. Melzig

 Institut für Pharmazie

 Freie Universität Berlin

Disputation am: 18.12.2018

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Immunität	1
1.1.1. Die angeborene Immunität	1
1.1.2. Die adaptive Immunität	2
1.2. Endzündung	3
1.2.1. Selektine und Entzündung	4
1.2.2. Komplementsystem und Entzündung	5
1.3. Blutgerinnung	7
1.4. Tumor	8
1.4.1. Signalumsetzung von Tumorzellen	8
1.4.1.1. RAS/ERK Signalweg	9
1.4.1.2. PI3-Kinase (PI3k) Signalweg	10
1.4.1.3. Wnt Signalweg	11
1.4.2. Antitumor Therapie	12
1.4.2.1. Konventionelle Tumorthherapie	12
1.4.2.2. Gezielte Antitumor Therapie	13
1.4.2.3. Immunologische Tumorthherapie	15
1.4.2.4. Natürliche Produkte in der Tumorthherapie	16
1.5. Traditionelle chinesische Medizin (TCM)	17
1.5.1. <i>Ganoderma lucidum</i>	18
1.5.1.1. Immunmodulatorische Wirkungen	18
1.5.1.2. Antitumor Wirkungen	19
1.5.1.3. Andere Wirkungen	20
1.5.2. <i>Tremella aurantia Iba</i>	22
1.5.2.1. Immunstimulatorische Wirkungen	22
1.5.2.2. Antioxidantien Wirkungen	22
1.5.2.3. Antidiabetes Wirkungen	23
1.5.3. <i>Sargassum graminifolium</i>	23
1.5.4. Bioaktivität von sulfatierte Polysaccharide	25
1.5.4.1. Anti-Entzündungswirkung	25
1.5.4.2. Antikoagulierende und antithrombotische Aktivität	26
1.5.4.3. Antivirale Aktivität	27
1.5.4.4. Antioxidative Aktivität	28
1.6. Zielsetzung	28

2. Material und Methoden	30
2.1. Materialien	30
2.1.1. Reagenzien	30
2.1.2. Antikörper	30
2.1.3. Kits	31
2.1.4. Medien	32
2.1.5. Fraktionen aus Naturstoffen	32
2.1.6. Ziellinien	32
2.1.7. Tieren	33
2.2. Methoden	33
2.2.1. Zellpräparation und Zellkultur	33
2.2.1.1. Medium für Tumorzellen	33
2.2.1.2. Präparation von Lymphozyten aus der Milz der Maus (MSLs)	33
2.2.1.3. Präparation von Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen (BMMs)	34
2.2.1.4. Präparation von human peripheren Blutlymphozyten (HPBLs)	35
2.2.2. Bioassay	36
2.2.2.1. Markierung von FITC-Polysacchariden	36
2.2.2.2. Bestimmung der Proliferation und Aktivierung durch Alamar-Blau-Assay	36
2.2.2.3. Quantifizierung der Zytokine IL-1 β und TNF- α	37
2.2.2.4. Messung von Stickstoffmonoxid (NO)	37
2.2.2.5. Bestimmung der gesamte Immunglobulin-Produktion	38
2.2.2.6. Messung der Zytokine-Produktion	38
2.2.2.7. Phagozytotisches Assay von Makrophagen	39
2.2.2.8. Analyse der Subpopulationen von Lymphozyten	39
2.2.2.9. Analyse der HPBLs-vermittelte Tumor-Zytotoxizität	40
2.2.2.10. Messung der Bindung der L-Selektin mit ihrer Ligand durch SPR-Verfahren	40
2.2.2.11. Einfluss der Bindung des L-Selektin-Antikörpers (anti-CD62L) an L-Selektin auf der Oberfläche von HPBLs durch Proben	41
2.2.2.12. Analyse der Bindung von verschiedenen Proben an L-Selektin auf der HPBLs-Oberfläche	41
2.2.2.13. Analyse der Chemotaxis von Lymphozyten	41
2.2.2.14. Analyse der Homing von Lymphozyten	42
2.2.2.15. Analyse der Aktivierung des Komplementsystems	42
2.2.2.16. Zell-Matrix-Adhäsionsassay	43
2.2.2.17. Einfluss der Bindung des β 1-Integrin Antikörpers (CD29)	

auf der Zelloberfläche der Tumorzellen durch Proben	44
2.2.2.18. Analyse der Migration von Tumorzellen durch Wundheilung	44
2.2.2.19. Analyse der Transwell-Migration von Tumorzellen	44
2.2.2.20. Messung der Blutgerinnung	45
2.2.2.21. Analyse der apoptotischen Zellen	46
2.2.2.22. Analyse des Zellzykluses	46
2.2.2.23. Analyse der Zellproliferation durch CFSE-Färbung	46
2.2.2.24. Messung des intrazellulären ROS	47
2.2.2.25. Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$)	47
2.2.2.26. Gewinnung von Protein aus Tumorzellen	48
2.2.2.27. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay	48
2.2.2.28. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.2.2.29. Western Blot	50
3. Ergebnisse	52
3.1. Untersuchung der biologischen Wirkungen der Fraktionen aus <i>G. lucidum</i> , <i>T. aurantia lba</i> und <i>S. gaminifolium</i>	52
3.2. Immunstimulierende Wirkungen von Polysaccharid-Fraktionen	53
3.2.1. Aktivierung von Makrophagen	53
3.2.1.1. Aktivierung von Makrophagen nach Stimulation durch Sarg-Z	53
3.2.1.2. Induktion der Produktion von NO aus BMMs nach Stimulation durch Sarg-Z	54
3.2.1.3. Induktion der Sekretion von IL-1 β und TNF- α aus BMMs nach Stimulation durch Sarg-Z	55
3.2.1.4. Erhöhung der Phagozytose der BMMs nach Stimulation durch Sarg-Z	56
3.2.2. Aktivierung der Lymphozyten	57
3.2.2.1. Erhöhung der Proliferationsrate von MSLs nach Stimulation durch Sarg-Z	57
3.2.2.2. Erhöhung des prozentualen Anteils von B-Zellpopulation nach Stimulation durch Sarg-Z	59
3.2.2.3. Sekretion von gesamte Immunglobulin aus MSLs nach Stimulation durch Sarg-Z	60
3.2.2.4. Erhöhung des prozentualen Anteils der CD4 ⁺ CD8 ⁺ doppelt positiven T-Zellpopulation in MSLs nach Stimulation durch Sarg-Z	60
3.2.2.5. Keine Einfluss von Sarg-Z auf die Aktivierung der T-Zellen der MSLs	62
3.2.2.6. Sekretion von IL-6 der MSLs nach Stimulation durch Sarg-Z	63

3.2.2.7.	Erhöhung der Proliferationsrate von HPBLs nach Stimulierung durch Sarg-Z	63
3.2.2.8.	Erhöhung des prozentualen Anteils der CD4 ⁺ CD8 ⁺ doppelt positiven T-Zellpopulation von HPBLs nach Stimulation durch Sarg-Z	65
3.2.2.9.	Aktivierung der CD8 ⁺ T-Zell der HPBLs nach Stimulation durch Sarg-Z	66
3.2.2.10.	Induzierung der Zytotoxizität von HPBLs gegen Tumorzellen durch Sarg-Z	67
3.3.	Hemmung des Entzündungsprozesses durch Polysaccharid-Fraktionen	68
3.3.1.	Hemmung der L-Selektin - Ligand Bindung durch GLP20, JRP und Sarg-Z	68
3.3.1.1.	Erhöhung der Hemmungswirkung von GLP20 und JRP nach der Sulfatierung	69
3.3.1.2.	Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes von GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z	70
3.3.2.	Hemmung der Bindung zwischen L-Selektin Antikörper (anti-CD62L) und die L-Selektin der HPBLs durch GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z	71
3.3.3.	Bindung der GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z an die Zelloberfläche von HPBLs	73
3.3.4.	Hemmung der SLC-induzierten Chemotaxis von HPBLs durch GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z	74
3.3.5.	Hemmung der Lymphozyten Homing zu lymphatischen Organe durch GLPss58 und JRP-SS	76
3.3.6.	Hemmung der Aktivierung des Komplementsystemes durch GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z	79
3.3.7.	Interaktion von TNF- α und IFN- γ mit GLPss58 und JRP-SS	80
3.4.	Anti-Tumorwirkung von Polysaccharid-Fraktionen	81
3.4.1.	Hemmung der Proliferationsrate von MEL-2- und MCF7-Zellen durch GLPss58 und JRP-SS	82
3.4.2.	Keine Apoptose-Induktion von MEL-2- und MCF7-Zellen nach Behandlung von GLPss58 und JRP-SS	83
3.4.3.	Hemmung der Zelladhäsion von MEL-2- und MCF7-Zellen auf verschiedene ECM-Proteine durch GLPss58 und JRP-SS	84
3.4.4.	Bindung von GLPss58 und JRP-SS an der Zelloberfläche der MEL-2- und MCF7-Zellen	85

3.4.5. Hemmung der Bindung zwischen β 1-Integrin Antikörper (anti-CD29) und β 1-Integrin auf der Zelloberfläche der MEL-2- und MCF7-Zellen durch GLPss58 und JRP-SS	86
3.4.6. Inhibierung der Migration von MEL-2- und MCF7-Zellen durch GLPss58 und JRP-SS	88
3.4.7. Hemmung der Phosphorylierung der MAP Kinase (ERK) und Protein-kinase C (PKC) in MEL-2- und MCF7-Zellen durch GLPss58 und JRP-SS	89
3.4.8. Hemmung der Proliferationsrate der MEL-2-Zellen durch Aktivierung von Wnt/ β -catenin Signalweg	91
3.4.8.1. Hemmung der MEL-2-Zellproliferation durch Aktivierung von Wnt/ β -catenin Signalweg durch Wnt3a	92
3.4.8.2. Hemmung der MEL-2-Zellproliferation durch Aktivierung von Wnt/ β -catenin Signalweg durch GLPss58 und JRP-SS	93
3.4.8.3. Arretierung der Zellzyklus in der G1-Phase nach Aktivierung von Wnt/ β -catenin Signalweg durch GLPss58 und JRP-SS	95
3.5. Anti-Blutgerinnung durch Polysaccharid-Fractionen	96
3.6. Anti-Proliferation verschiedener Tumorzellen durch Triterpenoiden aus <i>G.lucidum</i>	98
3.6.1. Anti-Proliferation verschiedener Tumorzellen durch Triterpenoiden G2 und G4 aus <i>G.lucidum</i>	99
3.6.2. Untersuchung der Antitumormechanismen von G2 und G4	100
3.6.2.1. Induktion der Apoptose von MEL-2 Zellen durch G2 und G4	100
3.6.2.2. Induktion der Produktion von ROS in MEL-2-Zellen durch G2 und G4	101
3.6.2.3. Induktion der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ in MEL-2-Zellen durch G2 und G4	102
3.6.2.4. Induktion der DNA-Schädigung und p53 Expression in MEL-2-Zellen durch G2 und G4	103
3.6.2.5. Hochregulationen von Bax und Unterregulation von Bcl-2 in MEL-2-Zellen durch G2 und G4	104
3.6.2.6. Induktion von Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrium und Caspase Aktivierung in MEL-2-Zellen durch G2 und G4	104
3.6.2.7. Hemmung des PI3K/Akt - Signalwegs in MEL-2-Zellen durch G2 und G4	106
3.6.2.8. Aktivierung von Wnt/ β -catenin Signalweg in MEL-2-Zellen durch G2 und G4	107

4. Diskussion	108
4.1. Bioassay-direkte Fraktionierung nach traditioneller chinesischer Medizin	109
4.2. Sarg-Z aktivierte B-Zellen und Makrophagen der Maus	109
4.3. Sarg-Z erhöht den prozentualen Anteil der CD4 ⁺ CD8 ⁺ doppelt positiven T-Zellen	110
4.4. Antitumorale Aktivität von Sarg-Z	112
4.5. Antiinflammatorische Aktivität von Sarg-Z, GLPss58 und JRP-SS	115
4.6. Anti-Blutgerinnungsaktivität von GLPss58 und JRP-SS	119
4.7. Antitumorale Aktivität von GLPss58 und JRP-SS	120
4.8. Antitumorale Aktivität von G2 und G4	123
5. Zusammenfassung	127
6. Summary	131
7. Literatur	134
8. Veröffentlichungen	146
9. Danksagung	147
10. Lebenslauf	148

Abkürzungen

APC	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMMs	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>circular dichroismus</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CFT	<i>Clot-formation-time</i>
CTLs	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
ConA	<i>concanavalin A</i>
CT	<i>Clotting-Time</i>
DMEM	<i>dulbecco`s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbend assay
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPBLs	Human periphere Blutlymphozyten

HRP	Horseradish peroxidase konjugiert
IC ₅₀	50% of inhibition concentration
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
IL-1 β	Interleukin-1 β
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAC-1	Macrophage antigen-1
mAk	monoklonale antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	Mannose-Bindeprotein
MCF	<i>Maximum-clot-firmness</i>
MEK	Synonym MAPKK, Kinase der MAPK
MSLs	Mause-Milz-Lymphozyten
NO	Stickstoffmonoxid
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin (Emission bei 575 nm)
PECAM-1	<i>platelet / endothelial-cell adhesion molecule-1</i>
PHA	<i>phytohemagglutinin</i>
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PSGL-1	P-Selektin Glykoproteinligand-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	Rat fibrosaroma
RAS	Rat sarcoma
RNase A	Ribonuclease A
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gelelectrophoresis</i>

sLeX	Sialyl Lewix X
SPR	<i>Surface-Plasmon-Resonance</i>
sTyr/sLeX-PAA	Sulfo Tyrosin / sialyl Lewis X-Polyacrylamid
TAA	Tumorassoziierte Antigen
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit Tween 20
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
TEMED	Tetramethylehtylendiamin
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
Tris	Tris-hydroxymethylaminoethan
Triton-X 100	T-octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>

1. Einleitung

1.1. Immunität

Während seines Lebens besitzt ein Mensch zwei Arten der Immunität gegen verschiedene Krankheitserreger, man spricht von einer angeborenen und einer adaptiven Immunität. Sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunität hängt von weißen Blutzellen, den Leukozyten ab.

1.1.1. Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität wird zu einem großen Teil von den Granulozyten und Makrophagen getragen. Granulozyten enthalten viele Granula in ihrem Zytoplasma und wegen des unregelmäßig geformten Zellkerns nennt man sie auch polymorphkernige Leukozyten. Granulozyten unterscheiden sich in drei Arten: neutrophile, eosinophile und basophile Zellen. Neutrophile Zellen sind phagozytische Zellen und stellen die umfangreichste und wichtigste zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems dar. Eosinophile Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von parasitischen Infektionen. Basophile Zellen tragen beim Schutz der Schleimhäute im Körper bei. Makrophagen sind phagozytische Zellen. Sie können zahlreiche verschiedene Pathogene sofort angreifen, denen sie vorher bereits einmal oder gar nicht begegnet sind.

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems, das zur Verteidigung von Mikroorganismen (z. B. Bakterien, Pilzen und Parasiten) dient, es weist jedoch stark zerstörende Eigenschaften auf. Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten, das Komplementsystem zu aktivieren: den klassischen Weg, den MBL-Weg (Mannose-bindende Lektine) und den alternativen Weg. Bei dem klassischen Weg bindet zuerst Faktor C1 an einen Antigen-gebundenen Antikörper (IgG und IgM). Die Untereinheit C1q ist verantwortlich für diese Bindung. Danach werden die an C1q gebundenen Serin-Proteasen (C1r und C1s) aktiviert. Nach der Aktivierung der Serin-Proteasen C1r und C1s werden sie von C2 in C2a und C2b und von C4 in C4a und C4b gespalten. C2a und C4b lagern sich an eine "C3-Konvertase" an (C4bC2a), welche die C3 in C3a und C3b spaltet. Anschließend bildet C4b2a3b die C5-Konvertase, die C5 in C5a und C5b spaltet. C5b leitet die Bildung des Zellyse-Komplexes ein. Die Aktivierung des MBL-Weges erfolgt durch die Bindung von Mannose auf der Oberfläche von Mikroorganismen, und aktiviert dann die MBL-

assoziierten Serinproteasen (MASP-1, MASP-2 und MASP-3). Diese MBL-assoziierten Serinproteasen katalysieren dieselben Reaktionen wie die Serinproteasen C1r und C1s im klassischen Weg. Bei dem alternativen Weg wird der Komplementfaktor C3 durch den spontanen Zerfall in C3a und C3b gespalten. Freies C3b bildet mit Faktor B eine C3-Konvertase C3bBb. Dieser Komplex kann C5 aktivieren und somit die Auslösung des lytischen Komplexes induzieren.

1.1.2. Die adaptive Immunität

Die adaptive Immunität beruht auf den Lymphozyten, welche für eine lebenslange Immunität gegen den Krankheitserreger verantwortlich sind, mit dem sie einmal in Kontakt gekommen sind. Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: B- (B-Zellen) oder T-Lymphozyten (T-Zellen). Sie werden nach dem Ort ihrer Reifung benannt. T-Zellen reifen im Thymus, während B-Zellen im Knochenmark reifen. B-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, die Antikörper freisetzen.

T-Zellen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, die eine differenziert zu zytotoxischen T-Zellen (T_c) und entfernt infizierte Zellen, wohingegen die sogenannten T-Helfer-Zellen, andere Zellen wie B-Zellen oder Makrophagen aktivieren. An der Oberfläche der Lymphozyten gibt es extrem vielgestaltige Rezeptoren, wobei jeder Lymphozyt exakt einen Rezeptor besitzt, der für ein bestimmtes Antigen spezifisch ist. Aus diesem Grund können Lymphozyten eine große Vielfalt von Antigenen erkennen.

Alle Blutzellen des Immunsystems, einschließlich der roten Blutkörperchen, der Blutplättchen und der weißen Blutzellen stammen aus den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, die als pluripotente Stammzellen bezeichnet werden. Diese teilen und entwickeln sich zu Vorläuferzellen für die zwei Linien der Blutzellen: den myeloischen Zellen und den lymphatischen Zellen. Die myeloiden Vorläuferzellen sind die Vorstufe der Granulozyten und Makrophagen. Makrophagen sind die gereifte Form der Monozyten, die im Blutkreislauf zirkulieren und zu Makrophagen differenzieren, sobald sie in das Gewebe eintreten.

Phagozytose durch Makrophagen ist die erste Verteidigungslinie gegen fremde Mikroorganismen im angeborenen Immunsystem. Mittels der Oberflächenrezeptoren können Makrophagen bakterielle, pilzliche und virale Mikroorganismen erkennen und binden. Wenn dies geschieht, beginnen Makrophagen, die Mikroorganismen aufzunehmen und Zytokine freizusetzen. Diese Zytokine binden an Rezeptoren in

anderen Zellen und beeinflussen somit das Verhalten dieser Zellen. Die Zytokine, die von Phagozyten nach einer Begegnung mit Mikroorganismen freigesetzt wurden, induzieren die Entzündungsreaktion. An der Infektionsstelle erhöhen die Zytokine die Durchlässigkeit der Gefäßwand, damit Protein und Flüssigkeit in das Gewebe gelangen können. Diese Zytokine führen zur Erhöhung der Adhäsionskraft des Gefäßwandendothels, so dass dort zirkulierende Leukozyten haften bleiben und hindurch gelangen. Die vorherrschenden Zelltypen in der ersten Phase einer Entzündungsreaktion sind neutrophile Zellen und Makrophagen, und werden daher als Entzündungszellen bezeichnet. In einer späteren Phase kommen die Lymphozyten zum Einsatz. Die Aktivierung der Lymphozyten findet erst in den Lymphknoten statt, nachdem sie mit Antigenen in Kontakt gekommen sind, welche von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) in die Lymphknoten transportiert wurden.

1.2. Entzündung

Eine Entzündung ist eine lokale und systemische biologische Reaktion von Körpergeweben auf schädliche Reize, wie z. B. Pathogene oder geschädigte Zellen, und ist eine schützende Immunantwort an deren Immunzellen, wobei Blutgefäße und molekulare Mediatoren beteiligt sind. Die Funktionsweise einer Entzündung ist es die Reizstoffe, geschädigte nekrotische Zellen oder Krankheitserreger aus dem Gewebe zu entfernen und die Regeneration des Gewebes zu initiieren.

Die klassischen Anzeichen einer Entzündung sind die Rötung, das Anschwellen, der Schmerz und die Wärme. Die Rötung wird durch die erhöhte Durchblutung und Einwanderung von Erythrozyten in die entzündeten Stellen verursacht. Das Anschwellen erfolgt durch die Erhöhung der Durchlässigkeit des Blutgefäßes, so dass sich Gewebs-Flüssigkeiten, Plasmaproteine, Erythrozyten und Leukozyten ansammeln. Der Schmerz wird durch Sekretion von Schmerz-Botenstoffen, sogenannten Metaboliten und Zytokinen induziert, die die Nervenzellen stimulieren. Die Wärme wird durch eine erhöhte Durchblutung und von Leukozyten freigesetzten Chemokinen verursacht.

Die Entzündung ist nicht völlig spezifisch für die Elimination von Pathogenen oder Zelltrümmern, es kann auch das gesunde Gewebe schädigen. Dies steht im Vordergrund bei chronischen Entzündungen. Analog zu Autoimmunerkrankungen bzw. Allergien, können Entzündungen problematisch werden, wenn sie sich gegen

körpereigenes Gewebe oder harmlose Umweltreize richten. Häufige Erkrankungen, die mit einer Entzündung einhergehen, sind beispielsweise Arteriosklerose, Rheumatoide Arthritis, Lupus Erythematosus oder sogar Krebs [1]. Bei diesen Krankheiten sind eine Vielzahl von Proteinen an der Entzündung beteiligt [1]. Deshalb sind Entzündungen von großer Bedeutung in der Medizin und anti-entzündliche Therapien werden im klinischen Bereich immer mehr eingesetzt.

1.2.1. Selektin und Entzündung

Die Entzündung wird zunächst durch Freisetzung von Leukozyten aus den Blutgefäßen ins Gewebe eingeleitet. Dies wird als Leukozyten-Extravasation genannt wobei es zu einer Adhäsionskaskade von Leukozyten mit dem Endothelzellen kommt, die sich in sieben Schritte unterteilen lässt: 1) initialer Kontakt, 2) schnelles Rollen, 3) langsames Rollen, 4) feste Adhäsion, 5) Verstärkung der Adhäsion und Abflachen, 6) intravaskuläres Kriechen und 7) para- oder transzelluläre Migration [2]. An diesem Prozess sind zahlreiche Liganden, ihre Rezeptoren und Zytokine beteiligt [2].

Die Wechselwirkung zwischen Selektinen und ihren Liganden wird durch den initialen Kontakt und das Rollen induziert. Die Familie der Selektine hat drei Mitglieder: L-Selektin, welches auf Leukozyten exprimiert wird, und P-(Plättchen)- und E-(Endothel)-Selektin, welche auf den Plättchen, bzw. Endothelzellen exprimiert werden. L-(Leukozyten) Selektin wird im Gegensatz zu P- und E- Selektinen konstitutiv auf Leukozyten exprimiert und funktionsfähig, wohingegen P- und E -Selektine nur nach Induktion durch Entzündungs-Mediatoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Folgende Liganden wurden als potentielle L-Selektinliganden erkannt: CD34 [3], GlyCAM-1 (Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule-1) [4], Podocalyxin [5] und Endomucin [6] sowie PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) [7]. P- und E-Selektin interagieren ebenfalls mit dem Liganden PSGL-1 [8], aber mit geringerer Affinität wie mit L-Selektin, sowie mit dem E-Selektin Ligand-1 (ESL-1) [9] und CD44 [10] auf der Oberfläche von Leukozyten.

Die Leukozyten rollen dabei entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration, die während der Entzündung erzeugt wird. Sowohl die Selektin-vermittelte Leukozyten-Endothel-Interaktion, als auch die Bindung von Chemokinen an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) führen zur Aktivierung der Leukozyten. Dadurch werden die Gestalt und die Zusammensetzung der

Oberflächenmoleküle der Leukozyten verändert. L-Selektin wird nach Aktivierung abgespalten, was als "Shedding" bezeichnet wird. Die Integrine (Membranproteine) werden zeitgleich aktiviert, bzw. hochreguliert. Danach kommen Leukozyten zu deren Polarisierung. Der erste Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen der Gefäßwand wird durch Selektine vermittelt, gefolgt vom Rollen und der Integrin-vermittelten festen Adhäsion und Abflachen der Leukozyten am Endothel. Hierbei sind vor allem das β 1-Integrin *very late antigen-4* (VLA4) und das β 2-Integrin *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) mit ihren Liganden *vascular cell-adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) aus der Superfamilie der Immunglobuline von großer Bedeutung [11-12]. Der letzte Schritt der Adhäsions-Kaskade: die Transmigration der Leukozyten auf dem Endothel, wird durch Interaktion von *macrophage-1 antigen* (MAC-1) mit ICAM-1 vermittelt [13]. Zusätzlich vereinfachen die leukozyteneigenen Proteasen den Durchtritt der Leukozyten durch das Endothel, indem sie die Bindungen der an den endothelialen Zell-Zellkontakten beteiligten Proteine lösen. Dies ermöglicht dann die Transmigration von Leukozyten durch das Endothel [14].

Ohne den oben bereits erwähnten Selektin-vermittelten ersten Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen kann keine Leukozytenextravasation erfolgen. Deswegen sind Selektine in der Entstehung von akut- und chronisch-entzündlichen Krankheiten involviert, was durch viele Studien bestätigt wurde [15]. So kann beispielsweise mittels monoklonaler Antikörper gegen L-Selektine die Extravasation von Neutrophilen in entzündetem Gewebe stark verringert werden [15]. In Selektin-knockout Mäusen ist die Neutrophilen-Rekrutierung im entzündeten Gewebe unmöglich [16], daher kann die Hemmung von Selektinen zur antiinflammatorischen Therapie eingesetzt werden.

1.2.2. Komplementsystem und Entzündung

Die löslichen Komplementbestandteile sind nicht nur im Kreislauf, sondern auch in Körperflüssigkeiten und -geweben vorhanden, die bereit sind, Abwehrreaktionen auszulösen, die durch exogene (z. B. infektiöse Agenzien) oder endogene (z. B. Ischämie, Autoimmunität) Reize induziert werden und können unregelt für Gewebsschäden verantwortlich sein [17]. Komplementkomponenten, die im Plasma oder in Körperflüssigkeiten aktiviert werden, sind in der Regulierung aller Phasen einer akuten Entzündungsreaktion involviert, einschließlich der Veränderungen im

Gefäßfluss und Kaliber, der Zunahme der vaskulären Permeabilität, der Extravasation von Leukozyten und der Chemotaxis [18].

Mastzellen sind im Bindegewebe rund um die Blutgefäße weit verbreitet und zählen zu den Ersthelfern bei Entzündungen. Anaphylatoxine setzen bei akuten allergischen Reaktionen durch Auslösung des Mastzellen-Zerfalls Histamin, Tumornekrosefaktoren (TNF)- α , neu synthetisierte Zytokine, Tryptasen, andere Proteasen und Chemokine frei, die Vasodilatation und Extravasation von Flüssigkeit verursachen [19]. Anaphylatoxine spielen im Prozess der Extravasation eine Rolle und beeinflussen direkt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen sowie Leukozyten.

C3a und C5a werden als Anaphylatoxine bezeichnet und sind kleine Proteine, die bei der Aktivierung des Komplementsystems durch Spaltung aus größeren Vorläufern freigesetzt werden. C3a wirkt als ein Kostimulator des Lipopolysaccharide-Signaling zur Erhöhung der Expression von IL-6 in Mastzellen [20]. C5a hat die Fähigkeit, Genexpression und Proteinsynthese von TNF- α und Interleukin (IL-1 β) in Monozyten und Makrophagen zu induzieren [21]. C5a stimuliert in humanen Endothelzellen die Hochregulierung von Genen für Adhäsionsmoleküle, wie E-Selektin, intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1, Gefäßzelladhäsionsmolekül-1 und IL-6 [22]. Eine Studie hat gezeigt, dass C5a ein Aktivator der Integrin-abhängigen Adhäsion und Transmigration von Eosinophilen und Neutrophilen ist [23]. Darüber hinaus nehmen Anaphylatoxine indirekt an diesem Prozess teil, indem sie TNF- α und IL-1 β -Expression induzieren. Diese zwei Zytokine scheinen während der Entzündung Hauptregulatoren der Adhäsions-molekülexpression sowohl an Leukozyten als auch am Endothel zu sein [17]. Während des Entzündungsprozesses wandern Leukozyten entlang eines chemischen Gradienten von chemotaktischen Mediatoren zum Entzündungsherd und passieren die Blutgefäßwände. C5a weist gut etablierte chemotaktische Faktoren auf, die die Migration von Leukozyten direkt durch die Bindung an verwandte Rezeptoren beeinflussen, die auf Entzündungszellen exprimiert werden [14].

Eine zusätzliche Eigenschaft von Anaphylatoxinen ist ihre Fähigkeit, die Synthese anderer chemotaktischer Faktoren zu induzieren. einschließlich Eicosanoiden und Chemokinen, zu induzieren, wie z.B. C5a stimulieren Maus-dermale mikrovaskuläre Endothelzellen, die mit IL-6 präpariert sind, um Monozyten-chemoattraktives Protein-1 und Makrophagen-Entzündungsprotein-2 [25]. C3a und C5a sind potente Entzündungsmediatoren und C5b initiiert die Bildung des C5b-9-terminalen

Komplementkomplexes, der in bakterielle Zellwände eingebaut wird und die Lyse von Pathogenen, insbesondere gramnegativen Neisseria-Stämmen, induziert [19].

1.3. Blutgerinnung

Die Blutgerinnung auch als Hämostase bekannt, ist ein mehrschrittiger Prozess, welcher die bei Verletzungen der Blutgefäße entstehenden Blutungen stillt. Bei der Hämostase wird zunächst der Prozess „Blutstillung“ eingeleitet. Die Blutplättchen (Thrombozyten) und die Wandzellen des betroffenen Blutgefäßes (Endothel- und glatte Muskelzellen) sowie das umliegende Bindegewebe sind an der Blutstillung beteiligt. Wenn ein Gefäß verletzt ist, verengt es sich, dann heften sich die Blutplättchen an Kollagenfasern (Thrombozytenadhäsion, die im Extrazellulärraum zahlreich vorhanden sind und verkleben untereinander und schließen lose den ersten Wundverschluss. Bei der sich anschließenden Blutgerinnung wird dieser Verschluss durch die Bildung von Fibrin-Fäden verstärkt. In diesem Fall kann die Blutgerinnung in zwei Wege unterteilt werden (intrinsischer und extrinsischer Weg). Dabei spielt die Aktivierung der im Blutplasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren eine wichtige Rolle.

Beim intrinsischen Weg werden die Thrombozyten nach Kontakt mit Kollagenaromen aktiviert und dann werden viele Haftstoffe wie Fibronectin und Thrombospondin freigesetzt. Dies führt zu einer Aggregation der Thrombozyten und zur Bildung eines weißen Thrombus [26]. Die aktivierten Thrombozyten können die Gerinnungsfaktoren XII und XI (Serinproteasen) aktivieren, die eine Gerinnungskaskade im intrinsischen System auslösen. Der extrinsische Weg wird durch Kontakt von Blut mit dem Gewebefaktor aus verletztem endotheliales Gewebe initiiert. Der freigesetzte Gewebefaktor bildet einen Komplex mit dem Faktor VII und aktiviert dann die Gerinnungskaskade. Sowohl bei dem intrinsischen als auch bei dem extrinsischen Weg wird am Ende der Kaskade die Faktor X aktiviert, der das Prothrombin in Thrombin spaltet. Das aktivierte Thrombin wandelt das Fibrinogen in Fibrin um. Durch Wirkung der Faktors XIII wird die Vernetzung von Fibrin zu einem Fibrinnetz katalysiert. Die roten Blutkörperchen werden in dem Fibrinnetz eingefangen, und ein roter Thrombus wird gebildet. Der Thrombus wird stabilisiert und Gerinnsel gebildet [27].

Die Blutgerinnung spielt bei der Wundheilung eine wichtige Rolle. Im gesunden Körper werden die gebildeten Thromben durch Fibrinolyse wieder völlig aufgelöst. Eine

verstärkte Blutgerinnung ist für Menschen gefährlich, da das Blutgerinnsel im Blutgefäß eine sehr langsame Fließgeschwindigkeit hat und zu einem erhöhten Embolie-Risiko führen kann. Deswegen muss bei vielen Patienten die Blutgerinnung gehemmt werden, um eine Lungenembolie oder Herzrhythmusstörung zu vermeiden. Heparin wird zur medikamentösen Gerinnungshemmung *in vivo* häufig eingesetzt. Ab einer Kettenlänge von fünf Monosacchariden (drei D-Glucosamine und zwei D-Glucuronsäure) wirken Heparine gerinnungshemmend. Entsprechend der Kettenbausteine besitzen Heparine viele negative Ladungen, über welche sie auch an Antithrombin III koppeln können. Dieser Komplex hemmt die aktivierte Faktor Thrombin und Faktor Xa.

1.4. Tumor

Ein Tumor zeichnet sich unabhängig von der Ursache durch Zunahme des Gewebevolumens aus. In der Medizin werden Tumore nach ihren Eigenschaften und Fähigkeiten in zwei Arten klassifiziert: gutartige und bösartige Tumoren. Gutartige Tumoren wachsen lokal begrenzt und bilden keine Tochtergeschwülste (Metastasen), können aber durch ihr bloßes Volumen das umliegende Gewebe verdrängen und damit schwere Probleme verursachen. Bösartige Tumore wachsen dagegen unbegrenzt in das umliegende Gewebe und schädigen daher den Organismus stärker als gutartige Tumore und wird in der Medizin als Krebs bezeichnet [28]. Krebs ist Haupttodesursache weltweit. Laut der Welt-Gesundheitsorganisation (WHO) erkrankten 2012 etwa 14 Millionen an Krebs, wovon 8,2 Millionen ihrem Krebsleiden erlagen [29]. Im Jahr 2012, waren bei den Männern Lungen-, Prostata-, Darm-, Magen- und Leberkrebs die fünf am häufigsten diagnostizierten Krebsarten, während es bei den Frauen Brust-, Darm-, Lungen-, Gebärmutterhals- und Magenkrebs war [29]. Es wird erwartet, dass die Zahl der jährlichen Krebsneuerkrankungen von derzeit 14 Millionen bis auf 22 Millionen innerhalb der nächsten 20 Jahre ansteigen wird [29]. Deswegen ist die Forschung antitumoraler Therapien von größter wissenschaftlicher Bedeutung.

1.4.1. Signalumsetzung von Tumorzellen

Zelluläre Signalwege sind nicht voneinander isoliert, sondern miteinander gekoppelt, und bilden ein komplexes Signalnetzwerk. Zellen erhalten Informationen von vielen verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren, von der Zellmatrix- und Zell-Zell-

Kontakten. Sie müssen diese Informationen integrieren, um verschiedene Prozesse wie Proteinsynthese, Zellwachstum, Motilität, Zellarchitektur, Polarität, Differenzierung und programmierten Zelltod zu regulieren. Krebszellen sind genetisch instabil, sie können ihre Signalstoffe kontinuierlich verändern, um ihre Proliferation zu stabilisieren und dem Zelltod zu entkommen [30]. Obwohl ein Mutation-aktivierter Weg durch einen Inhibitor blockiert werden kann, können Tumorzellen diesem Weg durch Aktivierung anderer Wege ausweichen. Daher ist das Verständnis der Signalwege des Tumors sehr wichtig für die Entwicklung einer Tumorthherapie.

1.4.1.1. RAS-ERK Signalweg

Der ERK (extrazellulär regulierte Kinase)-Signalweg ist der meist untersuchte MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg und spielt insbesondere bei Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Die wichtigsten signalübermittelnden Komponenten des MAPK-Signalwegs sind RAS (rat sarcoma), RAF (rat fibrosaroma), MEK (synonym MAPKK, Kinase der MAPK), und ERK. RAS ist ein mutationsaktiviertes Signalprotein, welches in verschiedenen humanen Krebszellen vorkommt. Der RAS-ERK-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Integration externer Signale in der Anwesenheit von Mitogenen, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), die das Zellwachstum und die Zellproliferation in vielen Säugerzelltypen fördern.

Durch die Bindung des EGF an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) wird eine Phosphorylierung der intrazellulären Rezeptordomäne ausgelöst und aktiviert dann fungiert als eine Tyrosinkinase. Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) und durch dessen Bindung wird SOS (Son of Sevenless) zur Plasmamembran rekrutiert. SOS bindet daraufhin membrangebundene RAS-Proteine, die an der inneren Oberfläche der Membran verankert sind, und stimuliert den Austausch von GDP gegen GTP [31]. RAS kann Guanosin triphosphat (GTP) binden und es bildet sich ein aktiver RAS-GTP-Komplex [31].

Aktives GTP-gebundenes RAS bewirkt Konformationsänderungen von RAF, welche MEK (MEK1 und MEK2) phosphoryliert und aktiviert. MEK phosphoryliert und aktiviert eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK). MAPK wurde ursprünglich als "extrazellulär Signal-regulierte Kinase" (ERK) bezeichnet [32]. Aktiviertes MEK1 und MEK2 aktivieren ERK1 und ERK2 (Serin-/Threoninkinasen), welche

Wachstumsfaktor-responsive Zielmoleküle und Transkriptionsfaktoren regulieren, so dass letztlich eine Wachstumsfaktor-abhängige Regulation von Transkription, Metabolismus und zytoskelettalem Rearrangement erfolgen kann [32]. Durch die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren wird die Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert. Diese fördern Vorgänge wie die Proliferation.

Cyclin-abhängige Kinasen (CDK1, 2, 3, 4 und 6) gehören zur Familie der Proteinkinasen, welche sowohl bei der Transkription als auch bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen. Deren wechselnde zelluläre Konzentration ist für die Steuerung der Zellzyklusphasen entscheidend. Proteinkinasen sind Enzyme, die anderen Proteine phosphorylieren, sind jedoch nur in Verbindung mit ihrem zugehörigen Cyclin aktiv. Aufgrund ihrer essentiellen Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus und somit bei der Proliferation von Zellen, werden sogenannte CDK-Inhibitoren, als potentielle Krebs-Therapeutika getestet. Der Teilungszyklus eukaryotischer Zellen, lässt sich in die vier Phasen G1, S, G2 und M einteilen. Die Bindung von CDK4/6 an Cyclin D1 führt durch Phosphorylierung des Retinoblastom (Rb)-Proteins, zum Übergang von der G1- zur S-Phase [33]. Rb wird normalerweise in frühen G1 an den Transkriptionsfaktor E2F gebunden und inhibiert seine Transkriptionsaktivität, wodurch die Expression von S-Phasen-Eintrittsgenen einschließlich Cyclin E, Cyclin A2 und Emi1 verhindert wird [33]. In der S-Phase wird die DNA repliziert und neue Gene exprimiert, es schließen sich die G2-Phase und die Mitosephase an. Vermittelt wird die ungehemmte Zellteilung letztlich von aktivierenden Transkriptionsfaktoren der Familie E2F. Aktiviertes ERK stimuliert die Expression des Transkriptionsfaktor Myc, der ein direkter Aktivator von E2F ist [33].

1.4.1.2. PI3-Kinase (PI3K) Signalweg

Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) / AKT (auch bekannt als Proteinkinase B (PKB)) ist ein intrazellulärer Signalweg, der für die Regulierung des Zellzyklus wichtig ist. Daher steht er in direktem Zusammenhang mit dem Zellwachstum, der Motilität und dem Überleben. Die PI3K phosphoryliert und aktiviert AKT und lokalisiert AKT in der Plasmamembran. Das aktivierte AKT kann eine mehrstufige Kaskade initiieren [34]. Eine Stufe davon ist die Serin/Threonin-Kinase mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*). Aktiviertes mTOR führt durch Phosphorylierung von zwei Schlüsselproteinen zur deren Aktivierung, welche die Translation von Proteinen regulieren: 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1*) und S6K1

(*protein S6 kinase 1* regulieren). mTOR wird durch Rapamycin gehemmt [34]. YAP (*yes-associated protein*) ist ein Aktivator des p53-bezogenen Transkriptionsfaktors p73 und ein Substrat von AKT. YAP verstärkt die p73-induzierte Transkription der proapoptischen Proteine wie Bax und Bad, wohingegen AKT diesen Effekt durch Inaktivierung von YAP verhindert [35]. Das FoxO-Protein (forkhead box, Klasse O) ist Transkriptionsfaktor, der sich im Zellkern an bestimmte Stellen der DNA heftet und so die Expression verschiedener Tumorsuppressoren wie p27 und p21 unterdrückt [35]. FoxO-Transkriptionsfaktoren werden durch AKT phosphoryliert und inaktiviert [35]. Dadurch können die Zellen krebsartig werden [35]. Zusätzlich zu seinem Einfluß auf das Zellwachstum kann der PI3/Akt-Weg auch die maligne Progression fördern, indem er das Zellüberleben erhöht. Bei vielen Krebsarten ist dieser Weg überaktiv, wodurch die Apoptose reduziert und die Proliferation ermöglicht wird. PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) ist eine Phosphatase, welche durch Dephosphorylierung von Phosphatidylinositolphosphaten (insbesondere IP3) den PI3K-AKT/PKB-Signalweg unterbricht und als Tumorsuppressor wirkt [35].

1.4.1.3. Wnt Signalweg

Wnt-Gene kodieren 19 sezernierte Glykoproteine, die als Liganden wirken, um den Rezeptor-vermittelten Signalweg zu aktivieren, und die Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zellmotilität kontrollieren [36]. Zwei Wnt-Signalwege wurden charakterisiert: der kanonische Wnt-Signalweg und der nichtkanonische Wnt-Signalweg. Der kanonische Wnt-Signalweg ist von β -Catenin abhängig und wird als Wnt/ β -Catenin-Signalweg beschrieben. Dies kann zu einer Akkumulation von β -Cateninen im Zytoplasma und schließlich zur Translokation von β -Cateninen in den Kern als Co-Aktivator von Transkriptionsfaktoren führen, die zu der TCF/LEF-Familie gehören [37]. Ohne Binding des Wnt-Liganden an den Wnt-Rezeptor Frizzled (FZD) und *Low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP)5/6 auf der Zellmembran werden keine β -Catenine im Zytoplasma akkumuliert, da β -Catenine von einem Proteinkomplex zerstört werden. Dieser Komplex umfasst die folgenden Proteine: Axin, Adenomatose Polyposis coli (APC), Protein-Phosphatase 2A (PP2A), Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) und Casein-Kinase 1 α (CK1 α) [38,39]. Dieser Komplex degradiert β -Catenin, indem er β -Catenin mit Ubiquitin markiert, anschließend wird das ubiquitinierte β -Catenin im Proteasom verdaut [37]. Sobald jedoch der Wnt-Ligand an FZD und LRP5/6 bindet, wird das intrazelluläre Protein Dishevelled (DSH) durch

Phosphorylierung aktiviert und hemmt anschließend die GSK3-Aktivität des Proteinkomplexes. Dann wird der Abbau von β -Catenin gehemmt.

Der nichtkanonische Wnt-Signalweg ist von β -Catenin unabhängig und kann durch Regulierung der Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) die Calcium-vermittelten intrazellulären Signalwege kontrollieren. Deswegen kann er als Wnt/Calcium-Signalweg beschrieben werden [40]. Analog zum Wnt/ β -Catenin-Signalweg interagiert der aktivierte FZD-Rezeptor direkt mit DSH nach der Ligandenbindung und aktiviert spezifische DSH-Proteindomänen. Diese Ko-stimulation von DSH kann zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC) führen und dann spaltet sich Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃). Der IP₃-Rezeptor ist ein Ligandenaktivierter Calciumkanal in der Membran des glatten ER. Nach der Bindung von IP₃ mit seinem Rezeptor wird die Freisetzung von Calcium aus ER induziert [40]. Beide Wnt-Wege werden in Verbindung mit Krebs gebracht, insbesondere in Bezug auf Brustkrebs oder Darmkrebs [41].

1.4.2. Antitumor Therapie

1.4.2.1. Konventionelle Therapien

Zu den konventionellen Verfahren zur Behandlung von Krebs gehören Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Gutartige Tumore können, wenn sie sich noch in einem frühen Entwicklungsstadium befinden, chirurgisch entfernt werden. Grundsätzlich gelten diese Verfahren für alle Krebsarten. Im besten Fall kann der Tumor vollständig entfernt werden und die Funktion des erkrankten Organs bleibt erhalten [42].

Minimalinvasive Verfahren werden heutzutage als neu entwickelte Techniken zur operativen Tumorentfernung verwendet. Durch minimalinvasive Verfahren haben Patienten weniger Schmerzen, erholen sich schneller und genesen schneller und Untersuchungen z.B. bei Gebärmutterhals-, Enddarm- und Prostatakrebs zeigen, dass minimal-invasive Verfahren die gleichen Erfolgsaussichten haben wie die herkömmlichen offenen Operationen [43]. Allerdings kann das Risiko für einen Rückfall auftreten. Um im Körper verbliebene Krebszellen zerstören zu können, wird im Anschluss an die Operation eine unterstützende Therapie, wie die Strahlen- oder Chemotherapie angewandt [44].

Die Strahlentherapie ist eine der zentralen Säulen der Krebstherapie. Die tumorzerstörende Wirkung der Strahlentherapie tritt nur innerhalb des Bestrahlungsfelds auf. Für einige lokal begrenzte Krebsarten, z.B. Kehlkopfkrebs oder Prostatakrebs ist der alleinige Einsatz von Strahlentherapie ausreichend. Bei der Strahlentherapie wird die Erbsubstanz der Krebszellen durch ionisierende Strahlung geschädigt, sodass die Zellteilung gestoppt wird. Danach werden die Tumore kleiner und verschwinden sogar. Allerdings ist die zerstörende Wirkung der Strahlentherapie nicht spezifisch, das bedeutet, dass auch gesunde Körperzellen beschädigt werden können [44].

Unter Chemotherapie versteht man die Behandlung bösartiger Tumore mit Chemotherapeutika, die in den Teilungszyklus der Krebszellen eingreifen. Heute gibt es mehr als 50 verschiedene die Zellteilung-hemmende Medikamente, z.B. Alkylanzien, die in der Krebstherapie eingesetzt werden, die sich mit dem genetischen Material des Zellkerns verbinden, und dadurch die Zellteilung verhindern. Andere Chemotherapeutika wie Vincaalkaloide wirken an Mikrotubuli und hemmen dadurch die Zellteilungsprozesse [45]. Im Vergleich zu gesunden Zellen, teilen und vermehren sich Krebszellen sehr schnell, so dass Chemotherapeutika besonders intensiv auf Krebszellen wirken, jedoch können auch gesunde Zellen durch Chemotherapeutika beschädigt werden. Dies ist ein Nachteil der Chemotherapie. Im Gegensatz zu lokal wirkenden Methoden, wie z.B. Operation und Strahlentherapie wirkt die Chemotherapie im ganzen Körper und kann die Metastasen der Krebszellen behandeln [45]. Im Frühstadium von Krebserkrankungen kann die Chemotherapie die anderen therapeutischen Verfahren unterstützen.

1.4.2.2. Gezielte Antitumor Therapie

Die konventionellen Behandlungsverfahren sind zwar bei mehreren Krebsfällen wirksam, bleiben aber im weiter fortgeschrittenen Stadium in ihren Möglichkeiten beschränkt. Operation und Strahlentherapie wirken nur unmittelbar am Ort des Tumors. Sie eignen sich nicht gut für bösartige Tumore, die bereits Metastase gebildet haben. Die Chemotherapie bekämpft zwar Krebszellen im ganzen Körper, schädigt aber auch gesundes Gewebe, weshalb auch erhebliche Nebenwirkungen einhergehen. Gezielte Antitumor-Therapien werden derzeit entwickelt, um spezifisch den Krebs zu bekämpfen ohne gesunde Körperzellen zu beeinflussen. Deshalb werden sie auch als zielgerichtete Therapien bezeichnet. Viele monoklonale Antikörper sind bereits als Medikament zugelassen.

In Krebszellen wurden die Wachstumsrezeptoren im Vergleich zu gesunden Zellen überexprimiert. Dies führt zur häufigen Übertragung des Wachstumssignals ins Zellinnere, und kann dann zu einer beschleunigten Zellteilung kommen. Um diese Übertragung zu verhindern, werden bei molekularbiologischen Therapien die Rezeptor-Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren blockiert. Die Wachstumssignale werden innerhalb der Zelle über verschiedene Wege der Signaltransduktion z.B. über den MAP-Kinase-Weg (*mitogen activated protein*) oder mTOR-Weg an den Zellkern weitergeleitet. Beide Wege sind an Prozessen des Zellwachstums und der Zellteilung beteiligt und werden in Krebszellen überexprimiert oder mutiert. Nach der Aktivierung des Wachstumssignalweges kommt es zum unkontrollierten Wachstum der Krebszellen. Deswegen stellt die Inhibierung der Signaltransduktion einen weiteren Ansatzpunkt der molekularbiologischen Therapie dar. Heutzutage werden bereits einige monoklonale Antikörper z. B. Catumaxomab, Ipilimumab in die Krebstherapie eingesetzt. Diese Wirkstoffe können entweder dazu verwendet werden, die Wachstumsrezeptoren auf der Zelloberfläche direkt zu blockieren oder auf der Oberfläche der Tumorzellen zu markieren, damit Immunzellen sie erkennen können. Es werden aber auch Hemmstoffe wie Afatinib, Imatinib und Vemurafenib eingesetzt, die sich spezifisch gegen die Signaltransduktion richten, indem sie die Tyrosinkinase und den mTOR-Inhibitor Everolimus hemmen [46]. Krebszellen haben noch eine Fähigkeit, nämlich die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) zu induzieren. Tumore benötigen, wie alle anderen Zellen im Körper, Nährstoffe und Sauerstoff, weil sich Krebszellen häufig teilen, ist ihr Bedarf an Nährstoffen besonders hoch und deshalb benötigt ein Tumor eigene Blutgefäße. Dies führt zu einem weiteren Anwendungsmöglichkeit für molekular-biologische Therapien [46]. Bavacizumab ist ein monoklonaler Antikörper der die Angiogenese hemmt und als Medikament zur Behandlung von sechs Krebserkrankung im fortgeschritten Stadium in Europa zugelassen ist [47]. Kleine Moleküle können die Zellmembran durchdringen, um mit Targets innerhalb einer Zelle zu interagieren. Kleine Moleküle werden normalerweise so designt, dass sie die enzymatische Aktivität des Zielproteins beeinträchtigen so inhibiert Brotezomib Proteasome, Imatinib Tyrosinekinasen und Seliciclib Cyclin-abhängige Kinasen.

1.4.2.3. Immunologische Tumortherapie

Im 21. Jahrhundert gilt die Krebsimmuntherapie als großer Hoffnungsträger der Medizin, da die Krebsimmuntherapie im Vergleich zu herkömmlichen Behandlungsverfahren wie Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie für gesunde Zellen weniger toxisch ist. Mehrere Formen der Immuntherapie werden in Laboratorien erforscht und in klinischen Studien getestet.

Generell tragen Krebszellen bestimmte Zelloberflächenmerkmale, sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA), die dann vom Immunsystem erkannt und zerstört werden können, insbesondere durch zytotoxische T-Zellen (CTLs). Viele Tumorarten haben sich jedoch weiterentwickelt, und sind in der Lage der zytotoxischen Immunantwort von CTLs zu entgehen, indem sie immunsuppressive Zytokine wie PD-1L, TGF β oder IL-10 sekretieren, welche die Aktivität der CTLs schwächen oder die regulatorische T-Zellpopulation (Treg) hochregulieren [48].

Ein zentraler Ansatzpunkt der Immuntherapie sind Wirkstoffe, die auf die Schaltstellen der Immunantwort (Immun-Checkpoints) gegen Tumore auf der Oberfläche von T-Zellen einwirken, damit diese Zellen Tumorzellen direkt angreifen und die Abwehrreaktion der anderen Immunzellen koordinieren [48]. Als erstes Medikament wurde der Wirkstoff Ipilimumab als Therapie gegen schwarzen Hautkrebs zugelassen [49]. Ipilimumab ist ein monoklonaler Antikörper und greift am inhibitorischen Signal von CTLA-4 (cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) der T-zelle ein. Daher wirkt es als Verstärker der T-Zellfunktion und es kommt dann zur Aktivierung. Proliferation sowie Infiltration von T-Zellen in Tumoren, führt zum Absterben der Tumorzellen [49]. Seit 2015 ist Nivolumab ebenfalls ein weiterer monoklonaler Antikörper als Wirkstoff für die Therapie von Lungenkrebs zugelassen [50]. Nivolumab bindet an den PD-1 (*programmed cell death protein 1*) Rezeptor auf T-Zellen und hemmt die Interaktion mit den Liganden PD-L1 und PD-L2 auf Krebszellen. Dadurch wird die Aktivierung der T-Zellen stimuliert und Krebszellen eliminiert [50].

Neben der Aktivierung vom Immunsystem durch dieses Medikament ist der Ansatz der Krebsimpfung eine weitere erfolgversprechende Therapie. Krebsimpfstoffe enthalten entweder spezifische Tumor-assoziierte Antigene (TAA) oder MCH-I-/MCH-II-präsentierbare Peptide aus Tumorzellen. Nach der Injektion des Krebsimpfstoffes in Krebspatienten präsentieren dendritische Zellen das tumor-assoziierte Antigen auf

ihrer Oberfläche, und induzieren tumorantigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen (CTLs) in den Lymphknoten. Außerdem werden dabei CD4⁺ Helfer T-Zellen aktiviert, die eine effektive Immunantwort gegen den Tumor unterstützen können [51]. Danach können die Tumorzellen eliminiert werden, ohne gesunde Zellen involvieren zu müssen.

Die adaptive T-Zellen-Therapie ist auch eine neu entwickelte Krebsimmuntherapie. Hier müssen die T-Zellen aus dem Körper des Patienten entnommen werden. Durch ex vivo-Behandlung mit einem immunogenen Tumorantigen wird der tumorspezifische chimäre Antigenrezeptor (CAR) auf der Oberfläche dieser T-Zellen exprimiert. Die veränderten T-Zellen werden danach zurück in den Körper des Patienten injiziert [52]. Bei einer klinischen Studie mit einem Anti-CD19-CAR T-Zelltransfer konnte bei Patienten, die an B-Zell Leukämie erkrankt waren, eine Remissionsquote von 88% erreicht werden [53].

Zusätzlich werden auch Immuntoxine zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt. Immuntoxine bestehen aus zwei Komponenten. Eine Komponente ist ein an Krebszellen bindendes Targetmolekül. Dies dient als Ligand zur Anbindung an die Zielstruktur auf der Zellmembran einer Krebszelle und ist in den meisten Fällen ein monoklonaler Antikörper, ein Antikörperfragment oder ein Antikörpermimetikum. Andere Komponenten sind Toxine, die über chemische Linker mit Targetmolekülen miteinander verbunden sind. Als Toxine kommen pflanzliche Toxine wie Rizin oder Saporin, sowie bakterielle Toxine wie Diphtherietoxin oder Exotoxin A zur Anwendung [54]. Das Immuntoxin bindet an der Oberfläche der Krebszelle, mittels rezeptorvermittelter Endozytose wird es internalisiert und im Lysosom zerlegt. Dabei wird das Toxin im Zytosom freigesetzt, führt zur Zerstörung der Krebszellen und löst anschließend die Apoptose aus.

1.4.2.4. Natürliche Produkte in der Tumortherapie

Die Rolle von Naturprodukten als Heilmittel ist bereits seit der Antike bekannt. Mit der Entwicklung der organischen Chemie sind synthetische Produkte von natürlich vorkommenden Stoffen Hauptaugenmerk des modernen Gesundheitssystems. Trotz der großen wissenschaftlichen und technischen Fortschritte in der kombinatorischen Chemie, leisten Medikamente, die aus natürlichen Produkten gewonnen werden, heute noch erhebliche Beiträge zur Wirkstoffforschung [55]. Eine Analyse der Anzahl

der Chemotherapeutika und ihrer Quelle zeigt, dass über 60% der zugelassenen Arzneimittel aus natürlichen Verbindungen gewonnen werden [56].

Die enorme chemische Vielfalt macht Naturprodukte zu einer attraktiven Quelle für neue therapeutische Kandidaten. Natürliche Produkte bieten eine größere strukturelle Vielfalt als die herkömmliche Synthese, und bieten daher große Chancen bei der Suche nach neuen niedermolekularen Substanzen, die gegen eine breite Palette von Targets wirksam sind. Da bislang weniger als 10% der Naturstoffe auf deren biologische Aktivität getestet wurde, warten noch viele weitere Naturstoffe darauf, entdeckt zu werden. Zusätzlich sind natürliche Produkte, die biologisch aktiv sind, im Allgemeinen kleine Moleküle mit hohem Wirkstoffpotential. Sie können besser vom Körper absorbiert und metabolisiert werden [57].

Die Suche nach neuen Antitumormitteln mit neuen bioaktiven Eigenschaften aus natürlichen Quellen wird durch die Zusammenarbeit von Wissenschaftlern weltweit fortgesetzt. Experimentelle Wirkstoffe aus Naturprodukten bieten eine große Chance, nicht nur völlig neue chemische Klassen von Antitumormitteln, sondern auch neuartige und potentiell relevante Wirkmechanismen evaluieren zu können [58].

Heute gibt es schon viele natürliche Produkte, welche als Arzneistoff in der Medizin zur Behandlung verschiedener Krebserkrankungen eingesetzt werden. Paclitaxel wird in der Chemotherapie für maligne Tumoren (z. B. Brustkrebs) eingesetzt. Sie wird aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert und stört den Abbau von Mikrotubuli, und damit die Zellteilung (Mitose) [59]. Camptothecin ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid und hat auch signifikante anti-neoplastische Aktivität. Diese Verbindung wurde zuerst von *Camptotheca acuminata* durch Wall et al. (1966) entdeckt [60]. Die zytotoxische Wirkung von Camptothecin richtet sich auf die Topoisomerase I, so dass die DNA-Synthese der Krebszellen gehemmt wird [61]. Andere bekannte aus Naturstoffen isolierte Moleküle zur Behandlung von Krebserkrankung sind Colchicin, Etoposide, Irinotecan, und Topotecan [58].

1.5. Traditionelle chinesische Medizin (TCM)

Die Philosophien, die der traditionellen chinesischen Medizin zugrunde liegen, sind unterschiedlich, aber sowohl die westliche Medizin als auch die TCM sind bei der klinischen medizinischen Behandlung wirksam. TCM hat seine eigenen kohärenten Theorien in Bezug auf die Ätiologie, Diagnose und Behandlung von Krankheiten

entwickelt. Im Gegensatz zur westlichen Medizin handelt es sich bei der TCM um eine Erfahrungsheilkunde, wohingegen in der westlichen Medizin jede Therapie wissenschaftlich und experimentell erforscht und analysiert wird.

Ein bekanntes Beispiel ist das chinesische Kraut Qing Hao, welches in China seit tausenden von Jahren verwendet wird, um Malaria zu behandeln und aus der Pflanze *Artemisia annua* isoliert wird. Durch die Reinigung des Wirkstoffs, Artemisinin (Qinghaosu) wurde jetzt ein vielversprechendes Anti-Malaria-Medikament entwickelt [62]. Durch die Entdeckung dieses Wirkstoffs hat die chinesische Wissenschaftlerin Youyou Tu 2015 den Medizin-Nobelpreis erhalten.

Ephedrin, ein weltweit verwendetes Arzneimittel gegen Hypotonie, chronische Bronchitis und Asthmaanfälle, wurde ursprünglich aus der Pflanze *Ephedra sinica* extrahiert und in der TCM verwendet [63]. Der bemerkenswerte Vorteil von TCM ist die reichlich vorhandene klinische Erfahrung und geringe Toxizität, die dazu beigetragen hat, dass auch kurzfristig bioaktive Komponenten aus TCM-Produkten isolieren werden können. In aktuellen Studien wird die Suche nach Wirkstoffen von TCM immer wichtiger.

1.5.1. *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum (*G. lucidum*) wird in China "Ling Zhi" genannt und ist ein Pilz aus der Familie der Lackporlingsverwandten (Polyporaceae). Dieser medizinische Pilz ist weit verbreitet und wird in China seit mehr als 4000 Jahren für die Behandlung von verschiedenen Krankheiten, einschließlich Krebs, verwendet. Es wurde als ein gesundheitsförderndes Lebensmittel weltweit akzeptiert. *G. lucidum* soll nicht nur Krankheiten vorbeugen, sondern auch das Leben verlängern können. Es gibt viele Studien über die biologischen und medizinischen Funktionen der Extrakte von *G. lucidum*.

1.5.1.1. Immunmodulatorische Wirkungen

G. lucidum haben eine immunmodulatorische Aktivität, die hauptsächlich auf deren Protein- oder Polysaccharid-Fraktion zurückzuführen ist. Ein Protein, LZ-8, wurde aus *G. lucidum* isoliert und zeigte eine starke immunmodulatorische Aktivität. Es hat eine mitogene Wirkung auf humane Monozyten und T-Zellen [64]. Wang et al. (2002) isolierte eine fucosehaltige Glykoproteinfraktion aus *G. lucidum*, die die Proliferation

von Milzzellen und die Expression der Zytokine IL-1 β , IL-2 und IFN- γ induzierte [65]. GLIS, ein bioaktives Proteoglycan, wurde aus *G. lucidum* isoliert. Es konnte die Aktivierung und Proliferation von Milzlymphozyten der Maus stimulieren und die meisten der aktivierten Zellen waren B-Zellen. Nach deren Aktivierung wurde eine gewisse Menge Immunglobulin produziert. Zusätzlich wurde auch die IL-2-Produktion von Lymphozyten erhöht. Die Aktivität von Maus-Makrophagen, inklusive Freisetzung von Stickstoffmonoxide (NO) und Zytokine, (IL-1 β und TNF- α), Phagozytose sowie Tumor-Zytotoxizität, wurde durch GLIS stimuliert [66].

Die Spore von *G. lucidum* enthält auch Polysaccharide, welchen eine starke immunologische Aktivität bei der Proliferation der Lymphozyten nachgewiesen wurde [67]. Eine Polysaccharid-Fraktion aus frischen Fruchtkörpern von *G. lucidum* kann menschliche Monozyten-Makrophagen und T-Lymphozyten stimulieren, was zu einer Erhöhung der Konzentrationen von IL-1 β , TNF- α und IL-6 führt. Die Freisetzung von IFN- γ aus T-Lymphozyten wurde ebenfalls stark gefördert [68].

Eine Studie an Mäusen zeigte, dass β -1,3/1,6-Glucan von *G. lucidum* die IgA- und IgG-Produktion in Serum induziert, die Expression des Immunglobulin-Rezeptors im Dünndarm erhöhte, die IL-2-Produktion verbessert und NK-Zellen aktiviert. Diese entzündliche Reaktion durch *G. lucidum* β -1,3/1,6-Glucan ist abhängig von der aufgenommenen Cholesterinmenge [69].

1.5.1.2. Antitumor Wirkungen

G. lucidum ist extrem reich an Triterpenen, die sich positiv auf Krebserkrankungen (anti-angiogenetisch und zytotoxisch) auswirken. Zwei Triterpenoide, Lucidensäure A und Ganoderinsäure E zeigten eine signifikante zytotoxische Aktivität gegenüber menschliche Leberkrebszellen Hep G2-Tumorzellen und Menogaril-resistente Mausleukämie P388-Tumorzellen [70]. Die sechs folgenden Lanostan-Triterpene wurden ebenfalls gefunden: Ganoderinsäure- γ , - δ , - ϵ , - ζ , - η und - θ , die alle eine Hemmwirkung gegenüber Maussarkom Meth-A-Tumorzellen und Lewis Lungenkarzinom LLC-Tumorzellen zeigten [71].

Min et al. (2000) berichtete, dass das Steroid aus Fruchtkörpern von *G. lucidum* eine starke Hemmung des Wachstums auf die humanen epidermoidalen KB-Zellen und dem humanen hepatozellulärem Karzinom PLC Tumorellen *in vitro* zeigten [71]. Eine Studie zeigte, dass der Extrakt aus *G. lucidum* das Wachstum von menschliche

Gebärmutterhalskrebszellen HeLa-Zellen hemmt und in der Lage ist, den Zellzyklus am Übergang von der G1- in die S-Phase zu blockieren und eine deutliche Abnahme des intrazellulären Calciumspiegels induziert [72]. *G. lucidum* gemischte Triterpene induzieren Apoptose von Brustkrebszellen MCF-7 Zellen und vermindern das Wachstum von DMBA (*dimethyl benz anthracene*) -induzierten Mamma- und Hautkarzinomen bei Versuchstieren [73].

Jiang D. et al. (2017) hat zum ersten Mal beschrieben, dass Polysaccharide (GLPs), die aus Sporen, Myzelien und Fruchtkörpern des *G. lucidum* isoliert wurden, direkt Antitumor-Aktivität bei HT29-Zellen zeigten, indem sie die Reaktivierung von p53 induzieren. Daher kann das Targeting von p53 durch GLPs neben anderen Chemotherapeutika auch als eine neue Behandlungsstrategie gegen Krebs angesehen werden [74]. GLPs könnten auch die bei der Chemotherapie auftretenden Nebenwirkungen, wie Ermüdung verbessern, indem sie die Entzündungsreaktion und den oxidativen Stress reduzieren [75].

Die Einnahme eines Extrakts aus *G. lucidum* erhöhte zwar das Körpergewicht, aber normalisierte die Blutwerte von Mäusen nach Röntgen Bestrahlung [76]. Es wurde auch festgestellt, dass ein Heißwasserextrakt des Fruchtkörpers von *Ganoderma lucidum* eine gute Radio-Schutzfähigkeit *in vitro* gegenüber Schäden durch Hydroxyradikale und UV-Bestrahlung zeigte [77]. Diese schützenden Eigenschaften sind mit einer Verringerung der Nebenwirkungen der Strahlentherapie im Tumorpatienten verbunden.

Die gebrochenen Sporen von *G. lucidum* (SBGS) zeigten auch starke Antitumor-Aktivität gegenüber Lungenkrebszellen. Die Ethanol-Extrakte von SBGS arretierten den Zellzyklus in der G2/M-Phase und lösten die Apoptose aus, indem sie die Expression und Aktivität von Cyclin B1 und CDC2 sowie anti-apoptischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-xl senkten. Außerdem hemmten sie den Akt/mTOR-Signalweg, indem sie das Zellwachstum von Lungenkrebszellen hemmten [78].

1.5.1.3. Andere Wirkungen

Neben den oben erwähnten Effekten wurden auch noch weitere Wirkungen von verschiedenen Extrakten aus *G. lucidum* beschrieben. Mehrere biologisch aktive Triterpene wurden aus *G. lucidum* isoliert und als zytotoxisch oder antiviral wirksam bewiesen. Es wurde festgestellt, dass Ganoderiol F und Ganodermanontriol als Anti-

HIV-1-Mittel wirksam sind. Ganoderinsäure-B, Ganoderiol-B, Ganoderinsäure-C1, Ganoderinsäure- α , Ganoderinsäure H und Ganoderiol A waren mäßig aktive Inhibitoren gegenüber HIV-1 [79]. Andere Triterpene, wie Ganoderinsäure- β , Ganodermanodiol, Ganodermanontriol und Ganolucidinsäure-A zeigten eine signifikante Aktivität gegenüber dem humanen Immunschwäche-Virus (Anti-HIV) -1-Protease [80]. Das saure Protein gebundene Polysaccharid (APBP) wurde aus wasserlöslichen Substanzen von *G. lucidum* isoliert, und zeigte eine antivirale Aktivität gegen HSV-1 und HSV-2. Die antiherpetische Aktivität von APBP steht im Zusammenhang mit seiner Bindung an HSV-spezifische Glykoproteine, die für die Bindung und Penetration verantwortlich sind, und behindert die Bindung von Viren an die Membranen von Wirtszellen. [81].

Es wurde berichtet, dass Wasser-Extrakte von *G. lucidum* den Blutdruck und die Blutplättchenaggregation [82], sowie die Konzentration von Cholesterin im Blut senken konnten [83]. Manche Extrakte von *G. lucidum* zeigten auch hepatoprotektive [84], antimikrobielle [85], und entzündungshemmende [86] Wirkung und schützen darüber hinaus vor Allergien [87].

Anhand mehrerer Studien an Mäusen wurde gezeigt, dass ein Extrakt der *G. lucidum* die Leber schützen konnte. Dies ist auf die anti-oxidative Wirkung zurückzuführen, die die Entgiftungsaktivität der Leber verstärkt [88]. Auch eine weitere Polysaccharid-Fraktion aus *G. lucidum* konnte die humanen Fibroblasten gegen UVB-induzierte Lichtalterung schützen [89].

Ganodermanodiol aus *G. lucidum* könnte künftig für die Herstellung von Hautpflegeprodukten verwendet werden, denn es konnte die Aktivität von Tyrosinase, dem Tyrosinase-verwandten Protein-1 (TRP-1), TRP-2 sowie dem Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktor (MITF) hemmen, wodurch die Melanin-Produktion in Melanomzellen verringert wurde. [90].

Neue Studien zeigten die therapeutische Wirkung von Polysacchariden aus Myzelien des *G. lucidums* (GLPS3) gegenüber der chronischen Pankreatitis (CP) und der Modulation der Darmmikroflora bei Mäusen. GLPS3 verminderte die Pankreatitis (Bauchspeicheldrüsenentzündung) bei Mäusen durch Verminderung des Lipase-, IFN- γ - und TNF- α -Spiegels sowie durch Erhöhung der Superoxid-Dismutase (SOD) und der gesamten antioxidativen Aktivität. Bei Modulation der Darmmikroflora erhöhte

GLPS3 die relative Häufigkeit der nützlichen Bakterien wie *Lactobacillales* und *Lachnospiraceas* im Dünndarm [91].

Polysaccharide des *G. lucidum* (GLPs) zeigten eine neuroprotektive Wirkung gegen die Neurotoxine Methyl-4-phenylpyridin und Rotenon. Diese neuroprotektive Eigenschaft ist auf ihre antioxidative Aktivität zurückzuführen. Auf diesem Grund können sie bei der Behandlung von der Parkinson-Krankheit verwendet werden, um von der durch den oxidativen Stress induzierte Neurodegeneration zu schützen [92].

1.5.2. *Tremella aurantia lba*

Tremella aurantia lba (*T. aurantia lba*) ist ein Mitglied der Gattung *Tremella* und ein hochgeschätzter essbarer und medizinischer Pilz. Er heißt in China "Jin er". In China wurden die Polysaccharide aus der *Tremella*-Familie zur Krebsvorsorge und zur Stimulierung des Immunsystems eingesetzt [93]. Viele *Tremella*-Arten zeigten pharmakologische Eigenschaften, wie Immunverstärkung von *T. mesenterica* [94], die Antitumor Aktivität von *T. fuciformis* [95] und die Anti-Diabetes-Aktivität von *T. aurantia lba* [96]. Im Vergleich dazu ist jedoch relativ wenig über die Art und Bioaktivität von Polysacchariden aus *Tremella aurantia lba* bekannt.

1.5.2.1. Immunstimulatorische Wirkungen

Ein saures Heteropolysaccharid (TAPA1), das aus dem Fruchtkörper von *T. aurantia lba* isoliert wurde, stimuliert die Proliferation von Milz-Lymphozyten von Mäusen (MSLs) in vitro [97]. TAPA1-s, das sulfatierte Derivat von TAPA1, zeigte eine stärkere immunstimulierende Wirkung als TAPA1 selbst [98]. Durch Acetylierung von TAPA1 (TAPA1-ac) wurden seine Immunstimulationseffekte in Bezug auf die Proliferation von MSLs signifikant erhöht. Außerdem stimulierte TAPA1-ac die Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) [99]. Eine Fraktion des Myzelpolysaccharids (MCP), welche aus Myzel von *T. aurantia lba* extrahiert wurde, zeigte eine immunstimulatorische Wirkung auf RAW264.7-Zellen. MCP induzierte die Proliferation, die NO-Produktion und die Sekretion von TNF- α , IL-1 β und IL-6 von RAW264.7-Zellen [100].

1.5.2.2. Antioxidantien Wirkungen

In Ratten-Studien wurde gezeigt, dass der Rohextrakt (TBE) von *T. aurantia lba* antioxidative Eigenschaften besitzt, da er die Aktivitäten von Superoxid-Dismutase und

Glutathion-Reduktase erhöht, und gleichzeitig den zunehmenden oxidativen Stress in verschiedenen Geweben reduzieren kann [101]. Durch die 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) - Radikalfänger-Methode wurde festgestellt, dass die Polysaccharid-Fractionen aus Myzel (MCP) antioxidative Eigenschaften besitzen [100].

1.5.2.3. Antidiabetes Wirkungen

Ein abnormaler Lipidstoffwechsel und ein erhöhter oxidativer Stress sind die bekanntesten Komplikationen der diabetischen Mellitus. Regulierter Lipidstoffwechsel und verminderter oxidativer Stress sind deshalb der Schlüsselindikator dafür, die diabetischen Komplikationen zu heilen. In Ratten-Studien wurde gezeigt, dass der Rohreextrakt (TBE) und die Polysaccharid-Fraktion aus Myzel (TMP) von *T. aurantia lba* Anti-Diabetes Aktivität haben. Sowohl TBE als auch TMP konnten den Blutzuckerwert von diabetischen Ratten verringern. TBE konnte den Cholesterin und Triglycerin-Spiegel im Serum in verschiedenen Geweben von diabetischen Ratten reduzieren. Dabei war TBE auch in der Lage, den oxidativen Stress zu regulieren. Deshalb hat TBE besserer Antidiabetes Aktivität [101].

1.5.3. *Sargassum gaminifolium*

Sargassum ist eine braune Seealge. Zahlreiche Arten sind in den gemäßigten und tropischen Ozeanen der Welt verteilt. Diese Algen sind in der Regel braun oder dunkelgrün und wachsen häufig an Korallen, Felsen oder Muscheln in mäßig exponierten oder geschützten Felsengebieten. Manche Arten sind jedoch freischwimmend. Das *Sargasso*-Meer des Atlantischen Ozeans wurde nach diesen Algen benannt, da es eine große Menge an *Sargassum* beherbergt [102]. *Sargassum* umfasst etwa 250 Arten [103]. *Sargassum* wird hauptsächlich als Rohstoff für die Alginatproduktion verwendet und dient als Quelle für pflanzliche Lebensmittel, Biostimulanzien, und tierische Lebensmittel. Aufgrund der Anwesenheit von Fucoidan und anderen bioaktiven Stoffen wird *Sargassum* Extrakt auch in Pharmazeutika eingesetzt [104].

Eine Bibliographie zeigte, dass *Sargassum* eine wichtige Quelle für zahlreiche bioaktive Stoffe ist, u. a. für Steroide, Flavonoide, Polysaccharide, Terpenoide, Fettsäuren, Plastochinone und Tannine [105]. In dem Review-Artikel von Zhang et al wurden die verschiedenen biologischen Eigenschaften der einzelnen Mitglieder der

Seealgen-Familie Sargassum aufgelistet und sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst [105].

Tabelle 1: Zusammenfassung der biologischen Aktivitäten von verschiedenen Arten von Sargassum [105]

Biologische Aktivität	Algen
Antioxidative Aktivität	<i>Sargassum filipendula</i> ; <i>Sargassum fusiforme</i> <i>Sargassum kjellmanianum</i> ; <i>Sargassum micracanthum</i> <i>Sargassum pallidum</i> ; <i>Sargassum plagiophyllum</i> ; <i>Sargassum siliquastrum</i> ; <i>Sargassum thunbergii</i> <i>Sargassum vulgare</i> ; <i>Sargassum wightii</i>
Anti-Tumor Aktivität	<i>Sargassum filipendula</i> ; <i>Sargassum fusiforme</i> <i>Sargassum kjellmanianum</i> ; <i>Sargassum micracanthum</i> <i>Sargassum pallidum</i> ; <i>Sargassum plagiophyllum</i> <i>Sargassum thunbergii</i> ; <i>Sargassum vulgare</i>
Antihyperlipidämische Aktivität	<i>Sargassum fluitans</i> ; <i>Sargassum fusiforme</i> <i>Sargassum henslowianum</i> ; <i>Sargassum natans</i> <i>Sargassum thunbergii</i>
Antiinflammatorische Aktivität	<i>Sargassum hemiphyllum</i> ; <i>Sargassum sagamianum</i> <i>Sargassum siliquastrum</i> ; <i>Sargassum vulgare</i>
Anti-Herpes Aktivität	<i>Sargassum horneri</i> ; <i>Sargassum naozhounse</i> <i>Sargassum patens</i> ; <i>Sargassum tenerrimum</i>
Antikoagulans Aktivität	<i>Sargassum fulvellum</i> ; <i>Sargassum thunbergii</i> <i>Sargassum vulgare</i>
Antimikrobielle Aktivität	<i>Sargassum johnstonii</i> ; <i>Sargassum pallidum</i> <i>Sargassum wightii</i>

Immunologische Aktivität	<i>Sargassum fusiforme</i> ; <i>Sargassum kjellmanianum</i> <i>Sargassum pallidum</i>
Anti-HIV Aktivität	<i>Sargassum fusiforme</i>

Sargassum. graminifolium (*S. graminifolium*) ist ausgiebig an den Küsten des Süd- und Ostchinesischen Meeres verbreitet. Seit über 1000 Jahren werden sie in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet [106]. Heute gibt es jedoch nur sehr wenige Berichte über die Wirkungen seiner bioaktiven Stoffe. Die Studien von Zhang et al. (2013) zeigten, dass eine Polysaccharid-Fraktion des *S. graminifoliums* antioxidative Eigenschaften aufweist und Mitochondrien gegen Beschädigungen schützen konnte [107].

1.5.4. Bioaktivität von sulfatierte Polysaccharide

Viele Seesalgenarten werden als Lebensmittel verwendet, aber aufgrund ihrer gesundheitlichen Vorteile finden sie auch in der traditionellen Medizin Anwendung. Seegräser sind reich an sulfatierten Polysacchariden. Es ist bewiesen, dass sulfatierte Polysaccharide eine Vielzahl von biologischen Eigenschaften besitzen, einschließlich Antikoagulations-, antiviraler und antiinflammatorischer Aktivitäten, der Relevanz in nutraceuticals/funktionellen Lebensmitteln, für kosmetische und pharmazeutische Anwendungen.

1.5.4.1. Anti-Entzündungswirkung

Fucoidan ist ein sulfatiertes Polysaccharid, das hauptsächlich in verschiedenen Arten von Seesalgen vorkommt und entzündungshemmende Wirkung aufweist. Zum Beispiel wurde in einem Kaninchenmodell einer bakteriellen Meningitis die Leukozytenrollen durch intravenöse Infusion von Fucoidan deutlich reduziert [108]. Dieser Effekt war auf die Bindung von Fucoidan an L- und P-Selektine zurückzuführen, bei denen es sich um die für den Rekrutierungsprozess essentiellen Zelladhäsionsmoleküle handelt [109]. Zusätzlich zur Beeinträchtigung der Wirkung von Selektinen inhibieren algesulfatierte Polysaccharide die Enzymaktivität wie Heparanase und Elastasen, die am Abbau der Basalmembranintegrität während der Entzündung beteiligt sind [110]. Eine der wichtigsten Aktivitäten ist die starke inhibitorische Wirkung von Fucoidan auf die Aktivierung des Komplementsystems von

Menschen. Die Beobachtungen zeigten, dass Fucoidan-Fractionen von *A. nodosum* sowohl die klassischen als auch die alternativen Wege im menschlichen Serum stark inhibieren [111]. Es wurde festgestellt, dass niedermolekulare Fucoidan-Fractionen an die C1q-Untereinheit des C1-Komplexes binden konnten [112]. Die Bindung von Fucoidan hemmt die Aktivität von C1q, somit die C1-Aktivierung inhibiert wurde [113]. Weiterhin wurde gefunden, dass Fucoidan die C1q-Erkennung von IgG stören kann [114]. Fucoidan bindet auch C4 und verhindert dadurch den Abbau und die Bildung seines Spaltprodukts C4b, das für die Bildung der C3-Konvertase und die Vermehrung des Komplements benötigt wird [112].

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass sulfatierte Polysaccharide aus Algen die angeborene Immunantwort direkt regulieren können, indem sie an Erkennungsrezeptoren, wie dem Mannose-Rezeptor und den Toll-like-Rezeptoren auf phagozytischen Zellen und Makrophagen binden [115].

Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) wurde nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) aus Immunzellen exprimieren [116], jedoch konnte das Fucoidan in Gegenwart von LPS die induzierte Expression von iNOS und Stickoxid beeinträchtigen [117]. In ähnlicher Weise unterdrückt Fucoidan die Interferon-gamma-induzierte iNOS-Expression in Makrophagen- und Glia-Zelltypen [118].

1.5.4.2. Antikoagulierende und antithrombotische Aktivitäten

Die wahrscheinlich meist untersuchte Bioaktivität von marinen sulfatierten Polysacchariden ist die Heparin-ähnliche gerinnungshemmende Aktivität, die von Fucoidanen und anderen Fucanen der Seealge gezeigt wird. Dies wurde zuerst für Fucoidan berichtet, welches die Fibringerinnungsbildung und die Antithrombinaktivität hemmt [119]. Die Grundlage für diese Aktivitäten ist bislang nicht vollständig aufgeklärt, aber zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass es mehr als einen Wirkungsmechanismus gibt, einschließlich der direkten und indirekten Inhibierung von Thrombin durch die Aktivierung von Thrombininhibitoren (z.B. Antithrombin und Heparin-Cofaktor II) [120].

Die Strukturmerkmale sulfatierter Polysaccharide wie Molekulargewicht, Sulfatierungsgrad und Position des Sulfatrestes am Zuckerrückgrat sind wichtig für ihre Antikoagulationsaktivität [121]. Zum Beispiel fand Nishino et al heraus, dass ein höherer Gehalt an Sulfatgruppen mit einer höheren gerinnungshemmenden Aktivität

in sulfatierten Polysaccharid-Fractionen von *E. kurome* einhergeht [122]. Sie konnten weiterhin zeigen, dass die gerinnungshemmende Aktivität von Fucanen mit dem Sulfatgehalt korreliert [123]. Fucane mit höherem Molekulargewicht (z. B. 27 und 58 kDa) zeigten eine stärkere gerinnungshemmende Aktivität als solche mit niedrigerem Molekulargewicht (~ 10 kDa) [124]. Chevolot *et al.* berichtete über die Bedeutung der Position der Sulfatgruppen an den Zuckerresten in Bezug auf ihre antikoagulierende Aktivität [125]. Bei der Untersuchung des Fucoidans von *A. nodosum* wurde festgestellt, dass die gerinnungshemmende Aktivität 2-O-sulfatierte und 2,3-O-disulfatierte Fucose-Reste erfordert, während eine Sulfatierung an der O-4-Position nicht notwendig ist.

1.5.4.3. Antivirale Aktivität

Sulfatierte Polysaccharide aus der Seealge besitzen die Fähigkeit, die Replikation von umhüllten Viren (Herpes-simplex-Virus (HSV), humaner Immunschwächevirus (HIV), humaner Cytomegalovirus, Dengue-Virus und humaner Respiratorischer Synzytial-Virus (RSV)) zu inhibieren [126]. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die Auswirkungen von sulfatierten Polysacchariden auf die virale Replikation durch eine Reihe von Mechanismen mit spezifischen strukturellen Eigenschaften der Polysaccharide und nicht einfach durch unspezifische Wechselwirkungen erfolgen [127].

Ein Fucan aus *Cladosiphon okamuranus*, bestehend aus Glucuronsäure und sulfatierten Fucose-Einheiten, inhibierte die Infektion vom Dengue-Virus Typ 2 (DENV-2) in BHK-21-Zellen [128]. Die Sulfatierung des Fucans war für diese Aktivität notwendig. Die Analyse der Struktur der Hüllglykoproteine aus den vier Serotypen des Denguevirus zeigte, dass Arginin-323 im DENV-2, nahe der Heparinbindungsstelle für die Fucaninteraktion kritisch ist. In ähnlicher Weise berichtete Talarico *et al.*, dass zwei sulfatierte Polysaccharide, die aus der Rotalge gewonnen wurden, ein Carrageenan aus *Gymnogongrus griffithsiae* und ein Galactan aus *Cryptonemia crenulata*, die DENV-2-Multiplikation in Vero-Zellen hemmten [129]. Es wurde gezeigt, dass diese Polysaccharide sowohl die DENV-2-Adsorption als auch die Internalisierung in die Zellen stören und nur wirksam sind, wenn sie gemeinsam mit dem Virus oder kurz nach der Infektion zugegeben werden [129].

Die marinen sulfatierten Polysaccharide zeigten auch die antivirale Aktivität gegenüber die HSV-Typen 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) [130]. Sulfatierte Polysaccharide aus der Rotalgenart *Sebdenia polydactyla* hemmten die Vermehrung von HSV-1 in Vero-Zellen [130]. Die Aktivität wurde durch Desulfatierung dieser Polysaccharide aufgehoben, wohingegen übersulfatierte Derivate eine erhöhte Wirksamkeit zeigten. Mohsen et al. berichtete, dass er zunächst sulfatierte Polysaccharide aus *Sargassum latifolium* isolierte und durch anschließende Fraktion drei Fraktionen (SP-I, SP-II and SP-III) gewann, die er in einem Plaque Assay gegenüber HSV-1 teste. Es stellte sich heraus, dass die Fraktion mit dem höchsten Sulfatestergehalt und Molekulargewicht am wirksamsten die antivirale Aktivität gegenüber HSV-1 [131]. Demnach beruht die antivirale Aktivität der sulfatierten Polysaccharide auf einem komplexen Zusammenspiel von Strukturmerkmalen, wie Sulfatierungsgrad, Position der Sulfatgruppen am Polysaccharidgerüst, Molekulargewicht, der Zuckerrest-Zusammensetzung und Stereochemie [127].

1.5.4.4. Antioxidative Aktivität

Viele Studien zeigen, dass sulfatierte Polysaccharide, die in verschiedenen Algenarten vorkommen, antioxidative Fähigkeiten besitzen. Zum Beispiel zeigen Fucane von *F. vesiculosus* eine beträchtliche Superoxid-Radikalfänger-Fähigkeit [132]. Fucan-Fraktionen von *L. japonica* zeigen ebenfalls signifikante antioxidative Fähigkeiten in Superoxid-Radikal- und Hydroxyl-Radikalfänger-Assays [133]. Die Superoxid-Radikalfängeraktivität korreliert mit dem Sulfatgehalt der Polysaccharid-Fraktionen [134].

1.6. Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die immunmodulatorischen Kapazitäten verschiedener Polysaccharid-Fraktionen aus *G. lucidum*, *T. aurantia lba* und *S. graminifolium* zu untersuchen. Hierbei handelt es sich um zwei gegenseitige Immunveränderungen, die entweder das Immunsystem stimulieren oder die Entzündung hemmen. Es wurde untersucht, ob die immunmodulatorischen Kapazitäten von Polysaccharid-Fraktionen, die aus *G. lucidum* und *T. aurantia* isoliert wurden, durch Sulfatierung verstärkt werden konnten.

Sulfatierte Polysaccharide wie Heparin können für die Hemmung der Blutgerinnung verwendet werden, daher sollte weiterhin untersucht werden, ob die sulfatierten

Polysaccharide aus *G. lucidum* und *T. aurantia lba* gerinnungshemmende Wirkung haben. Außerdem sollte getestet werden, ob sie eine antineoplastische Wirkung besitzen.

Viele Studien beschreiben, dass Triterpenoide die aktiven Stoffe von *G. lucidum* sind, und Tumorzellen beim Wachstum hindern. G2 und G4 sind zwei Triterpenoiden des *G. lucidums*. Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, die Antitumorwirkung beider Fraktionen zu untersuchen und die entsprechenden molekularen Mechanismen aufzuklären.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

Alle Chemikalien wurden in analytischer Qualität von Merck Millipore, Sigma-Aldrich oder Roth gekauft. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit ELIX-Wasser hergestellt. Dieses Wasser wurde in einer ELIX-Wasseraufbereitungsanlage (Merck Millipore) hergestellt und hat einen Reinheitsgrad von Typ 2, welches mit bidestilliertem Wasser vergleichbar ist. Für die molekularbiologische Arbeit wurde MilliQ Wasser (Tridest Wasser) verwendet, welches in einer MilliQ-Biocell-A-10-Anlage (Merck Millipore) hergestellt wurde.

Alamar Blue solution	Biosource (Nivelles, Belgium)
Alkallive phosphatase Streptavidin	Pharmigen (Heidelberg, Germany)
ConA (Concanavalin A)	Sigma (Steinheim, Germany)
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma (Steinheim, Germany)
Mouse IgG reagent Grade	Sigma (Steinheim, Germany)
Naphthylethylene-diamine dihydrochloride	Sigma (Steinheim, Germany)
Resveratrol	Sigma (Steinheim, Germany)
Sulfanilamide	Sigma (Steinheim, Germany)

2.1.2. Antikörper

Anti-mouse CD3 FITC conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)
Anti-mouse CD19 PE conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)
Anti-mouse CD4 PE conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)
Anti-mouse CD8 FITC conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)
Anti-mouse CD69 PE conjugate	Dianova (Hamburg, Germany)
Anti-human CD3 FITC conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)
Anti-human CD19 PE conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)
Anti-human CD4 FITC conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)

Anti-human CD8 APC conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)
Anti-human CD29 FITC conjugate	ImmunoTools (Friesoythe, Germany)
Anti-human CD62L FITC/PE conjugate	BD Biosciences, (Heidelberg, Germany)
Anti-human CD69 FITC conjugate	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-human IgG FITC conjugate	BD Biosciences, (Heidelberg, Germany)
Anti-human AKT	Sigmal (Steinheim, Deutschland)
Anti-human p-AKT	Biolegend (San Diego, US)
Anti-human Axin2	Sigmal (Steinheim, Deutschland)
Anti-human Bax	AAT Bioquest (Sunnyvale, US)
Anti-humen Bcl-2	AAT Bioquest (Sunnyvale, US)
Anti-human caspase 3	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-human caspase 9	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-human Cytochrom c	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-human p-ERK1/2	Sigmal (Steinheim, Deutschland)
Anti-human GAPDH	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-human p-PKC- α	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-human p53	ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland)
Anti-human PI3K(p85)	Cell Signaling (Frankfurt, Deutschland)
Anti-human β -catenin	Sigmal (Steinheim, Deutschland)

2.1.3. Kits

Annexin V apoptosis detection kit	BD Biosciences, (Heidelberg, Germany)
BCA Protein assay reagent Kit	Pierce (Rockford, USA)
Calcein AM cell Viability Kit	Trevigen (Gaithersburg, USA)
CFSE cell proliferation Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Germany)
Huamn Complement system Kit	Euro Diagnostica (Sweden)
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare (Uppsala, Sweden)
Maus IL-1 β ELISA Kit	R&D (Minneapolis, USA)
Maus IL-2 ELISA Kit	R&D (Minneapolis, USA)

Maus IL-4 ELISA Kit	R&D (Minneapolis, USA)
Maus IL-6 ELISA Kit	R&D (Minneapolis, USA)
Maus IFN- γ ELISA Kit	R&D (Minneapolis, USA)
Maus TNF- α ELISA Kit	R&D (Minneapolis, USA)
Maus Total Immunglobulin ELISA Kit	antibodies (Aachen, Germany)

2.1.4. Medien

RPMI 1640 medium	Biochrom (Berlin, Germany)
DME medium	Biochrom (Berlin, Germany)
Penicillin-streptomycin Stock solution	Biochrom (Berlin, Germany)
Fetal calf serum	Kraeber (Wedel, Germany)

2.1.5. Fraktionen aus Naturstoffen

Bei der Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkungen wurden eine Fraktion GLP20 aus *G. lucidum* getestet. GLP20 ist eine Polysaccharid-Fraktion aus dem Fruchtkörper der *G. lucidum*. GLPss58 stellt die sulfatierte Form von GLP20 dar. G2 und G4 sind zwei unterschiedliche Triterpenoids aus dem Fruchtkörper der *G. lucidum*. JRP ist eine Polysaccharid-Fraktion aus *T. aurantia lba* und ihre sulfatierte Form bezeichnet man als JRP-SS. Sarg-Z ist eine Polysaccharid-Fraktion aus *S. graminifolium*.

Alle Proben aus *G. lucidum* und *T. aurantia lba* wurden von unseren Kooperationspartner in der Shanghai Akademie für landwirtschaftlichen Wissenschaften hergestellt und uns geliefert. Sarg-Z wurden von unseren Kooperationspartnern an der Shanghai Ozan Universität hergestellt und uns geliefert.

2.1.6. Zelllinien

L929	murine fibrosarcoma cell line
HT29	human colorectal adenocarcinoma cell line
SW620	human colon adenocarcinoma cell line
MCF7	human breast adenocarcinoma cell line

MDA-MB-231	human breast adenocarcinoma cell line
MEL-2	human melanoma cell line (ATCC-Name: SK-MEL-2)

Alle Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginia USA) erhalten.

2.1.7. Tiere

C57BL/6 Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz behandelt und die Genehmigung (T0169 /11) wurde vom staatlichen Tierschutzausschuss erhalten. Männliche Mäuse zwischen 8 bis 13 Wochen wurden zur Herstellung von Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen (BMMs) und Mausmilch-Lymphozyten (MSLs) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellpräparation und Zellkultur

2.2.1.1 Medium für Tumorzellen

RPMI 1640-Medium (Biochrom AG) und DMEM-Medium wurde mit 10 % hitz-inaktivierten FCS, 100 µg/mL Streptomycin und 100 IU/mL Penicillin eingesetzt. MCF-7, HT29, SW620, MEL-2 und L929-Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium und MDA-MB wurde in DMEM-Medium in einem Begasungsbrutschrank unter 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.1.2. Präparation von Lymphozyten aus der Milz der Maus

C57BL/6 Mäuse im Alter von 8-10 Wochen wurden für die Lymphozyten-Zubereitung verwendet. Die Milz wurde nach der Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation entfernt, mehrfach zerschnitten und schließlich mittels eines sterilen Spritzenkolbens durch ein Edelmetallgitter gedrückt. Das Gitter wurde zuvor zweimal mit PBS unter sterilen Bedingungen gespült. Die Milzzellensuspension wurde in ein neues Röhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 300 rpm für 3 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und anschließend bei 1300 rpm für 6 Minuten zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen. 3x10⁸-Zellen wurden für 10 min bei RT in 1 mL Lyse-Puffer inkubiert, um rote Blutkörperchen zu

lysieren. Die Zellsuspension wurde mit 10-fachem Überschuss von Medium verdünnt, um den Lyseprozess zu beenden. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellpellets schließlich in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS (fetal calf serum) und 1 % Penicillin/Streptomycin für weitere Experimente suspendiert. Die Zellviabilität wurde mittels des Trypanblau-Ausschluss Tests evaluiert.

Lyse-Puffer pH 7.2 : 1 Volum von Tris-HCl-Puffer (2,06 W / V in Wasser, pH 7,65) plus 9 Volum von 0,83% NH₄Cl-Lösung, pH-Wert auf 7,2

2.2.1.3. Präparation von Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen (BMMs)

Die vom Knochenmark abgeleiteten Makrophagen wurden nach der von Stanley et al. (1997) [135] beschriebenen Methode gewonnen. Mäuse mit einem Alter von 8-10 Wochen wurden zur Gewinnung von Knochenmark-Makrophagen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Die C57BL/6-Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Schienbeine und Oberschenkelknochen wurden von C57BL/6 Mäusen durch Schneiden des proximalen Endes des Oberschenkelknochens und dem distalen Ende des Schienbeins entfernt, wobei die anderen Enden intakt blieben. Eine 23-Gauge-Nadel wurde in die intakten Enden eingeführt und das Knochenmark wurde durch die Schnittenden mit eiskaltem DMEM gespült.

Die Knochenmarkzellen wurden durch eine 22-Gauge-Nadel homogenisiert und dann zentrifugiert (1200 g, 6 min, 4°C). Die Zellpellets wurden dann in vollständigem RPMI1640-Medium mit 10% L929 konditioniertem Medium resuspendiert und in Bakterienkulturschalen kultiviert. Nach drei Tagen wurden die nicht-adhärenten Zellen gesammelt, und die anhaftenden Zellen verworfen. Danach wurden die Zellen in Bakterienkulturschalen in RPMI1640-Medium mit 10% L929 konditioniertem Medium ausgesät und bei 37°C für weitere drei Tage inkubiert. Die nicht-adhärenten Zellen wurden entfernt und mit sterilem PBS gewaschen. Anhaftende Makrophagen wurden für die Verwendung durch Kratzen mit kaltem PBS gesammelt, wobei das Wachstumsmedium durch komplettem Medium ersetzt wurde.

L929-konditionertes Medium: Kultulmedium von L929 bis Wachstum auf etwa 100% Konfluenz.

Kulturmedium von L929: 10% hitz-inaktiviertem FCS, 100 ug/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin in DMEM-Medium

2.2.1.4. Präparation von human peripheren Blutlymphozyten (HPBLs)

Lymphozyten wurden aus periphere Blut von gesunden Spendern aus Blutbank von Charité-Universitätsmedizin Berlin hergestellt. Alle Blutspender hatten sich freiwillig zur Verfügung gestellt. Das Durchschnittsalter der Blutspender lag bei 30 Jahren. Einsammeln und Arbeit mit humanem Blut wurde nach dem deutschen Ethikgesetz durchgeführt und die Genehmigung (EA4/106/13) wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin erhalten.

Die Blutentnahme wurde im Charité Blutspende Zentrum Campus Virchow Klinikum (CVK) durch qualifizierte Ärztinnen/Ärzte durchgeführt. Die verwendeten Röhrchen enthalten ein Antikoagulans (Heparin). Für die Isolierung der Blutlymphozyten wurde ein Ficoll-Trennsystem (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare) eingesetzt. Das mit einem Antikoagulanz behandelte Blut wurde mit einer ausgewogenen Salzlösung (siehe Protokoll der Manufaktur von Ficoll-Paque PLUS) 1:1 vermischt. Mit aseptischen Techniken wurde Ficoll-Paque Plus (3 mL) abgezogen und im Zentrifugenröhrchen (15 mL) gegeben. Die verdünnte Blutprobe (4 mL) wurde sorgfältig auf Ficoll-Paque Plus pipettiert und bei 400 g für 35 min zentrifugiert. Während der Zentrifugation sammeln sich die mononuklearen Zellen wie z.B. Lymphozyten und Monozyten oberhalb im Ficoll-Paque Plus. Erythrozyten und Granulozyten bilden ein stabiles Pellet. Über der mit mononuklearen Zellschicht liegt das Blutplasma. Das Blutplasma wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die mononukleare Zellschicht wird mittels einer Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. 3 mL ausgewogene Salzlösung wurde zugefügt. Die Zellen wurden durch sanftes Einziehen in und aus einer Pasteurpipette ausgespült und bei 100 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 8 mL ausgewogene Salzlösung suspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen für die Untersuchung verwendet.

Saltzlösung = 1 Volume Lösung A + 9 Volumen Lösung B

Lösung A

50 µM CaCl₂ x 2H₂O

98 mM MgCl₂ x 6H₂O

5,4 mM KCl

Lösung B

0,14 M NaCl

0,415 M Tris

1% D-Glukose

2.2.2. Bioassay

2.2.2.1. Markierung von FITC-Polysacchariden

Die Herstellung von FITC markierten Polysacchariden wurde von A. N. de Belder et al (1973) beschrieben [136]. Die Polysaccharid-Probe (10 mg) wurde in Methylsulfoxid (200 µL) gelöst, das ein Tropfen Pyridin enthält. Fluoresceinisothiocyanat (1 mg) und Dibutylzinndilaurat (0,5 mg) wurden hinzugefügt, und das Gemisch anschließend 2 Stunden bei 95°C erhitzt. Nach 4-maligen Ausfällen in Ethanol wurde das erhaltene FITC-Polysaccharid über Nacht in Slide-A-Lyzer® G2 Dialysekassetten (Thermo Fisher Scientific) dialysiert, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Dann wurde FITC-Polysaccharid in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.2.2.2. Bestimmung der Proliferation und Aktivierung durch Alamar-Blau-Assay

Die Zellsuspension wurde auf eine geeignete Konzentration eingestellt und dann je 180 µL/Well der Zellsuspension auf eine 96-Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden 20 µL von verschiedenen Testmitteln in je dreifacher Ausführung zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C in 5 % CO₂- Atmosphäre für eine definierte Zeit wurden 20 µL Alamar-Blau in jedes Well gegeben. Nach Inkubation für weitere 4 h, wurde die Farbänderung der Lösung mit einem Mikro-ELISA-Autoreader bei 570 nm und 600 nm gemessen. Die Aktivierungsrate wurde nach der Alamar-Blau-Assay Formel (Nivelles, Belgien) berechnet.

$$\text{Proliferation rate} = \frac{(\epsilon_{ox})_{\lambda 2} A_{\lambda 1} - (\epsilon_{ox})_{\lambda 1} A_{\lambda 2}}{(\epsilon_{ox})_{\lambda 2} A_{\lambda 1_{\text{Control}}} - (\epsilon_{ox})_{\lambda 1} A_{\lambda 2_{\text{Control}}}} \times 100\%$$

$A_{\lambda 1}$: Absorbtion at 570nm $A_{\lambda 2}$: Absorbtion at 600nm
 $(\epsilon_{ox})_{\lambda 2}$: 117,216 $(\epsilon_{ox})_{\lambda 2}$: 80,856

Abbildung 1: Alamar-Blau-Assay Formel (Nivelles Belgien)

2.2.2.3. Quantifizierung der Zytokine IL-1 β und TNF- α

Die Anwesenheit der Zytokine IL-1 β und TNF- α , die aus Makrophagen in das Kulturmedium freigesetzt wurden, wurden unter Verwendung eines empfindlichen und spezifischen Sandwich-ELISA (R&D) quantifiziert. Die Makrophagen-Zellsuspension wurde auf die Konzentration 5×10^5 Zellen/mL eingestellt, und 180 μ L der Zellsuspension wurde in jedes Well einer 96-Mikrotiterplatte gegeben. In der Zwischenzeit wurden 20 μ L verschiedener Testmittel in dreifacher Ausführung zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C in 5 % CO₂ -Atmosphäre für 48 h wurden die zellfreien Überstände für die Zytokinmessung gesammelt. Je 100 μ L des zellfreien Überstands, IL-1 β oder TNF- α -Standard-Proben wurden auf eine 96-Mikrotiterplatte, welche mit einem polyklonalem Antikörper beschichtet wurde, der spezifisch gegen Maus-IL-1 β oder TNF- α reagiert, gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend vorsichtig gemischt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Platte 4-mal mit Waschpuffer gewaschen und dann das HRP-gekoppelte Anti-IL-1 β oder TNF- α in jedes Well gegeben und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 μ L Substrat-Lösung in jedes Well gegeben und 30 min inkubiert. Schließlich wurden 100 μ L Stopplösung zugegeben, und die Extinktion der Reaktionsmexturen wurde bei 450 nm (Referenz Wellenlänge 570 nm) gemessen.

2.2.2.4. Messung von Stickstoffmonoxid (NO)

Die Produktion von Stickstoffmonoxid wurde durch Messung der Nitrat/Nitrit-Bildung mittels der Griess-Reaktion bestimmt wurden [137]. Zuerst wurde Makrophagensuspension auf 5×10^5 Zellen/mL eingestellt, und 180 μ L der Zellsuspension auf jedes Well der 96-Mikrotiterplatte verteilt. In der Zwischenzeit wurden 20 μ L verschiedener Testmittel in dreifacher Ausführung zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C in 5% CO₂ -Atmosphäre für 48 h wurde je 100 μ L zellfreier Überstand für die anschließende Nitrit-Messung gesammelt. Dafür wurde der Überstand (100 μ L) mit 50 μ L Griess-Reagenz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und die entstehende Farbereaktion wurde durch Messung der Absorbtion bei 543 nm bestimmt. Die Nitritkonzentration wird mit Natriumnitrit als Standard bestimmt. Die Konzentration wurde, entsprechend der Anleitung des Assays, nach Abzug der Blanks mit der Standardkurve berechnet. Die Standardkurve ist linear zwischen 0,1 und 100 μ M.

Griess-Reagens

1 % Sulfanilamid

0,1 % Naphthylethylen-diamin -dihydrochlorid

2,5 % Phosphorsäure

2.2.2.5. Bestimmung der gesamten Immunglobulin-Produktion

Das gesamte Immunglobulin in den Kulturüberständen von MSLs wurde durch das Total Immunglobulin ELISA Kit (Aachen, Deutschland) gemessen. Die MSLs wurden auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt, und 200 μ l der Zellsuspension wurde in jedes Loch einer 96-Mikrotiterplatte zugegeben. Dann wurden die Zellen mit oder ohne Behandlung von verschiedener Proben mit angegebenen Konzentration für 7 Tage bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Zellfreie Suspensionen, nach Behandlung mit den verschiedenen Proben, wurden für das Immunglobulin-ELISA-Assay verwendet. 100 μ l zellfreier Überstand oder Ig-Standard-Proben wurden jeweils in ein Loch einer 96-Mikrotiterplatte zugegeben, welche mit Ig-Antikörper beschichtete wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Platte 4-mal mit Waschpuffer gewaschen und dann die Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Anti-Ig-Antikörper zugegeben und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 μ l Substrat-Lösung in jedes Loch zugegeben und 30 min inkubiert. Schließlich wurde 100 μ l Stopplösung zugegeben und die Extinktion der Reaktionsmixturen wurde bei 450 nm mit einer Referenz Wellenlänge von 570 nm gemessen.

2.2.2.6. Messung der Zytokin-Produktion

Die Zytokinproduktion (IL-2, -4, -6, IFN- γ) in den Überständen von kultivierten MSLs wurde durch ELISA-Kits (R&D, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Lymphozyten der Mausmilz wurden auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/mL eingestellt, und 200 μ L der Zellsuspension in jedes Well einer 96-Mikrotiterplatte gegeben. In der Zwischenzeit werden 20 μ L verschiedener Testmittel in dreifacher Ausführung zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C in 5% CO₂- Atmosphäre für 48 Stunden wurden die zellfreien Überstände für die Zytokinmessung gesammelt.

100 μ L zellfreier Überstand und IL-2-, IL-4-, IL-6- oder IFN- γ - Standard-Proben werden jeweils auf eine 96-Mikrotiterplatte mit einem polyklonalem Antikörper, der spezifisch

gegen Maus- IL-2, IL-4, IL-6 oder IFN- γ gerichtet ist, gegeben. Danach wurde die Mikroplatte vorsichtig gemischt und bei 4°C über Nacht inkubiert, die Platte wurde anschließend 4-mal mit Waschpuffer gewaschen und dann der HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper gegen IL-2, IL-4, IL-6 oder IFN- γ jeweils zu entsprechendem Well gegeben und anschließend wurde wieder bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 μ L Substrat-Lösung in jedes Well gegeben und ein weiteres Mal für 30 min inkubiert. Schließlich wurden 100 μ L Stopplösung hinzugefügt, und die Extinktion der Reaktionsmixturen bei 450 nm (Referenz Wellenlänge 570 nm) gemessen.

2.2.2.7. Phagozytotisches Assay von Makrophagen

Die Fixierung und Permeabilisierung von *E. coli* (Optische Dichte = 6 in 1 mL) erfolgt durch zehnmünütige Inkubation in 4% Formaldehyd; 0,1% Triton X-100/PBS. Nach dem Waschen wurde *E. coli* mit FITC durch Inkubieren in 10 μ g/mL FITC/PBS für 10 min markiert. Danach wurde das FITC-markierte *E. coli* dreimal mit PBS gewaschen und auf die optische Dichte von 1 in PBS verdünnt. Makrophagen wurden unter Verwendung von kaltem PBS geerntet und in RPMI-1640 Medium auf 2×10^5 Zellen/mL verdünnt. Die Zellen wurden in 12-Well-Platte mit 1 mL ausgesät und mit Polysacchariden für 24 h bei 37°C behandelt. 100 μ L FITC-markierte *E. coli* werden auf das Well gegeben und für 90 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Zahl der phagozytischen Zellen mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt. 10000 Zellen wurden jeweils mittels FACScalibur (Becton Dickinson) gezählt. Die Daten wurden durch Cellquest-Software analysiert.

2.2.2.8. Analyse der Subpopulationen von Lymphozyten

Lymphozyten wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten. Dann werden 200 μ L Zellsuspension (2×10^6 Zellen/mL) in 96-Well-Platte mit oder ohne Proben zugegeben. Nach einer Behandlung für 72 h wurden die Lymphozyten zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit spezifischen mAk Anti-CD3(T-Zellen)-FITC/anti-CD19(B-Zellen)-PE, anti-CD8 (zytotoxische T-Zellen)-FITC/anti-CD4(T-Helfe Zellen)-PE, anti-CD3-PE/anti-CD69 (aktiviert T-Zellen)-FITC und anti-CD8-APC/anti-CD69-FITC doppel gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in 0,3 mL PBS

resuspendiert. Die Fluoreszenz-Analyse wurde unter Verwendung eines FACScan-Analysators durchgeführt. Ein Mittelwert von 10000 Zellen wurde in diesem Gate analysiert. Die Cellquest-Software wurde verwendet, um die Daten für die Berechnung des Prozentsatzes von verschiedenen Lymphozyten-Unterpopulationen zu analysieren.

2.2.2.9. Analyse der HPBLs-vermittelten Tumor-Zytotoxizität

2×10^4 MCF7-Zellen wurden als Zielzellen auf Platten mit 96-Well ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2×10^5 HPBLs (bei einem Verhältnis von 10 HPBLs zu einer Zielzelle) in Gegenwart von Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen für 24 h in einem mit 5% CO₂-befeuchtetem Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach der zytotoxischen Wirkung von HPBLs werden die sterbende bzw. unadhärenten Zellen und suspendierende HPBLs entfernt. Die überlebenden und adhären Zellen wurden mittels der Kristallviolett färbung quantitative bestimmt. Nach dem Waschen wurden je 100 µL 70% Ethanol in die Wells zugefügt. Nach 15 min wurde die Farbintensität durch Spektroskopie bei 540 nm analysiert. Im Vergleich mit der Zellzahl der Zielzellen von Kontrollexperiment, die reduzierte Prozentsatz von Zielzellen nach der Behandlung mit verschiedener Proben wird als Zytolyse-Prozentsatz der Tumorzellen durch HPBLs ausgedruckt

2.2.2.10. Messung der Bindung der L-Selektin mit ihrer Ligand durch SPR (surface plasmon resonance)-Verfahren

SPR-Experimente wurden auf einem BIAcore X Instrument nach der Hinweise von Firma GE Healthcare bei 25°C durchgeführt. L-Selektin-IgG-Chimäre (R&D Systems), die die Leukozyten-nachahmen, wurden auf Protein A beschichteten Gold (Au)-Nanopartikeln (15 nm Durchmesser) immobilisiert, und auf die Oberfläche eines SPR-Sensorchips ähnlich dem vaskulären Endothel aufgetragen. Der synthetische L-Selektin-Modell-Ligand SiaLex/sTyr-PAA sowie N-Acetyl-Lactosamin-PAA wurden bereit auf dem SPR-Sensorchip beschichtet. Die Selektin-Nanopartikel wurden in 0,020 M HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4, mit 0,150 M NaCl und 0,001 M CaCl₂) dispergiert und mit einer konstanten Flussrate von 20 mL/min durchströmt.

Zur Bewertung der Bindung von potentiellen Inhibitoren von L-Selektin wurde ein definierter Vorinkubationsschritt mit dem Selektin Nanopartikel vor seinem Durchgang

über die Sensorchipoberfläche durchgeführt. Die Reduktion des Bindungssignals in Bezug auf die Inhibitor-Konzentration wurde als x% der Bindung berechnet und notiert. Die Inhibitor-Konzentration, die die Bindung um 50% reduziert, wird als IC₅₀-Wert bezeichnet. Jede Konzentration wurde mindestens in zweifacher Ausfertigung aufgetragen.

2.2.2.11. Einfluss der Bindung von L-Selektin Antikörpern (anti-CD62L) an L-Selektin auf der Oberfläche von HPBLs durch Proben

Jeweils 1×10^5 HPBLs wurden mit den unterschiedlichen Proben in 10 µl PBS bei angegebenen Konzentrationen oder gleichem Volumen PBS als Negativkontrolle für 30 min bei Raumtemperatur in 90 µL RPMI 1640 Medium mit 10% FCS (fetales Kälberserum) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 µL FITC-konjugiertem anti-CD62L-monoklonalem Antikörper in 100 µL PBS für 30 min auf Eis markiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und die Anzahl sowie die FITC-Intensität der Antikörper-gebundenen HPBLs wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt. 20000 Zellen wurden für jede messung verwendet. Die Daten wurden durch Cellquest-Software analysiert.

2.2.2.12. Analyse der Bindung von verschiedenen Proben an L-Selektin auf der HPBL-Oberfläche

Jeweils 1×10^5 HPBLs wurden mit 100 µl 50 µg/mL unterschiedlichen FITC-markierten Proben und 1 µL PE-markierten anti-CD62L-monoklonalen Antikörpern für 30 min in 100 µL PBS auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen durch Durchflusszytometrie analysiert. 20000 Zellen wurden jeweils gemessen. Die Daten wurden durch Cellquest-Software analysiert

2.2.2.13 Analyse der Chemotaxis von Lymphozyten

Um die Chemotaxis von humanen peripheren Blutlymphozyten (HPBLs) zu analysieren wurde ein TransWell System (Zwei-Kammer-System, Merck, Darmstadt) und humanes sekundäres lymphatisches Gewebe Chemokin (hSLC) verwendet. In der oberen Kammer wurden die Zellen ausgesät. In der unteren Kammer befindet sich das verwendete Chemokin. Die Kammern sind durch eine Membran mit 3 µm großen Poren voneinander getrennt. Die Zellen können nicht durch die Poren wandern, sondern müssen sich aktiv hindurch bewegen, nachdem sie von Chemokin stimuliert

wurden. Die Zellen wandern entlang eines Konzentrationsgradienten aktiv durch die Poren hindurch in Richtung der Chemokine. Die Isolierung von HPBLs wurde unter Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben. In die untere Kammer der Transwellplatten (24er Platte) wurde 300 μL serumfreies Medium mit 10 ng/mL hSLC gegeben. 1×10^6 HPBLs wurde zuerst in 100 μL serumfreiem Medium mit oder ohne Proben für 30 min im Inkubator (37°C , 5% CO_2) inkubiert. Nach dreimal Waschen wurden 100 μL der Zellsuspension in die obere Kammer eingesät. Nach zwei Stunden Inkubation wurden die Zellen der oberen und unteren Kammer in FACS-Puffer aufgenommen und von PE-markiertem Anti-CD62L Antikörper gefärbt und gemessen.

2.2.2.14. Analyse der Homing von Lymphozyten

Die Analysen-Methode vom Lymphozyten-Homing wurde von Kenji Chiba et. al (1998) im Detail beschrieben [138]. Dafür wurden Calcein-markierte Spleen Lymphozyten von C57BL/6J Mäusen (MSLs) verwendet. Die Isolierung der MSLs wurde unter Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben.

Lymphozyten ($1,2 \times 10^8$ Zellen) wurden mit Calcein markiert, indem sie in 500 μL RPMI1640 Medium, welches 2 μM Calcein-AM enthält, für 30min im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) inkubiert. Nach der Markierung wurde eine Viabilität der Lymphozyten von mehr als 95% durch Trypan Blue Färbung nachgewiesen. Um der Einfluss von Probe auf Lymphozyten-Homing zu untersuchen, wurden die Calcein-markierten Lymphozyten (4×10^7 Zellen) in 200 μL RPMI1640 Medium, welche 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der entsprechenden Probe enthält, für 30 min in Brutschrank (37°C , 5% CO_2) inkubiert. Danach wurden die behandelten und unbehandelten Calcein-markierten Lymphozyten über die Schwanzvene von Mäusen injiziert. Nach der Injektion für 10 bzw. 30 min, wurde Peripherieblut von Maus-Schwanzvene entnommen, und nach der Injektion für 30 min wurden Lymphknoten und Milz nach der Tötung der Mäuse genommen. Die Calcein-markierten Lymphozyten jeweils in Lymphozyten von Peripherieblut, Lymphknoten und Milz wurden nach Injektion für 10 bzw. 30 min mittels FACS-Analyse quantitativ nachgewiesen.

2.2.2.15. Analyse der Aktivierung der Komplementsystems

Die Aktivierung des Komplementsystems kann über den klassischen, alternativen und Lektin (Mannose-bindendes Lektin)-aktivierende Wege erfolgen. Über welchen Weg

das Komplementsystem aktiviert wird, kann mittels eines ELISA-Kits (Wieslab® Complement Kit) untersucht werden. Dieses Assay ist ein Enzym-Immunoassay, indem ein hämolytische Assay mit der Aktivierung des Komplementsystems unter Verwendung von markierten Antikörpers miteinander kombiniert. Dieser markierte Antikörper produziert nach erfolgreicher Aktivierung von Komplementsystem ein Neoantigen. Die Menge des erzeugten Neoantigens (C5b-9) ist proportional zu der Aktivität von funktionellem Weg des Komplementsystems. Die Wells der 96-Mikrotiterplatte waren jeweils mit spezifischen Aktivatoren für einen der drei oben genannten Wege beschichtet. Das menschliche Serum wurde in Verdünnungsmittel, die mit spezifischen Inhibitoren versetzt, verdünnt und um sicherzustellen, dass nur einer der drei möglichen Wege aktiviert ist. Danach wurden die Wells gewaschen und der C5b-9-Antikörper konnte mit einem spezifischen alkalischen Phosphatase-markierten Antikörper nachgewiesen werden, welcher sich gegen das während der MAC (membrane attack complex) -Bildung exprimierte Neoantigen richtet. Nach einem weiteren Waschschrift und Inkubation mit einer alkalischen Phosphatase-Substratlösung konnten spezifische Antikörper nachgewiesen werden, wobei die Menge der Aktivierung des Komplementsystems mit der Farbintensität korreliert und als Extinktion (optische Dichte (OD)) gemessen werden kann.

Bei dem Experiment wurden die Proben mit definierten Konzentrationen in verdünnte Serum gemischt. Die Aktivierung des Komplementsystems durch verdünntes Serum ohne Mischung von Proben diente lediglich als Kontrolle und deren Aktivität wurde gleich 100% gesetzt. Die Reduktion der Aktivität durch die Probe wurde in Bezug auf die Kontrolle als $100 - x\%$ Aktivität berechnet. Jede Messung wurde jeweils zweifach wiederholt.

2.2.2.16. Zell-Matrix-Adhäsionsassay

Je 100 μ l (50 ng/mL) unterschiedlicher ECM-Proteine (Fibronectin, Laminin, Collagen-I und -IV, Merck, Darmstadt) werden in einer 96-Well-Platte über Nacht ausplattiert. Nach dem Waschen wurde die Zellen (2×10^5) wurden in 90 μ L RPMI 1640 Medium mit 10% FCS (fetales Kälberserum) resuspendiert und gemeinsam mit 10 μ L der jeweils unterschiedlichen Proben in PBS bei angegebenen Konzentrationen oder dem gleichen Volumen PBS als Negativkontrolle in die 96-Well-Platte gegeben und für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal gewaschen, um die suspendierenden Zellen zu entfernen. Die adhärenierten Zellen wurden mit 10% Formaldehyd für 30 min

fixiert und mit 0,05% Kristallviolett angefärbt. Nach dem Waschen wurden 100 µL 70% Ethanol in die Platte gegeben. Nach 15 min wurde die Farbintensität mittels eines Spektrometers bei 540 nm analysiert.

2.2.2.17. Einfluss der Bindung des β 1-Integrin Antikörpers (anti-CD29) an das β -Integrin auf der Oberfläche von Tumorzellen durch Proben

Jeweils 1×10^5 Tumorzellen wurden mit 100 µg/mL unterschiedliche Proben in 100 µL RPMI 1640 Medium mit 10% FCS (fötales Kälberserum) oder dem gleichen Volumen Medium als Negativkontrolle für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 µL FITC-konjugiertem anti-CD29-mAk für 30 min in 100 µL PBS auf Eis markiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und die Anzahl sowie die FITC-Intensität der Antikörper-gebundenen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2.2.2.18. Analyse der Migration von Tumorzellen durch Wundheilung

Die Analyse der Tumorzellmigration erfolgte durch Wundheilung nach Verletzung. 1×10^5 Zellen wurden in einer 96-Well-Platte gesät. Nach 48 h bildeten die Zellen eine Monolage, welche durch Abkratzen von Zellen mit einer Pipettenspitze verletzt wurden (Zeitpunkt $t=0$). Anschließend wurden die Proben mit 50 µg/mL in Medium eingesetzt und die Zellen weiterkultiviert. 24 h nach Verletzung wurde die Migration der Zellen in den zuvor zellfreien Bereich durch Fotografieren dokumentiert. Die Werte der zellfreien Areale wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h als **a** und $t = 24$ h als **b** vermessen und der relative Migrationsrate in Form: "Migrationsrate = $(a-b)/a \times 100$ [%]" bestimmt.

2.2.2.19. Analyse der Transwell-Migration von Tumorzellen

Die Tumorzellmigration wurde durch das Transwell System analysiert. Tumorzellen mit einer Zellzahl von 1×10^5 wurden zuvor mit je 50 µg/mL der Proben für 30 min behandelt und anschließend mit serumfreien Medium gewaschen, und in das obere Well mit durchlässiger Membran (8 µm Poren) des Transwells gegeben. In unteren Well wurde das Medium, welches 10% FCS enthält, eingegeben. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen, die durch die Membran gewandert sind, mit 4% Formaldehyd für 30 min fixiert, und dann mit 0,05% Kristallviolett gefärbt und

schließlich mittels eines Spektrometers bei 540 nm gemessen. Der OD-Wert ist proportional zu den migrierten Zellen.

2.2.2.20. Messung der Blutgerinnung

Um die Wirkung der einzelnen Proben auf die Blutgerinnung zu messen wurde die ROTEM® Thromboelastometrie (Tem International GmbH, München) durchgeführt. Dazu wurde eine frische Blutprobe von gesunden Spendern entnommen. Die Blutentnahme wurde im Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben.

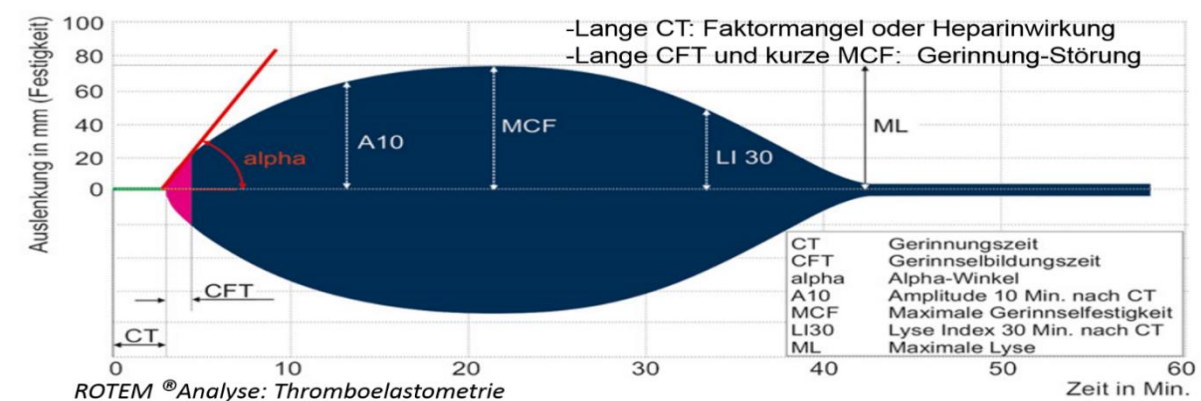


Abbildung 2: Standardanalyse der Blutgerinnung aus ROTEM® Thromboelastometrie

Das Blut wurde direkt in ein mit Antikoagulans Zitrat enthaltenes Röhrchen (BD Vacutainer® mit Na-Citrat gepuffert 3,8%) eingesammelt. 300 µL der Blutprobe wurde dann in eine Küvette gefüllt und ein zylindrischer Stempel eingetaucht. Der Stempel wurde durch eine elastische Feder nach rechts und links gedreht. Anschließend wurde 20 µL Aktivator der spezifischen intrinsischen oder extrinsischen Gerinnungskaskade hinzugefügt und anschließend direkt mit der Messung begonnen. Solange keine Gerinnsel auftreten, bewegt sich der Stempel ungehindert von rechts und links. Sobald sich ein Gerinnsel bildet, ist die Bewegung des Stempels durch die zunehmende Gerinnung eingeschränkt, was als Festigkeitskurve über die Zeit dargestellt werden kann. Die kinetische Änderung wurde optisch erfasst und von einem integrierten Computer berechnet. Es entstehen die typischen Kurven und numerischen Parameter (Abb. 2). Nach der Messung wurden drei Parameter miteinander verglichen: Die Clotting-Time (CT) zeigt den Beginn der Gerinnung an, „MCF“ entspricht der maximalen Gerinnsel-Festigkeit. Bei beiden Experimenten wurde die Probe in Citrat-behandeltem Blut mit definierter Konzentration eingesetzt und bei Raumtemperatur für

30 min inkubiert. Der Start der Blutgerinnung erfolgte durch den Zusatz von einem Aktivator.

2.2.2.21. Analyse der apoptotischen Zellen

Die Zell-Apoptose wurde mittels Dead Cell Apoptosis Kit (BD Pharmingen, USA) ausgewertet. MCF-7 und MEL-2 wurden in einer 24-Well-Platte mit 1×10^5 Zellen pro Well mit verschiedenen Proben behandelt. Nach einem definierten Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet und mit kaltem PBS zweimal und dann einmal mit 100 μ L Annexin-V Bindungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 μ L Bindungspuffer resuspendiert. 5 μ L der Annexin V-FITC und 1 μ L Propidiumiodid (PI) (100 μ g/mL) Lösungen wurden jeweils in die Zellsuspensionen für 15 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Dann wurden 300 μ L Bindungspuffer zugegeben, und 10000 Zellen/Gate sofort mit einem FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Für die Auswertung wurde die Cellquest-Software verwendet.

2.2.2.22. Analyse des Zellzykluses

MCF-7 und MEL-2 wurden in einer 24-Well-Platte mit 1×10^5 Zellen pro Well ausgesät und mit verschiedenen Proben für 24 h behandelt. Nach einem definierten Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet und mit kaltem PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 70 % Ethanol für 48 h fixiert und permeabilisiert. Nach dem Zentrifugieren bei 1000 rpm für 5 min wurden die Zellen in 200 μ L PBS mit 50 μ g/mL Propidiumiodid und 50 μ g/mL RNase A resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Dann wurden 200 μ L Bindungspuffer zugegeben und die Zellen wurden sofort durch FACS analysiert. 10000 Zellen wurden für jede Analyse gemessen.

2.2.2.23. Analyse der Zellproliferation durch CFSE-Färbung

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) ist ein Fluoreszenzfarbstoff für Zellen. CFSE ist zellpermeabel und bindet an intrazelluläre Lysinreste und andere Aminquellen. Dadurch kann er über einen langen Zeitraum aufbewahrt werden. Je nach Zellteilung kann CFSE in Tochterzellen übertragen werden, wobei die Fluoreszenzintensität bei vermehrter Zellzahl verringert wird. 1×10^6 Zellen wurden in 500 μ L PBS resuspendiert. CFSE wurde bis zu einer Endkonzentration von 2 μ M

hinzugefügt, und dann vorsichtig gevortext. Die Zellsuspension wurde 15 min bei 37°C stehengelassen. Danach wurde die Zellsuspension 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 mL vorgewärmten Medium resuspendiert und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Pellet nochmal mit dem Medium gewaschen. Die CFSE-markierten Zellen wurden gleichmäßig in 6 Teile aufgeteilt, wovon ein Teil sofort mittels FACS analysiert wurde und die erhaltenen Daten als Tag 0 gesetzt werden. Die anderen 5 Teile wurden auf 24-Well-Platte ausgesät und bei 37°C in einem Inkubator mit 5% CO₂ inkubiert, wovon jeden Tag 1 Teil/Gruppe geerntet und analysiert wurde.

2.2.2.24. Messungen des intrazellulären ROS

Zur Untersuchung des intrazellulären ROS-Levels wurde 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCF-DA, Merck, Darmstadt) verwendet. Die Tumorzellen wurden mit Phenolrot RPMI1640 mit 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin auf 1×10^5 Zell/mL eingestellt und 1 mL pro Well in 24-Well-Platte ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit Proben für 24 h behandelt. Danach wurden die Zellen mit PBS (enthält Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und in 10 µM DCF-DA in PBS (enthält Ca²⁺/Mg²⁺) bei 37°C für 30 min inkubiert. 10000 Zellen wurden mittels FACScalibur (Becton Dickinson) gemessen. Die Daten wurden mittels Cellquest-Software analysiert.

2.2.2.25. Messungen des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$)

Um die Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ zu messen, wurde die JC-1 (Invitrogen, Deutschland) mitochondriale Membranpotential Detektionsmethode verwendet. JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide) ist ein lipophiler kationischer Carbocyanin-Farbstoff, der in funktionell aktive Mitochondrien einlagert und je nach Höhe des Membranpotentials eine rote, bzw. grüne Fluoreszenz emittiert. Bei gesunden Zellen mit hohem mitochondrialen $\Delta\Psi_m$, bildet JC-1 spontan Aggregate in den Mitochondrien mit intensiver roter Fluoreszenz. Wohingegen JC-1 in apoptotischen oder kranken Zellen mit niedrigen $\Delta\Psi_m$ in seiner monomeren Form im Zytosom bleibt und eine grüne Fluoreszenz zeigt. Der Farbstoff wurde zunächst bei Raumtemperatur vorgewärmt und dann im Verhältnis 1:10 mit Phenolrot-freiem RPMI 1640 Flüssigmedium verdünnt. Die Tumorzellen wurden in Phenolrot-freiem RPMI 1640 Flüssigmedium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin auf 1×10^5 Zellen/mL eingestellt und je 1 mL pro Well

in einer 24-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach der Behandlung mit verschiedener Probe für 8 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 200 µL JC-1 Farblösung bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10000 Zellen mittels FACScalibur (Becton Dickinson) gemessen. Die Daten wurden mittels Cellquest-Software analysiert.

2.2.2.26. Gewinnung von Proteinen aus Tumorzellen

Die Zellen wurden dann mittels 0,05% EDTA (im PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) geerntet und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und nochmal zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet auf Eis gestellt. Danach wurde das Zellpellet mit 100 µL Lysepuffer resuspendiert, in 1,5 mL Röhrchen überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Schließlich wurde die Ultrazentrifugation (150.000 rpm, 30 min, 4°C) mit dem TLA-100.4 Rotor durchgeführt. Aus dem Überstand wurden die löslichen Proteine aus Zellen gewonnen.

Lysepuffer

1% Triton X-100

1 mM PMSF

2.2.2.27. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

Diese Methode beruht auf der Reaktion von Bicinchinonsäure (BCA) mit einwertigen Kupferionen in der Umgebung von Proteinen. Dabei wurden zweiwertige Kupferionen, in Anwesenheit von Proteinen und im alkalischen Medium, zu einwertigen Kupferionen reduziert, welche mit der Bicinchinonsäure reagieren. Dabei binden jeweils zwei Moleküle Bicinchinon mit einem Kupferionl und es entsteht eine violette Farbe. Die Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 50 : 1 gemischt. 200 µL davon wurden jeweils in ein Well einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 10 µL Proteinprobe hinzugegeben. Nach 30 min bei 37°C wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Standardreihe kalkuliert.

2.2.2.28. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad aufgetrennt werden. Das Gel wurde zwischen zwei vertikale Glasplatten gegossen und besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Zuerst wurde das 12% ige Trenngel hergestellt und mit Isopropanol beschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist, wurde der Isopropanol entfernt. Das 3,75% ige Sammelgel wurde danach hergestellt, auf das Trenngel gegeben und der Probentaschenkamm eingesteckt. Nach der Polymerisierung wurde der Kamm entfernt und die Elektrophorese-Kammer mit dem Elektrophoresepuffer befüllt. 50 µg Proteinprobe mit ddH₂O auf 20 µL aufgefüllt, anschließend mit 5 µL 5-fach konzentrierten SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Dadurch wurden die Proteine denaturiert und eventuell vorhandene Disulfidbrücken durch Zugabe von Reduktionsmitteln reduziert. Die Ladungen der Aminosäureseitenketten wurden durch SDS maskiert, sodass SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladung-Masse-Verhältnisse und ähnliche Form aufweisen. 5 µL Molekulargewichtstandard wurde auf das Gel aufgetragen und dient als Vergleich zum Ablesen der relativen Molekülmasse der Probe. Nachdem die Proben in die vorgesehenen Taschen aufgetragen wurden, wurde das Gel in die Kammer gebracht, mit Elektrophoresepuffer bedeckt und eine Spannung von 100 V angelegt. Nach ca. 90 min wurde die Auftrennung gestoppt.

<u>2 Trenngel</u>	12%	<u>2 Sammelgel</u>	4%
1,5 M Tris HCl pH 8,8	4 mL	0,5 M Tris HCl pH 8,8	2 mL
Rotiphorese Gel A	6,4 mL	Rotiphorese Gel A	750 mL
Rotiphorese Gel B	2,56 mL	Rotiphorese Gel B	300 mL
ddH ₂ O	3 mL	ddH ₂ O	3,45 mL
10% SDS	75 µL	10% SDS	50 µL
10% APS	150 µL	10% APS	75 µL

5x SDS Probepuffer

0,25M Tris-HCl pH 6,8
0,5M DTT

Elektrophoresepuffer

125 mM Glycin
24,8 mM Tris

10 % SDS

3,5 mM SDS

50 % Glycerol

25 % β -Mercaptoethanol

2.2.2.29. Western Blot

Nachdem die Proteine in einer SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, wurden sie auf eine Membran übertragen. Es wurden Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen verwendet. PVDF-Membranen müssen vor der Benutzung aktiviert werden, indem die Membranen für 5 min in 100% Methanol getaucht wurden. Das Gel wurde aus den Glasplatten entnommen und in den Blotpuffer gelegt. Ein Western Blot wurde in der folgenden Reihenfolge aufgebaut: Schlitten, Schwämme, vier Lagen Whatman-Papier, Membran, SDS-Gel und weiter dann vier Lagen Whatman-Papier, Schwämme und Schlitten. Alle Komponenten wurden zuvor im Blotpuffer getränkt. Das Western Blot wurde senkrecht in der Kammer aufgestellt, die mit Blotpuffer befüllt wurde. Anschließend wurde ein senkrecht zur zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Bei der Elektrophorese mit Spannung von 100v wurden Proteine von Gel nach Membranen übertragen. Transferqualität wurde durch Einlegen der Membran in Ponceau-Rot überprüft. Die sichtbaren Banden wurden nach der Ponceau-Rot-Färbung für 10 min. und anschließend 3x mit TBST Spülungen beobachtet.

Blotpuffer (pH 8,5)

187 mM Glycin

25 mM Tris

Antikörperinkubation

Die Proteine, die mittels Western Blot auf eine Membran gebracht wurden, wurden mittels spezifischer und markierter Antikörper detektiert. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h bei RT in einer Blocklösung mit 10% Magermilch gelöst in 1x TBST (Tris buffered saline mit 0,1% Tween-20) blockiert und anschließend mit 1x TBST gespült. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte in der entsprechenden Verdünnung über Nacht bei 4°C in TBST mit 5 % Magermilch. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 min mit 1x TBST entfernt, bevor der Sekundärantikörper, welche mit Peroxidase konjugierte ist,

für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C zugegeben wurde. Nach anschließendem dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz.

Blockpuffer

1x TBST

5% Magermilchpulver (Sucofin)

Entwicklung

Zum Nachweis der auf dem Immunoblot gebundenen Antikörper wurde die Membran mit dem Luminata Classico Western HRP Substrat inkubiert. Die Membran wurde dann aus der Flüssigkeit genommen, mit einem Papiertuch abgetupft und mit 1 mL Detektionsreagenz bedeckt. Nach einer Minute Inkubation wurde das Reagenz mit einem Papiertuch abgenommen. Die Membran wurde anschließend in einer Dunkelkammer zwischen zwei durchsichtige Folien gelegt und in einer Dunkelkammer auf einem Röntgenfilm (ECL, GE Healthcare) exponiert. Der Film wurde dann für 30 Sekunden bis 30 Minuten entwickelt und sichtbar gemacht.

Detektionsreagenz

-Lösung A: 200 mL 0,1M Tris HCL pH 8,6, 50 mg Luminol (Sigma)

-Lösung B: 11 mg Hydroxycoumarinsäure , 10 mL DMSD

-Entwicklung: für jede Membran wurde 2 mL Lösung A mit 200 µL Lösung B und 0,6 µL H₂O₂ (30 %) frisch zusammengemischt und auf der Membran gegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der biologischen Wirkungen der Fraktionen aus *G.lucidum*, *T. aurantia lba*, und *S. graminifolium*

Während der Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkung wurden unterschiedliche Fraktionen aus *G. lucidum*, *T. aurantia lba*, und *S. graminifolium* getestet. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Polysaccharid-Fraktionen benannt und je nach Herkunft vorgestellt. Die Herstellung und chemische Analyse von GLP20, GLPss58, JRP, JRP-SS und G2 sowie G4 wurden von unseren Kooperationspartner in der Shanghai Akademie für landwirtschaftlichen Wissenschaften durchgeführt. Die Herstellung und chemische Analyse von Sarg-Z wurden von unseren Kooperationspartner an der Shanghai Ozan Universität gemacht.

GLP20 ist eine Polysaccharid-Fraktion aus dem Fruchtkörper des *G. lucidums*. Die Isolierungsverfahren und chemische Struktur von GLP20 wurden von Liu. et al. (2014) beschrieben [139] (Abb. 3). Die Struktur zeigte, dass GLP20 ein β -(1-3)-verknüpftes D-Glucan mit einer β -(1-6)-D-Glucopyranosyl-Seitenverzweigungseinheit an jedem dritten Rest ist. Das Molekulargewicht von GLP20 ist $3,75 \times 10^6$ Da. GLPss58 ist die sulfatierte Form von GLP20. Die Herstellung von GLPss58 wurde von Zhang. et al (2017) beschrieben und die Sulfatierungsgrad (DS) von GLPss58 ist 0,58 [140].

JRP ist eine Polysaccharid-Fraktion aus *T. aurantia lba* und deren sulfatierte Form bezeichnet man als JRP-SS. Die Isolierungs- und Sulfatierungsmethode von JRP ist dieselben wie GLP20. JRP hat ein Molekulargewicht von $6,08 \times 10^6$ Da und einen Zuckergehalt von 85,24%. Ihr Zuckeranteil ist Galactose (1,93%), Glucose (29,87%), Xylose (22,14%), Mannose (39,94%) und Glucuronic acid (6,13%). Die Sulfatierungsgrad von JRP-SS ist 0,21.

Sarg-Z ist eine Fraktion aus *S. graminifolium*. Die Herstellung und chemische Charakterisierung von Sarg-Z wurden von Zhang et al. (2012, 2013) beschrieben [141, 142]. In die beiden Publikationen wurde Sarg-Z als SGP genannt. Sarg-Z ist eine Art homogenes Polysaccharide und ihr Molekulargewicht ist $1,19 \times 10^4$ Da. Sarg-Z hat einen Zuckergehalt von 75,68%, Proteingehalt von 0,12% und Sulfatgehalt von 10,13% [142]. Die chemische Struktur von Sarg-Z wurde in Abbildung 3 gezeigt.

Für die Untersuchung der Antitumorwirkungen wurden Fraktionen G2 und G4 von Triterpenoiden aus dem Fruchtkörper des *G. lucidum* verwendet. Weiterhin wurden die entsprechenden Mechanismen dieser Stoffe analysiert. Die chemische Struktur von G2 und G4 werden in Abbildung 3 angezeigt. Die Molekulargewichte von G2 und G4 sind jeweils 554,75 Da und 612,79 Da.

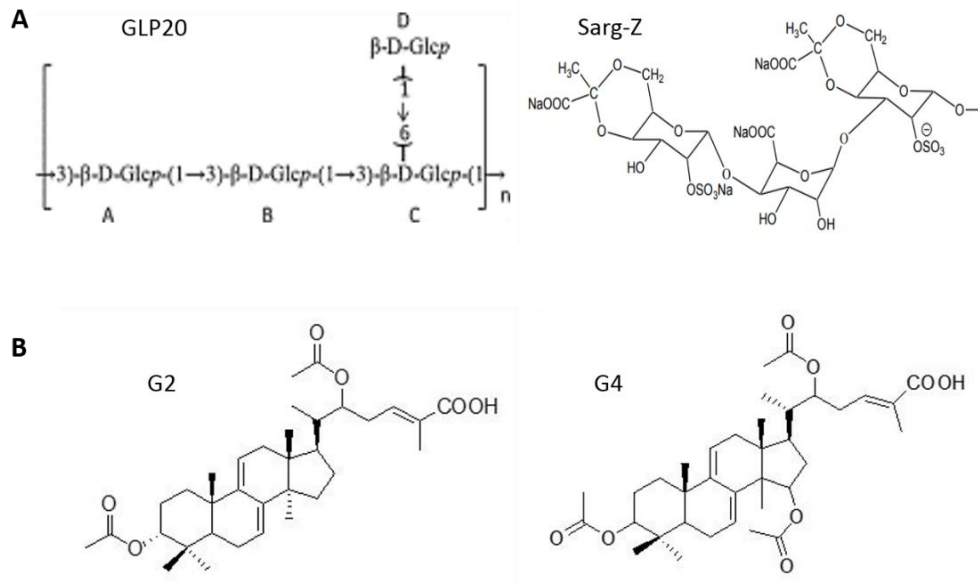


Abbildung 3: A) chemische Struktur von Wiederholungseinheiten von GLP20 [139] und Sarg-Z [141]. B) chemische Struktur von G2 und G4. Die Analyse der chemischen Struktur wurde von unsere Kooperationspartner durchgeführt.

3.2. Immunstimulierende Wirkungen der Polysaccharid-Fraktionen

3.2.1. Aktivierung von Makrophagen

3.2.1.1. Aktivierung von Makrophagen nach Stimulation durch Sarg-Z

Um die immunstimulierende Wirkung zu untersuchen, wurden zunächst die Reaktionen von Makrophagen zu den oben genannten unterschiedlichen Polysaccharid-Fraktionen untersucht. Für diese Experimente wurde die Maus Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen (BMMs, Bone Marrow-Derived Macrophages) aus C57Bl/6 Mäusen isoliert. Die BMMs wurden jeweils mit den im vorangegangenen Kapitel bereits vorgestellten Fraktionen GLP20, GLPss58, JRP, JRP-SS und Sarg-Z für drei Tage behandelt. Als positive Kontrolle wurde Lipopolysaccharid (LPS) verwendet.

Die relative Aktivierungsrate wurde mittels des Alamar-Blue-Assays gemessen, und mit PBS als negative Kontrolle (Phosphatgepufferte Salzlösung) verglichen. Es wurde

gefunden, dass Sarg-Z BMMs bereits ab 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aktivieren konnte (Abb. 4C), während bei den anderen Fraktionen im Bereich von 1–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ keinerlei Wirkungen beobachtet wurde (Abb. 4). Abb. 4C stellt die konzentrationsabhängige immunstimulierende Wirkung von Sarg-Z auf Makrophagen dar.

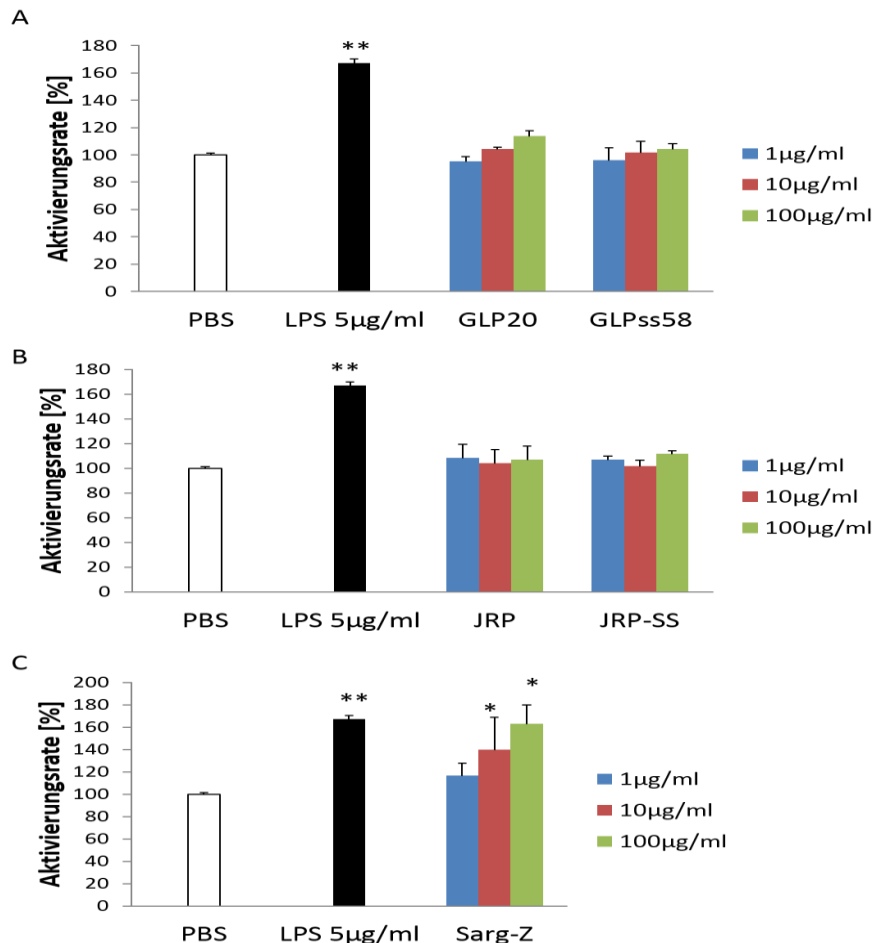


Abbildung 4: Untersuchung der Wirkungen verschiedener Polysaccharid-Fractionen auf die Aktivierung der BMMs. BMMs wurde mit den einzelnen Polysaccharid-Fractionen für 72 h behandelt. Die Aktivierungsrate wurde mittels des Alamar Blue Assays gemessen. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des Zweistichproben-t-Tests (paired t Test) wird die spezifische Signifikante berechnet * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

3.2.1.2. Induktion der Produktion von NO aus BMMs nach Stimulation durch Sarg-Z

Makrophagen sind in der Lage, nach deren Aktivierung NO zu produzieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Sarg-Z BMMs stimulieren kann, um NO zu produzieren. Für dieses Experiment wurden BMMs 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sarg-Z behandelt, und eine signifikante, aber

dosisabhängige NO-Produktion wurde gemessen (Abb. 5). Das bedeutet, dass Sarg-Z eine stimulierende Wirkung auf Makrophagen hat.

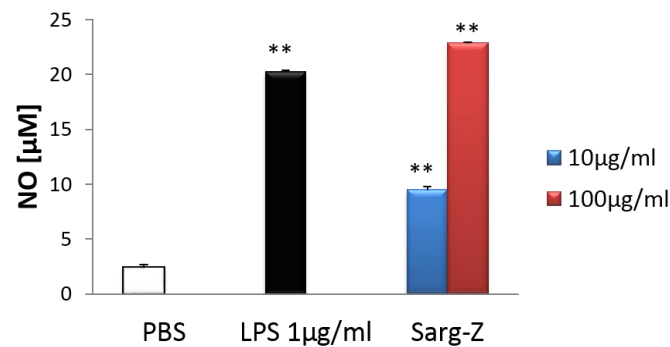


Abbildung 5: Untersuchung der NO-Produktion von BMMs nach der Stimulation durch Sarg-Z. BMMs wurde von Sarg-Z mit unterschiedlichen Konzentrationen für 48 h *in vitro* behandelt. Die Überstände wurde gesammelt und auf NO analysiert. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, **= $p<0,01$.

3.2.1.3. Induktion der Sekretion von IL-1 β und dem Tumornekrosefaktor TNF- α aus BMMs nach Stimulation durch Sarg-Z

In dem oben erwähnten Experiment konnte gezeigt werden, dass Sarg-Z Makrophagen aktivieren kann. Nach Aktivierung können Makrophagen viele verschiedene immunmodulatorische Substanzen ausschütten, wie beispielweise die beiden Zytokine TNF- α und IL-1 β , welche derzeit als die primären Mediatoren bei der Abtötung von Tumorzellen gelten.

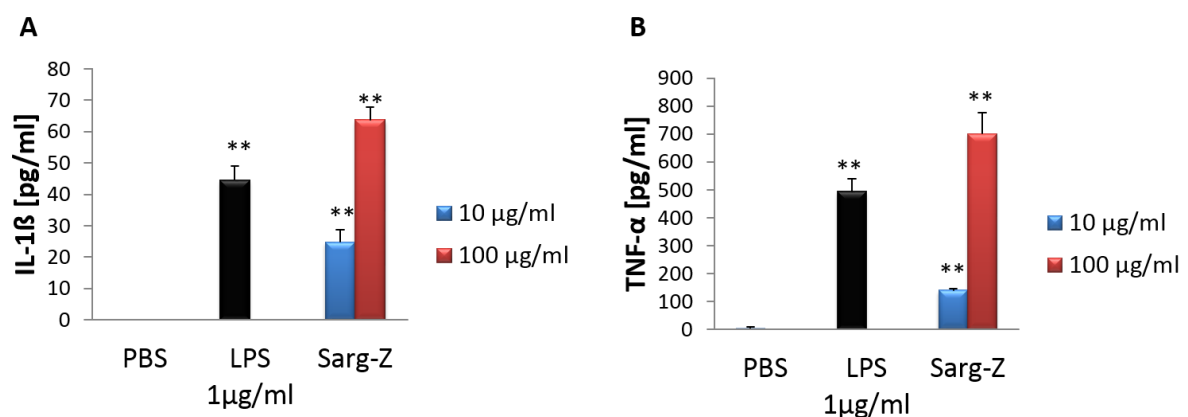


Abbildung 6: Untersuchung der Sekretion von IL-1 β und TNF- α aus BMMs nach der Stimulation durch Sarg-Z. BMMs wurde von Sarg-Z mit unterschiedlichen Konzentration für 48 h *in vitro* behandelt. Die Überstände wurde gesammelt und auf IL-1 β (A) und TNF- α (B) analysiert. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander

unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikanz berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$.

Abbildung 6A und 6B zeigen die erhöhte Sekretion von Zytokinen IL-1 β und TNF- α von BMMs nach Behandlung durch Sarg-Z. Diese Fraktion induzierte eine konzentrationsabhängige Zunahme der IL-1 β - und TNF- α -Sekretion von BMMs.

3.2.1.4. Erhöhung der Phagozytose der BMMs nach Stimulation durch Sarg-Z

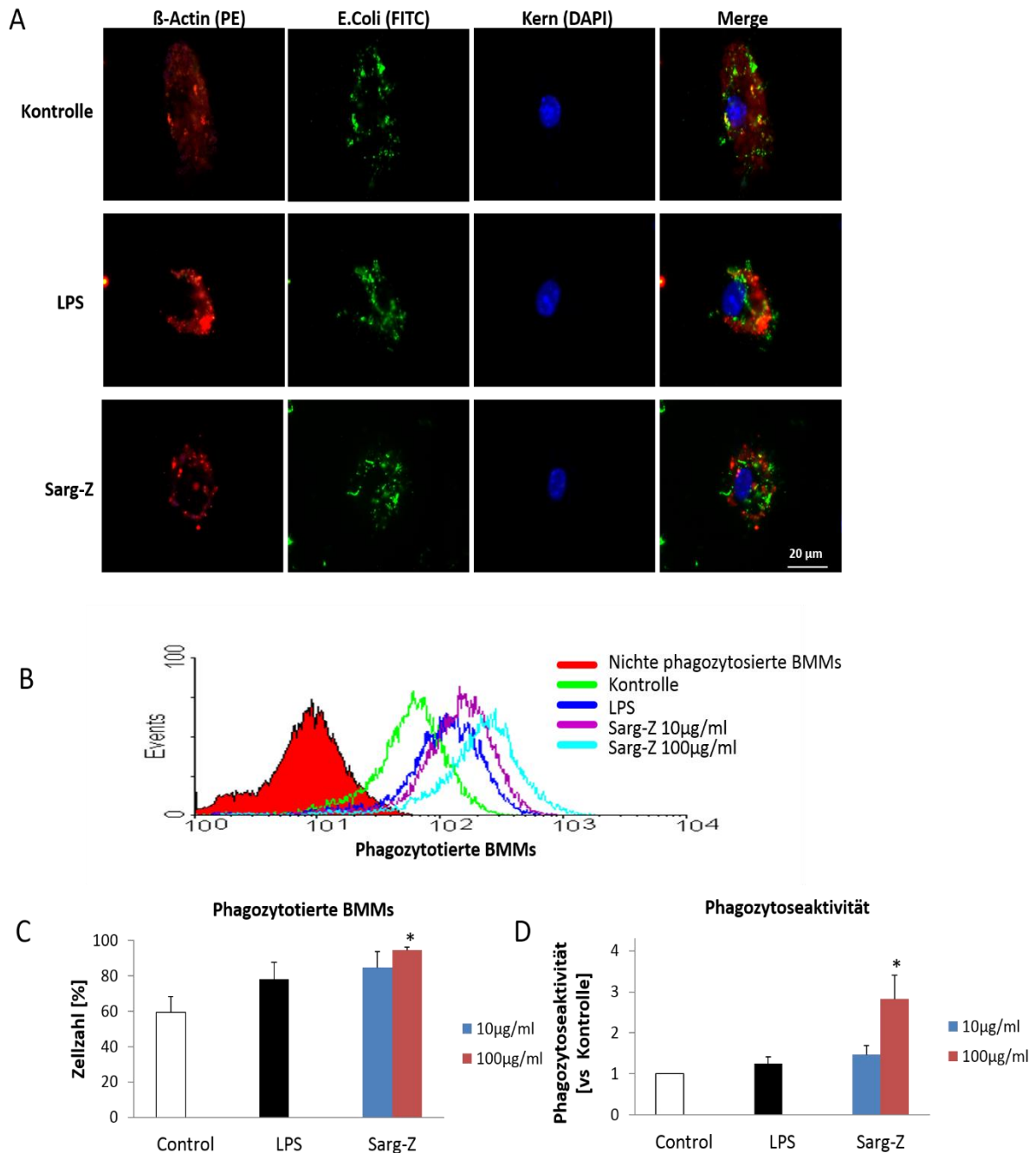


Abbildung 7: Untersuchung der Phagozytose der BMMs nach der Stimulation durch Sarg-Z. A) Fotografische Aufnahme der Phagozytose der BMMs durch Fluoreszenzmikroskopie. Die Zellen wurden mittels PE-Anti- β -Actin Antikörper angefärbt

und die Zellkerne mit DAPI. *E. coli*-Zellen wurden mit FITC markiert (grün). **FACS-Analyse B) der FITC-Intensität der BMMs, C) der Prozentsatz der phagozytierten BMMs und D) Phagozytoseaktivität der BMMs.** BMMs wurden mit Sarg-Z (10-, 100 µg/mL), LPS (1 µg/mL) oder PBS als Kontrolle für 24h bei 37°C *in vitro* behandelt, dann mit FITC-markierten *E. coli*-Bakterien für 90 min kultiviert. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet $*=p<0,05$, $**=p<0,01$.

Ein Merkmal von Makrophagen bei der Immunabwehr *in vivo* ist die Aufnahme und Zerstörung von infizierten Krankheitserregern, beispielweise Bakterien durch Phagozytose. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass BMMs, die mit PBS, Sarg-Z oder LPS behandelt wurden FITC-markierte *E. coli* Bakterien aufnahmen (Abb. 7A).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die FITC-Intensitäten proportional zur aufgenommenen Menge an Bakterien ist. Sarg-Z erhöhte signifikant die Aufnahme von Bakterien in BMMs (Abb. 7B). Die Menge der aufgenommenen Bakterien durch BMMs wurde mittels Flow Zytometrie gezählt. Bei Behandlung von BMMs mit je 100 µg/mL Sarg-Z konnten diese Menge von 60% auf 90% erhöht werden (Abb. 7C). Die Fluoreszenz-Intensität der Bakterien, die sich in gleichmäßigen phagozytierten BMMs aufgetreten war, wurde in dieser Arbeit als Phagozytoseaktivität definiert. Bei einer Konzentration von 100 µg/mL, konnte Sarg-Z eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität von BMMs jeweils um das ca. 3- oder 4-fache stimulieren (Abb. 7D). Diese stimulierenden Effekte von Sarg-Z auf die Phagozytose der BMMs sind konzentrationsabhängig (Abb. 7B-C).

3.2.2. Aktivierung der Lymphozyten

3.2.2.1. Erhöhung der Proliferationsrate von Maus-Milz Lymphozyten (MSLs) nach Stimulation durch Sarg-Z

In vorherigeren Kapitel (s. Abb. 4) wurde nachgewiesen, dass nur Polysaccharid-Fraktion Sarg-Z aus allen getesteten Polysaccharid-Fractionen die Aktivierung von Makrophagen stimulieren kann. Es wurde weiterhin untersucht, ob die unterschiedlichen Polysaccharid-Fractionen eine immunstimulatorische Wirkung auf Lymphozyten haben.

Dafür wurden die Lymphozyten aus der Milz aus C57Bl/6 Mäusen isoliert. Die MSLs wurden jeweils mit den verschiedenen Polysaccharid-Fractionen und mit unterschiedlicher Konzentration für 72 h behandelt. PBS wurde als negative Kontrolle

verwendet und LPS und Concanavalin A (ConA), welche die bekanntesten Aktivatoren jeweils für B-Zellen und T-Zellen von Mäusen sind, wurden in diesem Experiment als positive Kontrollen verwendet. Danach wurden die entsprechenden Proliferationsraten von MSLs durch Alamar-Blue-Assay analysiert. Abbildung 8A und B zeigen, dass die Rohfraktionen GLP20 und JRP sowie ihre sulfatierte Form keine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von MSLs hatten, während LPS und ConA die Proliferationsraten von MSLs jeweils um ca. 300% bzw. 200% erhöhten. Im Gegensatz dazu wurde die Proliferationsrate von MSLs nach der Behandlung mit Sarg-Z deutlich erhöht (Abb. 8C). Diese zunehmenden Proliferationsraten waren von der Konzentration der jeweiligen Polysaccharid-Fraktion abhängig. Bei einer Konzentration von 500 µg/mL konnten Sarg-Z die Proliferationsrate der MSLs um mehr als 4-fache erhöhen (Abb. 8C). Das bedeutet, dass Sarg-Z eine immunstimulatorische Wirkung auf Lymphozyten hat.

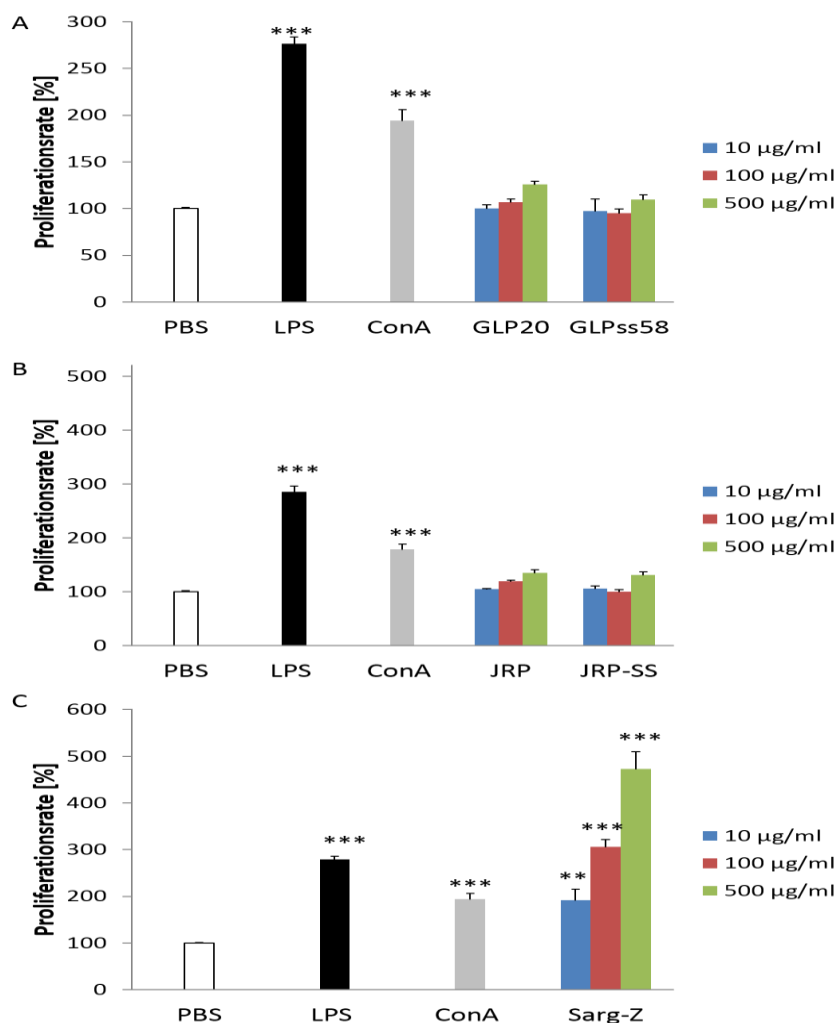


Abbildung 8: Untersuchung der Proliferationsrate der MSLs nach der Behandlung von verschiedenen Fraktionen. PBS wurde als negative Kontrolle, LPS (25 µg/mL) und ConA (5

$\mu\text{g/mL}$) wurden als positive Kontrolle verwendet. MSLs wurden mit unterschiedlichen Fraktionen bei 37°C für 72h behandelt. Die Proliferationsraten wurden durch die Methode von Alamar-Blue-Assay gemessen. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$.

3.2.2.2. Erhöhung des prozentualen Anteils von der B-Zellpopulation nach Stimulierung durch Sarg-Z

Um herauszufinden, welche Zellpopulation von MSLs bei der Behandlung von Sarg-Z ausbreitet werden, wurden FITC-markierte Antikörper gegen T-Lymphozytenmarker CD3 und PE-markierte Antikörper gegen B-Lymphozytenmarker CD19 verwendet und die entsprechende Zellpopulation nach Stimulation durch Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 9 zeigt, dass, ähnlich wie LPS, Sarg-Z die Proliferation von B-Zellen (CD19^+) signifikant stimulieren konnte. Nach Behandlung von Sarg-Z mit $100 \mu\text{g/mL}$ für 48 h wurden die Prozentsätze der B-Zellpopulation von 9,7% jeweils auf 35,1% erhöht, während der Prozentsätze der T-Zellpopulation reduziert wurden (Abb.9).

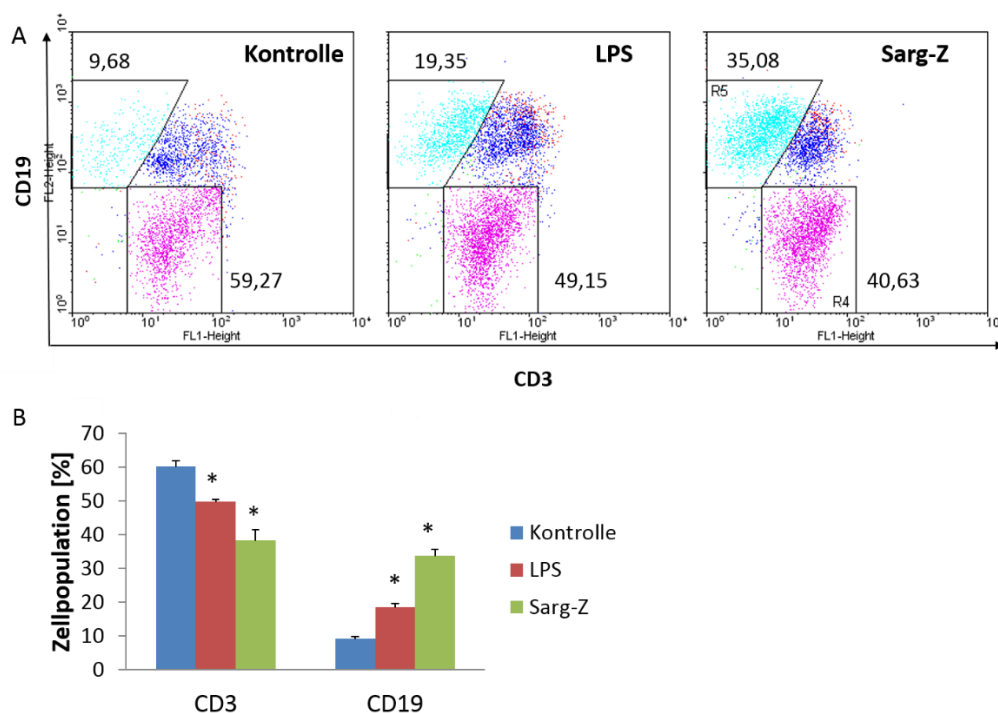


Abbildung 9: Untersuchung der Subpopulationen der MSLs nach der Stimulation durch Sarg-Z. A) Durchflusszytometrie von CD3^+ (T-Zellen) und CD19^+ (B-Zellen) in MSLs nach der Behandlung mit Sarg-Z. B) Auswertung der Ergebnisse und Darstellung im Säulendiagramm. MSLs wurden mit PBS (negative Kontrolle), LPS ($25 \mu\text{g/mL}$) oder Sarg-Z ($100 \mu\text{g/mL}$) bei 37°C für 48 h behandelt. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von

zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$.

3.2.2.3. Sekretion von gesamte Immunglobulin aus MSLs nach Stimulation durch Sarg-Z

Die Wirkungen von Sarg-Z auf B-Zellen wurden weiter untersucht, ob die Konzentration von gesamte Immunglobulin in dem Medium erhöht. Abbildung 10 zeigt, dass die Sekretion von Immunglobulin aus MSLs nach Behandlung von Sarg-Z induziert werden. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ war die Wirkung von Sarg-Z auf die Sekretion von Immunglobulin deutlich stärker als die von LPS (25 $\mu\text{g/ml}$).

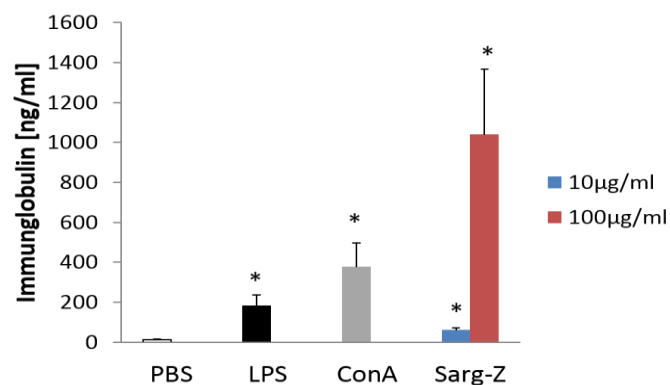


Abbildung 10: Untersuchung der Induktion der Immunglobulin-Produktion aus MSLs nach Behandlung durch Sarg-Z. MSLs wurden mit PBS (negative Kontrolle), LPS (25 $\mu\text{g/ml}$), ConA (5 $\mu\text{g/ml}$) oder Sarg-Z (100 $\mu\text{g/ml}$) bei 37°C für 72 h behandelt. Der Überstand wurde gesammelt. Die Immunglobulin-Konzentration wurde mittels der ELISA-Methode gemessen. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des Paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$.

3.2.2.4. Erhöhung des prozentualen Anteils der CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven T-Zellpopulation in MSLs nach Stimulation durch Sarg-Z

T-Zellen mit unterschiedlichen Zellfunktionen lassen sich in zwei Unterformen einteilen: Eine davon sind CD4⁺ Lymphozyten, die durch Sekretion unterschiedlicher Zytokine an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind. Diese Zellformen werden als T-Helferzellen bezeichnet. Zu der zweiten Unterform gehört die zytotoxische T-Zelle, die durch CD8⁺ Lymphozyten auf der Oberfläche gekennzeichnet sind. Sie können den programmierten Zelltod der defekten Zellen auslösen, indem sie die auf MHC-I-Molekülen präsentierten Antigene erkennen. Abbildung 9 zeigt, dass Sarg-Z keine stimulierende Wirkung auf die Proliferationsrate von T-Zellen in MSLs hatte, aber es ist noch unklar, ob das Verhältnis zwischen CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten in T-Zellen

verändert werden. Um dies zu untersuchen, wurden Anti-CD8(FITC)- und Anti-CD4(PE)-Antikörper verwendet und die entsprechende Zellpopulation nach Stimulation durch Durchflusszytometrie analysiert. Es wurde gefunden, dass eine erhöhte CD4⁺/CD8⁺ doppelte positive T-Zellpopulation detektiert wurde, wohingegen die einzelnen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen verringert wurde (Abb.11). Nach 48 h Behandlung durch Sarg-Z erhöhte sich die Menge der CD4⁺/CD8⁺ doppelt positiven T-Zellpopulation von 1,6% auf jeweils 9,7% (Abb.11). Vielen Studien haben bereits bewiesen, dass die CD4⁺/CD8⁺ doppelt positive Population zu den T-Gedächtniszellen gehören, wobei man bei den Gedächtnis-T-Zellen CD4- beziehungsweise CD8-positive Zellen voneinander unterscheidet. Darüber hinaus unterscheidet man innerhalb dieser zwei Typen mindestens zwei funktionell unterschiedliche Gruppen, nämlich zum einen die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und zum anderen die zentralen Gedächtnis-T-Zellen. Beide Gruppen kommen bei CD4- als auch bei CD8-positiven Gedächtnis-T-Zellen vor. Sie werden durch Expression von CD4⁺ auf CD8⁺-T-Lymphozyten gebildet und optimieren die zellvermittelte Immunität von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Viren und Alloantigene *in vivo* [143]. Daher wird angenommen, dass Sarg-Z die CD4⁺-Expression auf CD8⁺-T-Zellen stimulieren und die zytotoxische Wirkung von CD8⁺-T-Zellen hochreguliert werden kann.

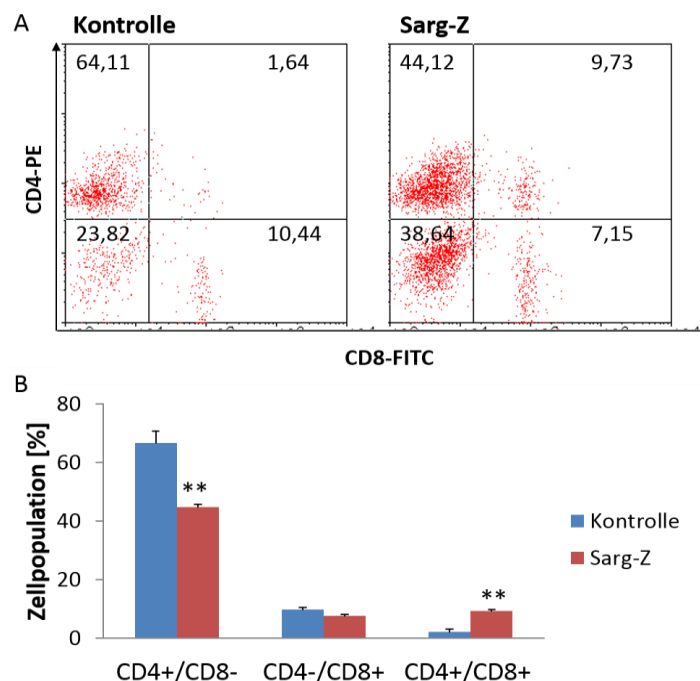


Abbildung 11: Untersuchung der Subpopulationen der T-Lymphozyten nach der Stimulation durch Sarg-Z. A) Durchflusszytometrie von CD4⁺ (T-Helferzellen) und CD8⁺ (B-Zytotoxische T-Zellen) nach Behandlung. MSLs wurden mit PBS (negative Kontrolle),

Sarg-Z (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bei 37°C für 48 h behandelt. **B) Auswertung und Darstellung der Ergebnisse im Säulen-Diagramm.** Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des Paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$.

3.2.2.5. Kein Einfluss von Sarg-Z auf die Aktivierung der T-Zellen der MLSs

Sullivan et al. haben berichtet, dass die CD4⁺-Hochexpression auf CD8⁺-T-Zellen in peripheren Blut mononuklearer Zellen (PBMC) als zusätzlicher Marker für die Identifizierung aktivierter CD8⁺-T-Zellen fungieren kann [144]. Um herauszufinden, ob die T-Zellen nach der Behandlung mit Sarg-Z aktiviert werden können, wurde ein PE-markierter Antikörper gegen CD69, der auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, verwendet. Abbildung 12 zeigt, dass Sarg-Z nach Behandlung für 48 h mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kaum MSLs aktivierten konnte. ConA mit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diente als positive Kontrolle und konnte ca. 20% der T-Zellen aktivieren (Abb. 12).

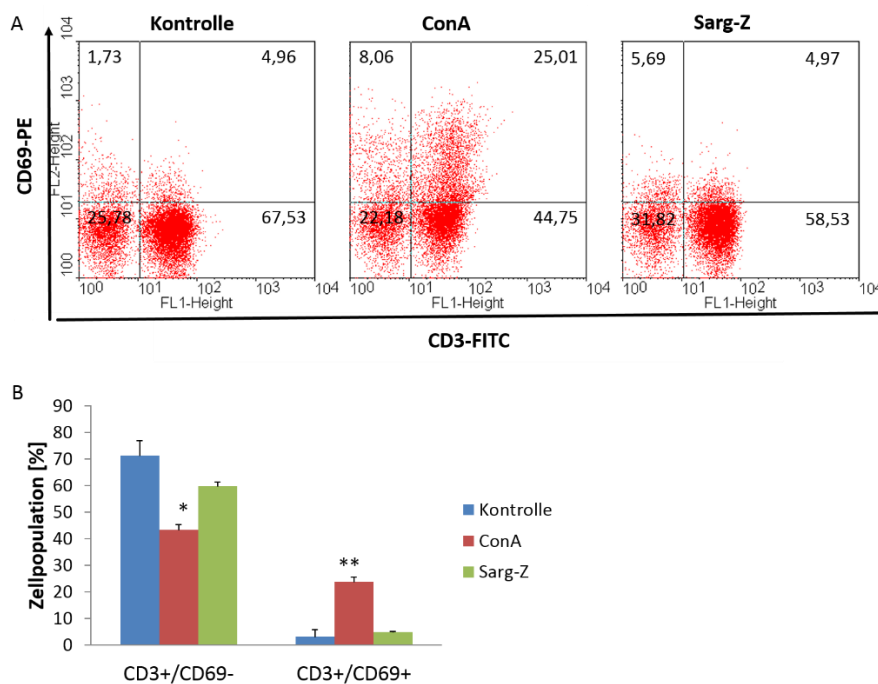


Abbildung 12: Untersuchung des Einflusses von Sarg-Z auf die Aktivierung der T-Lymphozyten von MSLs. A) Durchflusszytometrie der aktivierenden T-Zellen mit Expression von CD69 (CD3⁺/CD69⁺ doppelt positive) nach Behandlung. MSLs wurde mit PBS (negative Kontrolle), ConA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), oder Sarg-Z (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bei 37°C für 48 h behandelt. **B) Auswertung und Darstellung der Ergebnisse im Säulen-Diagramm.** Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$.

3.2.2.6. Sekretion von IL-6 der MSLs nach Stimulation durch Sarg-Z

Ein Merkmal aktivierender Lymphozyten ist es, die verschiedenen Zytokine zu sezernieren. Es wurde untersucht, ob Sarg-Z die MSLs Sekretion von Zytokinen, insbesondere von IL-2, IL-4, IL-6 und IFN- γ , induzieren kann. Abbildung 13 zeigt, dass MSLs nach Stimulation mit Sarg-Z nur IL-6 sekretierten. Da IFN- γ , IL-2 und IL-4 durch aktivierte T-Zellen, IL-6 aber hauptsächlich durch aktivierte B-Zellen von MSLs produziert werden, wurde geschlossen, dass Sarg Z nur die Aktivierung von B-Zellen in MSLs stimulieren konnte (Abb. 9 und 10), aber keinerlei Wirkung auf T-Zellen haben (Abb. 12).

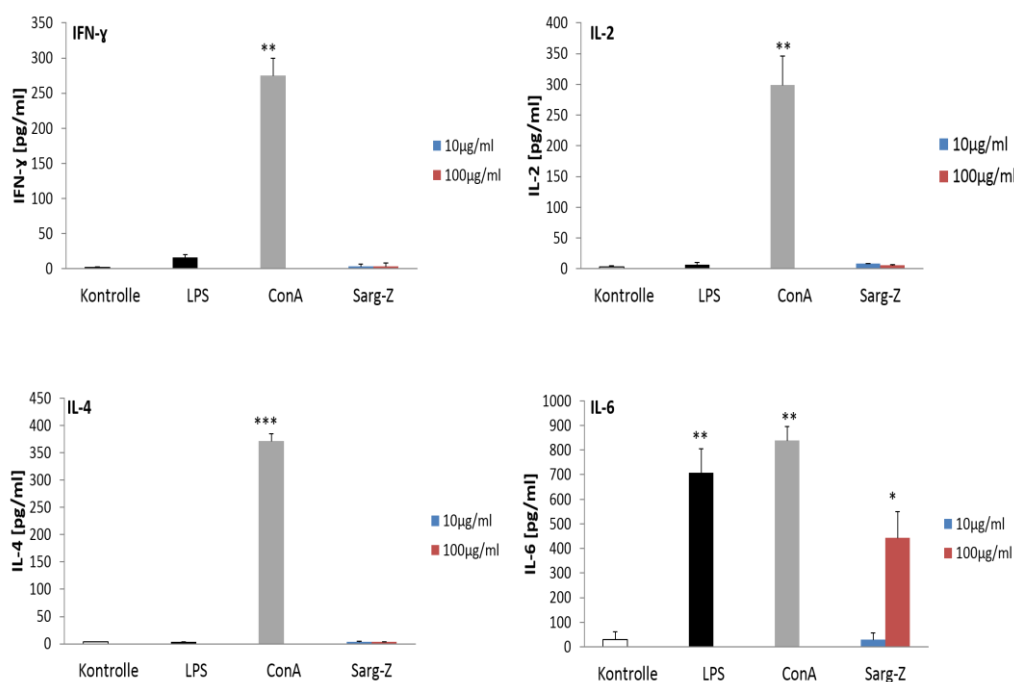


Abbildung 13. Untersuchung des Einflusses von Sarg-Z auf die Sekretion verschiedener Zytokine. MSLs wurden mit PBS (negative Kontrolle), LPS (25 $\mu\text{g/ml}$), ConA (5 $\mu\text{g/ml}$) oder Sarg-Z (100 $\mu\text{g/ml}$) bei 37°C für 72 h behandelt. Die Überstände wurden gesammelt. Die verschiedenen Zytokin-Konzentrationen in Überständen wurden mittels der ELISA-Methode gemessen. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird der spezifische Signifikante berechnet, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

3.2.2.7. Erhöhung der Proliferationsrate von HPBLs nach Stimulierung durch Sarg-Z

Bei der Untersuchung der immunstimulierenden Wirkung aller Polysaccharid-Fractionen wurde festgestellt, dass die Fraktion Sarg-Z die Immunzellen von Mäusen, insbesondere von Knochenmark- abgeleiteten Makrophagen (BMMs) und Maus-Milz

B-Lymphozyten (MSLs), *in vitro* aktivieren kann. Ob es sich um ähnliche Ergebnisse in humanen Immunzellen handelt, insbesondere in humanen peripheren Blutlymphozyten (HPBLs), wurde untersucht. Phytohaemagglutinin (PHA) mit 5 µg/mL wurde als positive Kontrolle verwendet. Nach Inkubationen für 72 h wurde die entsprechende Proliferationsrate von HPBLs durch Alamar-Blue-Assay analysiert. Abbildung 14 zeigt, dass nur Sarg-Z die Proliferation von HPBLs *in vitro* dosisabhängig stimulieren kann, während die anderen Polysaccharid-Fractionen keinerlei stimulierende Wirkung auf HPBLs aufwiesen. Das Ergebnis von den HPBLs stimmt mit den Ergebnissen von den MSLs überein.

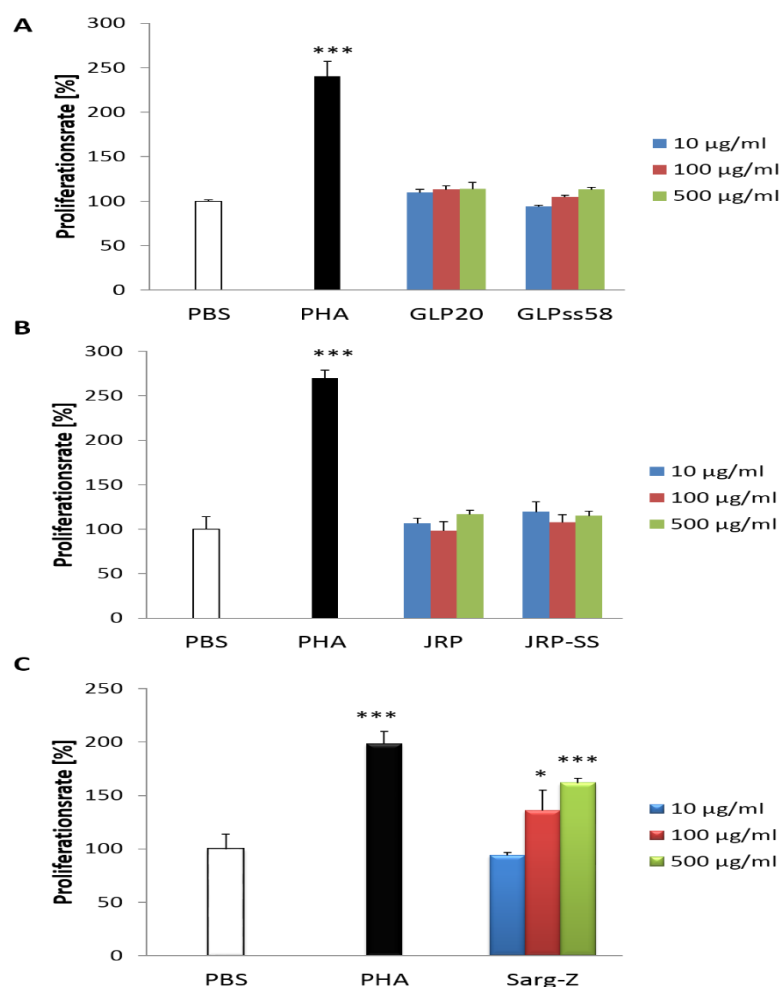


Abbildung 14: Untersuchung des Einflusses verschiedener Fraktionen auf die Proliferation von HPBLs. HPBLs wurden mit PBS (negative Kontrolle), PHA (5 µg/mL) oder Sarg-Z (100 µg/mL) bei 37°C für 72 h behandelt. Die Proliferationsrate wurde mittels der Alamar Blue Assay analysiert. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

3.2.2.8. Erhöhung des prozentualen Anteils der CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven T-Zellpopulation von HPBLs nach Stimulation durch Sarg-Z

Die Anti-CD3 (FITC)-, anti-CD19 (PE)-, anti-CD4 (FITC)- und anti-CD8 (PE)-Antikörper wurden verwendet, um herauszufinden, welche Zellpopulation der HPBLs durch Sarg-Z stimuliert wird. Der prozentuale Anteil der entsprechenden Zellpopulationen wurde nach Stimulation mittels Durchflusszytometrie analysiert.

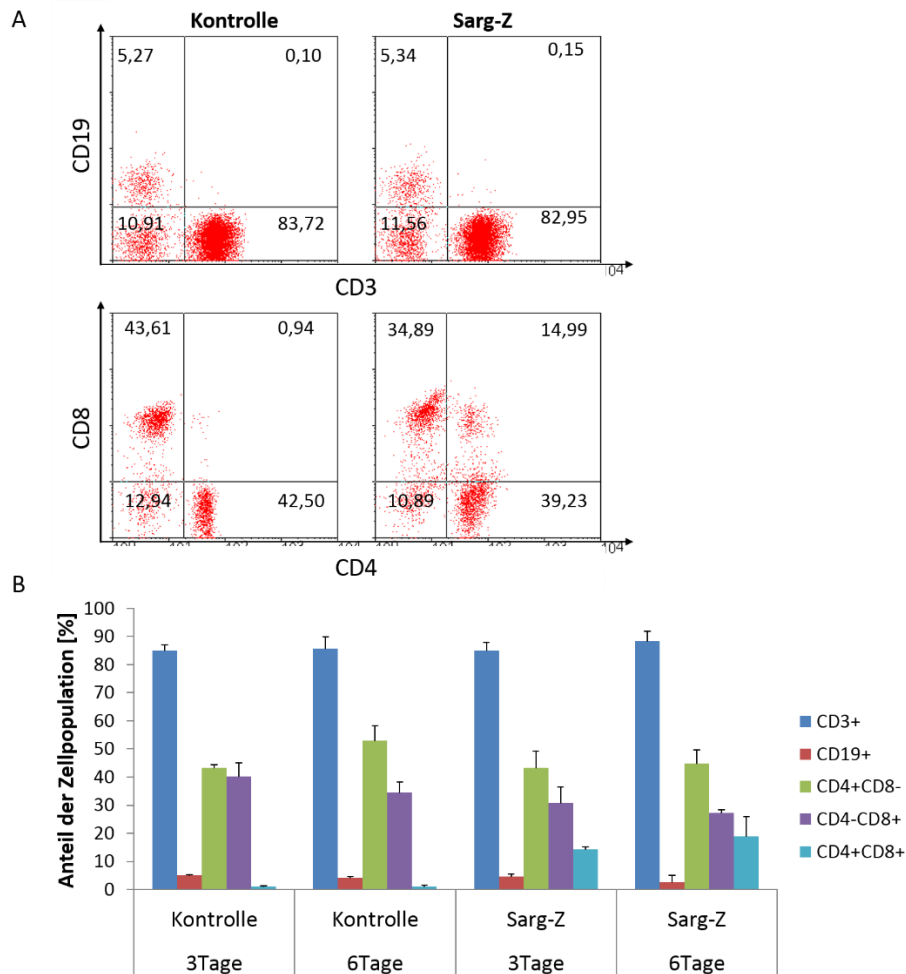


Abbildung 15: Analyse der Subpopulationen von HPBLs nach Stimulation durch Sarg-Z. A) Durchflusszytometrie von CD3⁺ (T-Zellen), CD19⁺ (B-Zellen), CD4⁺ (T-Helferzellen) und CD8⁺ (B-Zytotoxische T-Zellen) nach Behandlung. HPBLs wurden mit PBS (negative Kontrolle) oder Sarg-Z (100 µg/mL) für 3 Tage behandelt. **B) Auswertung und Darstellung der Ergebnisse im Säulen-Diagramm.** Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte ± SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen.

Die prozentualen Anteile von B-Zellen (CD19⁺) und T-Zellen (CD3⁺) zeigten keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle, nachdem sie von Sarg-Z mit 100 µg/mL behandelt wurden (Abb. 15A). Der prozentuale Anteil von CD4⁺ T-Zellen am 6. Tag war höherer als am 3. Tag bei der Kontrolle. Im Vergleich dazu zeigten die mit Sarg-Z

behandelten CD4⁺ T-Zellen keinen Unterschied zwischen dem 3. und 6. Tag (Abb. 15B). Der Anteil von CD8⁺ T-Zellen am 6. Tag war niedriger als am 3. Tag bei der Kontrolle. Im Vergleich zur Kontrolle verringerten Sarg-Z die CD8⁺ T-Zellpopulation zeitabhängig, wenn auch nur geringfügig (Abb. 15B). Im Gegensatz zu den oben genannten vier Populationen wurde nach der Behandlung mit Sarg Z eine signifikant erhöhte CD4⁺CD8⁺ doppelt-positive Zellpopulation gefunden (Abb. 15). Dieses Ergebnis wurde auch bei der Untersuchung von MSLs *in vitro* nachgewiesen (Abb. 11), aber bis heute ist es noch nicht geklärt, wie diese Zellpopulation auftrat. Im Gegensatz zu MSLs zeigt Sarg-Z keine Wirkung auf die Proliferation von B-Zellen in HPBLs.

3.2.2.9. Aktivierung der CD8⁺ T-Zell der HPBLs nach Stimulation durch Sarg-Z

In MSLs wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺ CD8⁺ doppelt positiven T-Zellen durch Sarg Z bzw. Sarg S erhöht (Abb. 9), aber nicht aktiviert (Abb. 11). Basierend auf dem Bericht von Sullivan et al. (2001) kann CD4 auf CD8⁺ T-Zellen als zusätzliche Marker von aktivierten CD8⁺ T-Zellen in peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) exprimiert werden [144], deswegen sollten die CD4⁺CD8⁺ doppelt positive T-Zellen aktiviert sein. Es wurde untersucht, ob aktivierende T-Zellen, die mit Sarg-Z behandelt wurden, auftreten können. Dafür wurden anti-CD3 (PE), anti-CD8 (Apc) und anti-CD69 (FITC) verwendet.

Abbildung 16A zeigt das FACS-Ergebnis der HPBLs, die durch Sarg-Z mit 100 µg/mL für 3 Tage behandelt wurden. Es konnte festgestellt werden, dass der prozentuale Anteil der CD3⁺CD69⁻ sowie der CD8⁺CD69⁻-Population, den jeweils die aktivierenden T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen entsprechen, waren nach der Behandlung durch Sarg-Z höher als in der Kontrolle. Abbildung 16B fasst die aktivierenden oder nicht aktivierenden T-Zellen bzw. CD8⁺-T-Zellen nach Behandlung mit jeweils PBS oder Sarg-Z zusammen. Nach sechs tägiger Behandlung mit Sarg-Z wurden jeweils 21% aktivierende T-Zellen nachgewiesen, wovon 15% aktivierende zytotoxische CD8⁺-T-Zellen waren. Das bedeutet, dass in HPBLs die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen hauptsächlich durch Sarg-Z aktivieren wurden.

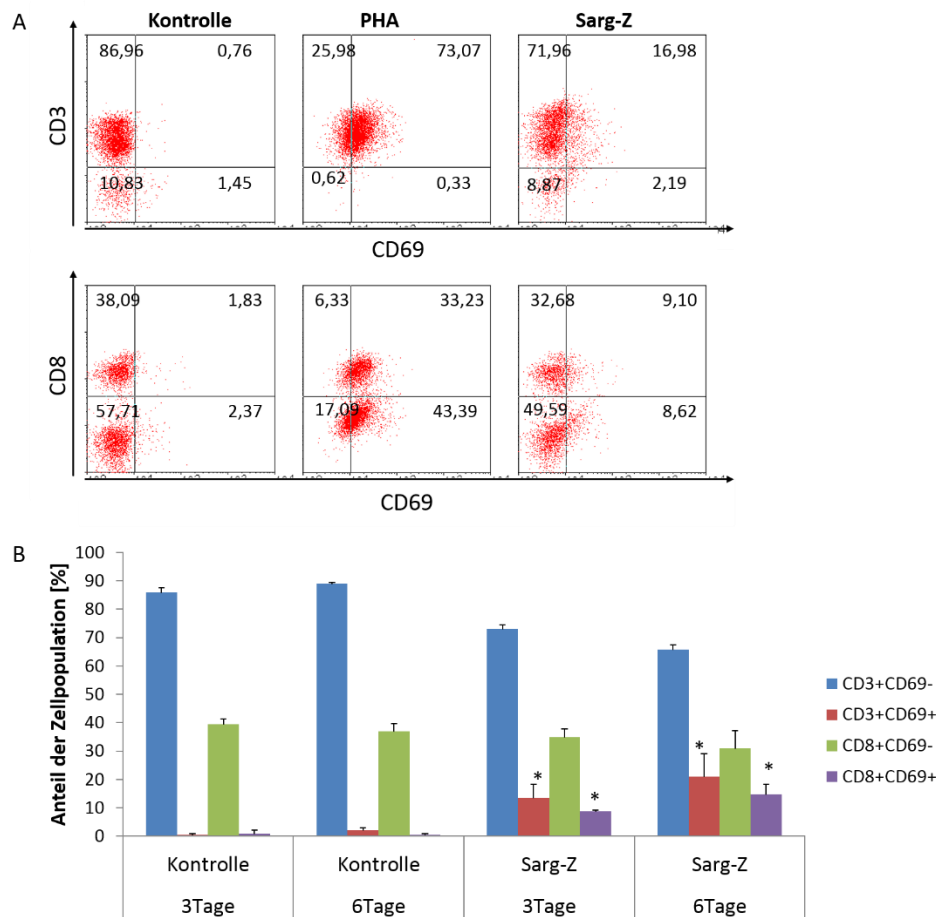


Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses von Sarg-Z auf CD8⁺ T-Zellen von HPBLs. A) Durchflusszytometrie von CD3⁺CD69⁺ (aktivierende T-Zellen) und CD8⁺CD69⁺ (aktivierende zytotoxische T-Zellen) nach Behandlung. HPBLs wurden mit PBS (negative Kontrolle), PHA (5 µg/mL), oder Sarg-Z (100 µg/mL) bei 37°C für 3 Tage behandelt. **B) Auswertung und Darstellung der Ergebnisse im Säulen-Diagramm.** Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte ± SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$.

3.2.2.10. Induzierung der Zytotoxizität von HPBLs gegen Tumorzellen durch Sarg-Z

Im menschlichen Körper (*in vivo*) können zytotoxische T-Zellen die von Pathogenen infizierten Zielzellen töten, indem sie fremde Peptide aus Pathogenen erkennen, die an MHC-I-Moleküle an der Zelloberfläche gebunden sind. Danach aktivieren zytotoxische T-Zellen und setzen spezielle lytische Granula frei. Diese Granula enthalten spezifische Zytokine: Granzyme und Perforine. Die Granzyme können den programmierten Zelltod der Zielzellen induzieren. Das Protein Perforin führt zur Bildung von Poren auf den Zielzellmembranen, wodurch die Granzyme in die Zellen gelangen können [145]. Aktivierende zytotoxische T-Zellen können auch den

membrangebundenen Fas-Ligand exprimieren. Durch Bindung des Fas-Liganden auf der Oberfläche der Zielzellen kann eine Apoptose der Zielzellen induziert werden [146].

Es wurde nachgewiesen, dass zytotoxische T-Zellen von HPBLs durch *in vitro* Behandlung mit Sarg-Z aktiviert werden können (Abb. 16). Um deren zytotoxische Wirkung zu untersuchen, wurden HPBLs in Gegenwart von MCF7-Zellen (MCF7-Zellen : HPBLs= 1 : 10) mit Sarg-Z für 24 h stimuliert. Abbildung 17A zeigt, dass sich die relative Zellzahl von MCF7-Zellen in Gegenwart von HPBLs nach Behandlung mit Sarg-Z dosisabhängig verringert, während Sarg-Z selbst keinen Einfluss auf das Wachstum von MCF7-Zellen hat (Abb. 17B).

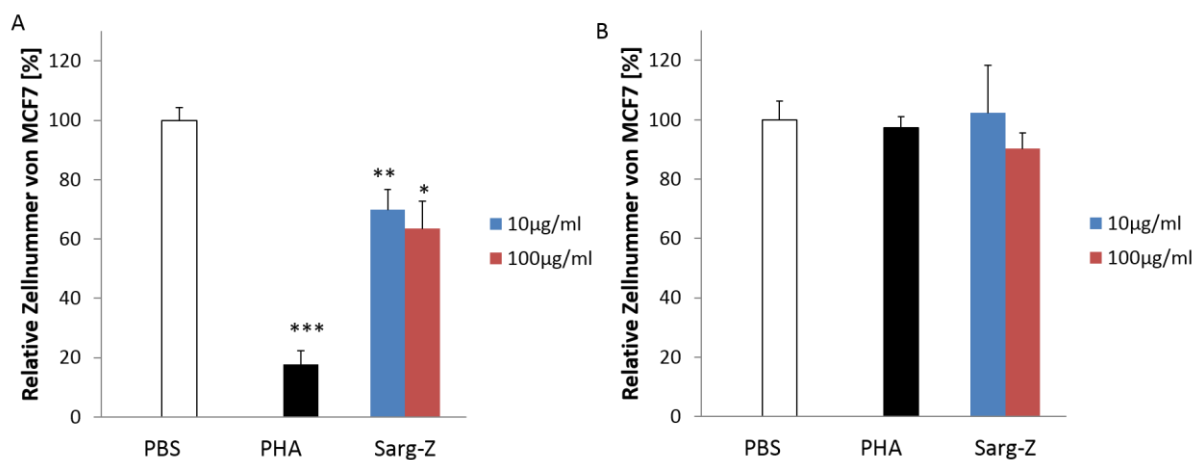


Abbildung 17. Untersuchung der Zytotoxizität von HPBLs in Gegenwart von MCF7-Zellen durch Behandlung mit Sarg-Z. A) Analyse des Einflusses des Sarg-Z auf das Wachstum der MCF7-Tumorzellen. 20000 MCF7-Zellen wurden mit PBS, PHA (5 µg/mL), oder Sarg-Z (100 µg/mL) bei 37°C für 24 h behandelt. Die Wachstumsrate wurde mittels dem Kristallviolett-Test analysiert. **B) Analyse der zytotoxischen Aktivität der HPBLs behandelt mit Sarg-Z gegenüber MCF7-Tumorzellen.** HPBLs (2 x 10⁵/Well) wurden mit PBS als Kontrolle, PHA (5 µg/mL) oder Sarg-Z in Gegenwart von MCF7-Zellen (2 x 10⁴/Well) bei 37°C für 24h behandelt. Die Zytotoxizität wurde nach 24 h gemessen. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte ± SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001.

3.3. Hemmung des Entzündungsprozesses durch Polysaccharid-Fraktion

3.3.1. Hemmung der L-Selektin - Ligand Bindung durch GLP20, JRP und Sarg-Z

Abbildung 18 zeigt, dass die Rohfraktionen GLP20, JRP und Sarg-Z bei 500 µg/mL eine signifikante Hemmwirkung auf die Bindung zwischen L-Selektin und seinen Liganden besitzt. GLP20 wies eine Hemmwirkung von 78% auf. Ebenfalls inhibierte

Sarg-Z bei dieser Konzentration die L-Selektin-Ligand Bindung bis zu ca. 90%, wobei JRP nur 30% Hemmwirkung zeigte (Abb. 18)

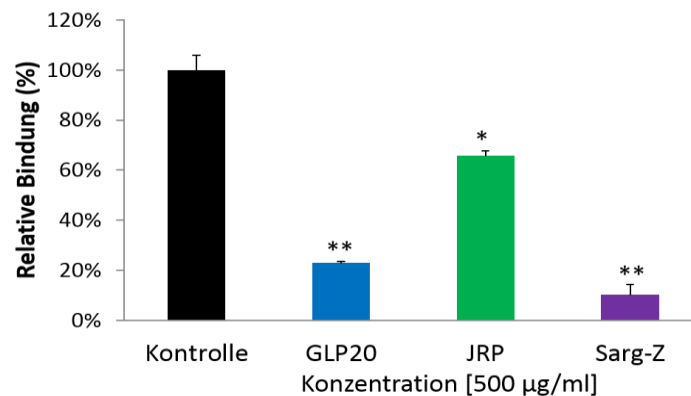


Abbildung 18: Untersuchung der Inhibition auf L-Selektin-sTyr/sLeX Bindung durch GLP20, JRP und Sarg-Z mittels SPR-Verfahren. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

3.3.1.1. Erhöhung der Hemmungswirkung von GLP20 und JRP nach der Sulfatierung

P-Selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) ist ein bekannter Ligand von P- und L-Selektin [147]. PSGL-1 besitzt zwei wichtige Bindungsmotive für P- und L-Selektin. Ein Bindungsmotiv ist Sialyl Lewis X (sLeX) mit O-Glycan-Struktur und das zweite Motiv eine Sulfatgruppe an einer der drei Tyrosinseitenketten am N-Terminus, beide Motive zeigen gemeinsam eine hohe Affinität gegenüber P- und L-Selektin [147]. Es wird berichtet, dass durch Modulation der Sulfatgruppe zu einem beliebigen Polysaccharid, welche die L-Selektin-Ligand Bindung hemmt, die entsprechende inhibitorische Wirkung erhöht werden kann [112]. Es wurde dann untersucht, ob die hemmenden Wirkungen der sulfatierten Polysaccharide GLPss58 und JRP-SS höher sind als ihre Ausgangsform GLP20 und JRP.

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Wirkung der sulfatierten Polysaccharide GLPss58 bzw. JRP-SS um ein vielfaches stärker ist als die der Ausgangsfractionen GLP20 und JRP (Abb. 19). Bei einer Konzentration von 62,5 µg/ml konnte GLPss58 die L-Selektin-Ligand Bindung bis zu ca. 96 % hemmen, während GLP20 bei gleicher Konzentration nur eine Hemmwirkung von 11% aufwies. Ebenfalls hemmte JRP-SS bei einer Konzentration von 50 µg/ml die L-Selektin-Ligand Bindung um ca. 85%, während JRP bei 500 µg/ml nur 34% inhibierende Aktivität zeigte (Abb. 19).

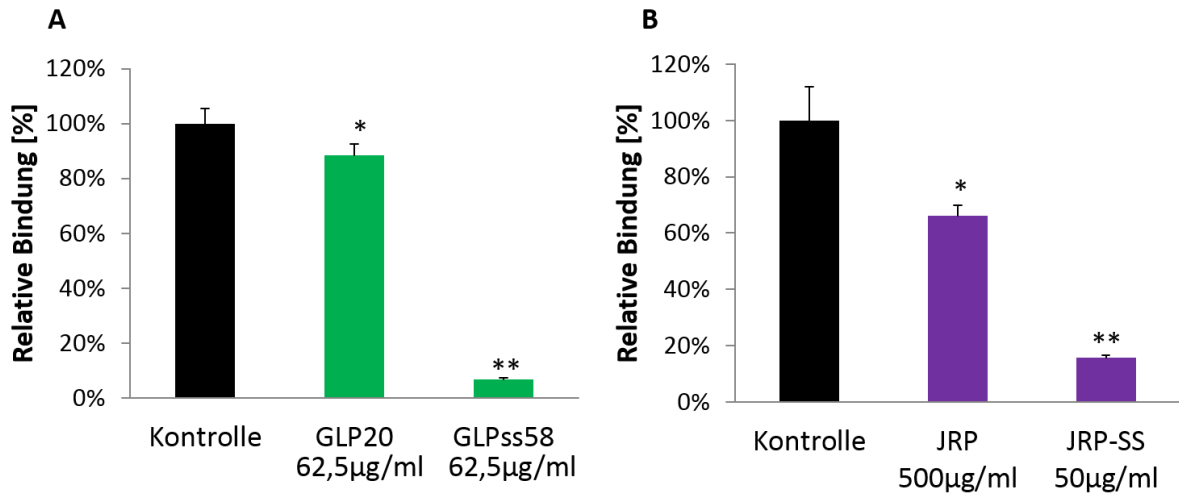


Abbildung 19: A) Untersuchung der Hemmwirkung von GLPss58 und JRP-SS auf L-Selektin – sTyr/sLex Bindung durch SPR-Verfahren. A) Vergleich der Hemmwirkung zwischen GLP20 und GLPss58. B) Vergleich der Hemmwirkung zwischen JRP und JRP-SS. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$.

3.3.1.2. Bestimmung des IC_{50} -Wertes von GLP20, GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z

Von den jeweiligen Fraktionen GLP20, GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z wurde der IC_{50} -Wert der Hemmung der L-Selektin-Ligand Bindung bestimmt. Das entsprechende Ergebnis wurde in der folgenden Abbildung dargestellt und in der Tabelle 2 zusammengefasst.

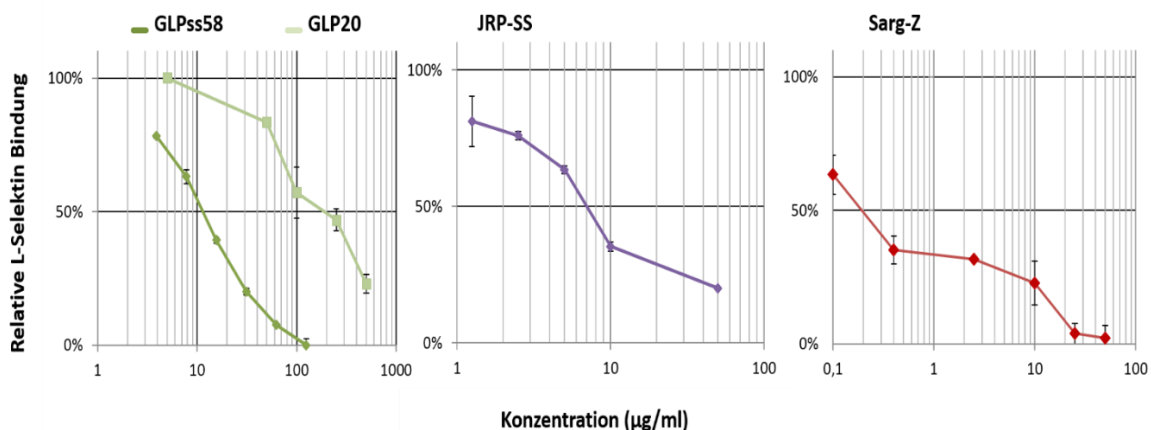


Abbildung 20: Grafische Darstellung der konzentrationsabhängigen Hemmung von GLPss58 auf die L-Selektin - sTyr / sLeX-Bindung durch SPR-Verfahren. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Tabelle 2: Zusammenfassung der IC₅₀-Werte

	GLP20	GLPss58	JRP-SS	Sarg-Z
IC ₅₀ -Wert	150 µg/mL	13.5 µg/mL	7.5 µg/mL	0.2 µg/mL

3.3.2. Hemmung der Bindung zwischen L-Selektin Antikörper (anti-CD62L) und die L-Selektin der HPBLs durch GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z

Tabelle 2 zeigt, dass GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z eine sehr starke Hemmwirkung auf die L-Selektin-Ligand Bindung hatten, wobei Sarg-Z die stärkste Wirkung im Vergleich zu den anderen Fraktionen hatte. Es stellte sich die Frage, ob die vier Polysaccharid-Fraktionen direkt mit L-Selektin wechselwirken können, wodurch die L-Selektin-Liganden Bindung blockiert wird. Um dies zu untersuchen, wurde der FITC-markierte monoklonale Antikörper HuDERG-55 (anti-CD62L mAK) und HPBL verwendet. HuDERG-55 kann an die Lektin-Domäne des humanen L-Selektins binden [148]. Diese Bindung kann verhindert werden, wenn die Lektin-Domäne des L-Selektins bereits mit Polysacchariden in Wechselwirkung tritt.

Bei dieser Untersuchung wurden HPBLs zunächst mit den einzelnen Fraktionen für 30 min inkubiert, dann zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem L-Selektin-Antikörper für weitere 30 min inkubiert. Die FACS-Analyse zeigte, dass die Bindung zwischen L-Selektin und seinem Antikörper durch GLP20 oder JRP und bei einer Konzentration von 500 µg/mL nicht gehemmt wurde, wohingegen GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z eine deutliche Hemmwirkung gemessen wurde (Abb. 21). Bei einer Konzentration von 500 µg/mL, GLPss58, JRP-SS bzw. Sarg-Z reduzierte sich die Fluoreszenzintensität des FITC-gelabelten HuDERG-55-Antikörpers, welcher an das L-Selektin auf der Oberfläche der HPBLs bindet, um 28%, 22% bzw. 20% (Abb. 21B). Das Ergebnis weist darauf hin, dass GLPss58, JRP-SS bzw. Sarg-Z mit L-Selektin an der Oberfläche von HPBLs miteinander wechselwirken und in deren Folge die Bindung des L-Selektins mit ihrem Antikörper beeinträchtigt.

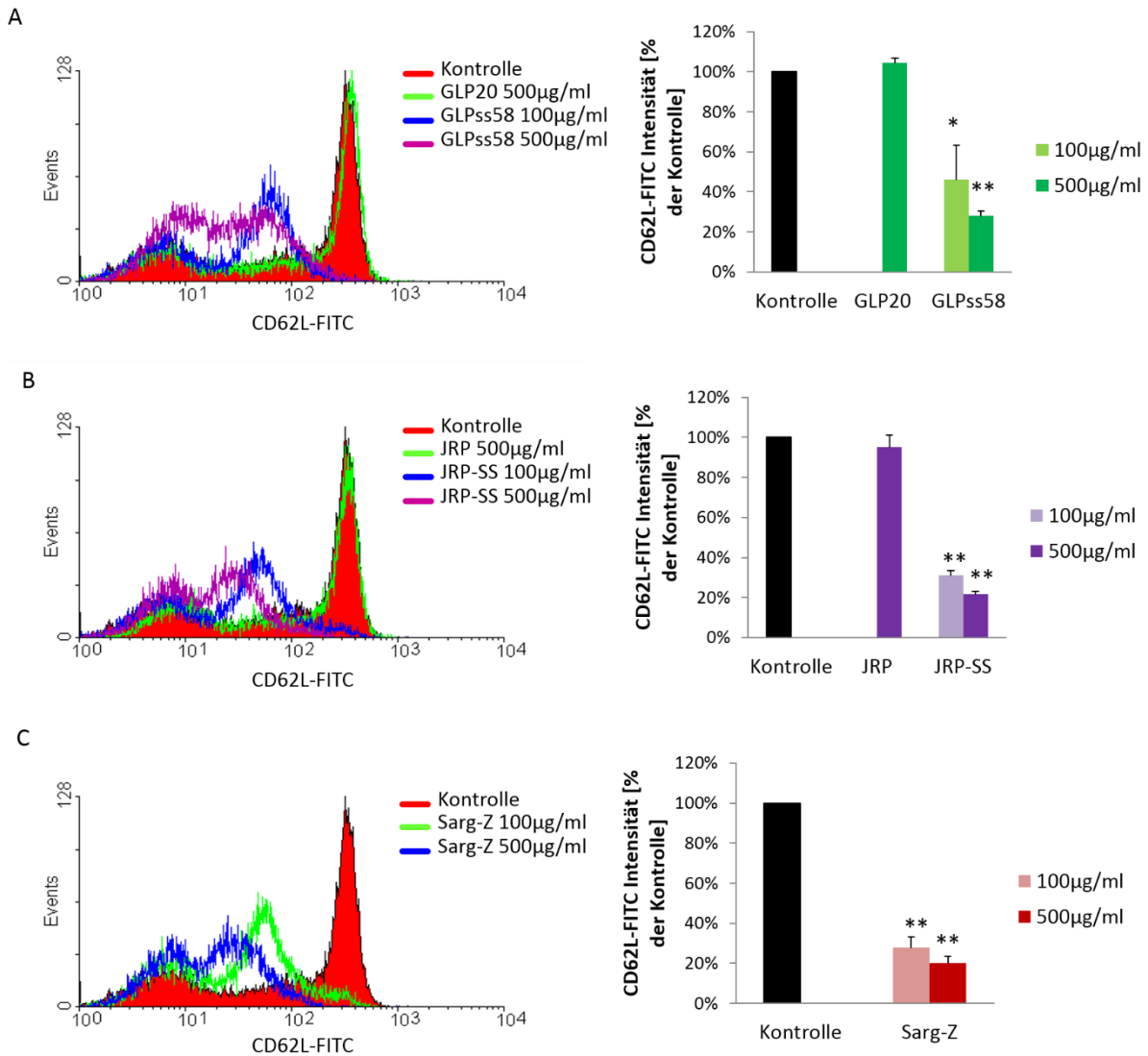


Abbildung 21: Untersuchung des Einflusses auf die Interaktion zwischen dem L-Selektin Antikörper (anti-CD62L mAK) und L-Selektin auf der Oberfläche von HPBLs nach der Behandlung mit verschiedenen Polysacchariden durch Durchflusszytometrie. A) Analyse der Hemmwirkung von GLP20 und GLPss58, B) Analyse der Hemmwirkung von JRP und JRP-SS und C) Analyse der Hemmwirkung von Sarg-Z. Links: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von L-Selektin mit dem Anti-CD62L-FITC-Antikörper nach Behandlung mit verschiedenen Fraktionen mit PBS oder nur PBS als negative Kontrolle. Der rote Block repräsentiert das Ergebnis der negativen Kontrollzellen; die grüne Linie zeigt das Ergebnis von HPBLs, die mit Fraktionen bei einer Konzentration von 100 µg/ml behandelt wurden; die blaue Linie zeigt das Ergebnis von HPBLs, die mit Fraktionen bei einer Konzentration von 500 µg/ml behandelt wurden. **Rechts:** Grafische Darstellung der anti-CD62L-FITC-Intensität auf der Oberfläche von HPBLs nach Behandlung mit oder ohne Polysaccharid-Fraktion. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte ± SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$

3.3.3. Bindung der GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z an die Zelloberfläche von HPBLs

Im Kapitel 3.3.2. wurde angenommen, dass GLPss58, JRP-SS bzw. Sarg-Z an die Lektin-Domäne von L-Selektin binden können, und dadurch die Interaktion zwischen L-Selektin und Antikörper blockieren können. Um zu untersuchen, ob sie spezifisch an L-Selektin binden können, wurden alle Polysaccharid-Fractionen zuvor mit FITC markiert. HPBLs wurden dann mit der jeweils FITC-markierten Polysaccharid-Fraktion und dem PE-markierten L-Selektin Antikörper für 30 min inkubiert und dann durch FACS analysiert.

Abbildung 22 zeigt, dass nur bei den mit GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z behandelten Zellen zunehmende FITC-Signale im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurden. Zusätzlich zu den L-Selektin-positiven HPBLs (anti-CD62L-mAK-PE-positiven Zellen) konnten die drei Fraktionen auch an L-Selektin-negative HPBLs binden. Das bedeutet, dass GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z nicht nur speziell auf die Anbindung von L-Selektine begrenzt sind. Aus diesem Ergebnis wurde die Hypothese aufgestellt, dass es eine oder mehrere andere Komponenten auf der Zelloberfläche gäbe, die als Rezeptoren für Sulfat-haltige Fraktionen dienen. Um festzustellen, ob GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z in Zusammenhang mit L-Selektin stehen, bzw. ob sie die L-Selektin-vermittelte Zellfunktion beeinflussen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

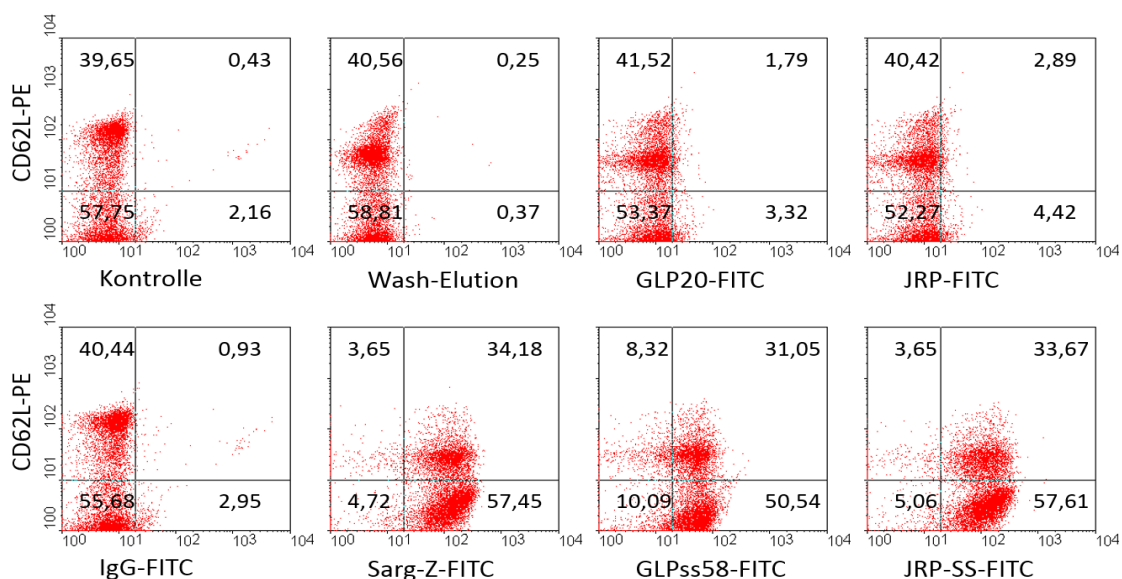


Abbildung 22: Untersuchung der Bindung verschiedener FITC-markierter Polysaccharid-Fractionen an der Zelloberfläche von HPBLs. Alle Polysaccharid-

Fraktionen wurden vorher mit FITC markiert. HPBLs wurden mit dem jeweils FITC-markierten Polysaccharid-Fraktionen und PE-markiertem L-Selektin Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert und dann durch FACS analysiert.

3.3.4. Hemmung der SLC-induzierten Chemotaxis von HPBLs durch GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z

Die effektive Rekrutierung von Leukozyten an geeignetem Gewebe ist wichtig um eine effiziente Immunantwort zu erzeugen. Die Migration bzw. Invasion von peripheren Lymphozyten zu den Geweben wird durch L-Selektin vermittelt. Die Migration bzw. Invasion bezieht sich auf die Bindung von L-Selektin auf der Zelloberfläche der Lymphozyten und seinem Liganden auf der endothelialen Zellschicht [149]. Das lösliche oder die auf dem Endothelium des sekundären Lymphatischen Organs gebildete Chemokin, wie z.B. die homöostatischen Chemokin SLC (CCL21), die in sekundären lymphatischen Organen gebildet werden, kann die Migration der Lymphozyten verstärken, indem SLC an den Rezeptor CCR7 bindet und schließlich den β 1- oder β 2-Integrin-vermittelten Signalweg aktiviert [150]. In Kapitel 3.3.2 wurde beschrieben, dass GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z die Interaktion zwischen L-Selektin von HPBLs und ihrem monoklaren Antikörper blockierten können, indem sie selbst mit L-Selektin eine Wechselwirkung eingehen. L-Selektin fungiert nicht nur als Adhäsionsmolekül auf Leukozyten, sondern beeinflusst auch die intrazellulären Signalwege. Das Crosslinking von L-Selektin nach Anbindung seines Liganden konnte die β 1 und β 2 Integrin-vermittelte Adhäsionsaktivität von Leukozyten und die Leukozytenmigration erhöhen [151]. L-Selektin konnte auch die Chemokin- wie SLC-vermittelte Lymphozytenmigration verstärken, indem es seine intrazellulären Signalwege hochregulierte [152]. Daher stellte sich die Frage, ob GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z die L-Selektin-vermittelte HPBLs Migration bzw. Invasion regulieren kann. Um dies zu untersuchen, wurden in vitro-Zellmigrationstests von HPBLs durch SLC-Induktion durchgeführt (siehe Kapitel (siehe Abschnitte 2.2.2.13).

In einen Vorversuch wurde festgestellt, dass die Invasionsrate von HPBLs in SLC-haltigen Bedingungen (10 ng/mL) nach 2 h ca. 10-mal höher war als unter SLC-freien Bedingungen (Abb. 23). Der prozentuale Anteil der Zellpopulationen von L-Selektin⁻ und L-Selektin⁺ HPBLs zeigte keinen Unterschied ob mit oder ohne SLC-Induktion (Abb. 23B). In Tabelle 3 wurden die Zellzahlen der migrierten HPBLs und der migrierten L-Selektin⁺-HPBLs sowie Quoten (migrierte Zellen Im Verhältnis zu Gesamtzellen) nach Behandlung mit PBS (Kontrolle) oder jeweils mit unterschiedlicher

Polysaccharid-Fraktion zusammengefasst. Für alle Versuche wurden jeweils 1×10^6 Zellen verwendet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde in Abbildung 24 dargestellt. Nach 2 h Inkubation mit GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z wurden jeweils diemigrierte Zellzahlen in der unteren Kammer für jede Fraktion ermittelt: $1,97 \pm 0,36 \times 10^5$ für PBS; $0,96 \pm 0,1 \times 10^5$ für GLPss58; $1,28 \pm 0,01 \times 10^5$ für JRP-SS und $1,22 \pm 0,34 \times 10^5$ für Sarg-Z. Darin vorkommende Zellzahl der L-Selektin⁺ HPBLs waren jeweils von $9,42 \pm 2,09 \times 10^4$; $2,78 \pm 1,12 \times 10^4$; $2,21 \pm 0,8 \times 10^4$ und $2,44 \pm 1,08 \times 10^5$. Im Vergleich zur Kontrolle wurde die Migrationsrate der gesamten HPBLs durch Behandlung mit GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z jeweils um ca. 50%, 34% und 38% reduziert (Abb. 24). Im Gegensatz dazu wurde die Migrationsrate der L-Selektin⁺ HPBLs durch Behandlung mit GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z deutlich gehemmt und jeweils um ca. 71%; 77% und 75% reduziert.

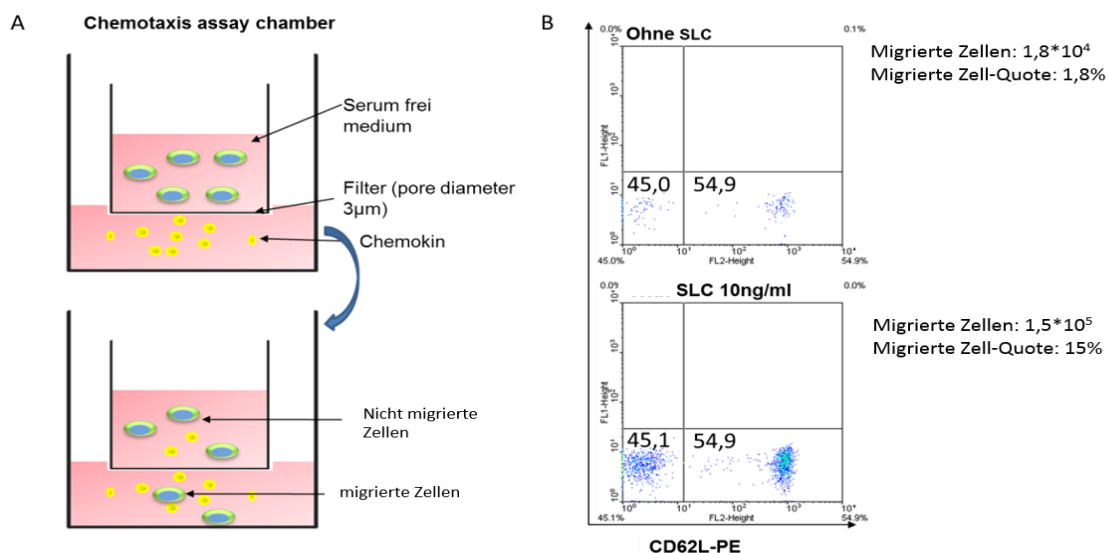


Abbildung 23: A) Das graphische dargestellte Prinzip des Chemotaxis Assay. B) Analyse der Prozentsätze der Selektin⁺ Zellen in den migrierten HPBLs.

Dies deutet darauf hin, dass die drei Fraktionen die Migration von HPBLs hemmen können, insbesondere die Migration von L-Selektin⁺-HPBLs, was auf eine Unterregulation der L-Selektin-vermittelten Signalisierung und Migration durch die Bindung von Polysaccharid-Fractionen an L-Selektin auf der Oberfläche der HPBLs hindeutet. Dies führt zu einer Reduktion der Chemotaxis der L-Selektin⁺-HPBLs als Reaktion auf die SLC-Behandlung.

Tabelle 3: Zellzahlen und prozentuale Anteile der migrierten HPBLs und L-Selektin⁺ HPBLs

	Kontrolle		GLPss58 (50 µg/ml)		JRP-SS (50 µg/ml)		Sarg-Z (50 µg/ml)	
	Zellnummer	Prozentage [%]	Zellnummer	Prozentage [%]	Zellnummer	Prozentage [%]	Zellnummer	Prozentage [%]
Total HPBLs	1 × 10 ⁶	100	1 × 10 ⁶	100	1 × 10 ⁶	100	1 × 10 ⁶	100
migrierte HPBLs:	(1.97±0.36)×10 ⁵	19.73±3.65	(0.96±0.1)×10 ⁵	9.56±0.49	(1.28±0.36)×10 ⁵	12.75±3.65	(1.22±0.34)×10 ⁵	12.16±3.35
migrierte L- Selectin+ HPBLs:	(9.42±2.09)×10 ⁴	9.43±2.09	(2.78±1.12) ×10 ⁴	2.77±1.13	(2.21±0.8)×10 ⁴	2.21±0.81	(2.44±1.08) ×10 ⁴	2.44±1.08

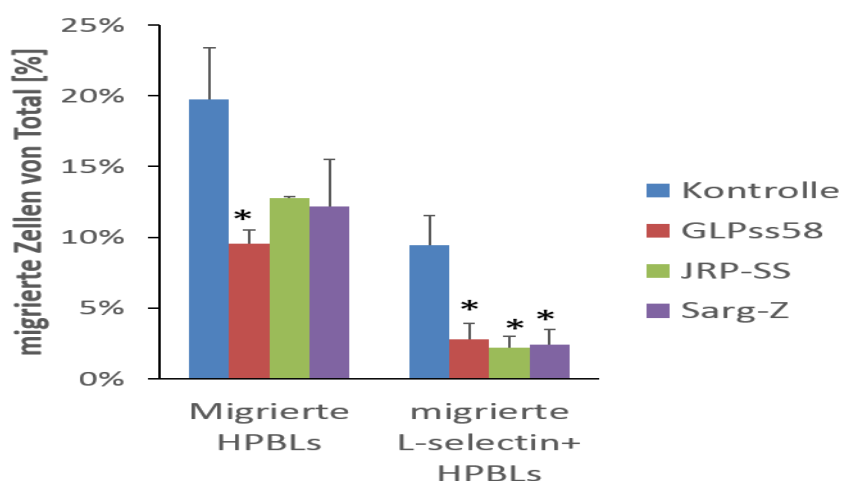


Abbildung 24: Hemmung der Chemokin SLC-induzierten Chemotaxis von HPBLs durch GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z. 1×10⁶ HPBLs wurden zuvor mit 50 µg/mL GLP20-SS, JRP-SS oder Sarg-Z. im serumfreien Medium für 30 min inkubiert. Nach dreimal Waschen wurden die Zellen in die obere Kammer gegeben. In die untere Kammer wurde 10 ng/ml SLC eingesetzt. Nach Inkubation für 2 h wurden die Zellen, die durch die Membran in die untere Kammer migriert ist, gesammelt. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und in 100 µL PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 µL PE-markiertem L-Selektin Antikörper (CD62L) für 30 min inkubiert. Die Zellzahlen der gesamten invadierten Zellen sowie der L-Selektin⁺-Zellen wurden durch FACS gemessen. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte ± SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mittels des paired t Test wird die spezifische Signifikante berechnet, *=p<0,05

3.3.5. Hemmung des Lymphozyten Homing zu lymphatischen Organe durch GLPss58 und JRP-SS

Lymphozyten sind dafür bekannt, dass sie kontinuierlich im peripheren Blut, die Milz oder die Lymphknoten(LN) rezirkulieren [153]. Es wurde auch berichtet, dass die

Rezirkulation von Lymphozyten durch Lymphozyten-Homing-Rezeptoren reguliert wird, einschließlich CD62L (L-Selektin), CD49d/ β 7 Integrin und CD11a/CD18-Integrin [154]. In vorherigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z die Bindung von L-Selektin an seine Liganden oder deren Antikörper inhibieren und die SLC-induzierte Invasion von L-Selektin-positiven HPBLs verhindern konnten. Weiterhin wurde untersucht, ob GLPss58 oder JRP-SS den L-Selektin-vermittelten Lymphozyten-Homing *in vivo* regulieren können.

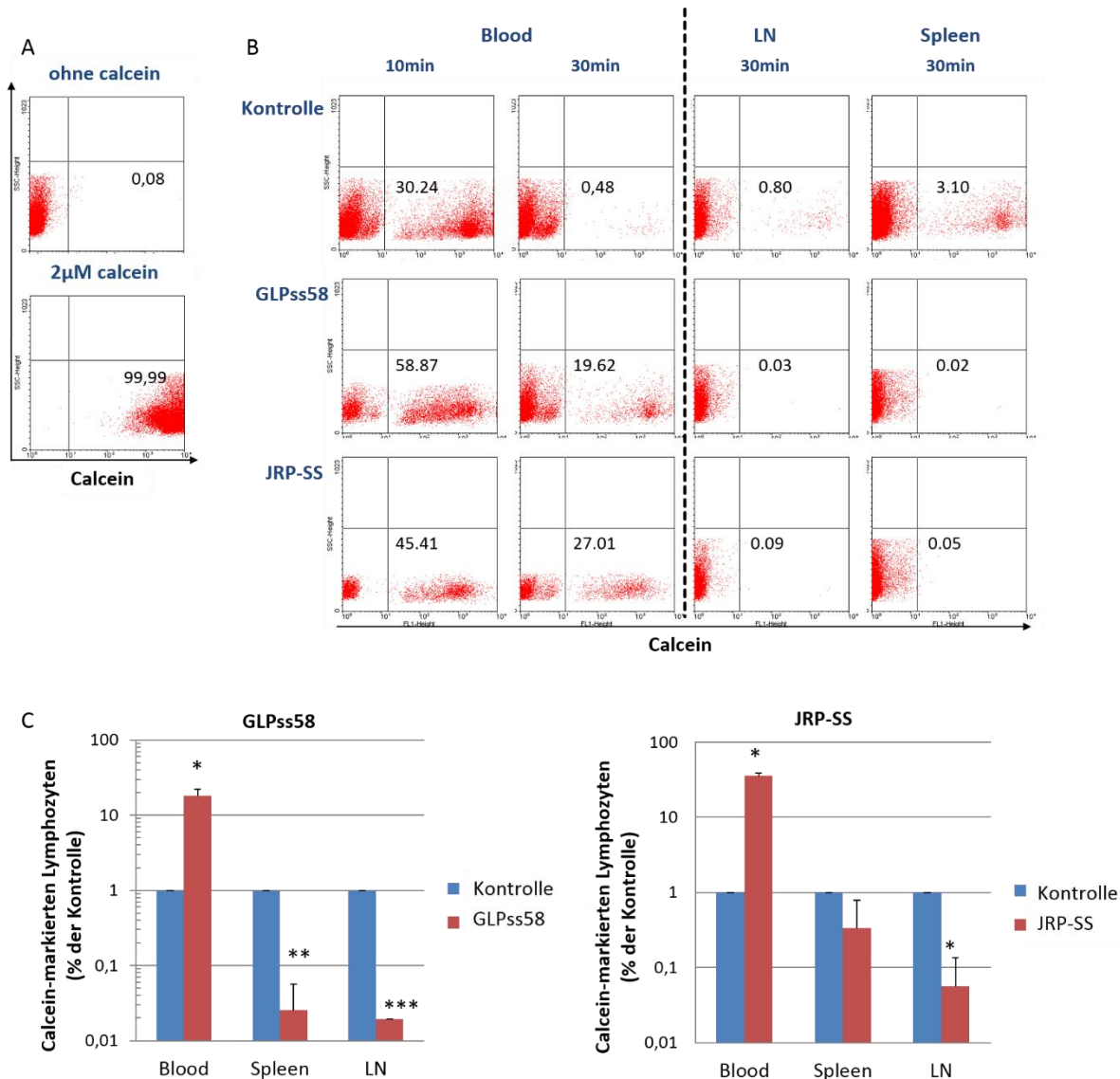


Abbildung 25: GLPss58 und JRP-SS hemmen die Lymphozyten-Homing *in vivo*. A) Markierung der Lymphozyten mit Calcein. Die Lymphozyten ($1,2 \times 10^8$ Zellen) aus Milz von C57Bl/6J Mäusen wurden mit 2μ M Calcein für 30 min bei RT markiert. B) Die prozentualen Anteile der Calcein-markierten Lymphozyten in Blut, Milz und Lymphknoten (LN) von injizierten Mäusen nach 10 min und/oder 30 min Injektion wurden ermittelt C) Einfluss von GLPss58 oder JRP-SS auf Lymphozyten-Homing nach 30 min Injektion im Vergleich zur Kontrolle. Die Calcein-markierten Lymphozyten (4×10^7 Zellen/200 μ L in PBS) wurden mit

jeweils 50 µg/mL der Probe für 30 min behandelt. PBS-behandelte Lymphozyten dienten als Kontrolle. Danach wurden die Calcein-markierten Lymphozyten in die Schwanzvenen von anderen Mäusen injiziert. Die prozentualen Anteile der Calcein-markierten Lymphozyten im Blut von injizierten Mäusen wurden 10 min bzw. 30 min nach Injektion durch FACS analysiert. Die Calcein-markierten Lymphozyten in Lymph-Organ wurden 30 min nach Injektion analysiert. Jedes Ergebnis zeigt jeweils den Mittelwert \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mittels des paired t Test wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$. Die relativen Calcein-markierten Lymphozyten in der Kontrolle werden gleich 1 gesetzt.

In dieser Untersuchung wurden die Maus-Milz-Lymphozyten (MSLs) mit Calcein markiert. Durch FACS Analyse wurde festgestellt, dass mehr als 99% MSLs nach Kultivierung mit 2 µM Calcein enthaltendem Medium für 30 min mit Calcein markiert wurden (Abb. 25A). Die Calcein-markierten MSLs wurden dann gleichmäßig aufgeteilt und jeweils mit PBS (als Kontrolle), GLPss58 und JRP-SS für 30 min behandelt, und anschließend in die Schwanzvene dreier Mäuse injiziert.

10 Minuten nach Injektion betrug der prozentuale Anteil der Calcein-markierten Lymphozyten im peripheren Blut der unbehandelten Kontrolle 30,24% im Vergleich zu den gesamten Lymphozyten, wohingegen er bei 58,87% bei GLPss58 bzw. 45,41% bei JRP-SS lag. 30 Minuten nach Injektion wurden die unbehandelten Calcein-markierten Lymphozyten im peripheren Blut auf 0,48% reduziert, während die mit GLPss58 oder JRP-SS behandelten Calcein-markierten Lymphozyten jeweils auf 19,62% bzw. 27,01% reduziert wurden. Das bedeutet, dass die unbehandelten Calcein-markierten Lymphozyten im peripheren Blut innerhalb von 20 Minuten um fast 98 % reduziert wurden, wohingegen 33% der GLPss58- und 59,48% der JRP-SS-behandelten Calcein-markierten Lymphozyten im peripheren Blut zurückgehalten wurden. Auf der anderen Seite, konnten 30 Minuten nach der Injektion 3,10% und 0,80% der unbehandelten Calcein-markierten Lymphozyten in der Milz- und Lymphknoten gefunden werden, während nur 0,02% und 0,03% der mit GLPss58 behandelten Calcein-markierten Lymphozyten in der Milz und Lymphknoten detektiert wurden. Ebenfalls wurden nur 0,09% und 0,05% der mit JRP-SS behandelten Calcein-markierten Lymphozyten in der Milz und Lymphknoten gefunden (Abb. 25B).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass GLPss58 oder JRP-SS in der Lage sind, das Lymphozyten-Homing vom peripheren Blut in die Lymphknoten bzw. Milz zu hemmen und es im peripheren Blut zurückhalten (Abb. 25C). Durch diese Ergebnisse können wir schlußfolgern, dass durch Hemmung der Bindung zwischen L-Selektin der MSLs

und seinen Liganden auf der Oberfläche von Endothelzellen sekundärer lymphatischer Organe, GLPss58 oder JRP-SS den Lymphozyten-Homing inhibieren können.

3.3.6. Hemmung der Aktivierung des Komplementsystems durch GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z

Das Komplementsystem ist ein Teil des Immunsystems. Die löslichen Komplementsystem-Bestandteile C3a und C5a können eine lokale Entzündungsreaktion auslösen, welcher zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Rekrutierung von Granulozyten und Monozyten an Gefäßwänden führt, was deren Einwanderung erleichtert und die Entzündung auslöst. Daher wurde der Einfluss aller Polysaccharid-Fractionen auf die Aktivierung von Komplementwege untersucht.

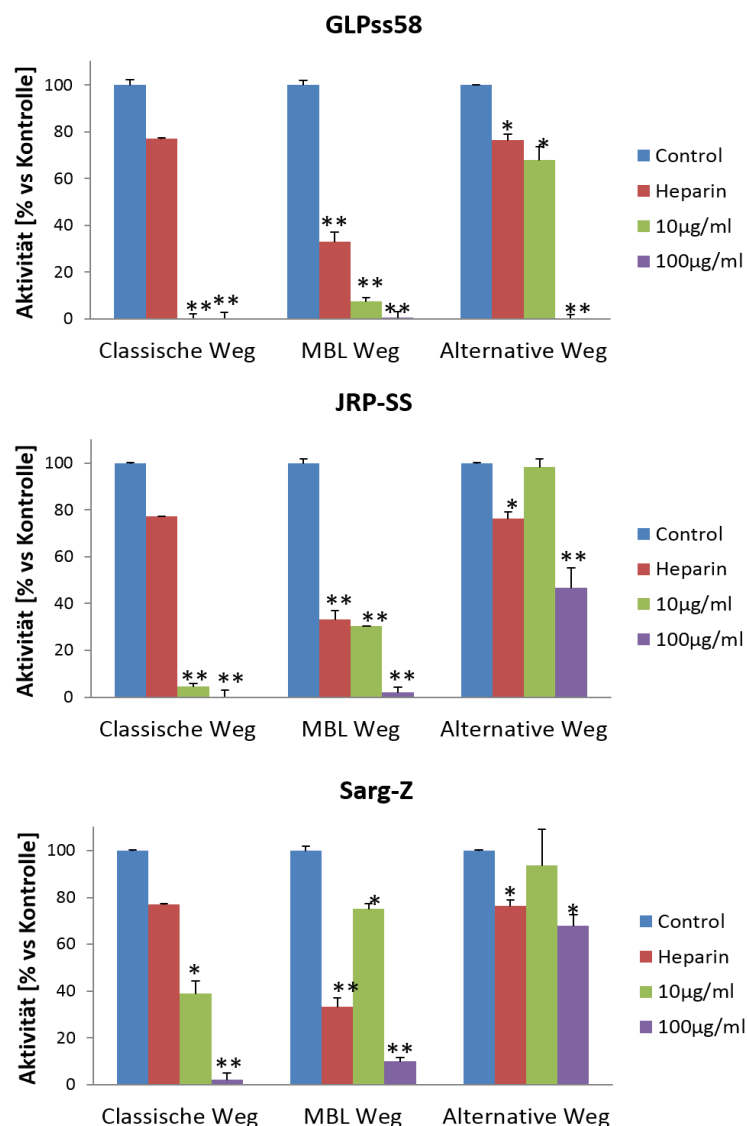


Abbildung 26: Untersuchung der Aktivierung vom Komplementsystem durch GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z. Heparin mit 10 µg/mL wurde als positive Kontrolle verwendet. Die

Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Test wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$.

Abbildung 26 zeigt, dass 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLPss58 die Aktivierung des klassischen Weges vollständig und des MBL-Weg um 90% inhibierte. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hemmte GLPss58 alle drei Komplementwege vollständig. JRP-SS zeigte also eine Hemmwirkung auf alle drei Wege des Komplements. Die Wirkung war beim klassischen Weg stärker als beim MBL- oder alternativen Weg. Bei Verwendung von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JRP-SS wurde die Aktivität des klassischen Weges um 95% und um 70% beim MBL-Weg gehemmt, wohingegen 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ notwendig waren, um die Aktivität des alternativen Weges um nur 54% zu inhibieren. Sarg-Z verhält sich ähnlich wie JRP-SS bei der Hemmung des Komplementsystems. Bei 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hemmte es den klassischen, MBL- und alternativen Wege jeweils um ca. 98%, 90% bzw. 30%.

3.3.7. Interaktion von TNF- α und IFN- γ mit GLPss58 und JRP-SS

In Abschnitt 3.3.6 wurde gezeigt, dass GLPss58 und JRP-SS eine ähnliche Wirkung wie Heparin haben die Aktivierung des Komplementsystems hemmen können. Die Zytokine TNF- α und IFN- γ haben immunstimulatorische Eigenschaften und sind an entzündlichen Prozessen beteiligt. Heparine sind endogene sulfatierte Polysaccharide, die die Blutgerinnung inhibieren können und darüber hinaus auch entzündungshemmend gegenüber der TNF- α - und IFN- γ -vermittelten Entzündungen wirken [155]. Die Strukturanalyse ergab, dass die beiden basischen Arginine im N-Terminus von TNF- α und einem basischen Aminosäurecluster, welcher sich im C-terminalen Bereich von IFN- γ lokalisiert ist, für deren Bindung an Heparin verantwortlich sind [156].

Um zu klären, ob GLPss58 und JRP-SS ähnliche Eigenschaften wie Heparin haben, und ebenfalls an TNF- α oder IFN- γ binden können, wurde eine ELISA-Analyse durchgeführt. Es wurde vermutet, dass, in der Falle dass GLPss58 und JRP-SS an TNF- α und IFN- γ binden können, die Interaktion mit ihren Antikörpern vielleicht auch verhindert werden könne. Ein vorläufiges Experiment zeigte, dass sowohl Heparin als auch GLPss58 oder JRP-SS keine Affinität für die Antikörper zeigen, die im ELISA-Test für beide Zytokine verwendet wurden. Die Zytokine (1 ng/mL) wurden zunächst mit und ohne Heparin, GLPss58 oder JRP-SS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann wurden sie für den ELISA-Test verwendet. Heparin wurde hierbei als positive

Kontrolle verwendet. Abbildung 27 zeigt, dass GLPss58 oder JRP-SS die Bindung von TNF- α oder IFN- γ zu ihren jeweiligen spezifischen Antikörpern signifikant inhibierten. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduzierte GLPss58 die Bindung von TNF- α oder IFN- γ zu ihrem Antikörper jeweils um 31% bzw. 32%. Die Ergebnisse sind mit Heparin bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vergleichbar. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verringerte JRP-SS die Bindung von TNF- α oder IFN- γ an deren Antikörper jeweils um 60% bzw. 40%. Die Hemmwirkungen von GLPss58 oder JRP-SS waren dosisabhängig (Abb. 27). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GLPss58 oder JRP-SS in der Lage sind, direkt an TNF- α oder IFN- γ zu binden und dadurch die Wechselwirkungen von TNF- α oder IFN- γ mit deren Rezeptoren blockiert würden, welche zur Hemmung der entzündlichen Aktivität von TNF- α oder IFN- γ führen.

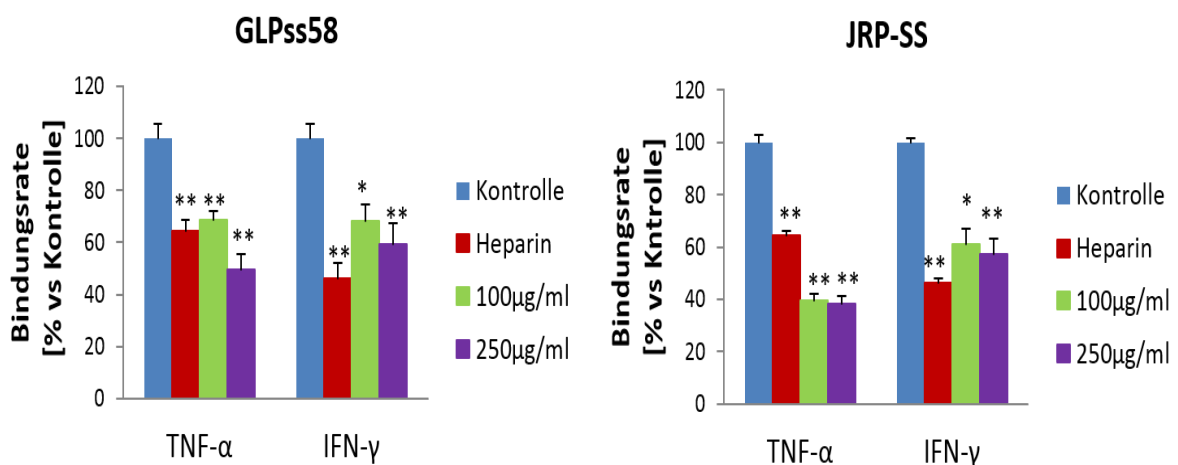


Abbildung 27: Untersuchung der Hemmung von GLPss58 und JRP-SS auf die Bindung von TNF- α oder IFN- γ zu deren Antikörpern. Heparin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diente als Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Test wird die spezifische Signifikanz berechnet, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$.

3.4. Anti-Tumorwirkung von Polysaccharid-Fractionen

Neben der entzündungshemmenden Wirkung von GLPss58 und JRP-SS wurde weiter untersucht, ob sie eine antineoplastische Wirkung besitzen. Dabei wurden zwei verschiedene Tumorzelllinien, die humane Melanom Zelllinie (MEL-2) und die humane Brust Adenokarzinom Zelllinie (MCF7) verwendet

3.4.1. Hemmung der Proliferationsrate von MEL-2- und MCF7-Zellen durch GLPss58 und JRP-SS

Zunächst wurde die Proliferation der beiden Tumorzellenlinien, die mit den beiden sulfatierten Polysacchariden behandelt wurden, analysiert.

Abbildung 28 zeigt, dass die Proliferation der beiden Tumorzellen durch Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS bei der hohen Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ deutlich inhibiert wurde, wobei diese hemmende Wirkung bei MEL-2-Zellen deutlich höher war als bei MCF7-Zellen. GLPss58 oder JRP-SS konnten bei 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ die Proliferationsrate von MEL-2-Zellen um etwa 60% hemmen, während die Proliferationsrate von MCF7-Zellen nur um etwa 40% reduziert werden konnte. Die jeweiligen Rohfraktionen GLP20 oder JRP hatte keinem Einfluss auf die Proliferation beider Tumorzellen.

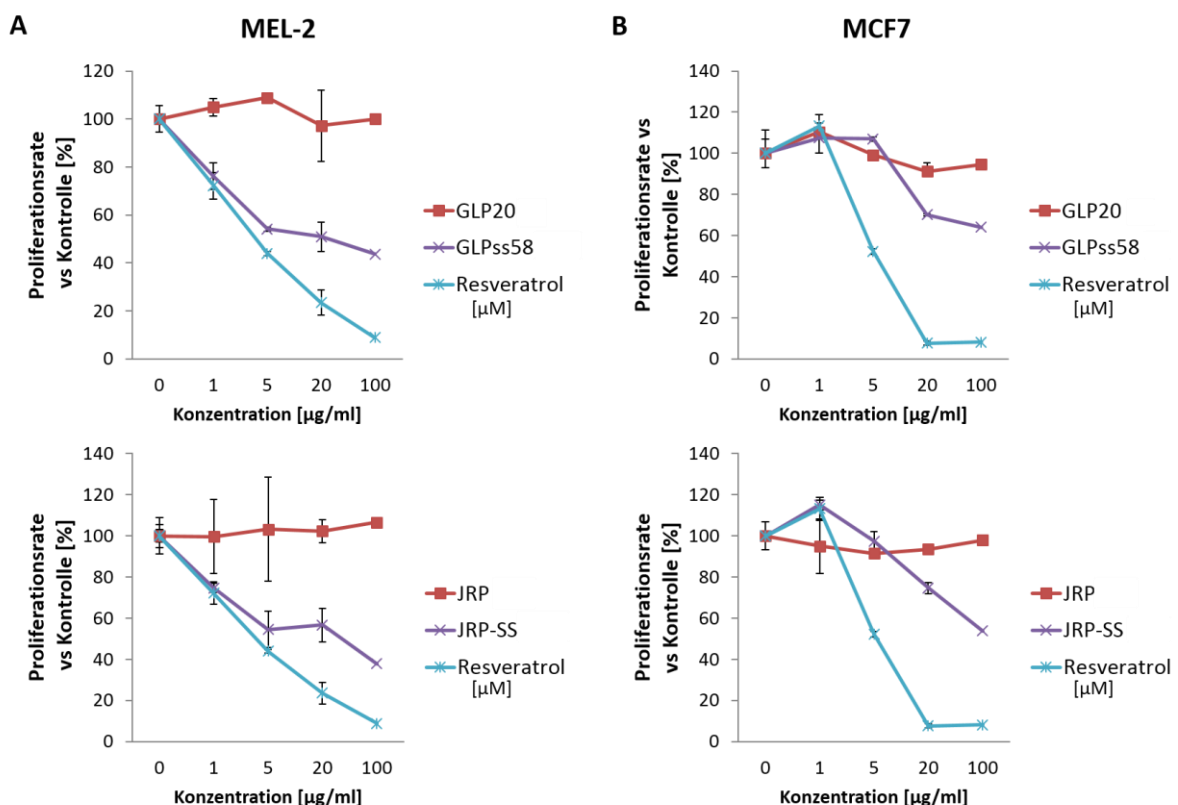


Abbildung 28: Untersuchung der Proliferation von MEL-2- und MCF7-Tumorzellen nach Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS. A) Proliferationsrate von MEL-2-Zellen mit Behandlung von GLPss58 oder JRP-SS mit unterschiedlichen Konzentrationen. B) Proliferationsrate von MCF7-Zellen bei Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS mit unterschiedlichen Konzentrationen. Resveratrol wurde als positive Kontrolle verwendet. Die Behandlungszeit war 72 h. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen.

3.4.2. Keine Apoptose-Induktion von MEL-2- und MCF7-Zellen nach Behandlung von GLPss58 und JRP-SS

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Im Gegensatz zur Nekrose, die durch Zellschwellung zur lokalen Entzündungen führt, leitet die Apoptose keine Entzündungsreaktion ein. Um zu bestimmen, ob die sulfatierten Polysaccharide GLPss58 und JRP-SS die Apoptose beider Tumorzelllinien induzieren können, wurde eine Apoptose-Untersuchung durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde Resveratrol verwendet.

Es wurde gezeigt, dass GLPss58 oder JRP-SS weder in MEL-2- noch in MCF7-Zellen eine Apoptose induzieren konnten, wohingegen die Apoptose nach Behandlung mit 50 μ M Resveratrol für 72 h bei 70% der MEL-2-Zellen und 82% der MCF7-Zellen eintrat (Abb.29). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Apoptose nicht die Ursache für die Reduktion der Proliferationsrate beider Tumorzellen nach Behandlung mit GLPss58 und JRP-SS war.

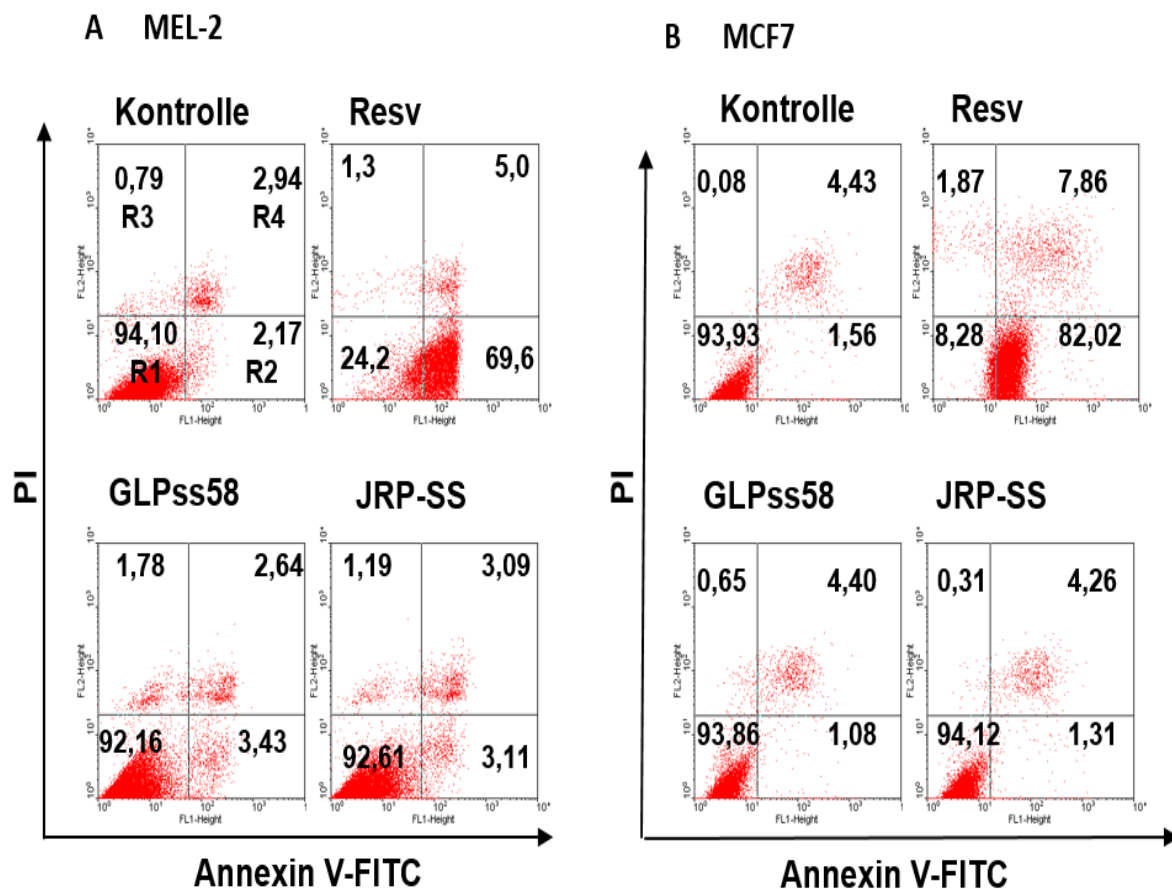


Abbildung 29: Untersuchung der Apoptose der MEL-2- und MCF7-Tumorzellen nach der Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS. A) Untersuchung der Apoptose von MEL-2. B)

Untersuchung der Apoptose von MCF7. R1: lebende Zellen. **R2:** frühe apoptotische Zellen. **R3:** späte apoptotische und nekrotische Zellen. **R4:** nekrotische Zellen. Konzentration von GLPss58 und JRP-SS waren 100 µg/mL. Konzentration von Resveratrol (**Resv**) war 50 µM.

3.4.3. Hemmung der Zelladhäsion von MEL-2- und MCF7-Zellen auf verschiedene ECM-Proteine durch GLPss58 und JRP-SS

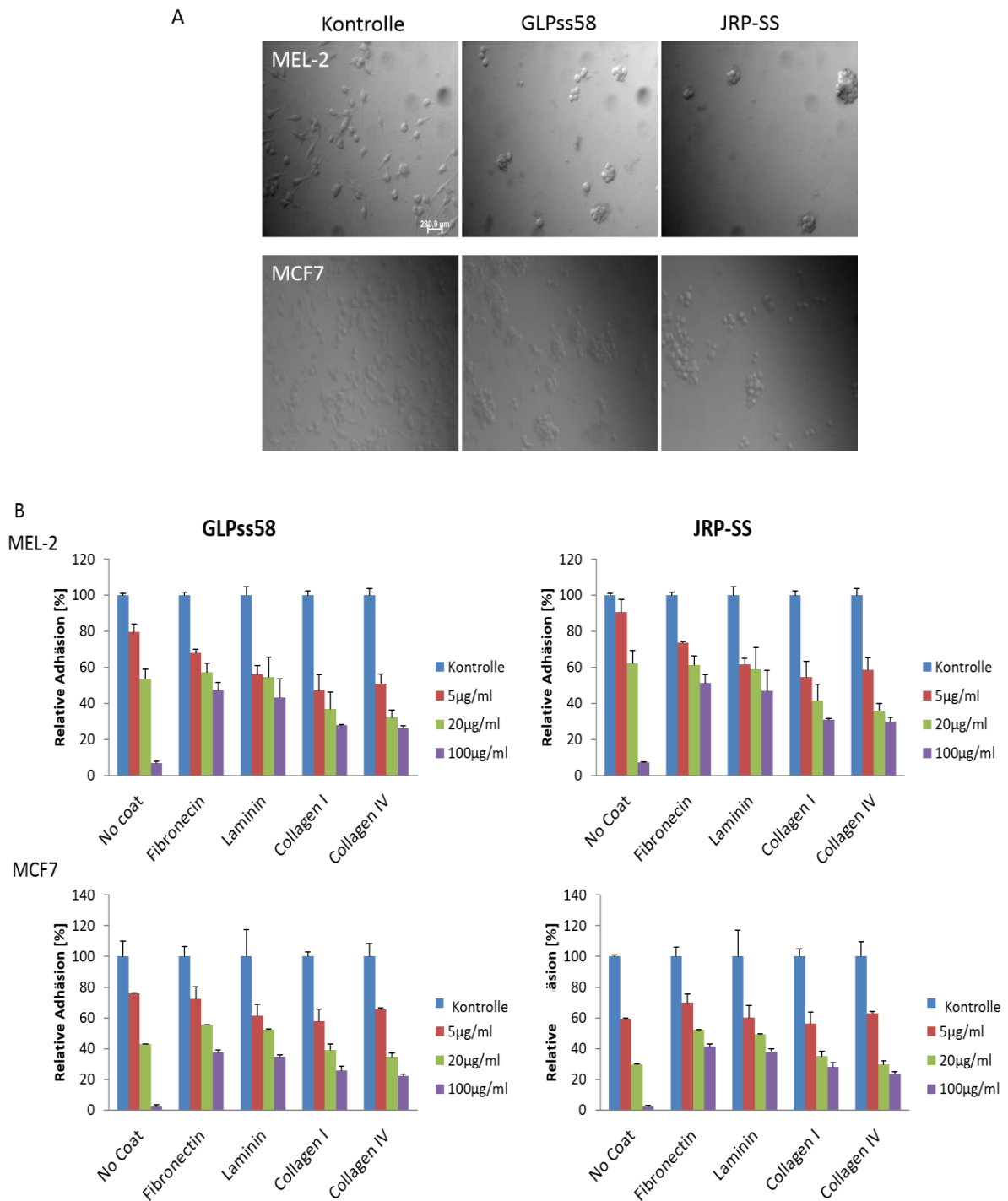


Abbildung 30: Untersuchung der Hemmwirkung von GLPss58 und JRP-SS auf die Zelladhäsion von MEL-2 und MCF7. A) Foto der MEL-2- und MCF7-Zellen nach

Behandlung mit GLPss58 (100 µg/mL) oder JRP-SS (100 µg/mL) für 24 h. B) Analyse der Zelladhäsion von MEL-2- und MCF7-Zellen mit verschiedenen ECM-Proteinen. PBS wurde als negative Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte ± SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen.

Nach der Behandlung durch GLss58 oder JRP-SS wurde unter dem Mikroskop beobachtet, dass sowohl MEL-2- als auch MCF7-Zellen teilweise verklumpf waren und nicht gut adheriert wurden (Abb. 30A). Die Adhäsion der Zellen auf extrazelluläre Matrix (ECM) ist erste wichtige Schritt während Tumor Metastasis und Invasion. Deswegen wurde anschließend untersucht, ob die GLPss58 und JRP-SS die Zell-Matrix-Adhäsion inhibieren konnten. Während dieser Untersuchung wurde die verschiedene ECM-Proteine (Fibronectin, Laminin, Collagen-I und -IV) auf 96-well Platte beschichtet. Abbildung 30B zeigt, dass die Zelladhäsion von MEL-2-Zellen und MCF7-Zellen an verschiedenen ECM-Proteinen durch GLPss58 und JRP-SS in einer dosisabhängigen Weise inhibiert wurde, während die inhibitorische Aktivität gegen Kollagen I und IV signifikant stärker war als gegen andere ECM-Proteine. Bei der Behandlung von GLPss58 und JRP-SS mit 100 µg/ml wurde die Adhäsion der mehr als 50% Zellen von MEL-2 und MCF7 an Kollagen I und IV gehemmt (Abb. 29B).

3.4.4. Bindung von GLPss58 und JRP-SS an der Zelloberfläche von MEL-2- und MCF7-Zellen

Das Zelladhäsionsassay zeigte, dass die sulfatierten Polysaccharide GLPss58 und JRP-SS die Zell-Matrix-Adhäsion von MEL-2- und MCF7-Zellen inhibieren können (Abb. 30B). Da die molekularen Gewichte der beiden Polysaccharide sehr hoch sind, können sie nicht direkt durch die Zellmembran diffundieren, stellt sich die Frage, ob GLPss58 oder JRP-SS an die Zelloberfläche binden können, und die Interaktion zwischen Zelle und Matrix zu blockieren.

Um dies zu überprüfen, wurden die beiden sulfatierten Polysaccharide zuerst mittels FITC markiert, jeweils mit den Tumorzellen für 30 min inkubiert und dann durch Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 31 zeigt, dass sich die Fluoreszenzsignale in den Tumorzellen nach Inkubation mit FITC-markierten GLPss58 oder JRP-SS, im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen oder mit FITC-IgG behandelten Zellen) signifikant erhöhten. Dies bedeutet, dass die beiden sulfatierten Polysaccharide an die Zelloberfläche binden können.

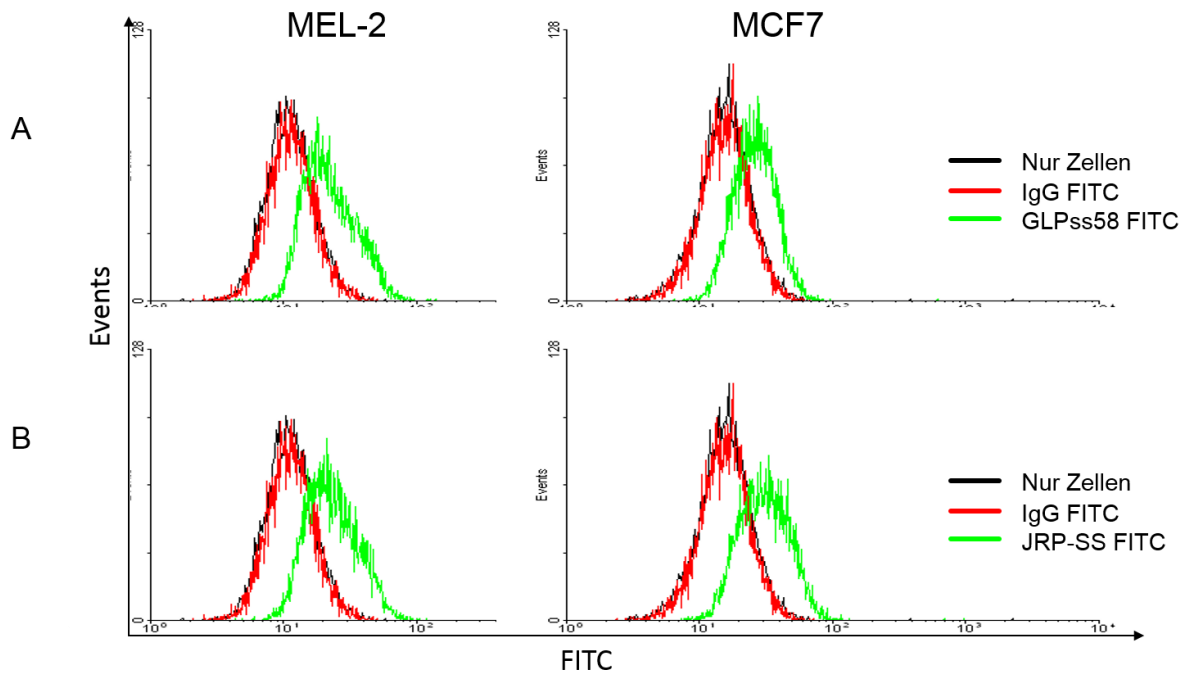


Abbildung 31: A) Analyse der Bindung von FITC-markiertem GLPss58 an der Zelloberfläche von MEL-2-Zellen und MCF7-Zellen. B) Analyse der Bindung von FITC-markiertem JRP-SS an die Zelloberfläche von MEL-2-Zellen und MCF7-Zellen. Konzentration von FITC-markierten GLPss58 und JRP-SS: 100 µg/mL. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und mit IgG-FITC (0,5 µg/ml) behandelten Zellen verwendet.

3.4.5. Hemmung der Bindung zwischen β 1-Integrin Antikörper (anti-CD29) und β 1-Integrin auf der Zelloberfläche der MEL-2- und MCF7-Zellen durch GLPss58 und JRP-SS

Die Adhäsion mehrerer Zelltypen an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wird hauptsächlich durch Mitglieder der Integrin-Familie vermittelt. Integrine sind Typ 1-transmembranäre heterodimere Rezeptoren, die aus nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten bestehen. Von den 19 α - und 8 β -Untereinheiten sind 25 verschiedene Integrin-Heterodimere beim Menschen beschrieben worden [157]. β 1-Integrine interagieren mit vielen α -Integrinen, und bilden danach Rezeptoren für verschiedene Liganden vom ECM, so sind z.B. die Integrine α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, und α 4 β 1 Rezeptoren für Kollagene, Laminine und Fibronektine [157].

Abbildung 32B zeigt, dass die sulfatierten Polysaccharide GLPss58 und JRP-SS die Zelladhäsion beider Tumorzellen von verschiedenen ECM-Proteinen dosisabhängig hemmen konnten. Es wurde nachgewiesen, dass GLss58 und JRP-SS auf der Zelloberfläche von beiden Tumorzellen binden können (Abb. 31). Daraus resultiere die Frage, ob die beiden sulfatierten Polysaccharide die Interaktion zwischen Zellmatrix

und Integrinen beeinflussen können. Durch Verwendung des FITC-markierten Antikörpers gegen β 1-Integrin (anti-CD29-FITC) wurde in Abbildung 32 gezeigt, dass GLPss58 und JRP-SS die Interaktion zwischen β 1-Integrin und seinem Antikörper sowohl in MEL-2-Zellen als auch in MCF7-Zellen beeinträchtigen konnten. Nach der Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS wurden MEL-2-Zellen in zwei Zellpopulationen aufgeteilt. Bei einer war das FITC-Signal von Antikörpern genauso hoch wie das der unbehandelten Zellen, dagegen war das FITC-Signal der anderen Zellpopulationen deutlich reduziert. Das bedeutet, dass nur bei einem Teil der Zellen die Bindung des Antikörpers an Integrin durch GLPss58 oder JRP-SS beeinträchtigt wurde. Diese Zellpopulation wird in der Folge als anti-CD29-niedrig bezeichnet (Abb. 32A). Nach Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS war die anti-CD29-niedrig MEL-2-Zellpopulation jeweils um 50% bzw. 30% in Bezug auf die gesamte Zellpopulation reduziert. Ebenfalls waren die FITC-Signale von den anti-Integrin-Antikörpern in MCF7-Zellen nach Behandlung mit dem jeweils sulfatierten Polysaccharid reduziert, aber traten nicht in zwei Populationen auf (Abb.32B).

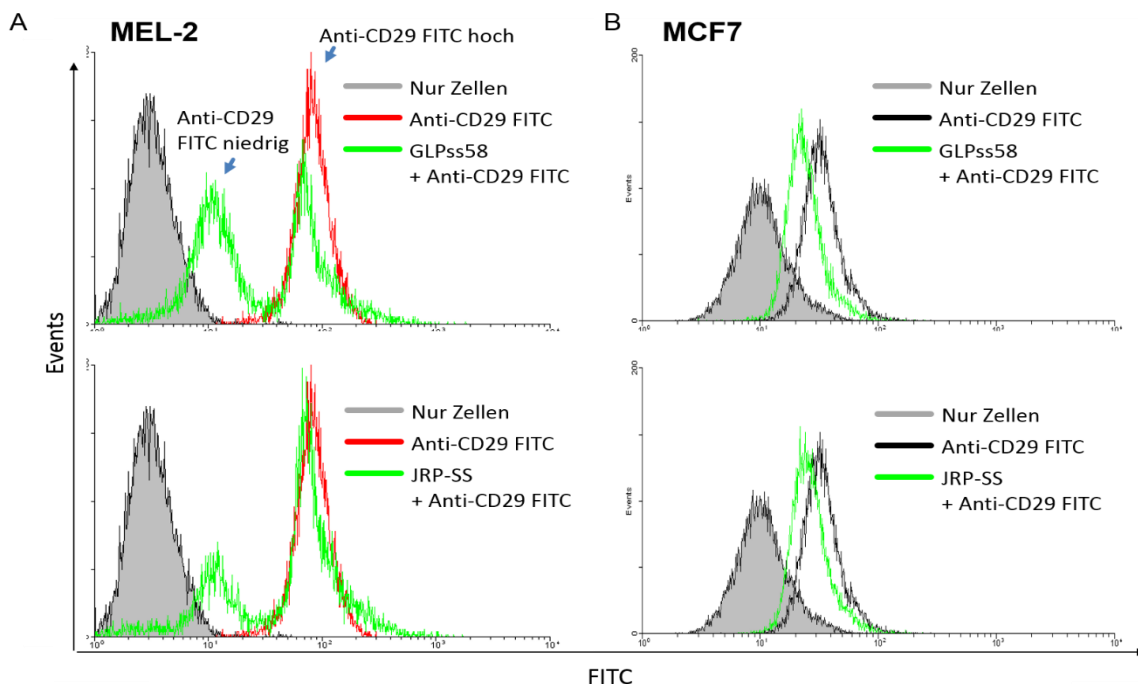


Abbildung 32: Untersuchung des Einflusses von GLPss58 oder JRP-SS auf die Interaktion des β 1-Integrins in der Zellmembran von MEL-2- und MCF7-Tumorzellen mit seinem Antikörper (anti-CD29). A) FACS-Analyse der Wirkung auf MEL-2-Zellen. B) FACS-Analyse der Wirkung auf MCF7-Zellen. Die Konzentration von GLPss58 und JRP-SS war 100 μ g/mL.

3.4.6. Inhibierung der Migration von MEL-2- und MCF7-Zellen durch GLPss58 und JRP-SS

Abbildung 32 zeigt, dass GLPss58 und JRP-SS als Bindungspartner für β 1-Integrin fungieren. Die Integrin-Familie vermittelt vor allem die Migration von Zellen [158], und es wurde untersucht, ob GLPss58 und JRP-SS die Migration beider Tumorzellen hemmen können. Für das Migrationsassay von MCF7-Zellen wurden Monolayer-Rückbildungsversuche nach Verletzung durchgeführt. Die Mobilität der Zellen, die zum Verletzungsort zurückkehrten, wurde gemessen und als Migrationsrate angezeigt. Zu diesem Zweck wurden MCF7-Zellen zuerst mit gleichen Zellzahlen ausplattiert und für zwei Tage kultiviert.

24 h nach Verletzung zeigten beide mit sulfatierten Polysacchariden behandelte Zellen eine reduzierte Zellmigration gegenüber der Kontrolle (Abb. 33A). Die relative Migrationsrate der Kontrolle bezeichnet man als 100% und im Vergleich dazu wurde diese Migrationsrate nach Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS jeweils um ca. 50% bzw. 62% reduziert (Abb. 33B).

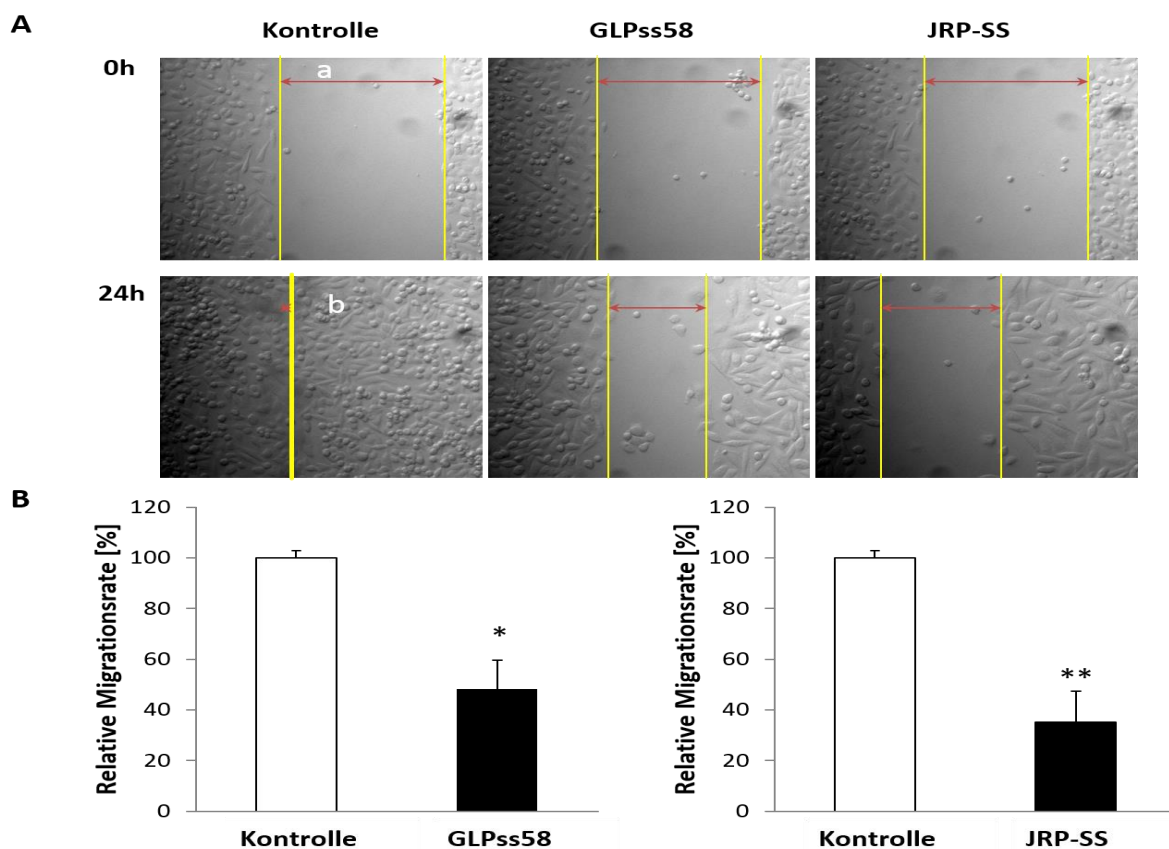


Abbildung 33: Untersuchung des Einflusses auf die Migration von MCF7-Zellen durch GLPss58 oder JRP-SS. Der Migrationstest wurde mittels der Wundheilung-Methode

durchgeführt (siehe 2.2.2.19). **A) Fotografische Abbildung der Migration der Zellen 24 h nach der Verletzung. B) Graphische Darstellung der Migrationsrate der MFC7-Zellen nach der Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS.** Konzentration von GLPss58 und JRP-SS war 50 µg/mL. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$.

Um die Migration von MEL-2-Zellen zu untersuchen, wurde hier ein Transwell-Migration-Assay verwendet, da die MEL-2-Zellen während der Kultivierung nicht die homologe Zellmonoschicht bilden konnten. Die migrierten unbehandelten Zellen wurden als 100% eingesetzt. Im Vergleich dazu wurde die Migrationsrate von MEL-2-Zellen nach der Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS jeweils um ca. 45% und 55% reduziert (Abb. 34B). Das bedeutet, dass GLPss58 und JRP-SS die Zellmigration von MEL-2-Zellen hemmen konnten.

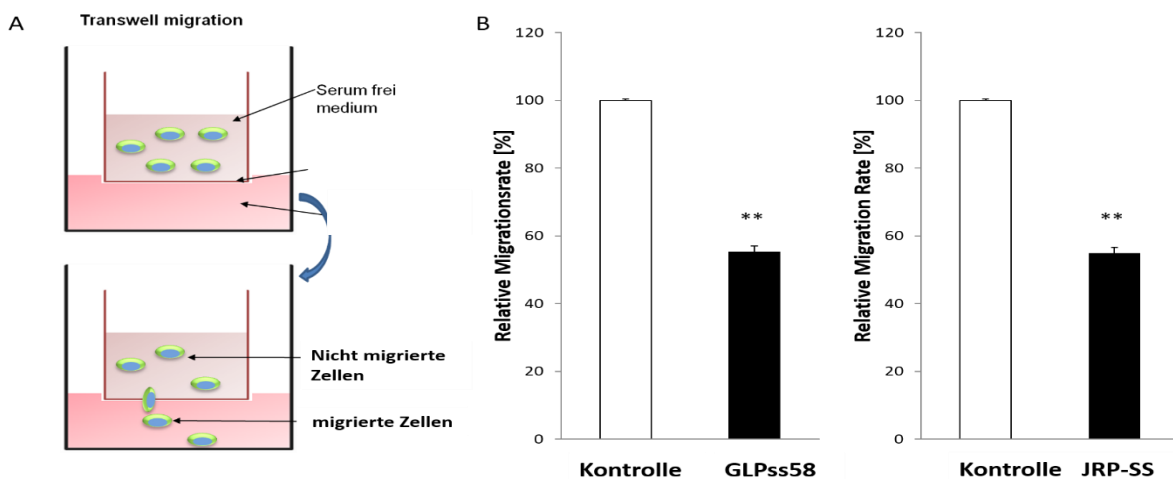


Abbildung 34: Untersuchung des Einflusses auf die Migration von MEL-2-Zellen durch GLP20-SS und JRP-SS. Migrationstest wurde durch Transwell-Methode durchgeführt (siehe 2.2.2.20). Für diese Analyse wurden die MEL-2-Zellen, die zuerst mit 50 µg/mL GLPss58 oder JRP-SS für 30min behandelt und anschließend mit serumfreiem Medium gewaschen und in das obere Well mit durchlässiger Membran (8 µm Poren) gegeben. Im unteren Well wurde das Medium mit 10% FCS gegeben. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Zellen, die durch die Membran gewandert sind, mit 4% Formaldehyd fixiert, 0,05% Kristallviolett angefärbt und im Spektrometer bei 540 nm gemessen. Die OD-Werte sind proportional zur migrierten Zellen. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$.

3.4.7. Hemmung der Phosphorylierung der MAP Kinase (ERK) und Proteinkinase C (PKC) in MEL-2- und MCF7-Zellen durch GLPss58 und JRP-SS

Außer der Zelladhäsion und Zellmigration können sich Integrine an der Initiation von intrazellulären Signalkaskaden beteiligen, einschließlich dem ERK1/2 und dem PKC α

Signalweg [159]. Um zu testen, ob GLPss58 und JRP-SS die Aktivierung der Integrin-vermittelten intrazellulären Signaltransduktion regulieren können, wurde die Expression von phosphorylierten Proteinen ERK1/2 und PKC α mittels Western Blotten nach Behandlung der Tumorzellen mit GLPss58 oder JRP-SS analysiert. Da die ECM-Komponente Kollagen-I ein Ligand von α 2 β 1 Integrin ist [160], wurde es hier als Kontrolle verwendet.

In MCF7-Zellen konnte FCS die Phosphorylierung von ERK und PKC α deutlich hochregulieren. Aber dies wurde von GLPss58 und JRP-SS signifikant gehemmt (Abb. 35B). Durch den Zusatz von Kollagen-I wurde nur eine Erhöhung durch phosphorylierte ERK detektiert, aber GLPss58 und JRP-SS zeigte hierfür keine hemmende Wirkung (Abb. 35B). Im Gegensatz zu MCF7 Zellen hemmten die beiden sulfatierten Polysaccharide nur die Phosphorylierung von PKC α in MEL-2-Zellen deutlich, als Kollagen-I in serumfreiem Medium zugesetzt wurde (Abb. 35C). Die durch FCS induzierte Phosphorylierung von pPKC- α in MEL-2-Zellen wurde durch beide sulfatierte Polysaccharide kaum gehemmt.

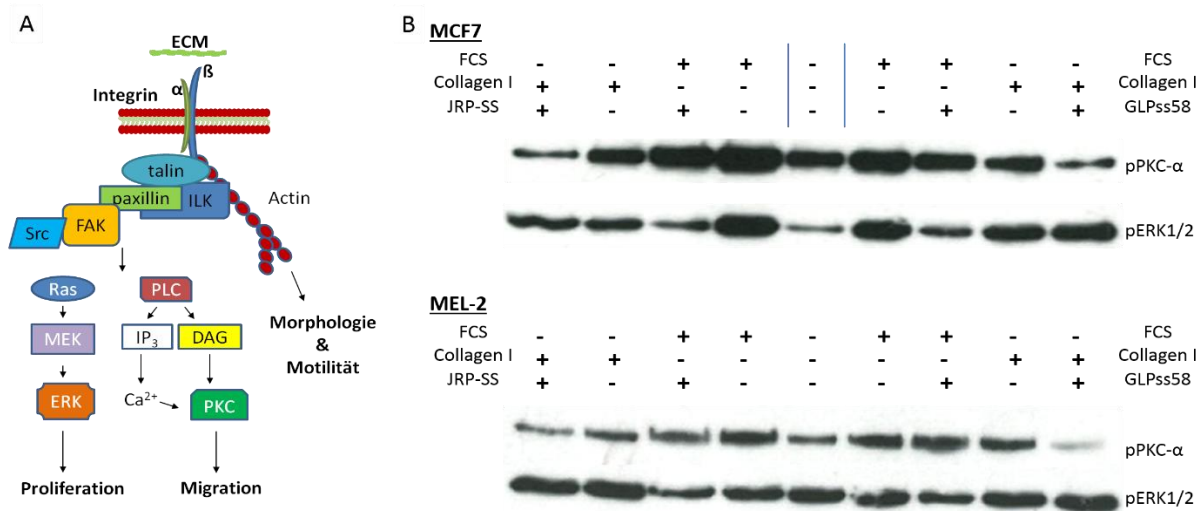


Abbildung 35: Analyse der Phosphorylierung der pPKC- α und pERK1/2 in MCF7- und MEL-2-Zellen nach Behandlung mit GLPss58 and JRP-SS für 24 h durch Western-Blotten. 5×10^5 Zellen wurden über Nacht inkubiert und dann im Kulturmedium mit unterschiedlichen Konditionen für 24 h behandelt. Danach wurde die Zelle geerntet und analysiert. **A) Graphische Darstellung von der Integrin-vermittelten intrazellulären Signalkaskade.** **B) Expression der pPKC- α und pERK1/2 in MCF7-Zellen** **C) Expression der pPKC- α und pERK1/2 in MEL-2-Zellen.** Konzentration von FCS: 10%, Kollagen I : 5 μ g/mL, GLPss58 und JRP-SS: 100 μ g/mL.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GLPss58 und JRP-SS die von FCS induzierte Aktivierung von ERK in MCF7-Zellen herunterregulierten, wodurch die

Proliferationsrate von MCF7-Zellen inhibiert werden konnte. Es wurde auch gezeigt, dass die FCS induzierte Phosphorylierung der PKC α beider Tumorzellen durch die beiden sulfatierten Polysaccharide signifikant herunterreguliert wurde und die Migration von MEL-2- und MCF7-Zellen beeinflusst wurde. Kollagen-I ist ein bekanntes Zellmatrix-Protein, das mit Integrin eine Bindung eingehen kann und die Integrin-vermittelte Signaltransduktion regulieren kann. Abbildung 35 zeigt, dass GLPss58 und JRP-SS die Kollagen I stimulierte Phosphorylierung von ERK keinen Einfluß hatten, Daher gab es keinen Hinweis dafür, dass die beiden sulfatierten Polysaccharide die Integrin-vermittelte Signaltransduktion regulieren können. Wegen der geringen Hemmwirkung auf die Aktivierung von ERK in MEL-2-Zellen stellte sich die Frage, ob es unterschiedliche Zielmoleküle bzw. Signaltransduktions-wege der MEL-2-Zellen bei der Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS gibt.

3.4.8. Hemmung der Proliferationsrate der MEL-2-Zellen durch Aktivierung von Wnt/ β -Catenin Signalweg

Um die in Abschnitt 3.4.7 gestellte Frage zu lösen, wurden weitere Signaltransduktionswege analysiert. Viele Studien zeigten, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signaling eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Proliferation und Survivals von vielen Typen humaner Krebszellen, einschließlich der Brust- und Darm-Tumorzellen, spielt, [161]. Im Gegensatz dazu kann durch Aktivierung der Wnt/ β -Catenin Signalinges die Proliferation der melanoma Tumorzellen gehemmt werden [162].

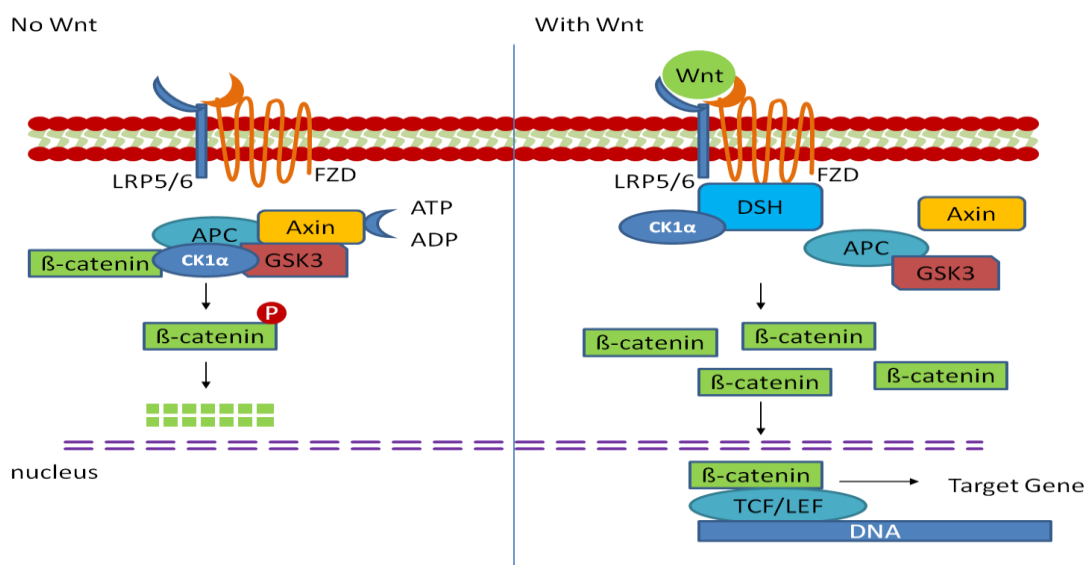


Abbildung 36: Wnt/ β -Catenin Signaling. Links: Freier Wnt-Rezeptor. Axin, GSK und APC bilden den "Zerstörer-Komplex" und β -Catenin wird durch Phosphorylierung zerstört.

Rechts: Wnt bindet an den Rezeptor. Axin wird aus der "Zerstörenden Komplex" entfernt. β -Catenin wird dephosphoryliert, akkumuliert und in den Zellkern umgelagert. Dort bindet das aktivierte β -Catenin an einen Transkriptionsfaktor der DNA-Kette und aktiviert die Transkription der Zielgene. P: Phosphat.

Abbildung 36 zeigt die graphische Darstellung des Wnt/ β -Catenin Signalweg. Nach Bindung des Wnt-Liganden an den Rezeptor FZD/LRP56-Komplex in der Zellmembran wird β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert. Dann lagert das aktivierte β -Catenin in den Zellkern um und aktiviert die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF. Dadurch wird die Transkription der Zielgene induziert.

3.4.8.1. Hemmung der MEL-2-Zellproliferation durch Aktivierung vom Wnt/ β -Catenin Signalweg durch Wnt3a

Nach der Aktivierung des Wnt / β -Catenin-Signalwegs werden verschiedene Zielgene in Brusttumorzellen und Melanomen exprimiert, was zur Auslösung von unterschiedlichen Zellreaktion in beiden Tumorzellen führt. Ein Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Brust Tumorzellen ist Cyclin D1, das nach Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs durch Wnt3a hochreguliert werden kann und danach zur Tumor-Progression und Proliferation führt [163]. Die Aktivierung des Wnt / β -Catenin-Weges durch Wnt3a im Melanom führt zu einer hochrangigen Regulation von Trpm1, Kit und Met. Diese Gene sind mit der normalen Melanozyten-Differenzierung assoziiert. So ist das Melanom-Progression-assoziierte Gen Mifit herunterreguliert. Wnt3a kann zu einer Veränderung im Zyklus des Melanoms führen. Die Wnt3a-behandelten Zellen zeigen eine erhöhte Population in der G1-Phase mit einer reduzierten Population in der S-Phase, welche dann zu einer Verringerung der Proliferation führt [161].

Um nachzuweisen, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs zur Herunterregulierung der Proliferation in MEL-2-Zellen, nicht aber in MCF-Zellen führt, wurden die beiden Ziellinien mit Wnt3a mit unterschiedlichen Konzentrationen für 3 Tagen behandelt. Anschließend wurden die entsprechenden relativen Proliferationsraten durch Alamar-Blue-Assay analysiert. Wnt3a wurde aus L-Zellen während der Kultivierung in Medium freigesetzt. Bis zum Wachsen der L-Zellen auf etwa 100 % Konfluenz wurde Wnt3a in dem konditionalen Medium gesammelt und mit der gewünschten Konzentration im Kulturmedium im Experiment verwendet. Abbildung 37A zeigt, dass Wnt3a die Proliferation von MEL-2-Zellen deutlich inhibierte und diese hemmende Wirkung von der Konzentration abhängig war. In Gegensatz dazu hatte Wnt3a keine Hemmwirkung auf die Proliferation der MCF7-Zellen. Mittels

Western-Blot konnte nachgewiesen werden, dass nach der Behandlung mit Wnt3a die Expression von β -Catenin in beiden Arten von Tumorzellen signifikant erhöht war (Abb. 37B). Die maximale Menge von β -Catenins in Zellen wurde bei der Behandlung mit 10% Wnt3a-haltigem Medium nachgewiesen. Bei erhöhten Anteilen von Wnt3a-kontionelle Medium (25%, 50%) wurde die Expression von β -Catenin im Zytoplasma gesenkt.

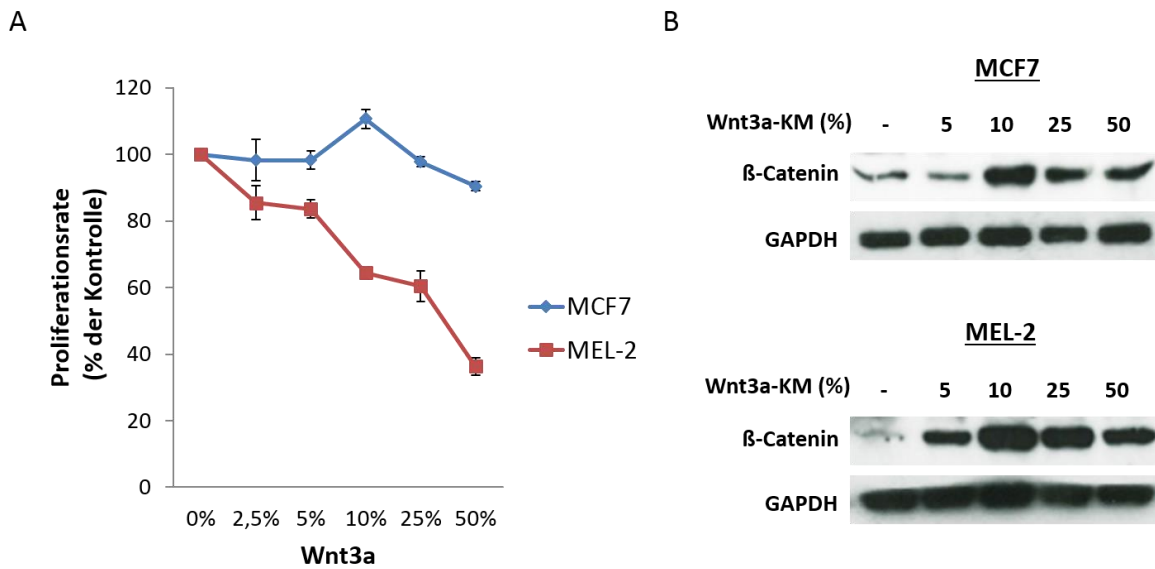


Abbildung 37: Untersuchung des Einflusses von Wnt3a auf die Proliferation von MEL-2-Zellen und MCF7-Zellen. **A)** Proliferation Assay durch Alamar-Blue-Assay nach Behandlung mit Wnt3a für 3 Tage bei RT. **B)** Analyse der Expression des β -Catenins in beiden Arten von Tumorzellen nach Behandlung mit Wnt3a für 24 h bei RT durch Western Blot. Wnt3a wurde aus L-Zellen während der Kultivierung in Medium freigesetzt. Bis zum Wachsen der Zellen auf ca. 100% Konfluenz wurde das konditionelle Medium gesammelt und nach gewünschtem Anteil für die Untersuchung eingesetzt. Wnt3a-KM (%): Wnt3a konditionelle Medium

3.4.8.2. Hemmung der MEL-2-Zellproliferation durch Aktivierung vom Wnt/ β -Catenin Signalweg durch GLPss58 und JRP-SS

Es wurde berichtet, dass die Proliferationsrate von MEL-2-Zellen nach der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs reduziert wurde [161]. Daher wurde untersucht, ob der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in MEL-2-Zellen durch GLPss58 oder JRP-SS aktiviert werden kann. 10% eines Wnt3a-konditionelle Mediums wurde als Positivkontrolle verwendet. GLPss58 und JRP-SS wurden im Medium bei einer Konzentration von 100 μ g/mL eingesetzt. Die Kultivierung der Zellen dauerte insgesamt 6 Tage.

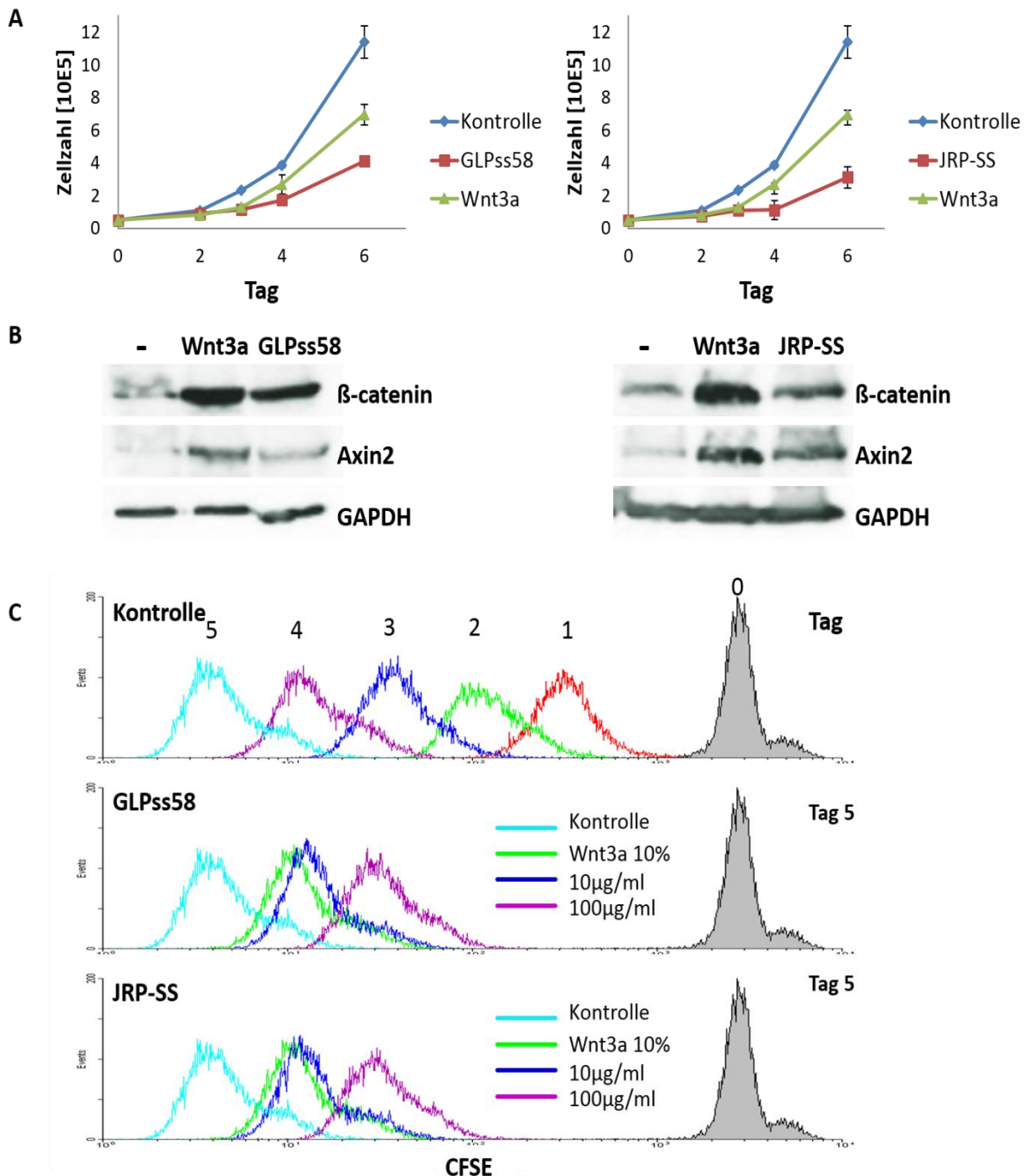


Abbildung 38: Untersuchung des Einflusses von GLPss58 oder JRP-SS auf die Proliferation von MEL-2-Zellen und die Aktivierung von dem Wnt/ β -Catenin Signalweg. **A) Analyse der Zellzahlen. Zellen wurden mit GLPss58 (50 μ g/mL), JRP-SS (50 μ g/mL) oder Wnt3a (10%) für 6 Tage behandelt, Zellzahlen wurden durch Trypan-Blau-Färbung gezählt. **B) Western Blot-Analyse der Expression von β -Catenin und des Zielproteins Axin2 in MEL-2-Zellen nach der Behandlung.** Zellen wurden mit GLPss58 (50 μ g/mL), JRP-SS (50 μ g/mL) oder Wnt3a (10%) für 6 Tage behandelt, und danach lysiert. 50 μ g der gesamten Proteine wurde auf Gel aufgetragen. Anti- β -Catenin und Anti-Axin2 Antikörper wurden für den Immunblot verwendet. **C) Analyse der Zellteilung mittels der CFSE-Färbung (siehe 2.2.2.23).** Die Zahl 1-5 stellten nachkommende Generationen der MEL-2-Zellen nach Kultivierung von 1 bis 5 Tage dar.**

Nach 3 Tagen wurde eine Hemmwirkung auf die Proliferation der MEL-2-Zellen nach der Behandlung mit Wnt3a, GLPss58 oder JRP-SS gezeigt (Abb. 38A). Nach 6 Tagen der Behandlung mit Wnt3a verminderte sich die Zellzahl um die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 38A), wohingegen sich die Zellzahl nach der Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS nach 6 Tagen das 4- bzw. 5-fache im Vergleich zur Kontrolle reduzierte (Abb. 38A). Gleichzeitig zeigte die Analyse des Western Blots, dass die Proteinexpression von β -Catenin sowie die des Zielproteins Axin2 in MEL-2-Zellen nach der Behandlung mit GLPss58 oder JRP-SS für 6 Tage deutlich zugenommen, im Vergleich zu denen in den nicht behandelten Zellen (Abb. 38B).

Die Proliferation von MEL-2-Zellen wurde nochmal durch CFSE Proliferation Assay analysiert. In diesem Experiment wurden die MEL-2-Zellen in Medium, das ein von den beiden sulfatierten Polysaccharid enthält, ausplattiert. Das Medium, welches 10% Wnt3a enthält, wurde als positive Kontrolle verwendet. Abbildung 38C oben zeigt, dass die CFSE Fluoreszenzintensität mit längeren Kultivierungszeiten in unbehandelten MEL-2-Zellen reduziert wurde, und bei jeder Zellteilung einen Peak gemessen werden konnte. Bei der unbehandelten Kontrolle wurde die Zellen maximal bis zu 5 Generationen geteilt, während die Zellteilung von MEL-2-Zellen durch Behandlung von Wnt3a bei der Positivkontrolle teilweise verhindert wurde und nur max. 4 Generation geteilt wurde. Ähnlich wie bei Wnt3a wurde auch eine reduzierte Zellteilung der MEL-2-Zellen nach der Behandlung von GLPss58 oder JRP-SS gefunden. Dies bedeutet, dass die Zellteilung von MEL-2-Zellen durch die beiden Substanzen verhindern wurde. Diese Hemmwirkung hing von den Konzentrationen beider sulfatierten Polysaccharide ab (Abb. 38C). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass GLPss58 und JRP-SS die MEL-2-Zellproliferation hemmen und die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs induzierten konnten. Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führt wahrscheinlich zur Reduktion der Proliferation von MEL-2-Zellen.

3.4.8.3. Arretierung des Zellzykluses in der G1-Phase nach der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs durch GLPss58 und JRP-SS

Chen et al. (2009) berichteten, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs durch Wnt3a zur Änderung der Zellanteile in den verschiedenen Phasen des Zellzykluses in melanoma Zellen führte, wobei der Zellanteil in der G1-Phase erhöht und in der S-Phase reduziert war [162]. Um zu untersuchen, ob GLPss58 oder JRP-SS den Zellzyklus der MEL-2-Zellen beeinflussen, wurden die Zellen in einem mit 10

$\mu\text{g/mL}$ GLPss58 oder JRP-SS enthaltenem Medium für 3 Tag kultiviert. Als positive Kontrolle wurde 10% Wnt3a-haltiges Medium verwendet.

Im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Wnt3a den Zellanteil in der G1-Phase um etwa 20% und reduzierte den S-Phasen-Zellanteil um etwa 10% (Abbildung 39). Die Effekte zwischen GLPss58 und JRP-SS unterschieden sich nur minimal. Beide sulfatierten Polysaccharide führten zu einer etwa 20%-igen Zunahme der Zellanteile in der G1-Phase und einer etwa 15% igen Abnahme der Zellanteile in der S-Phase (Abb.39).

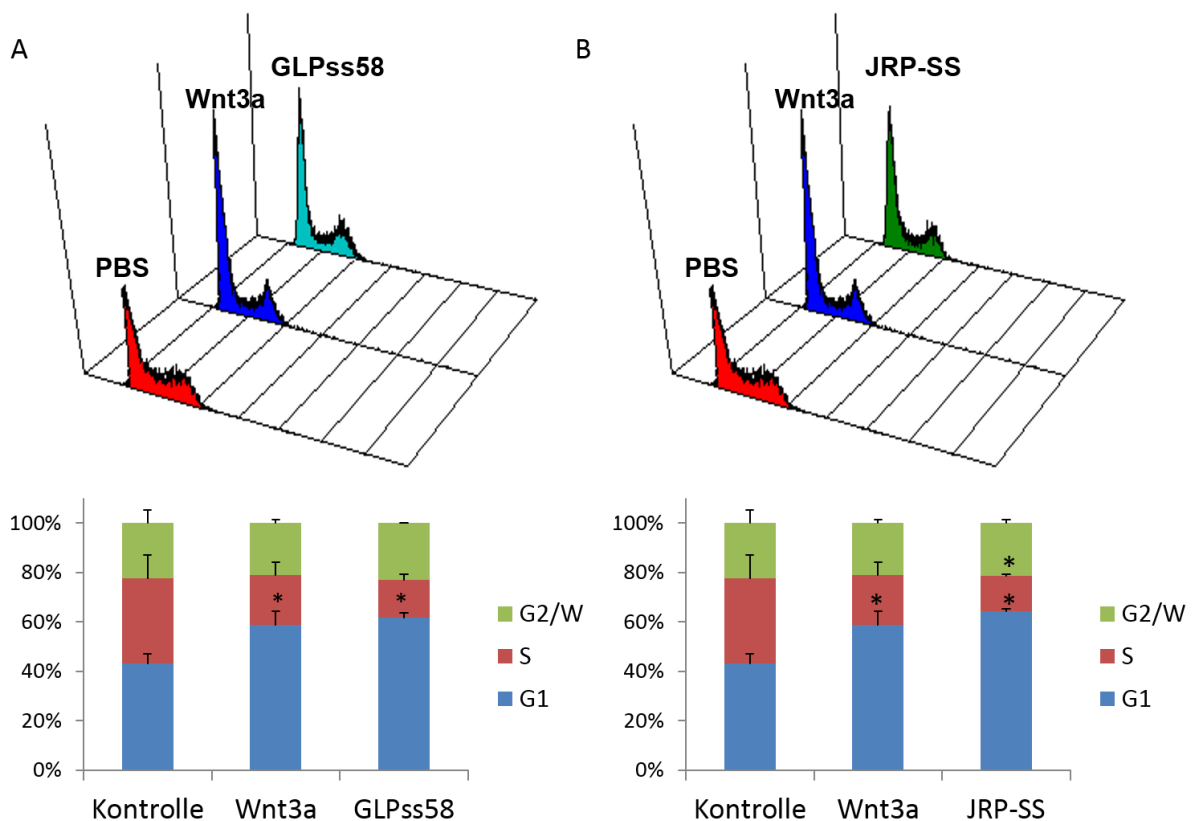


Abbildung 39: Veränderung der Zellanteile im Zellzyklus von MEL-2-Zellen nach Behandlung von GLPss58 (A) oder JRP-SS (B). 1×10^5 Zellen wurden in mit 10% Wnt3a und $10 \mu\text{g/mL}$ GLPss58 oder $10 \mu\text{g/mL}$ JRP-SS enthaltenem Medium gegeben und für 3 Tage kultiviert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung mit 70% Ethanol wurde die DNA der Zellen mit Propidiumiodid gefärbt, anschließend durch FACS analysiert. Wnt3a fungiert als positive Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mittels des paired t Tests wird die spezifische Signifikante berechnet $^* = p < 0,05$

3.5. Anti-Blutgerinnung durch Polysaccharide-Fractionen

Durch den anti-inflammatorischen Effekt zeigt Heparin einen guten Ansatz, den Entzündungsprozess zu hemmen [156]. In den Abschnitten 3.3.6 und 3.3.7 wurde

beschrieben, dass GLPss58 und JRP-SS ähnliche Eigenschaften wie Heparin, um den Entzündungsprozess zu verhindern. Heparin ist der bekannteste blutgerinnungshemmende Wirkstoff. Um zu untersuchen, ob die beiden sulfatierten Polysaccharide auch die gleiche Eigenschaft in Bezug auf die Störung der Hämostase haben, wurde ein Test zur Blutgerinnung mittels ROTEM® Thrombelastographie durchgeführt. In Abbildung 2 ist eine klassische Thrombelastographie bei der Messung dargestellt. Das Messprinzip wurde im Abschnitt 2.2.2.20 detailliert beschrieben. Die Blutgerinnungskaskade teilt sich in zwei initiale Wege, den intrinsischen (Kontaktaktivierung) und den extrinsischen Weg (Gewebefaktor Aktivierung), welche aber beide zu der gleichen grundlegenden Reaktion führen und Fibrin bilden.

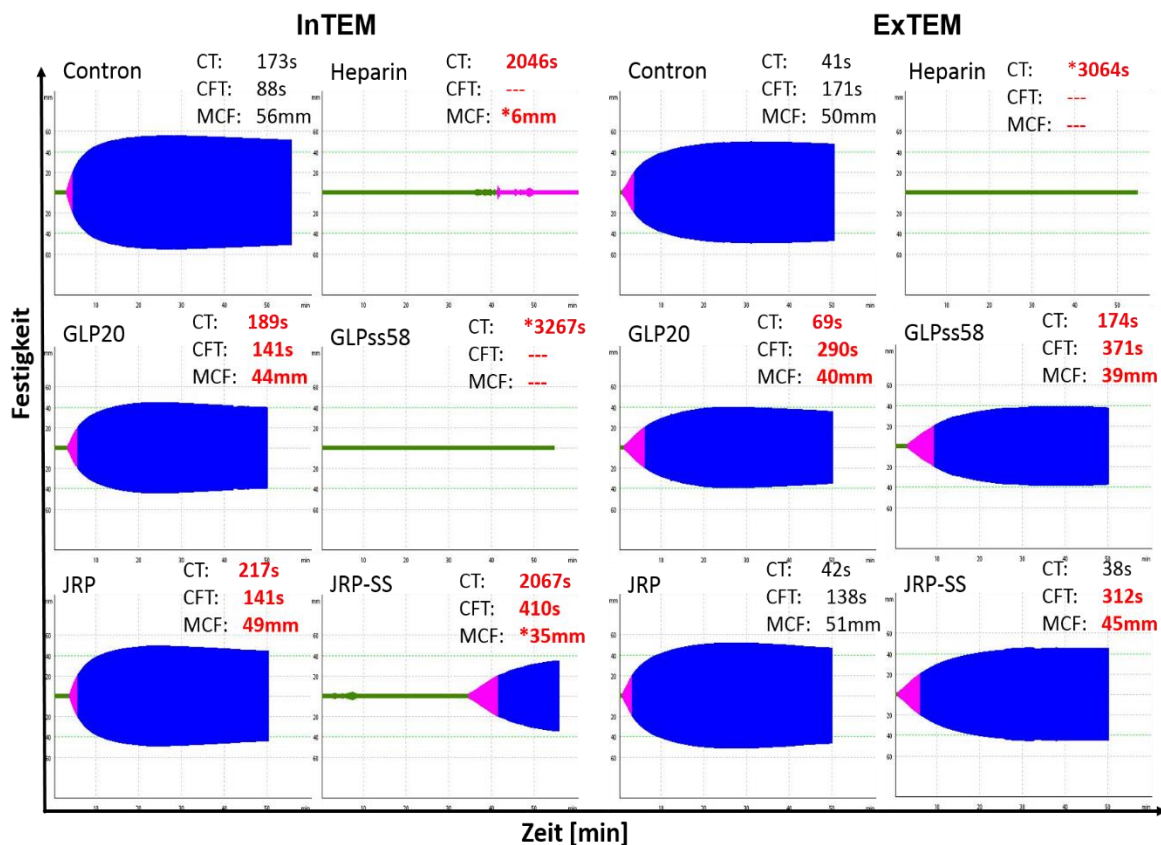


Abbildung 40: Untersuchung der Wirkung von GLPss58 und JRP-SS auf Blutgerinnung. Das menschliche Blut wurde in Zitrat-Röhrchen gesammelt. Das Reagenz von InTEM enthält einen Aktivator, der den intrinsischen Gerinnungsweg aktivieren kann. Das Reagenz von ExTEM enthält einen Gewebefaktor (TF): Gewebe-Thromboplastin, der den extrinsischen Gerinnungsweg aktivieren kann. Das Blutvolumen pro Messung betrug 300 µL. Die Messzeit dauerte 60 min. Die Konzentration von Heparin und den Proben war jeweils 100 µg/mL. Das Zeichen "*" bedeutet, dass die Werte niedriger als die Sollwerte waren, da die Messzeit nicht ausreichte.

Abbildung 40 zeigt deutlich, dass die Blutgerinnung durch Heparin (100 µg/mL) sowohl über den intrinsischen Weg (InTEM) als auch über den extrinsischen Weg (ExTEM)

gehemmt wurde. Bei dem intrinsischen Weg verlängerte Heparin die Gerinnungszeit (CT) von 173 (bei Kontrolle) auf 2046 Sekunden. Bis zum Ende der Messung wurden keine Werte zur Gerinnelbildungszeit (CFT) und zur maximalen Gerinnselfestigkeit (MCF) gemessen, da sich keine Gerinnel bildeten. Ähnlich wie Heparin verursachten GLPss58 und JRP-SS verlängerte CT-Werte jeweils bis *3267 und 2067 Sekunden. Für GLPss58 konnten die Werte von CFT und MCF nicht angezeigt werden, da die Messzeit nicht ausreichte, um eine Gerinnelbildung beobachten zu können. Außerdem verlängerte JRP-SS die CFT von 88 (bei Kontrolle) auf 410 Sekunden und verkürzte die MCF von 56 auf 35 mm. GLP20 und JRP, die jeweiligen Ausgangssubstanzen der beiden sulfatierten Polysaccharide, zeigten leichte Hemmwirkung auf die Blutgerinnung, aber im Vergleich zu ihren sulfatierten Formen war die Hemmwirkung verschwindend gering. Im Gegensatz zu der intrinsischen Gerinnung zeigten die Polysaccharide GLP20, GLPss58 und JRP-SS sehr schwache Hemmwirkung auf den extrinsischen Gerinnungsweg. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass sowohl GLPss58 als auch JRP-SS eine starke Hemmwirkung auf die intrinsische Blutgerinnung hatten, wohingegen sie nur eine schwache Wirkung auf den extrinsischen Weg zeigten sich damit konträr gegenüber Heparin zeigten.

3.6. Anti-Proliferation verschiedener Tumorzellen durch Triterpenoiden aus *G. lucidum*

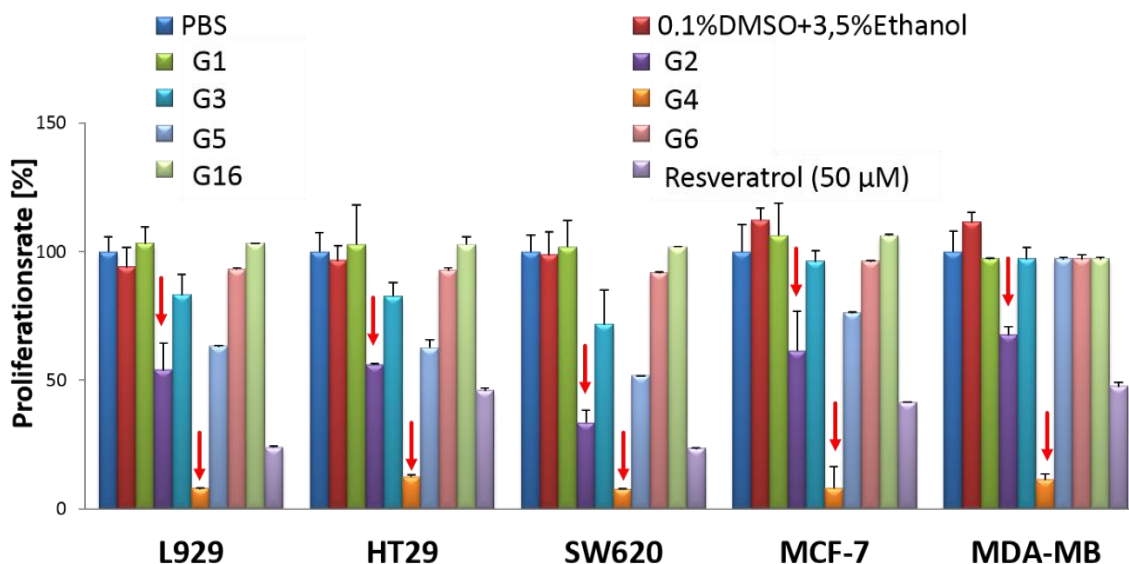


Abbildung 41: Untersuchung der Proliferationsrate verschiedener Tumorzelllinien nach der Behandlung mit unterschiedlichen Triterpene. 2×10^4 Zellen wurde in einer 96-well Platte ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proben mit einer max. Konzentration von 100 µg/mL aufgetragen und die Zellen für 24 h bei 37°C kultiviert. Die Proliferationsrate wurde durch die Alamar-Blue-Assay analysiert. **L929:** murine fibrosarcoma

cell line; **HT29**: human colorectal adenocarcinoma cell line; **SW620**: human colon adenocarcinoma cell line; **MCF7**: human breast adenocarcinoma cell line; **MDA-MB-231**: human breast adenocarcinoma cell line. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen.

G. lucidum wird in der traditionellen chinesischen Medizin als Antitumormittel verwendet. Es gibt über 200 verschiedene Arten von *G. lucidum*, die Triterpenoide und zahlreiche niedermolekulare Substanzen enthalten, wovon einige eine Antitumorwirkung zeigten [163]. In Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung der unterschiedlichen Triterpenoide, die aus *G. lucidum* isoliert, auf die Proliferation von verschiedenen Tumorzellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Fraktion G2 und G4 die stärkste Hemmwirkung hatten (Abb. 41).

3.6.1. Anti-Tumorwirkung von Triterpenoiden G2 und G4 aus *G. lucidum*

Abbildung 42 zeigt, dass die Substanzen G2 und G4 die Proliferation verschiedener Tumorzellen dosisabhängig hemmen konnten. G4 zeigte eine höhere Wirkung als G2.

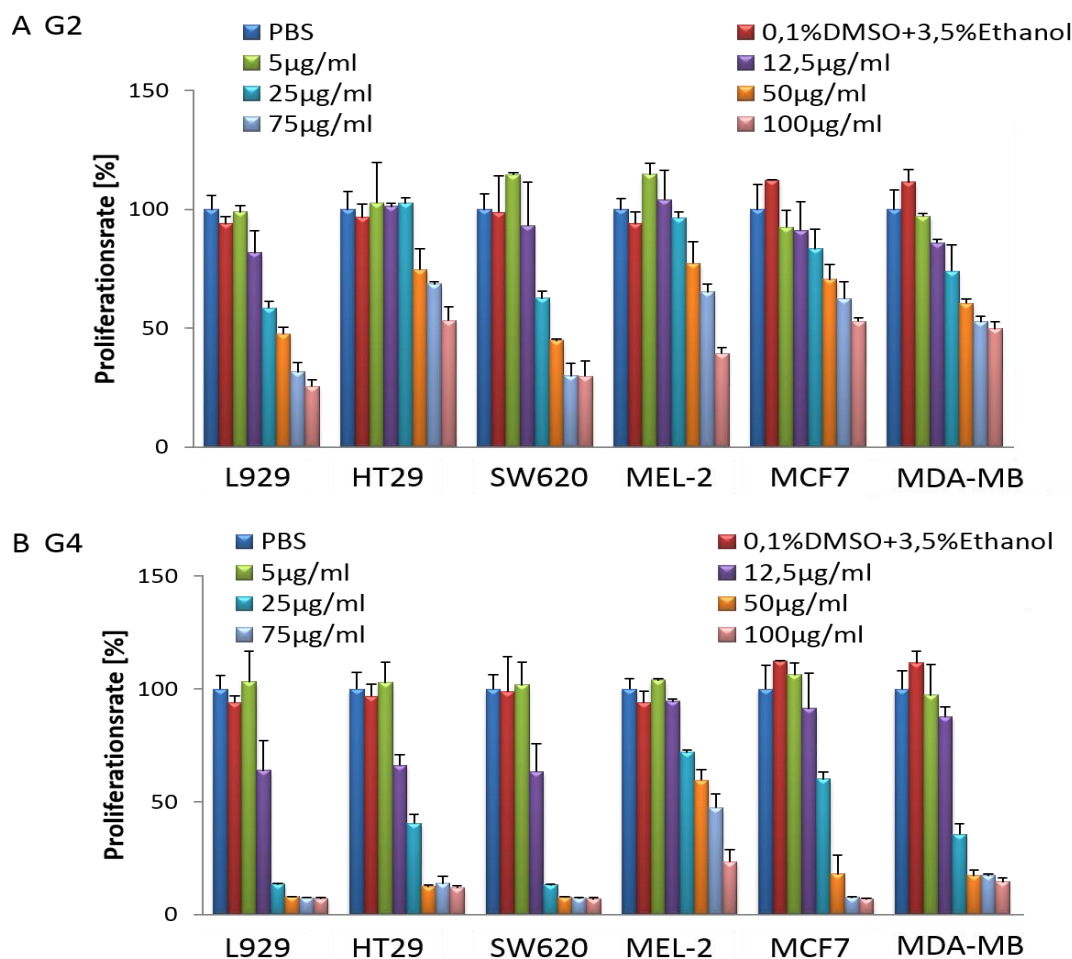


Abbildung 42: Untersuchung der Proliferationsrate verschiedener Tumorzelllinien nach der Behandlung mit den Triterpenen G2 (A) oder G4 (B). 1×10^4 Zellen wurde in einer 96-

well Platte ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proben mit unterschiedlichen Konzentration aufgetragen und die Zellen für 24 h bei 37°C weiter kultiviert. Die Proliferationsrate wurde durch Alamar-Blue-Assay analysiert. **MEL-2**: human melanoma cell line. Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SEM von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen.

3.6.2. Untersuchung der Antitumormechanismen von G2 und G4

Um herauszufinden, wie die Triterpenoiden G2 und G4 auf die Tumorzellen wirken, wurden MEL-2-Zellen für die folgenden Untersuchungen verwendet, weil es sich um eine humane maligne Melanom-Zelllinie handelt, die zu den hochgradig bösartigen Tumortypen gehören.

3.6.2.1. Induktion der Apoptose von MEL-2-Zellen durch G2 und G4

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Im Gegensatz zur Nekrose, die durch Zellschwellung zu lokalen Entzündungen führt, leitet die Apoptose keine Entzündungsreaktion ein. Ein Ziel der Krebsforschung ist es, kontrollierte Apoptose bei neoplastischen Zellen auszulösen.

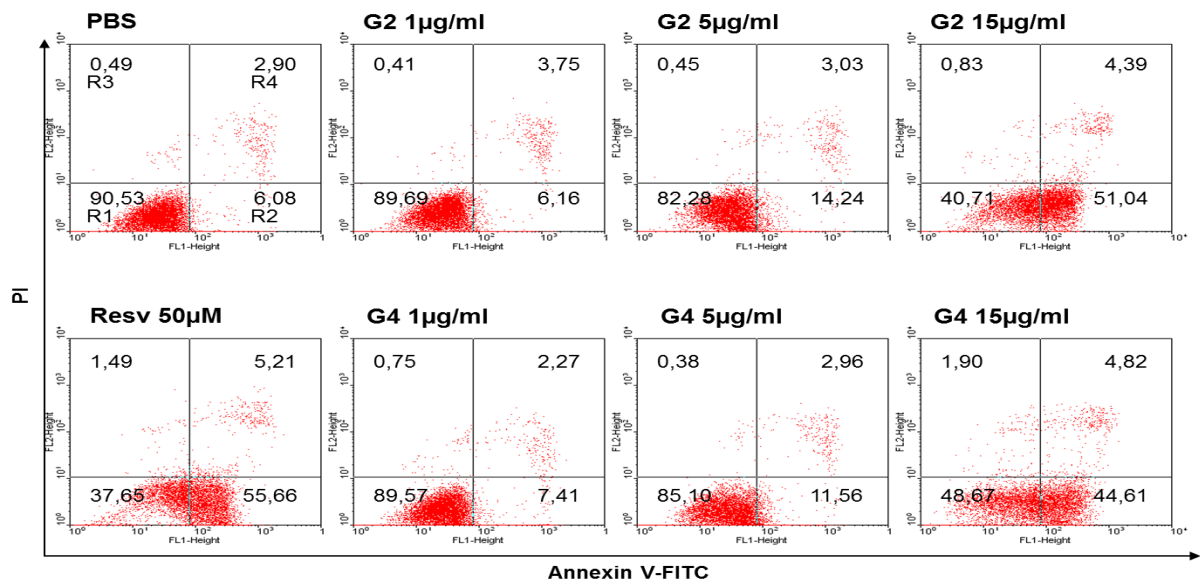


Abbildung 43: Untersuchung der Apoptose von MEL-2-Zellen nach der Behandlung mit G2 oder G4. 1×10^4 Zellen wurde in 24-well Platte ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proben mit unterschiedlichen Konzentration eingegeben und die Zellen für 24 h bei 37°C weiter kultiviert. **R1**: lebende Zellen. **R2**: früh-apoptotische Zellen. **R3**: spät-apoptotische und nekrotische Zellen. **R4**: nekrotische Zellen. **Resv**: Resveratrol.

Mittels der Apoptose-Untersuchung wurde gezeigt, dass G2 und G4 die Apoptose von MEL-2-Zellen dosisabhängig induzieren konnten. Nach der Behandlung mit G2 oder G4 (15 µg/mL) für 24 h gingen jeweils ca. 51% und 45% der MEL-2-Zellen in die

Apoptose (Abb. 43). Resveratrol mit 50 μM wurde als positive Kontrolle verwendet und induzierte bei ca.56% der Zellen eine Apoptose.

3.6.2.2. Induktion der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in MEL-2-Zellen durch G2 und G4

Mehrere Hinweise zeigten, dass sich die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als wichtiger physiologischer Regulator der intrazellulären Signalwege bedienen kann. Die Mitochondrien sind sowohl Quelle als auch Ziel von ROS. Diese Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Weg [164]. Die Triterpene G2 und G4 konnten die Generierung von ROS in MEL-2-Zellen induzieren (Abb. 44). Diese Wirkungen sind konzentrationsabhängig, wobei eine zunehmende intrazelluläre ROS-Produktion durch G2 und G4 deutlich erkennbar war (Abb. 44).

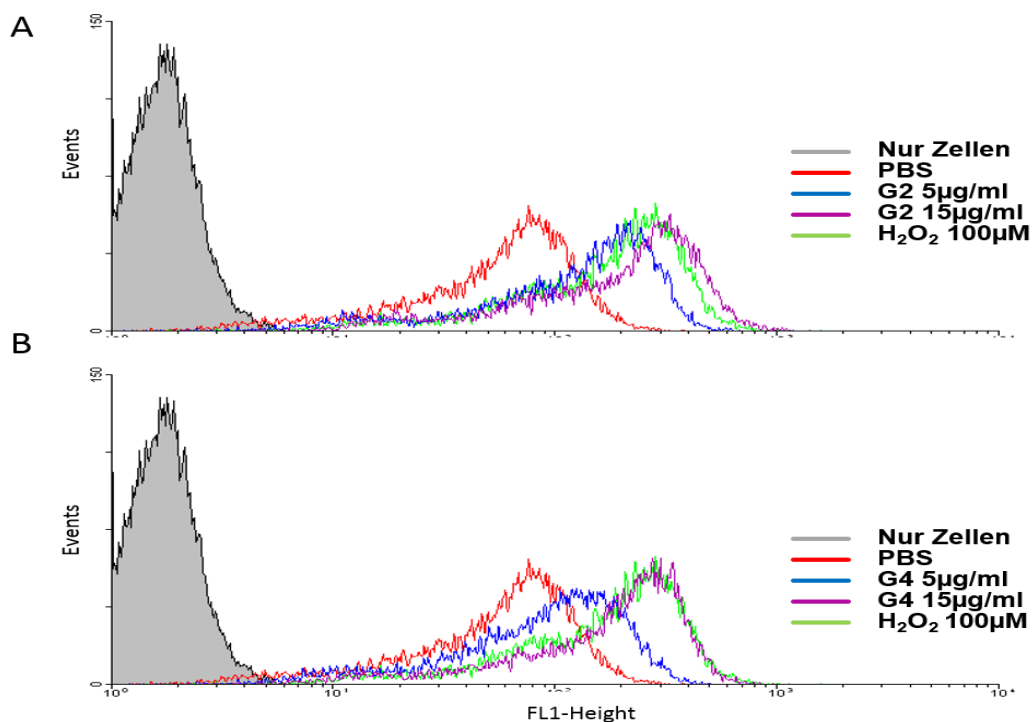


Abbildung 44: Untersuchung der ROS-Produktion in MEL-2-Zellen nach Behandlung mit G2 oder G4. 1×10^4 Zellen wurden in einer 24-well Platte ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proben mit unterschiedlichen Konzentration eingegeben und die Zellen für 24 h bei 37°C weiter kultiviert. **Grau hinterlegter Peak:** ROS-negative; **rote Kurve:** ROS-Produktion in unbehandelten Zellen; **Farbige Kurven:** ROS-Produktion in behandelten Zellen. H_2O_2 mit 100 μM als positive Kontrolle verwendet.

3.6.2.3. Induktion der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ in MEL-2-Zellen durch G2 und G4

Durch die Depolarisation der mitochondrialen Membran kommt es zur Freisetzung von ROS ins Zytoplasma [165]. Um zu untersuchen, ob G2 und G4 die Depolarisation des Mitochondrien Membrans von MEL-2-Zellen induzieren können, wurden das JC-1 mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ Detektionsreagenz verwendet. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ ist ein Kennzeichen für die Apoptose. Non-apoptotische Zellen enthalten das Monomer JC-1 im Zytoplasma (grün), welches aggregieren und sich in Mitochondrien (rot) anreichern kann.

Während der Apoptose wurde JC-1 nur in monomerer Form im Zytoplasma nachgewiesen (Abb. 45A). Nach der Behandlung mit G2 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder G4 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 8 h wurden bei jeweils ca. 75% bzw. 64% der Zellen das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ depolarisiert und durch FACS-Analyse detektiert (Abb. 45B). Dies bedeutet, dass der durch G2 und G4 induzierte ROS-Anstieg hauptsächlich durch die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ verursacht wurde.

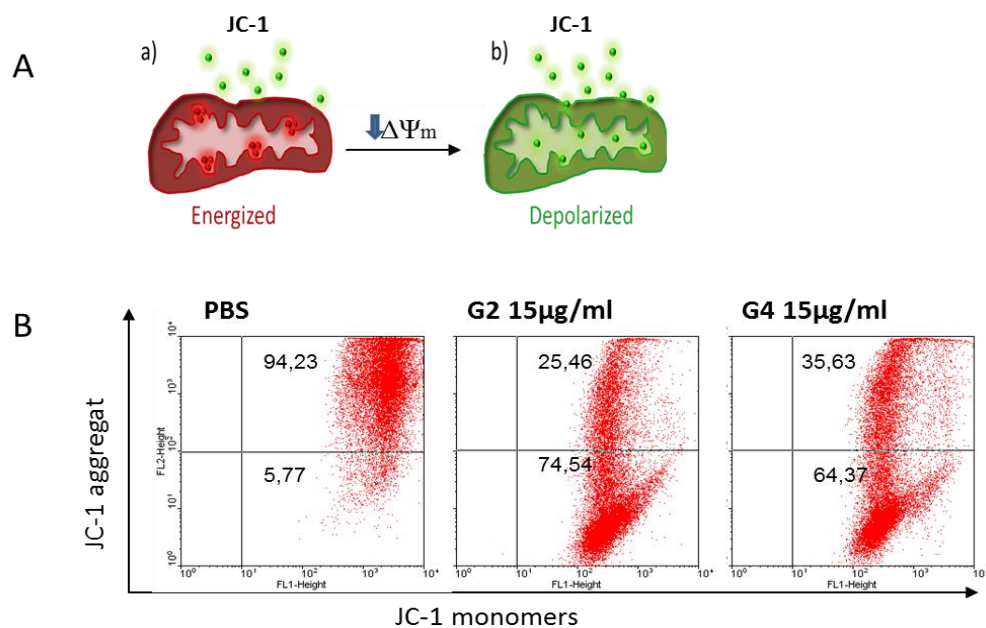


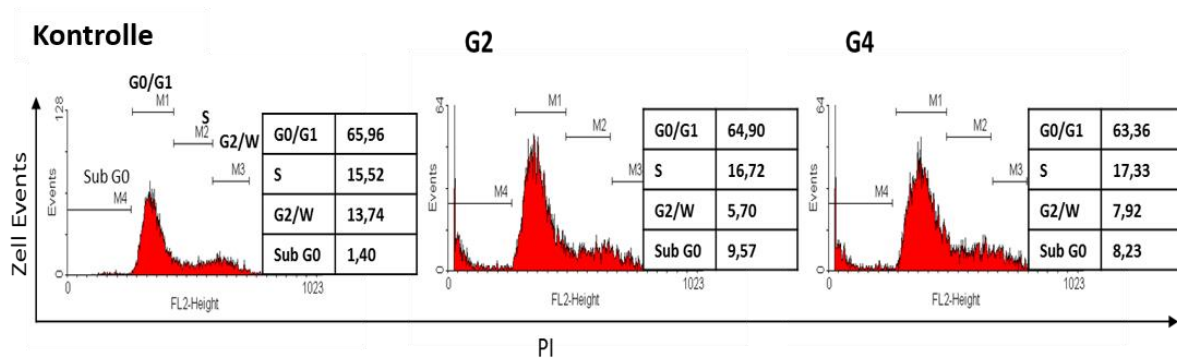
Abbildung 45: Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ in MEL-2-Zellen. A) JC-1 mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$ Detektionsreagenz. B) FACS-Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in MEL-2-Zellen 1×10^5 MEL-2-Zellen wurde mit G2 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder G4 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 8 h bei 37°C behandelt.

3.6.2.4. Induktion der DNA-Schädigung und p53 Expression in MEL-2 Zellen durch G2 und G4

ROS kann oxidative Schäden an der DNA induzieren, in dessen Folge der DNA-Doppelstrang aufgebrochen und fragmentiert wird [166]. Durch Analyse des Zellzykluses konnte gezeigt werden, dass G2 und G4 die Fragmentierung von DNA in MEL-2-Zellen induzieren.

Nach der Behandlung mit G2 oder G4 (5 $\mu\text{g/mL}$) für 24 h wurden die MEL-2-Zellen in der SubG0-Phase (DNA-Fragmentierung) von 1,4% auf 9,57% und 8,23% erhöht, und die MEL-2-Zellen in der G2/W-Phase von 13,74% auf 5,7% und 7,92% reduziert (Abb. 46A). Durch die Schädigung des DNA-Doppelstrangs können die DNA-Reparaturenzyme, einschließlich ATM (mutated in ataxia telangiectasa) und ATR (ATM-related kinase) aktiviert werden. Sowohl ATM als auch ATR können direkt die Expression und Phosphorylierung des Tumorsuppressor Gen p53 induzieren [161]. Durch Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass G2 und G4 den p53-Expression von MEL-2-Zellen zeitabhängig induzierten (Abb. 46B).

A



B

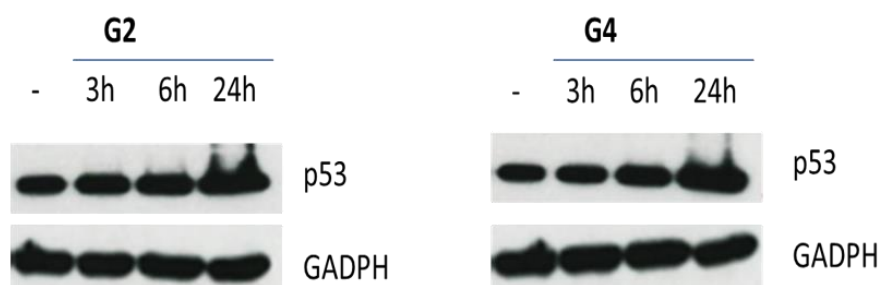


Abbildung 46: A) Untersuchung des Zellzyklus der MEL-2-Zellen durch Behandlung mit G2 oder G4. 1×10^5 Zellen wurden in einer 24-well Platte ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht wurden jeweils 15 $\mu\text{g/mL}$ der Proben hinzugefügt und die Zellen für 24 h bei 37°C kultiviert. M1: Zellen in der G0/G1-Phase. M2: Zellen in der S-Phase. M3: Zellen in der G2/M-

Phase. *M4*: Zellen in der Sub G0-Phase. **B) Western Blot Analyse der p53-Expression in MEL-2-Zellen nach Behandlung mit G2 oder G4 (15 µg/mL) für 3 h, 6 h und 24 h bei 37°C.**

3.6.2.5. Hochregulation von Bax und Unterregulation von Bcl-2 in MEL-2-Zellen durch G2 und G4

Bei stärkeren DNA-Schäden kann der pro-apoptotische Faktor wie Bax (Bcl2-associated X-Protein) aktiviert werden [167]. Daher ist die Aktivierung von p53 und Bax wichtig in der DNA-geschädigten-vermittelten Apoptose. Diese Apoptose kann auch p53-unabhängig sein, indem das anti-apoptotische Protein Bcl-2 degradiert wird [168]. Mittels Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass die Behandlung von MEL-2-Zellen mit G2 bzw. G4 zu einer Überexpression von Bak, bzw. zu einer Herunterregulation von Bcl-2-Expression führt (Abb. 47). Dies bedeutet, dass G2 und G4 eine DNA-geschädigte-vermittelte Apoptose in MEL-2-Zellen sowohl durch den p53-abhängigen Weg als auch p53-unabhängigen Weg induzieren können.

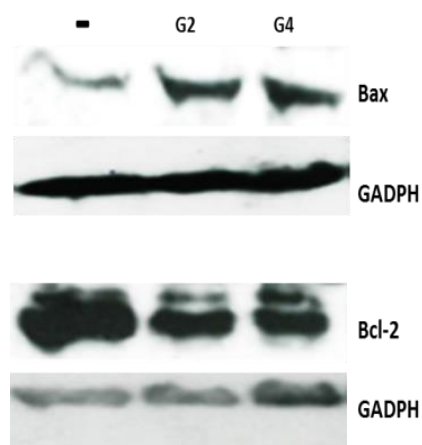


Abbildung 47: Western Blot Analyse der Expressionen von Bax und Bcl-2 in MEL-2-Zellen nach Behandlung mit G2 bzw. G4. 1×10^5 Zellen wurden in einer 24-well Platte ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen eingegeben und die Zellen für 24 h bei 37°C kultiviert.

3.6.2.6. Induktion der Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien und Caspase Aktivierung in MEL-2-Zellen durch G2 und G4

Bei der Apoptose unterscheidet man zwei Vorgänge: den extrinsischen und den intrinsischen Apoptoseweg, wobei der intrinsische Weg von den Mitochondrien vermittelt wird. Beim intrinsischen Weg kommt es durch Erhöhung der Permeabilität der Mitochondrienmembran zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Faktoren wie Smac (second mitochondria activator of caspases) aus

den Mitochondrien in das Zytoplasma. Cytochrom C bindet an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und bewirkt dessen Konformationsänderung und dadurch dessen Aktivität inhibiert. Gleichzeitig kommt es jedoch zur Aktivierung der Caspase 9, welche in der Folge Caspase 3 aktiviert, die schließlich zum apoptotischen Tod der Zelle führt. Cytochrom C wird über Poren sogenannte „mitochondrial outer membrane permeabilization pore“ (MOMP) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt. Die Bcl-2 Familien (Regulatorproteine) sind in der Lage die Apoptose durch direkte Einwirkung auf MOMP zu fördern bzw. zu hemmen. Bax oder Bak bilden die Pore, während Bcl-2 oder Bcl-xL seine Bildung hemmen [169].

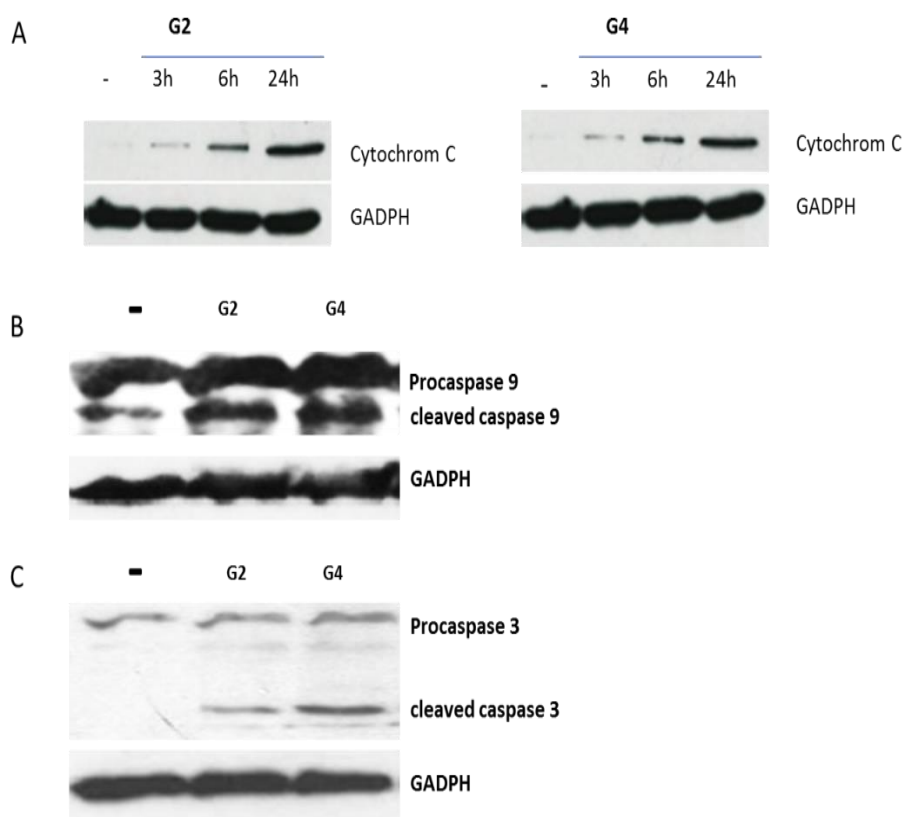


Abbildung 48: A) Western Blot Analyse der Expression von Cytochrom C in MEL-2-Zellen nach Behandlung mit G2 und G4 (15 µg/mL) für 3 h, 6 h und 24 h bei 37°C. B) und C) Western Blot Analyse der Expression und Aktivierung von Caspase 9 und Caspase 3 in MEL-2-Zellen nach Behandlung mit G2 und G4 (15 µg/mL) für 24 h bei 37°C.

Es wurde festgestellt, dass G2 sowie G4 die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials induzierten (Abb. 45) und das Mengenverhältnis von Bax/Bcl-2 (Abb. 47) in MEL-2-Zellen verändern. Um zu untersuchen, ob sie die Freisetzung von Cytochrom C induzieren und anschließend zur Aktivierung der Caspase-Kaskade in MEL-2-Zellen führen, wurden die Proteine Cytochrom C, Caspase 9 und Caspase 3 im Zytoplasma von MEL-2-Zellen durch Western Blot nach Behandlung mit G2 bzw.

G4 analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Cytochrom C durch Behandlung mit je 15 µg/mL mit G2 oder G4 zeitabhängig induziert wurde (Abb. 48A). Nach Behandlung mit jeweils einer Probe für 24 h wurden die Menge der aktivierten Caspase 9 und Caspase 3 (cleaved Form) in MEL-2-Zellen signifikant erhöht (Abb. 48B und C). Das bedeutet, dass G2 oder G4 den intrinsischen Apoptoseweg in MEL-2-Zellen aktivieren konnten.

3.6.2.7. Hemmung des PI3K/Akt - Signalwegs in MEL-2-Zellen durch G2 und G4

Der PI3K/Akt-Signalweg ist ein wichtiger intrazellulärer Signalweg bei der Regulierung des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation, der Migration, der Zelladhäsion und dem Zellüberleben. Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) katalysiert die Phosphorylierung der Hydroxylgruppe in der 3`-Position im Inositolring von Phosphatidylinositolen (Phospholipide) in der Zellmembran. Diese Reaktion führt zur Phosphorylierung bzw. Aktivierung von zahlreichen intrazellulären Signalmolekülen, die diverse zelluläre Antworten vermitteln, wie Proteinkinase B (auch AKT genannt). Beim Menschen kann eine unkontrollierte Aktivierung des PI3k/Akt-Signalwegs zu Krebs führen. Ob G2 oder G4 den PI3K/Akt-Signalweg inhibiert, muß noch geklärt werden. Um dies zu klären, wurden MEL-2-Zellen mit G2 und G4 mit jeweils 15 µg/mL für 24 h behandelt und die drei folgenden Proteine zelluläre PI3K, phosphorylierte Akt (pAkt) und Akt mittels Western Blot analysiert. Abbildung 49 zeigt, dass die Expression der PI3K und der Gehalt an pAkt durch G2 und G4 reduziert wurden, während die Expression von Akt unverändert blieb. Es wird angemerkt, dass G2 und G4 nicht nur die Apoptose der MEL-2-Zellen induzieren konnten, zusätzlich konnten sie auch die Proliferation der MEL-2-Zellen durch Hemmung den PI3k/Akt-Signalweg inhibieren.

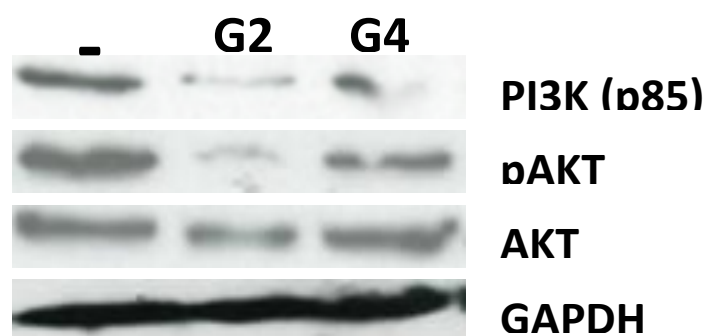


Abbildung 49: Western Blot Analyse der Expression von PI3K, pAKT und AKT in MEL-2-Zellen nach Behandlung mit G2 und G4 (mit je 15 µg/mL) für 24 h.

3.6.2.8. Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges in MEL-2-Zellen durch G2 und G4

Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führte zu einer Veränderung des Zellzykluses und zur Hemmung der Proliferationsrate von MEL-2-Zellen (siehe Abschnitte 3.4.8). Abbildung 50 zeigt, dass G2 und G4 die Expression von β -Catenin MEL-2-Zellen erhöhen können. Dies bezeichnet den Aktivierungszustand des Wnt/ β -Catenin Signalwegs. Die Expression von Axin2 in MEL-2-Zellen wurde nach Behandlung mit G2 oder G4 durch Western Blot nachgewiesen (Abb. 50). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Sign MEL-2-Zellen ist, wobei dieser Effekt von G2 stärker als von G4 bei gleiche Konzentration ist.

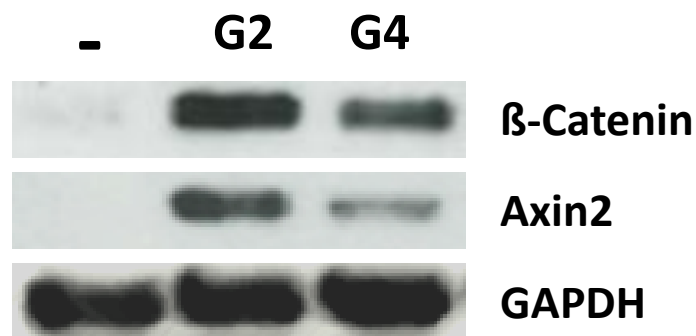


Abbildung 49: Western Blot Analyse der Expression von β -Catenin und Axin2 in MEL-2-Zellen nach Behandlung mit G2 oder G4 (15 μ g/mL) für 24 h für 37°C.

4. Diskussion

4.1. Bioassay-direkte Fraktionierung nach traditioneller chinesischer Medizin

Obwohl die traditionelle chinesische Medizin (TCM) ihre Wirksamkeiten bei der Behandlung von verschiedenen Krankheiten in der Vergangenheit durch empirische Anwendung bewiesen hat, sind deren Wirkstoffe bzw. deren Mechanismen noch nicht vollständig geklärt. Heutig zielen immer mehr Studien darauf ab. Die Suche nach neuen Wirkstoffen, die das Immunsystem regulieren können und/oder gegen Tumore wirksam sind, ist eine vielversprechende Strategie.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung bioaktiver Stoffe von spezifischen traditionellen chinesischen Heilpflanzen in Bezug auf deren Immunmodulation und die Hemmung des Tumorwachstums.

In der TCM in China wurden überwiegend die Rohextrakte aus chinesischen Heilpflanzen oder -pilzen, einschließlich *Ganoderma lucidum*, *Tremella aurantia lba* und *Sargassum graminifolium*, zur Inhibierung des Wachstums von Tumorzellen, Unterregulierung des Entzündungsprozesses oder Aktivierung von Immunzellen, verwendet.

Sarg-Z ist eine sulfathaltige Polysaccharid-Fraktion aus *S. graminifolium*. Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich eine hohe Aktivität sowohl bei der Stimulierung der Immunzellen als auch bei der Hemmung des Entzündungsprozesses zeigen. Sarg-Z konnte Makrophagen und Maus B-Zellen sowie humane T-Zellen, insbesondere CD4⁺CD8⁺ T-Zellen, stimulieren (Abb. 4, 10, 15 und 16). Darüber hinaus konnte es auch die L-Selektin-Ligand-Bindung inhibieren (Abb. 18) und die SLC-induzierte Chemotaxis von HPBLs hemmen (Abb. 24). Außerdem konnte Sarg-Z auch die Aktivierung des Komplementsystems hemmen (Abb. 26).

GLP20 und JRP sind Polysaccharid-Fractionen aus der Zellwand bzw. aus dem Fruchtkörper des *G. lucidum* und des *T. aurantia lba*. Sie zeigten eine Hemmwirkung gegenüber der L-Selektin-Ligand-Bindung und gegenüber der Aktivierung des Komplementsystems. Nach der Sulfatierung von GLP20 und JRP, zeigten jedoch GLPss58 und JRP-SS deutlich höhere antiinflammatorische Wirkungen. GLPss58 und JRP-SS hemmten signifikant die L-Selektin-Ligand-Bindung (Abb. 19), die Chemotaxis von HPBLs (Abb. 24) und die Aktivierung des Komplementsystems (Abb. 26). Sie interagierten mit TNF- α und IFN- γ (Abb. 27), so dass die Zytokin-vermittelte

Entzündung beeinflusst wurde. GLPss58 und JRP-SS konnten das Lymphozyten-Homing *in vivo* hemmen. Außerdem wiesen GLPss58 und JRP-SS auch eine signifikante Hemmwirkung auf die intrinsische Blutgerinnung auf. Besonders wichtig ist, dass GLPss58 und JRP-SS die Adhäsion und Migration von MEL-2- und MFC7-Tumorzellen direkt inhibieren konnten (Abb. 30, 33 und 34). Zusätzlich hemmten sie, durch induzierte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, die Proliferation von MEL-2-Zellen (Abb. 38). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fraktionen GLPss58 und JRP-SS für die Bekämpfung von Metastasen von Melanomzellen. Außerdem hemmten GLPss58 und JRP-SS der intrinsischen Blutgerinnung (Abb. 40).

G2 und G4 sind zwei Triterpenoiden-Fraktionen aus *G. lucidum*, welche die Proliferation von verschiedenen Tumorzellen hemmten (Abb. 42), indem sie die Zellapoptose induzierten (Abb. 43) und den PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg inhibierten.

4.2. Sarg-Z aktivierte B-Zellen und Makrophagen der Maus

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Charakterisierung der immunmodulatorischen Eigenschaften von Sarg-Z. Es wurde gezeigt, dass Sarg-Z die Proliferation von Maus-Milz B-Lymphozyten (MSBLs) stimulierte (Abb. 9). Danach entwickelten sich B-Zellen zu Plasmazellen und sekretiertes Immunglobulin (Abb. 10) Bei der Aktivierung von B-Zellen unterscheidet man zwischen sog. Thymus-abhängigen Antigenen und Thymus-unabhängigen Antigenen. Bei der Aktivierung durch Thymus-abhängige Antigene erhält die B-Zelle ein weiteres, notwendiges Aktivierungssignal durch die Interaktion von CD40, der auf der B-Zelle lokalisiert ist, mit seinem korrespondierenden CD40-Liganden (CD40L) von der T-Helfer-Zelle. Thymus-unabhängige Antigene können B-Zellen ohne T-Helfer-Zellen aktivieren. Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) fungiert als B-Zell-Mitogene und können die B-Zellen unabhängig von der Spezifität des Antigenrezeptors aktivieren. Sarg-Z konnte weder die Expression des aktivierten Markers CD69 auf T-Zellen von MSLs (Abb. 12), noch die Sekretion von den Zykokinen IL-2, IL-4 und IFN- γ durch aktivierte T-Helfer-Zellen aus MSLs (Abb. 13), stimulieren. Ähnlich wie bei LPS induzierte Sarg-Z die Produktion von Immunglobulin (Abb. 10) und dem Zytokin IL-6 (Abb. 12) von MSLs, die durch aktivierte B-Zellen sezerniert wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sarg-Z wie LPS, T-Zellen unabhängige B-Zell-Mitogene ist.

In meiner Arbeit wurde auch gezeigt, dass Sarg-Z BMMs dosisabhängig aktivieren konnte (Abb. 4). Nach der Stimulation sekretierten Makrophagen TNF- α und IL-1 β (Abb. 6) und erzeugten reaktiven NO (Abb. 5) sowie die Fähigkeit zur Phagozytose von Makrophagen war deutlich erhöht (Abb. 7). Diese Ergebnisse zeigten, dass Sarg-Z selektive B-Zellen und Makrophagen, aber nicht T-Zellen von Mäusen aktivieren konnte. Die in vielen natürlichen Pflanzen erhaltenen Polysaccharide stellen eine strukturell verschiedene Klasse von Makromolekülen dar, und diese strukturelle Variabilität kann die biologische Aktivität von B-Zellen, T-Zellen und/oder Makrophagen beeinflussen. Einige Polysaccharide können auch Maus-B-Zellen und -Makrophagen stimulieren, aber keine T-Zellen. Zhang et al. (2000) hatte das Polysaccharid GLIS aus *G. lucidum* isoliert. GLIS stimulierte die Proliferation und Antikörper-Produktion von B-Zellen, aktivierte Makrophagen zur Freisetzung von TNF- α und IL-1 β sowie NO und erhöhte die Phagozytose und Zytotoxizität von Makrophagen [170]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie GLIS, Sarg-Z eine immunstimulatorische Wirkung auf B-Zellen und Makrophagen der Maus hatten.

4.3. Sarg-Z erhöhte den prozentualen Anteil der CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven T-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Verwendung von Sarg-Z zu einer signifikanten Erhöhung der CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven T-Zellpopulation aus MSLs (Abb. 11) auch aus HPBLs (Abb. 15) führte, jedoch war die Herkunft und Funktion dieser T-Zellpopulation, die von Sarg-Z stimuliert wurde, noch ungeklärt.

Bei der T-Zell-Reifung in Thymus kommen geringe Mengen von CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven (DP) T-Zellen-Vorläufer vor. Die meisten von Ihnen (>95 %) sterben im Thymus. Diejenigen (<5 %), die die positive und negative Selektion überlebt haben, reifen zu einfachen positiven (SP) T-Zellen heran, die einzelne Corezeptoren CD4 oder CD8 und T-Zell-Rezeptoren (TCR) exprimieren. Dann wandern die reifen SP-T-Zellen durch das periphere Blut bis hin zu den sekundären lymphatischen Organen [171]. Entgegen der Erwartungen findet man auch geringe Anteile CD4⁺CD8⁺ DP-T-Zellen in gesunden Menschen und Tieren. Bei vielen Krankheiten, z. B. HIV-Infektion oder einer chronischen Entzündung, oder mit zunehmendem Alter erhöht sich der Anteil der CD4⁺CD8⁺ DP-T-Zellen im peripheren Blut [171]. Nascimbeni et al. berichteten, dass

die peripheren CD4⁺CD8⁺ DP-T-Zellen differenzierte Effektor/Memory T-Zellen mit antiviralen Eigenschaften aufweisen [172].

Die CD4⁺CD8⁺ DP-T Zellen können aus aktivierten CD4⁺ SP-T Zellen entsteht werden [173]. Paillard et al. berichtete, dass die IL-4 Produktion durch aktivierte CD4⁺ T-Zellen gesteigert wird und die CD8-Expression von humanen CD4⁺ SP-T-Zellen induzieren kann [174]. Die Expression von CD4 und CD8 wird durch ein sehr strenges Transkriptionsprogramm unter Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Runx3 und ThPOK reguliert [173]. ThPOK reguliert die Expression der Abstammungslinien von Runx3 und CD8 herunter, einschließlich der zytotoxischen Effektorgene Perforin und Granzym B [175]. In einer früheren Studie wurde berichtet, dass die Re-Expression von CD8 auf CD4⁺ T-Zellen eine Folge der Runx3-Hochregulierung und nachfolgender ThPOK-Herunter-Regulierung ist [176]. In Gegensatz dazu, es wurde berichtet, dass CD8⁺ SP-T-Zellen der Ursprung von CD4⁺CD8⁺ DP-T Zellen sein können. Durch Expression von CD4 an den CD8⁺ SP-T-Zellen wird die antivirale Funktion verstärkt [172]. Die Funktionen von CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen können je nach Bedingungen unterschiedlich sein. Bei viralen Infektionen führt die Expression von CD4 auf CD8⁺ SP-T-Zellen zur Verstärkung der zytotoxischen Reaktionen [177]. Die CD4-Expression auf der Oberfläche von CD8⁺ SP-T-Zellen führt durch Ick-Signaling zu einer höheren Expression von FasL und IFN- γ [178]. Es wurde berichtet, dass die CD4-Expression auf CD8⁺ SP-T-Zellen als Rezeptor für IL-16 fungieren kann, und somit die Migration aufgrund eines Konzentrationsgradienten von CD8⁺ SP-T-Zellen in Richtung IL-16 lenkt und in dessen Folge zu der Stelle der Infektion leitet [179]. Deshalb spielt die CD4-Expression auf CD8⁺ SP-T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der zytotoxischen T-Zell-Funktion. Die CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen, die aus CD4⁺ SP-T-Zellen stammen, weisen meist eine immunsuppressive Funktion auf. Die immunregulatorische Funktion für diese DP-T-Zellen basieren auf ihrem Zytokin-Sekretionsprofil, einschließlich IL-10, IL-13 und TGF- β , welche die Proliferation von T-Helfer Zellen reduziert oder die Differenzierung der Treg-Zellen induziert [174].

Für die CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen im Tumor scheint es keinen einheitlichen Zweck für die T-Zellfunktion zugeben. Aufgrund ihrer Eigenschaften des Immunescapes aus dem Tumor *in vivo*, z.B. von dem in der Tumor-Mikroumgebung vorhandenen Zytokine PD-1L, TGF- β und IL-10 oder Treg-Zellen, wird die Aktivität der zytotoxischen CD8⁺ SP oder CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen reduziert, sodass die Erkennung von Tumorzellen durch

MHC-Klasse-II beschränkt und ihre spezifische antitumorale Immunantwort gedämpft wird [180]. Jedoch scheinen sie aufgrund des einzigartigen Zytokin-Sekretionsprofils von CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen eine Antitumor-Aktivität zu haben [181]. Desfrancis hat beschrieben, dass CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen einen erhöhten TNF- α -Spiegel als Immunantwort auf eine Melanoma Zelllinie *in vitro* im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen sezernierten [181].

In Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Sarg-Z kaum Expression des aktivierten Markers CD69 auf MSLs induzierte. Im Kulturüberstand konnten keine Zytokine IL-2, IL-4 oder IFN- γ nach Behandlung von MSLs mit Sarg-Z detektiert werden. Daher ist unklar, wie die CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen aus MSLs durch Behandlung mit Sarg-Z *in vitro* entstehen, und welche Funktion sie haben. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante CD69-Expression auf CD8⁺ T-Zellen der HPBLs durch Stimulation mit Sarg-Z nachgewiesen (Abb. 16). Diese aktivierten CD8⁺ T-Zellen könnten die Quelle von humane CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen sein, die durch Sarg-Z induziert wurden. Da die von CD8⁺ T-Zellen stammenden CD4⁺CD8⁺ DP T-Zellen eine hohe zytotoxische Aktivität aufwiesen [174], konnte Sarg-Z eine signifikante Tumor-Zytotoxizität von HPBLs *in vitro* induzieren (Abb.17)

4.4. Antitumorale Aktivität von Sarg-Z

Sargassum, eine an den Küsten des Süd- und Ostchinesischen Meeres verbreitete Braunalge, die seit über tausend Jahren in der TCM als Meeresfrucht verwendet wird, daher ist es wichtig, die aktive Komponente von *S. graminifolium* herauszufinden und ihre Bioaktivität zu analysieren. Die Ethanol-Extrakte aus *S. graminifolium* zeigen einen antiallergischen Effekt *in vivo* [182]. Einige Berichte haben gezeigt, dass die aus *S. graminifolium* gewonnenen Polysaccharid-Fractionen antioxidative Eigenschaften *in vitro* hemmen konnten [183]. Ob sie auch antitumorale Aktivität zeigen, ist noch unklar. In dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass Sarg-Z keinen direkten Antitumor Effekt hat.

Es ist bekannt, dass Makrophagen eine wichtige Rolle in vielen primären Abwehrmechanismen spielen. In dieser Arbeit konnten gezeigt werden, dass Sarg-Z Makrophagen aktivieren können und in Folge dessen konnte die NO-Bildung (Abb. 5) und die Zytokin-Produktion (wie IL-1 β und TNF- α) (Abb. 6) von Makrophagen durch Stimulation von Sarg-Z deutlich erhöht werden. Die Fähigkeit der NO-Bildung aus

Makrophagen ist sehr wichtig, da NO eine breite biologische Aktivität nicht nur in vaskulären Systemen, sondern auch in der unspezifischen Wirtsabwehr gegenüber invasiven Mikroorganismen und Tumoren aufweist [184]. Durch NO wird die Zellatmung unterdrückt, der Eisenstoffwechsel verhindert, die DNA-Synthese und die Induktion von Apoptose gehemmt [185]. Die von Makrophagen abgeleiteten Zytokine könnten auch für eine Reihe von Tumorzellen zytotoxisch sein. IL-1 β fungiert meist als Entzündungszytokin und beteiligt sich an der Tumordinvasion und Tumorangio-genese [186], kann jedoch die T-Zell-vermittelte Antitumor-Immunität beeinflussen. Garmi et al. (2011) hat berichtet, dass im Lungentumor von IL-1 β - oder IL-1Ra (IL-1 β Rezeptor)-KO Mäusen weniger CD8⁺-T-Zellen mit reduzierter Aktivität (Zytokinproduktion und Tötungskapazität) beobachtet wurden [187]. Dabei wurde eine Akkumulation von MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) im Lungentumor in beiden KO-Mäusen gefunden [188]. Daraus wurde geschlossen, dass die Tumormetastase in IL-1 β - oder IL-1Ra-KO Mäusen viel ausgeprägter als in WT-Mäusen ist [189]. Es wurde berichtet, dass IL-1 β synergistisch oder mit TNF- α zum Abtöten von Tumorzellen führen kann [189]. TNF- α spielt eine entscheidende Rolle bei der Makrophagen-vermittelten Anti-Tumor Zytotoxizität [190], da es bei Tumor-Zellen die Apoptose induzieren kann, indem es an den TNF-Rezeptor auf der Tumorzelloberfläche gebunden wird [191]. Deswegen wurde vermutet, dass Sarg-Z die Makrophagen-vermittelte Antitumorwirkung durch Sekretion von Zytokine und NO verstärken kann.

In dieser Arbeit wurde gefunden, dass Sarg-Z die Immunglobulin-Produktion von B-Zellen stimulieren konnte (Abb. 10). Vor 80 Jahren wurde berichtet, dass humane monoklonale Antikörper die Tumorlyse sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Aktivierung von Antikörper-abhängiger Zytotoxizität ermöglichen [192]. Ollert et al. [193] haben festgestellt, dass natürliche menschliche IgM-Antikörper eine hohe Spezifität gegenüber Neuroblastom haben. Diese Antikörper können die Neuroblastomzellen sowohl durch Aktivierung des Komplementsystems als auch durch Induktion von Apoptose abtöten. Diaz-Zaragoza et al. [194] hat beschrieben, dass die beiden IgM-Typen (natürliche und adaptive IgM-Antikörper) und IgG-Antikörper die Eliminierung von Brustkrebszellen durch Induktion der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität (ADCC), durch Komplementsystem-abhängige Zytotoxizität (CDC) und Phagozytose fördern. Brändlein et al. [195] hat Tumor-spezifische monoklonale Antikörper, IgM-Isotype in Krebspatienten entdeckt. *In vitro* können sie die Apoptose von menschlichen Epithelkrebszellen induzieren, aber gegenüber

normalen/gesunden Epithelzellen sind sie unwirksam. Aufgrund der Größe des Pentamers kann IgM über die zehn Antigenbindungsstellen gleichzeitig mit multimeren Antigenen interagieren, und hat damit einen höheren Effekt gegenüber der Aktivierung des Komplementsystems als IgG und ist für die Abwehr von Infektionen und für die CDC gegen Tumore von großer Bedeutung [196]. Neben der Aktivierung vom Komplementsystem spielt IgG auch eine wichtige Rolle in der ADCC und Phagozytose [196]. Die IgM-Spiegel (natürliche und adaptive) bleiben konstant von der Transformation bis zum Auftreten eines Tumors, während IgG nur im Anfangsstadium der adaptiven Immunität anwesend sind [194]. Deshalb ist die Aufrechterhaltung eines hohen Immunglobulin-Niveaus von wichtiger Bedeutung für die Entfernung von Tumoren. Sarg-Z konnte hier einen wichtigen Beitrag leisten.

In dieser Arbeit wurde gefunden, dass Sarg-Z die humanen peripheren Blut CD8⁺-T-Zellen unabhängig von APC aktivieren konnten (Abb. 16) und dadurch die Tumorzellproliferation *in vitro* signifikant hemmen konnte (Abb. 17). Die zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen spielen eine wichtige Rolle für die adaptive Anti-Tumor Immunantwort. Die aktivierten CD8⁺-T-Zellen können die zytotoxischen Proteine Perforine und Granzyme freisetzen. Das Protein Perforin bildet Poren auf der Zielzellmembran, sodass die Granzyme in die Zellen gelangen können und die Zellapoptose induzieren können. Der Fas Ligand (FasL) wird auf der Oberfläche von aktivierten CD8⁺-T-Zellen exprimiert. Durch Interaktion mit dem Fas-Rezeptor induzieren sie eine Apoptose der Zielzellen [145]. Gewöhnlich werden CD8⁺-T-Zellen durch Erkennung fremder Antigene, die auf MHC-I Gruppe von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden, *in vivo* aktiviert [145]. Tumorzellen verändern sich ständig und können die Funktion von Immunzellen regulieren oder sogar inhibieren. Zum Beispiel kann der M2-Tumor Makrophagen, die sogenannten Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) rekrutieren [197]. TAM kann die Tumor-Angiogenese fördern und die adaptive Immunität inhibieren [197]. Der Tumor beeinflusst auch die spezifische Tumorantigen-Präsentation auf dendritischen Zellen (DC), indem er die Reifung, Migration und Zytokinproduktion von DC hemmt und sogar die Apoptose fördert [198]. Wegen der verminderten Tumorantigen-Präsentation auf APC können CD8⁺-T-Zellen gegen Tumore nicht aktiviert werden. Allerdings sind viele regulatorische T-Zellen (Treg) in der Tumormikroumgebung akkumuliert, die die Funktion von T-Helfer Zellen und zytotoxischen T-Zellen herunterregulieren [199]. Der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- β) kann die [198], und damit kann der Tumor der

Bekämpfung durch CD8⁺-T-Zellen entgehen. Daher ist die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen ein wichtiger Schritt für die CD8⁺-Zellenvermittelte Antitumor-Immunität, wobei zwei Anforderungen erfüllt sein müssen: Zum einen müssen die CD8⁺-T-Zellen der Tumor-induzierten Immunsuppression entgehen und zum anderen müssen sie den Tumor spezifisch bekämpfen. In einigen Tumormodellen wird TGF- β unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers blockiert, damit die zytotoxische Aktivität von CD8⁺-T-Zellen erhöht werden kann [200]. Neuere aktuelle Tumoringungsstrategien versuchen tumorspezifische CD8⁺-T-Zellen *in vivo* zu erzeugen [201]. Einige Versuche zeigten, dass die Kombination eines TGF- β -spezifischen Antikörpers mit einem Tumor-Impfstoff aufgrund einer erhöhten Anzahl und Aktivität von CD8⁺-T-Zellen, zu einer stärkeren Hemmung des Tumorwachstums führte [202]. Deshalb wurde angenommen, dass die Sarg-Z stimulierte HPBLs-vermittelte Tumorzytotoxizität (Abb. 17) durch Stimulation der Zytotoxizität von CD8⁺-T-Zellen erfolgt werden könnte.

4.5. Antiinflammatorische Aktivität von Sarg-Z, GLPss58 und JRP-SS

Im Falle einer Entzündung findet zuerst die Auswanderung von Leukozyten aus dem Blutgefäß ins entzündete Gewebe statt. Dies wird als Leukozyten-Extravasation bezeichnet, welche in der Folge zu einer Adhäsionskaskade von Leukozyten mit Endothelzellen führt, die in sieben Schritte unterteilt ist. Durch die Wechselwirkung zwischen L-Selektin und deren Liganden auf den Endothelzellen werden die wichtigsten Schritte vermittelt: Anfangskontakt und Rollen. L-Selectin wird konstitutiv auf Leukozyten exprimiert, während die anderen P- und E-Selektine erst nach Induktion durch entzündliche Mediatoren auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen exprimiert werden. Daher kann die Hemmung des L-Selektin-vermittelten Anfangskontakts und das Rollen der Leukozyten die weitere Adhäsionskaskade verhindern, und keine Leukozyten-Extravasation stattfinden bzw. der Entzündungsprozess somit gehemmt werden.

Die Hemmung der L-Selektin-Ligand Bindung durch verschiedene Polysaccharid-Fractionen wurde in dieser Arbeit über einen kompetitiven SPR-basierten Bindungsassay bewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass zwischen alle getestete Fractionen GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z die Bindung zwischen L-Selektin und seinen Liganden signifikant hemmen konnten (Abb. 20). Um zu analysieren, ob die Polysaccharid-Fractionen direkt mit L-Selektin interagieren und dadurch die L-

Selektin-Ligand-Bindung blockierten, wurde ein FITC-markierter Anti-L-Selektin (CD62L) monoklonaler Antikörper (mAb HuDERG-55) und menschliche periphere Blutlymphozyten (HPBLs) verwendet. Die FACS-Analyse zeigte, dass GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z die Bindung dieses Antikörpers an L-Selektin auf der Oberfläche der HPBLs signifikant blockierten, wohingegen GLP20 und JRP keine solche Wirkung hatten. Helen et al. [203] hat beschrieben, dass humanisierte anti-L-Selektin mAb HuDREG-55 an die Lektin-Domäne des humanen L-Selektins binden und dass diese Bindung verhindert werden kann, wenn die Lektin-Domäne zuvor mit Polysacchariden in Wechselwirkung getreten sind. Aus diesem Grund könnte es sein, dass GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z an die Lektin-Domäne des L-Selektin auf der Oberfläche von L-Selektin⁺-HPBLs binden und dann die Bindung zwischen L-Selektin und dem anti-CD62L-FITC mAb hemmen. Die drei Polysaccharid-Fractionen sind unspezifisch gegenüber L-Selektin und konnten die Bindung von mAb HuDREG-55 an das L-Selektin⁻ auf HPBLs durch Erkennung von anderen Komponenten auf der Zellmembran blockieren (Abb. 22). Welche Komponenten als Rezeptoren dienen, sind noch unklar. L-Selektin kann nicht nur als Adhäsionsmolekül auf Leukozyten wirken, sondern auch die intrazellulären Signalwege vermitteln [204]. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z die L-Selektin-vermittelte Zellfunktionen beeinflussen konnten, einschließlich chemotaxischer Invasion oder Homing von Lymphozyten. Die Chemotaxis von Lymphozyten gegen Induktion von SLC kann durch L-Selektin-Signalisierung verstärkt werden [205]. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z die SLC-induzierte Chemotaxis von HPBLs, insbesondere von L-Selektin⁺-HPBLs, inhibieren (Abb. 24). Es ist möglich, dass die drei Polysaccharid-Fractionen das L-Selektin der L-Selektin⁺-HPBLs gebunden haben, und dadurch den L-Selektin-vermittelten intrazellulären Signalweg herunterregulierten, welcher für die Reduktion der SLC-induzierten Lymphozyteninvasion verantwortlich ist. Dies führte zu einer geringeren Chemotaxis von L-Selektin⁺-HPBLs. Außerdem wurde gefunden, dass die drei Polysaccharid-Fractionen die SLC-induzierte Chemotaxis von L-Selektin⁻-HPBLs hemmen. Da CCR7 ein Membranrezeptor für SLC ist, und das SLC-vermittelte Signal weiterleitet und in dessen Folge die Lymphozyten-Migration aktiviert, wird vermutet, dass CCR7 auf der Zellmembran von HPBLs auch ein Target für GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z ist. Diese Hypothese soll in der Zukunft weiter untersucht werden.

L-Selektin fungiert auch als ein Homing-Rezeptor für die Rezirkulierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut in die lymphatischen Organe [154]. Schon lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Homing von Lymphozyten in Lymphorgane inhibiert wird, wenn die Bindung von L-Selektin mit seinem Liganden an endotheliale Zellen des lymphatischen Gewebes blockiert wird. In dieser Arbeit wurde darauf hingewiesen, dass GLPss58 und JRP-SS das Lymphozyten-Homing signifikant hemmen konnten, da bereits 30 min nach Injektion über die Schwanzvene die Zellenzahl der Lymphozyten in den Lymphorganen wie Milz und Lymphknoten, die jeweils mit einer Polysaccharid-Fraktion vorbehandelt wurden, deutlich geringer war als bei der Kontrolle. Mehrere Lymphozyten wurden im peripheren Blut zurückgehalten (Abb. 25). Alle Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die L-Selektin-Funktion ein mögliches Ziel von GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z auf die entzündungshemmende Wirkung war. Als ein entscheidendes Bindungsepitop bei der Selektin-Ligand-Bindung wurde Sulfat ermittelt, wie z. B. der sulfatierte Tyrosinrest in der Peptidkette des Liganden P-Selektin-Glycoproteinligand-1 (PSGL-1) [206]. Eine detaillierte Struktur-Wirkung-Beziehung auf der Basis von Polysacchariden mit verschiedenen Sulfatierungsgraden wurde von Fritzsche et al. für die P-Selektin-Inhibition untersucht. Es wurde gefunden, dass der Sulfatierungsgrad (DS) einen entscheidenden Einfluss auf die Selektinbindungsaktivität der Polysaccharide hat und deren Bindungsaffinität verstärkt [207]. Ein typisches Beispiel dafür ist Heparin, ein natürlich vorkommendes sulfatiertes Polysaccharid, das aus tierischem Gewebe isoliert wird und neben seiner starken antikoagulierenden Wirkung auch ein mäßiges entzündungshemmendes Potential zeigte [208]. Viele Selektin-Inhibitoren wie dendritisches Polyglycerinsulfat (dPGS) wurden als Heparin-Analoga entwickelt, die eine signifikante Inhibierungswirkung auf L-Selektin-Ligand-Bindung zeigten [209]. Daher kann vermutet werden, dass die Sulfatgruppen von GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z zur Hemmung der L-Selektin-Ligand-Bindung beitragen.

Nach der Aktivierung des Komplementsystems können die löslichen Komplementsystemkomponenten C3a, C5a und Komplex C5b-9 eine lokale Entzündungsreaktion auslösen. Dies führt zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und Rekrutierung von Granulozyten und Monozyten vom Gefäß ins Gewebe und löst die Entzündung aus [210]. Daher wurde der Einfluss von GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z auf die Aktivierung von Komplementsystemen untersucht. Wir haben festgestellt, dass GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z sowohl den klassischen als auch den MBL-Weg

signifikant inhibieren konnten (Abb. 26). In der vorherigen Untersuchung wurde gezeigt, dass die drei Polysaccharid-Fraktionen die Wechselwirkung zwischen der Lektin-Domäne vom L-Selektin und dessen Antikörper beeinflussen können (Abb. 21). Gleichfalls könnte die Lektin-Domäne des MBL-Weges jeweils durch die drei Polysaccharid-Fraktionen blockiert werden, und dadurch der MBL-Weg gehemmt werden. Der Mechanismus der Hemmung auf den klassischen Weg ist unbekannt, aber es wurden zwei Hypothesen vorgeschlagen. Eine allgemein akzeptierte Hypothese ist, dass GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z die Bildung der C3- oder C5-Convertase hemmen, während die zweite Hypothese ist, dass sie an C3 oder C5 binden und sie dann vor der Spaltung durch Protease schützen. Die Mechanismen der Hemmung von GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z auf die Aktivierung des Komplementsystems sollen weiter untersucht werden.

Die Zytokine TNF- α und IFN- γ haben immunstimulatorische Eigenschaften und sind an entzündlichen Prozessen beteiligt. Heparin kann die TNF- α und IFN- γ -vermittelte Entzündung hemmen, indem sie an beide Zykokine bindet und ihre Bindung auf der Zelloberfläche blockiert [211]. Die Heparin-Vorbehandlung dämpft das Rollen, die Adhäsion und die Migration der Leukozyten signifikant, die durch TNF- α [153] hervorgerufen werden. IFN- γ kann vaskuläre Endothelzellen aktivieren, um die Expression von Zelloberflächenmolekülen wie Klasse-II-MHC-Antigenen und Adhäsionsmolekülen zu erhöhen. Dieser Prozess kann durch Heparin inhibiert werden [155]. Heparin wechselwirkt mit TNF- α oder IFN- γ und blockiert dadurch die Erkennung ihrer Zelloberflächenrezeptoren und hemmt die beiden Zytokin-vermittelten Signalübertragungen [155]. Die Strukturanalyse zeigte, dass die beiden basischen Arginine im N-Terminus von TNF- α und der basische Aminosäurecluster im C-terminalen Bereich von IFN- γ für deren Bindung an Heparin wesentlich sind [156]. In dieser Arbeit wurde auch festgestellt, dass GLPss58 und JRP-SS in der Lage waren, an TNF- α und IFN- γ zu binden (Abb. 27) und somit deren Aktivität zur Auslösung der Entzündung hemmen konnten. Die antiinflammatorische Wirkung von GLPss58 und JRP-SS wird in folgende Abbildung zusammengefasst (Abb. 52). Wir werden in Zukunft weitere untersuchen, ob GLPss58 und JRP-SS die antiinflammatorische Effekt *in vivo* wirken können.

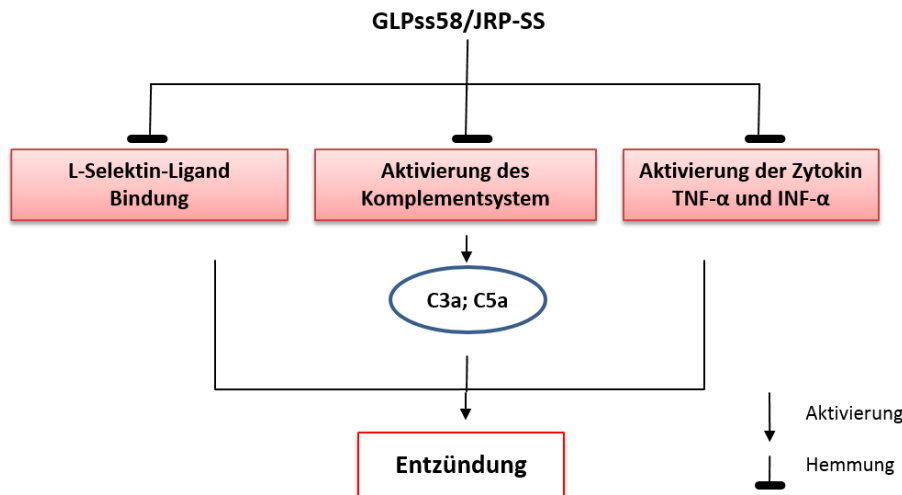


Abbildung 52: Zusammenfassung der antiinflammatorische Wirkungen von GLPss58 und JRP-SS.

4.6. Anti-Blutgerinnungsaktivität von GLPss58 und JRP-SS

Bei der Untersuchung der entzündungshemmenden Funktionen von GLPss58 und JRP-SS zeigte sich, dass sie ähnliche Effekte wie Heparin haben. Da Heparin ein bekanntes Blutgerinnungsmittel ist, wurde ein Blutgerinnungsversuch durchgeführt, um zu bestimmen, ob GLPss58 und JRP-SS diesen Effekt haben.

Es wurde festgestellt, dass sowohl GLPss58 als auch JRP-SS die Blutgerinnung, die durch intrinsische Weg initiiert wurde, signifikant inhibierte. Im Gegensatz zu Heparin zeigten sie jedoch eine geringere Hemmwirkung auf die extrinsische Blutgerinnung (Abb. 40). Der Unterschied zwischen beiden Gerinnungswegen beruht auf unterschiedlichen Aktivierungsfaktoren. Die Initiation des intrinsischen Weges erfolgt durch Aktivierung des Gerinnungsfaktors FXII nach Kontakt mit Kollagen, welches an den Orten im Blutgefäß auftritt, wo die Gefäßwände verletzt wurden. Dies induziert dann die Aktivierung von anderen Gerinnungsfaktoren in der Reihenfolge von FXI, FIX bis FX. Der extrinsische Weg wird von den Gewebefaktoren, der von verletztem Gewebe freigesetzt werden, initiiert. Diese Faktoren bilden mit dem Gerinnungsfaktor FVII den aktivierten Komplex TF-FVIIa, der anschließend die folgenden Gerinnungsfaktoren FIX und dann FX aktiviert. Die Aktivierung von FX spaltet Prothrombin zu Thrombin, das das Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Zahlreiche Blutzellen und Blutplättchen heften sich an Fibrin und nach dessen Quervernetzung setzt die Gerinnung. Das Heparin ist in der Lage an Antithrombin zu binden, der ein bekannter Proteaseinhibitor ist, wodurch die Inhibierungsaktivität von Antithrombin auf

die Gerinnungsfaktoren wie Thrombin tausendfach erhöht wird [156]. Deswegen kann Heparin sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Blutgerinnung verhindern.

Aufgrund der schwachen Wirkung beim extrinsischen Weg wurde geschlossen, dass GLPss58 oder JRP-SS die Wirkung von Antithrombin kaum verstärken konnte. Außerdem wurde der Beginn der Gerinnungsbildung beim intrinsischen Weg durch GLPss58 oder JRP-SS erheblich verzögert. Auch hier lassen sich wieder zwei Hypothesen aufstellen: Zum einen, dass GLPss58 oder JRP-SS entweder den Kontakt zwischen Kollagen und Gerinnungsfaktor FXII blockieren, und zum anderen, dass GLPss58 oder JRP-SS an die Gerinnungsfaktoren binden, die bei der Aktivierung des intrinsischen Weges beteiligt sind, und dadurch deren Aktivität hemmen. Diese Hypothesen sollen in Zukunft überprüft werden.

4.7. Antitumorale Aktivität von GLPss58 und JRP-SS

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass GLPss58 oder JRP-SS eine anti-neoplastische Wirkung haben, so konnten sie die Zellproliferation von MEL-2- und MCF7-Tumorzellen *in vitro* hemmen (Abb. 28). Diese Hemmkraft ist aber anhängig von der jeweils verwendeten Tumorzelle. GLPss58 oder JRP-SS mit einer Konzentration von 5 µg/mL konnte die Proliferationsrate von MEL-2-Zellen um ca. 40% inhibieren. Im Gegensatz dazu zeigten die zwei Polysaccharid-Fractionen bei dieser Konzentration nur eine geringe inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von MCF7-Zellen (Abb. 28).

Bei der Untersuchung des Inhibitionsmechanismus wurde festgestellt, dass die Antitumor-Aktivität von GLPss58 oder JRP-SS nicht durch die Induktion des Zelltods von Tumorzellen verursacht wird (Abb. 29). Während der Kultivierung *in vitro* wurden die Zellen unter dem Mikroskop beobachtet, dass GLPss58 und JRP-SS die Adhäsion beider Tumorzellen verhinderten. Daraus lässt sich vermuten, dass GLPss58 oder JRP-SS eine Anti-Zelladhäsionsaktivität haben. Bei der Untersuchung der Zelladhäsion auf verschiedene ECM-Proteine wurde festgestellt, dass GLPss58 oder JRP-SS die Zelladhäsion sowohl von MEL-2-Zellen als auch von MCF7 Zellen auf allen getesteten ECM-Proteinen wie Fibronectin, Laminin, Kollagen-I und IV signifikant verhinderten (Abb. 30). Da GLPss58 oder JRP-SS hochmolekulare Polysaccharide sind, können sie nicht durch die Zellmembran in die Zellen gelangen. Die FACS-Analyse zeigte, dass FITC-markierte GLPss58 oder JRP-SS an der Zelloberfläche

beider Arten von Tumorzellen binden konnten (Abb. 31). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass GLPss58 und JRP-SS an einen oder mehrere Membranrezeptoren binden können, die für die Bindung mit ECM-Proteinen verantwortlich sind, und dadurch die Zelladhäsion verhindern.

Diese Hypothese wurde in Integrin-Familien-Studien untersucht, da Mitglieder der Integrin-Familie hauptsächlich für die Adhäsion und Migration von mehreren Zellen verantwortlich sind. Daher wurde untersucht, ob GLPss58 bzw. JRP-SS die Interaktion von Integrin mit deren spezifischen molekularen Antikörpern blockieren und in der Folge die Zelladhäsion und -migration verhindern können. Integrine bestehen aus α - und β -Untereinheiten, wobei beim Menschen 25 verschiedene Heterodimere gefunden worden [157]. β 1-Integrin bildet mit verschiedenen α -Integrinen verschiedene Rezeptoren für unterschiedliche ECM-Liganden wie Kollagene, Laminine und Fibronektine [157]. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass GLPss58 oder JRP-SS die Bindung vom β 1-Integrin monoklonalen Antikörper in 50% der MEL-2-Zellen inhibiert werden konnte (Abb. 32), wohingegen die Bindung kaum in MCF7-Zellen inhibiert wurde. Dies bedeutet, dass β 1-Integrin ein spezifischer Rezeptor ist, der von GLPss58 und JRP-SS erkannt werden kann.

Nach Bindung an die ECM-Komponenten können Integrine die verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden aktivieren, einschließlich dem MAPK (ERK)- und Proteinkinase C (PKC)-Signalübertragungswege, wodurch die verschiedenen Zellantworten wie Zellproliferation oder Zellmigration induziert werden [158]. Die Western Blot Analyse zeigte, dass GLPss58 oder JRP-SS die Kollagen-I induzierte Phosphorylierung von PKC α , aber nicht von ERK in MEL-2- oder MCF7 Zellen signifikant inhibierten (Abb. 35). Der PKC-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration [159], wobei die Migration beider Arten von Tumorzellen durch GLPss58 und JRP-SS durch Unterregulierung des Integrin-vermittelten PKC-Signalweges gehemmt wurde. Die Unterregulation der Phosphorylierung des ERK-Signalwegs durch GLPss58 oder JRP-SS wurde nur in MCF7-Zellen im Normalkulturzustand gefunden (Abb. 35), d. h. beide Polysaccharid-Fractionen hemmen die Aktivierung von ERK in MCF7-Zellen über den gleichen Mechanismus wodurch die Zellproliferation inhibiert wurde.

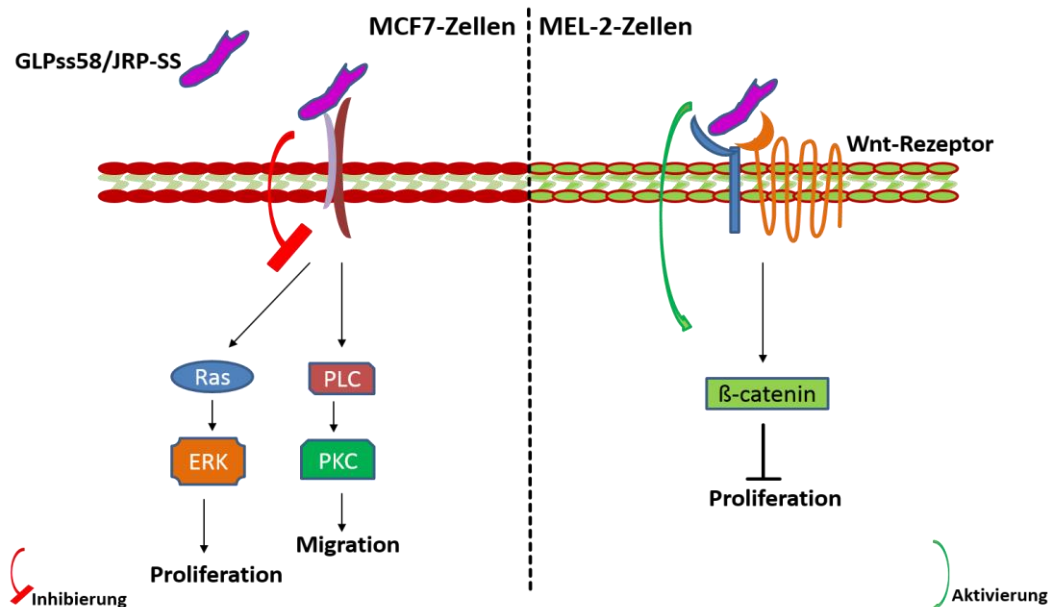


Abbildung 53: Antitumorale Wirkungen von GLPss58 der JRP-SS in MCF7- und MEL-2-Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GLPss58 oder JRP-SS einen stärkeren Hemmeffekt auf die Zellproliferation von MEL-2-Zellen besaßen als von MCF7-Zellen. Daher ist davon auszugehen, dass die beiden Polysaccharid-Fractionen jeweils unterschiedliche Wirkmechanismen in verschiedenen Tumorzelllinien haben. Es wurde beschrieben, dass der Wnt/ β -Catenin Signalweg unterschiedliche Rollen im Brust- oder in Melanom-Tumorzellen spielen [161]. Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs in Brust-Tumorzellen führt zur Erhöhung der Zellproliferation, indem das Protein Cyclin D1 überexprimiert wird [163]. Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung dieses Signalweges zu einer Überexpression von Trpm1, Kit und Met, die die Differenzierung des Melanoms von normalen Melanozyten induzieren und den Zellzyklus in der G1-Phase stoppen und die Zellproliferation verhindern [161]. Es konnte durch meinen Versuch nachgewiesen werden, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs durch Wnt3a zur Hemmung der Proliferation von MEL-2-Zellen, jedoch nicht von MCF7-Zellen führte (Abb. 37). GLPss58 und JRP-SS zeigten die gleiche Wirkung auf MEL-2-Zellen wie Wnt3a und zwar in Bezug auf die Induzierung der Akkumulation von β 1-Catenin in Zytosom (Abb. 38), die Verhinderung der Zellteilung und Beenden des Zellzykluses in der G1-Phase (Abb. 39). Dies bedeutet, dass GLPss58 und JRP-SS als Aktivatoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in MEL-2-Zellen wirken können, wodurch die Zellproliferation inhibiert wird. Dies erklärt, warum GLPss58 und JRP-SS eine stärkere Hemmwirkung auf der Proliferation in MEL-2-

Zellen zeigten als in MCF7-Zellen. In Abbildung 53 zeigt die graphische Darstellung der Wirkungen von GLPss58 oder JRP-SS in MCF7- und MEL-Zellen in diese Arbeit.

4.8. Antitumorale Aktivität von Triterpenoiden G2 und G4 aus *G. Lucidum*

Viele wissenschaftliche Studien haben berichtet, dass Triterpenoide aus *G. lucidum* anti-tumor effect haben, wie zum Beispiel Ganoderic acid T, DM, Me, Mf und S. In verschiedenen humanen Tumorzellen, wie Lungenkrebszelle, Brustkrebszellen oder Karzinomazellen, können die o.g. Triterpenoide hauptsächlich mitochondrial-vermittelte Apoptose induzieren [212-217]. Die Mechanismen der Antitumorwirkung der Triterpenoide in den Melanomzellen sind noch weniger beschrieben und wurden daher als ein Ziel in diese Arbeit gesetzt.

G2 und G4 sind zwei Triterpenoiden aus *G. lucidum*. Sie haben eine signifikante Hemmwirkung auf die Proliferation vieler verschiedener Tumorzellen, wobei G4 eine höhere Wirkung als G2 zeigte (Abb. 41). MEL-2-Zellen wurden verwendet, um die Wirkmechanismen von G2 und G4 zu erklären. Ein Ziel der Krebsforschung vieler natürlicher oder synthetischer Produkte ist es, eine kontrollierte Apoptose in Krebszellen auszulösen, so dass die Wirkung von G2 oder G4 auf die Apoptose von MEL-2-Zellen untersucht werden konnte. Es wurde gefunden, dass G2 oder G4 die Apoptose von MEL-2-Zellen dosisabhängig induzierten (Abb. 43).

Da G2 oder G4 kleine Moleküle sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie einfach durch die Zellmembran hindurch dringen und dann die Apoptose intrazellulär einleiten. Diese Hypothese wurde zunächst durch Untersuchungen beim intrinsischen apoptotischen Weg geprüft, der an der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass G2 oder G4 eine zunehmende intrazelluläre ROS-Produktion und die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ induzieren konnten (Abb. 44).

ROS werden hauptsächlich bei der Elektronentransportkette erzeugt, die sich auf der inneren mitochondrialen Membran abspielt, während des Prozesses der oxidativen Phosphorylierung. Die Emission von Elektronen von Komplex I und Komplex III der Elektronentransportkette führt zu einer teilweisen Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid. Anschließend wird das Superoxid durch zwei Dismutasen (SOD1 oder SOD2) schnell zu Wasserstoffperoxid abgebaut. Zusammengenommen werden

sowohl Superoxid als auch Wasserstoffperoxid, die in der mitochondrialen Matrix gespeichert sind, als endogenes mitochondriale ROS betrachtet [218]. Wenn der Schaden in den Mitochondrien zu groß ist, wird mitochondriales ROS freigesetzt und in der Zelle wird die Apoptose induziert. Der Spiegel des endogenen ROS könnte auch durch Hemmung von Antioxidans-Systemen, wie dem SOD-Inhibitor oder GSH-Inhibitor, erhöht werden, und dadurch der Zelltod induziert werden [219]. In dieser Arbeit wurde ein erhöhtes intrazelluläres ROS-Niveau in MEL-2-Zellen nach der Behandlung mit G2 oder G4 nachgewiesen werden (Abb. 44).

Es könnte sein, dass zunehmende intrazelluläre ROS von den beschädigten Mitochondrien freigesetzt wurde, und die Mitochondrien in MEL-2-Zellen durch G2 oder G4 signifikant beschädigt wurden. Ob G2 und G4 eine hemmende Wirkung auf intrazelluläre Antioxidantien wie SOD und GSH haben, wird in Zukunft untersucht werden. Die Gegenwart von ROS in der Zelle führt am häufigsten zu Schäden der DNA-, anschließend wird die DNA-Doppelstrang gebrochen und fragmentiert [164]. Um die beschädigte DNA zu reparieren, werden die DNA-Reparaturenzyme, einschließlich ATM und ATR aktiviert, welche die Expression des Tumorsuppressor Gen p53 induzieren [168]. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass G2 oder G4 die DNA-Fragmentierung und p53-Expression in MEL-2 Zellen induzieren konnte (Abb. 46). Bei stärkeren DNA-Schäden kann das pro-apoptotische Protein Bax aktiviert und das anti-apoptotische Protein Bcl-2 degradiert werden [168]. Durch das erhöhte Bax/Bcl-2-Verhältnis kann die Aktivierung der Caspase-3 hochreguliert und die Apoptose induziert werden [220]. Bcl-2 ist ein wichtiges porenstabilisierendes Protein auf der mitochondrialen Membran. Durch die Hemmung des Bcl-2 oder durch die Beschädigung der mitochondrialen Membran können die Poren destabilisiert werden und wodurch es zur Freisetzung von Cytochroms C kommt, welches anschließend die Caspase-Kaskade aktivieren und den Zelltod induzieren [169]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass G2 oder G4 zur Hochregulation der Bax-Expression und Herunterregulation von Bcl-2-Expression in MEL-2-Zellen führte (Abb. 47), und durch die Behandlung mit G2 oder G4 wurde Cytochrom C freigesetzt und die Aktivierung von Caspase 3 und 9 im Zytosom von MEL-2-Zellen induziert, was durch Western Blot nachgewiesen werden konnte (Abb. 48). Dies deutet darauf hin, dass G2 und G4 hauptsächlich den intrinsischen Apoptoseweg in MEL-2-Zellen induzieren konnten.

Der PI3K/Akt-Signalweg ist ein wichtiger intrazellulärer Signalweg für die Zellproliferation in verschiedenen Zellen. Durch die Verwendung von Inhibitoren von PI3K/Akt wurde die Zellmotilität von humanen Muskelzellen signifikant gehemmt [221]. Die Anwendung des Inhibitors gegen den PI3K-Akt-Weg in Kombination mit der PD1-Blockade konnte den Antitumor-Effekt der Immuntherapie gegen Melanomzellen verstärken [222]. Immer mehr Inhibitoren des PI3K/Akt-Weges wurden in klinischen Studien entwickelt und untersucht. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass G2 und G4 auch eine signifikante Hemmwirkung auf den PI3K/Akt-Weg in MEL-2-Zellen zeigten (Abb. 49). In Melanomzellen spielt der Wnt/ β -Catenin-Weg eine wichtige Rolle bei der Differenzierung zu normalen Melanozyten. Die Aktivierung dieses Weges führt zur Hochregulation der Expression der mit der Melanozyten-Differenzierung verbundenen Gene, so dass die Expression von Melanom-Progressions-assoziierten Genen und Zellproliferation gehemmt wird [145]. In dieser Arbeit wurde auch herausgefunden, dass G2 und G4 den Wnt/ β -Catenin-Weg in MEL-2-Zellen aktivieren konnten (Abb. 50). Dies deutet darauf hin, dass G2 und G4 nicht nur durch die Induktion der Apoptose, sondern auch durch Aktivierung des intrazellulären PI3K/Akt- und Wnt/ β -Catenin-Weges das Wachstum der Melanomzellen hemmen konnten. Abbildung 54 stellt den die antitumorale Wirkung von G2 oder G4 in MEL-2-Zellen in diese Arbeit dar.

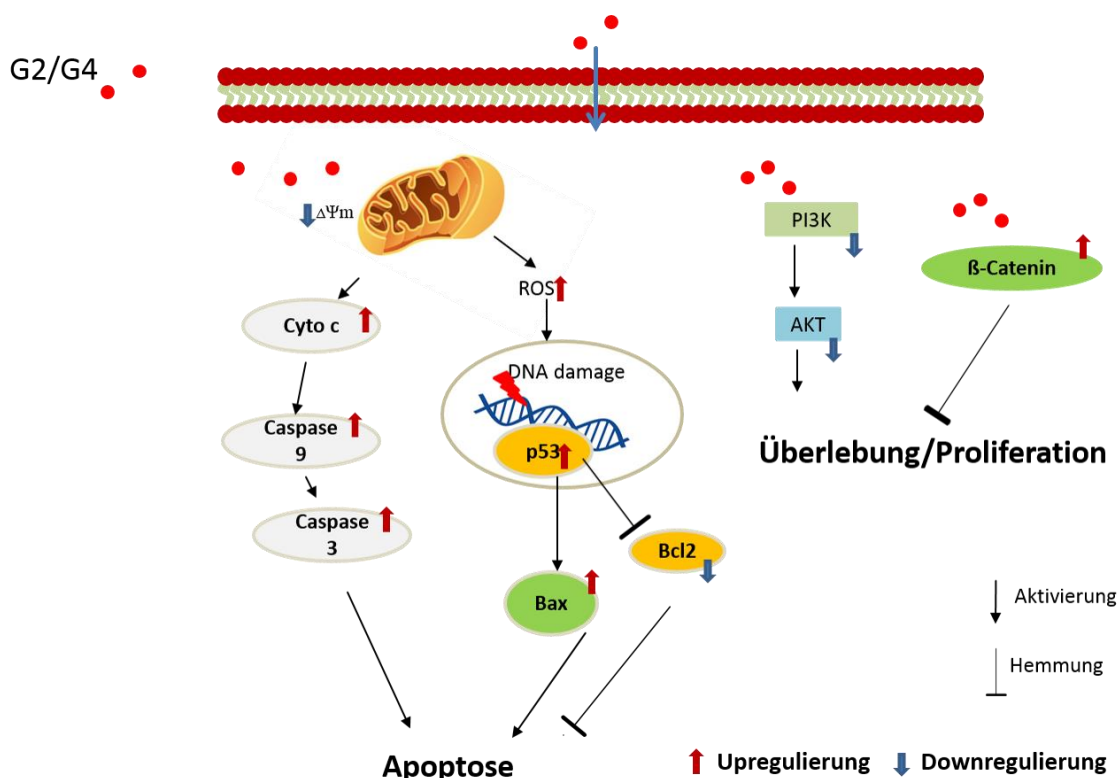


Abbildung 54: Antitumorale Wirkungen von G2 oder G4 in MEL-2-Zellen.

xxDiese Arbeit zeigt deutlich, dass die sulfatierten Polysaccharid-Fractionen GLPss58 und JRP-SS eine entzündungshemmende Wirkung haben, insbesondere bei der L-Selektin-vermittelten und Komplementsystem-vermitteltem Entzündung und haben daher das Potential für therapeutische Anwendung. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir auch herausgefunden, dass GLPss58 und JRP-SS nicht spezifisch gegenüber L-Selektin sind. Ob sie an andere Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen, die an den Entzündungsreaktionen beteiligt sind, binden können, werden wir in der Zukunft weiter analysieren. GLPss58 und JRP-SS haben ebenfalls eine signifikante antikoagulatorische Wirkung und können als alternative Analoga von Heparin verwendet werden. GLPss58 und JRP-SS haben eine effektive Hemmwirkung auf die in Melanomaproliferation *in vitro* durch Veränderung der Aktivität des intrazellulären Signalweges. Wir werden in Zukunft weitere Studien machen, um zu sehen, ob GLPss58 und JRP-SS das Potential haben, Melanomazellen in normale Melanozyten umwandeln zu können. Die Triterpenoiden G2 und G4 können eine Vielzahl von verschiedenen Tumoren hemmen und haben daher das Potential für tumortherapeutische Anwendung.

5. Zusammenfassung

In der traditionellen chinesischen Medizin werden Heilpflanzen wie *Ganoderma lucidum*, *Tremmella aurantia lba* und *Sargassum graminifolium* bereits seit langer Zeit eingesetzt um die Immunaktivität zu modulieren oder um Tumore zu bekämpfen. Diese Heilpflanzen sind eine wichtige Quelle für die Entwicklung neuer Arzneimittel, daher ist das die Aufklärung der Wirkstoffe und derer medizinischen Wirkungen und Mechanismen dieser Heilpflanzen besonders wichtig und vorrangiges Ziel in der Medizin. In vorliegender Arbeit wurden die biologische Aktivität einiger Fraktionen und gereinigter Stoffe aus o.g. Heilkräuter untersucht, welche von Kollegen in Shanghai hergestellt und zur Verfügung gestellt wurden. GLP20 und JRP sind jeweils Polysaccharid-Fraktionen aus *G. lucidum*, bzw. *T. aurantia lba*. GLPss58 und JRP-SS sind die sulfatierten Fraktionen jeweils aus GLP20 und JRP. Sarg-Z ist Polysaccharide-Fraktion aus *S. graminifolium*.

Immustimulatorische Wirkung

GLP20 und JRP zeigten weder eine immunstimulierende Wirkung auf die Maus-Immunzellen BMMs und MSLs, noch auf die humanen Immunzellen HPBLs.

Sarg-Z wies eine Multifunktion bei der Immunmodulation auf, sowohl bei der Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten, als auch bei der Regulierung von Entzündungsprozessen. Die Aktivierung von BMMs durch Sarg-Z führte zur Sekretion von TNF- α und IL-1 β sowie zur Induktion der Produktion von NO. Darüber hinaus wurde die Phagozytose-Aktivität der BMMs in Gegenwart von Sarg-Z signifikant erhöht. Weiterhin induzierten sie die Proliferation von B-Zellen von MSLs. Nach der Stimulation durch Sarg-Z wurden die B-Zellen aktiviert und zu Plasmazellen differenziert, sowie eine signifikante Menge von IgG sezerniert. Sarg-Z aktivierte nicht die T-Zellen von MSLs, sondern erhöhte auch signifikant den Prozentsatz von CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven T-Zellen. Jedoch konnten T-Zellen von HPBLs insbesondere die zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen durch Sarg-Z aktiviert werden. Ähnlich wie die MSLs konnte Sarg-Z auch den Prozentsatz der CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven T-Zellen von HPBLs erhöhen. Diese Ergebnisse bedeuten, dass die aus Algen isolierte Polysaccharide-Fraktion Sarg-Z gute Kapazität haben die Immunzellen zu aktivieren.

Antiinflammatorische Wirkung

GLP20 und JRP-SS konnten den Entzündungsprozess herunterregulieren. Die SPR-Analyse ergab, dass die Hemmwirkung auf die Bindung von L-Selektin und dessen Liganden bei einer hohen Konzentration von GLP20 oder JRP signifikant war. Im Vergleich zu den Ausgangsfractionen GLP20 und JRP zeigten ihre sulfatierten Fractionen GLPss58 bzw. JRP-SS eine 10-fach stärkere Hemmwirkung mit IC_{50} -Werte jeweils von 13.5 $\mu\text{g/ml}$ und 7.5 $\mu\text{g/ml}$ auf die L-Selektin-Ligand Bindung. Sarg-Z inhibierte die Bindung zwischen L-Selektin und dessen Ligand am stärksten und wies einen IC_{50} -Wert von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ auf. Auf Zell-Ebene hemmten GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z die Interaktion zwischen FITC-markierten L-Selektin-Antikörpern und L-Selektin auf der Zelloberfläche von HPBLs signifikant. GLPss58, JRP-SS oder Sarg-Z konnten an die Oberfläche der HPBLs binden und dadurch die SLC-induzierte Chemotaxis von HPBLs, insbesondere von L-Selectin⁺-HPBLs hemmen. In einer *in vivo* Studie mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Lymphozyten-Homing vom peripheren Blut in die lymphatischen Organe (Milz und Lymphknoten) signifikant durch GLPss58 oder JRP-SS gehemmt wurde. Weiterhin wurde es herausgefunden, dass GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z auch die Aktivierung des Komplementsystems hemmen konnten. Ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ zeigten sie eine stark hemmende Wirkung auf die Aktivierung sowohl von dem klassischen, als auch von dem MBL-Weg des Komplementsystems. Bei dem alternativen Weg zeigten GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z jeweils eine unterschiedliche Wirkungsstärke. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ konnte die Aktivierung des alternativen Weges vollständig durch GLPss58, aber nur 50% und 30% jeweils durch JRP-SS oder Sarg-Z gehemmt werden. Wie Heparin konnten GLPss58 und JRP-SS auch mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ wechselwirken. Die ELISA-Analyse zeigte, dass in Gegenwart von GLPss58 und JRP-SS die Bindung der spezifischen mAk jeweils an TNF- α und IFN- γ signifikant reduziert wurde. Diese Ergebnisse bedeuten, dass die GLPss58, JRP-SS und Sarg-Z den Entzündungsprozess durch Hemmung der Bindung der L-Selektin-Ligand-Bindung der Aktivierung des Komplementsystems sowie die Aktivierung von TNF- α und IFN- γ effektiv unterregulieren könnten.

Antikoagulierende Wirkung

Außer dem Anti-inflammatorischen Effekt zeigten GLPss58 und JRP-SS ein hohes Potential die Blutgerinnung verhindern zu können, insbesondere über den

intrinsischen Weg. Dabei verzögerten GLPss58 und JRP-SS den Beginn der Koagulation und reduzierten die Stärke und Dauer der Gerinnung.

Antitumorale Wirkung

GLPss58 und JRP-SS zeigten auch einen Antitumor-Effekt, der jedoch von den Tumorarten abhängig ist. Sowohl GLPss58 als auch JRP-SS konnten bereits bei 20 µg/mL die Proliferationsrate von MEL-2-Zellen um 50% inhibieren, wohingegen sie die Proliferationsrate von MCF7-Zellen bei Verwendung von 100 µg/mL nur um 30% inhibiert werden konnten. Durch Apoptose-Analyse konnte gezeigt werden, dass GLPss58 und JRP-SS keine Apoptose von MCF7- und MEL-2-Zellen induzieren.

GLPss58 und JRP-SS inhibierten die Zelladhäsion von MEL-2- und MCF7-Zellen auf den folgenden untersuchten ECM-Proteinen: Fibronectin, Laminin, Kollagen-I und IV, und induzierten die Zellaggregation beider Arten von Tumorzellen. GLPss58 und JRP-SS inhibierten zudem auch die Migration von MEL-2- und MCF7-Zellen. Die FACS-Analyse zeigte, dass diese Polysaccharid-Fractionen an der Zelloberfläche von beiden Tumorzellen binden konnten, und so die Wechselwirkung zwischen anti-CD29-Antikörper und β 1-Integrin teilweise verhinderten, welche ein wichtiges Adhäsionsmolekül auf der Zelloberfläche ist. In der Folge wurde die Migration von MEL-2- von MCF7-Zellen auch durch GLPss58 und JRP-SS deutlich gehemmt. Höchstwahrscheinlich würde die Hemmwirkung auf die Adhäsion und Migration durch GLPss58 und JRP-SS durch die Beeinträchtigung der Integrin-Funktion verursacht. Daher können wir sehen, dass GLPss58 und JRP-SS zur Hemmung der Metastase der Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen könnten.

Zusätzlich wurde es herausgefunden, dass GLPss58 und JRP-SS inhibierten signifikant die Phosphorylierung von PKC- α und ERK1/2 in MCF7-Zellen inhibierten. Dies bedeutet, dass GLPss58 und JRP-SS auf die beiden intrazellulären Mediatoren der Signaltransduktion wirkten, und dadurch die Proliferation von MCF7-Zellen hemmten. Im Gegensatz dazu, erfolgte die Anti-Tumorwirkung von GLPss58 und JRP-SS in MEL-2-Zellen hauptsächlich über die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges. Dadurch wurde der Zellzyklus zur Arretierung in der G1-Phase gezwungen und die Zellteilung von MEL-2-Zellen verzögert.

G2 und G4 sind zwei Triterpenoide aus *G. lucidum*. Sie konnten die Proliferation von verschiedenen Tumorzellen hemmen, wobei G4 eine stärkere Wirkung als G2 zeigte.

G2 und G4 konnten die Apoptose von MEL-2-Zellen durch Depolarisation der mitochondrialen Membran induzieren, wodurch die intrazelluläre ROS und Cytochrom C freigesetzt wurden. Der zunehmende interzelluläre ROS-Spiegel schädigte die DNA und induzierte die Expression des Proteins p53 in MEL-2-Zellen. Anschließend wurde das anti-apoptotische Protein Bcl-2 herunterreguliert und das proapoptotische Protein Bax hochreguliert. Das freigesetzte Cytochrom C induzierte die Aktivierung der Caspase 9/3-Kaskade, die zum apoptotischen Tod von MEL-2-Zellen führte. G2 und G4 hemmten auch den PI3K/Akt-Signalweg, wodurch die Proliferation der MEL-2-Zellen verhindert wurde. Zusätzlich wurde der Wnt/ β -Catenin Signalweg in MEL-2-Zellen nach der Behandlung mit G2 bzw. G4 aktiviert, wodurch die Zellteilung der MEL-2-Zellen verzögert wurde.

6. Summary

In the traditional Chinese medicine, *Ganoderma lucidum*, *Tremmella aurantia lba* and *Sargassum graminifolium* have been used as medicinal plants for a long time. They have the ability to modulate the immune system or to fight cancer. These medicinal plants are an important source for the development of new medicines, therefore, the elucidation of the active substance and their medical effects and mechanisms of these medicinal plants is particularly important and primary objective in medicine. In the present work, the biological activities of some fractions and purified substances from aforementioned medicinal herbs examined, which were prepared and provided by the colleague in Shanghai. GLP20 and JRP are respectively polysaccharide fractions from *G. lucidum* and *T. aurantia lba*. GLPss58 and JRP-SS are the sulfated fractions from GLP20 and JRP, respectively. Sarg-Z is polysaccharide fractions from *S. graminifolium*.

Immunostimulatory effect

GLP20 and have neither immunostimulating effect on mouse immune cells of BMMs and MSLs, nor on HPBL human immune cells.

Sarg-Z has demonstrated multifunctional effect on immunomodulation: it is able to activate macrophages and lymphocytes, as well as to regulate inflammatory processes. The Sarg-Z induced activation of BMMs leads to secretion of TNF- α and IL-1 β and production of NO. The phagocytic activity of the BMMs was significantly increased in the presence of Sarg-Z. The proliferation of B cells from MSLs was induced by Sarg-Z. After stimulation by Sarg-Z, the B cells were activated and differentiated to plasma cells and secreted significant amount of IgG. Sarg-Z could not activate the T cells of mouse spleen, but significantly increased the population of CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells. However, T cells of HPBLs, especially the cytotoxic CD8⁺ T cells, have been activated, and the percentage of the CD4⁺CD8⁺ double-positive T cell population was increased as well by Stimulation of Sarg-Z. These results indicate that the polysaccharide fraction Sarg-Z have good capacity to activate the immune cells.

Anti-inflammatory effect

GLP20 and JRP were able to down regulate the inflammatory process. At high concentrations, they exhibited a significant inhibitory effect on the binding of L-selectin to its ligand. In contrast to the initial fractions GLP20 and JRP, their sulfated forms GLPss58 and JRP-SS showed more than 10 times higher inhibitory effects with IC₅₀

values of 13.5 µg/ml and 7.5 µg/ml on the L-selectin-ligand binding, respectively. Sarg-Z strongly most inhibited binding between L-selectin and its ligand and had an IC₅₀ value of 0.2 µg/ml. On the cell level, GLPss58, JRP-SS or Sarg-Z significantly inhibited the interaction of FITC-labeled L-selectin antibodies with L-selectin on the surface of HPBLs. They could bind to the surface of HPBLs and then inhibited the SLC-induced chemotaxis of HPBLs, especially of L-selectin⁺-HPBLs. In the *in vivo* mouse studies, it was shown that the lymphocyte homing into lymphatic organs (spleen and lymph node) was significantly inhibited by GLPss58 and JRP-SS. GLPss58, JRP-SS and Sarg-Z were also able to inhibit the complement system. A strong inhibitory effect on the classical and the MBL pathways was achieved with 10 µg/mL. On the alternative pathway, GLPss58, JRP-SS and Sarg-Z showed a different potency. The activation of the alternative pathway was completely blocked by GLPss58 with 100 µg/mL, but only 50 % and 30 % by JRP-SS or Sarg-Z, respectively. Similarly to Heparin, GLPss58 and JRP-SS were able to interact with the cytokines TNF-α and IFN-γ. ELISA analysis showed that in the presence of GLPss58 or JRP-SS, the binding of TNF-α and IFN-γ to each of their antibodies was significantly reduced. These results indicate that the GLPss58, JRP-SS and Sarg-Z could effectively under-regulate the inflammatory process through inhibiting the binding of L-selectin-Legend binding, the activation of the complement system as well as the activity of TNF-α and IFN-γ.

Anticoagulant effect

Apart from their anti-inflammatory effect, GLPss58 or JRP-SS showed also a good effect of preventing blood coagulation. They particularly inhibited intrinsic blood clotting pathways. GLPss58 and JRP-SS delayed the start of the coagulation and shortened the strength and duration of the clot. .

Antitumor effect

GLPss58 and JRP-SS showed an antitumor effect as well, but these effects depended on different kinds of tumor cells. 20 µg/mL of GLPss58 or JRP-SS could already inhibit the proliferation rate of MEL-2 cells up to approx. 50%, whereas 100 µg/mL could only inhibited about 30% of the proliferation rate of the MCF7 cells. By apoptosis analysis, it was shown that GLPss58 and JRP-SS did not neither induce the apoptosis of MCF7 nor of MEL-2 cells. However, GLPss58 and JRP-SS inhibited the adhesion of both MEL-2 and MCF7 cells to different ECM proteins: fibronectin, laminin, collagen I and

IV, and induced cell aggregation of both kinds of tumor cells. GLPss58 and JRP-SS were able to inhibit the migration of MEL-2 and MCF7 cells. FACS analysis showed that both sulfated polysaccharides could bind to the cell surface of both kinds of tumor cells, and then partly inhibited the interaction between anti-CD29 antibodies and β 1-Integrin, which is an important adhesion molecule on the cell surface. Most likely, the inhibitory effect on adhesion and migration by GLPss58 and JRP-SS is caused by the influence of the integrin function. These suggest that both GLPss58 and JRP-SS have potential capacity to inhibit the metastase of tumors.

GLPss58 and JRP-SS inhibited very significantly the phosphorylation of PKC- α and ERK1/2 in MCF7 cells. This suggests that GLPss58 and JRP-SS influenced the activity of the signal transduction of the two intracellular mediators, and hence inhibited the proliferation of MCF7 cells. In contrast, the anti-tumor effect of GLPss58 and JRP-SS on MEL-2 cells was mainly achieved by the activation of the Wnt/ β -Catenin pathway. After activation of the Wnt/ β -Catenin pathway of MEL-2 cells by GLPss58 or JRP-SS, the cell cycle was arrested in the G1 phase and thereby the proliferation of MEL-2 cells was reduced.

G2 and G4 are two triterpenoids from *G. lucidum*. They could inhibit the proliferation of different tumor cells, of which G4 showed a stronger effect than G2. MEL-2 cells were used to investigate the molecular mechanisms of G2 and G4. We found that G2 and G4 were able to induce apoptosis of MEL-2 cells by depolarizing the mitochondrial membrane potential, and thus intercellular ROS and cytochrome C was released. The increased intercellular ROS levels damaged the DNA and induced the expression of protein p53 in MEL-2 cells. Subsequently, the anti-apoptotic protein Bcl-2 was under-regulated and the proapoptotic protein Bax was upregulated. The released cytochrome C induced the activation of the caspase 9/3 cascade, which leads to the apoptotic death of MEL-2 cells. G2 and G4 inhibited the PI3K/Akt signaling pathway as well, thereby inhibited the proliferation of MEL-2 cells. In addition, the Wnt/ β -catenin signaling pathway of MEL-2 cells was activated after treatment with G2 and G4, hence induced G1-phase cell cycle arrest and reduced the proliferation of MEL-2 cells.

7. Literatur

- 1 Cotran; Kumar, Collins (1998). "Robbins Pathologic Basis of Disease". Philadelphia: W.B Saunders Company
- 2 Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated". *Nat Rev Immunol* 7(9): 678-89.
- 3 Baumhater, S. *et al.* (1993). "Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34". *Science*, 262(5132): p. 436-8.
- 4 Dowbenko, D. *et al.* (1993). "Structure and chromosomal localization of the murine gene encoding GLYCAM 1. A mucin-like endothelial ligand for L selectin". *J Biol Chem*, 268(6): p. 4525-9.
- 5 Sasseti, C. *et al.* (1998). "Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34". *J Exp Med*, 187(12): p. 1965-75.
- 6 Samulowitz, U. *et al.* (2002), "Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope". *Am J Pathol*, 160(5): p. 1669-81
- 7 Spertini, O. *et al.* (1996). "P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells". *J Cell Biol*, 135(2): p. 523-31.
- 8 Moore, K. L. *et al.* (1992). "Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells". *J Cell Biol*, 118(2): p. 445-56.
- 9 Steegmaier, M. *et al.* (1995). "The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor". *Nature*, 373(6515): p. 615-20.
- 10 Katayama, Y. *et al.* (2005). "CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils". *J Exp Med*, 201(8): p. 1183-9.
- 11 Dunne, J. L., C. M. Ballantyne, A. L. Beaudet and K. Ley (2002). "Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1." *Blood*, 99(1): 336-41.
- 12 Campbell, J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson and E. C. Butcher (1998). "Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions." *Science*, 279(5349): 381-4.
- 13 Lo, S. K. *et al.* (1991). "Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha m beta 2) on human neutrophils." *J Exp Med*, 173(6): p. 1493-500.
- 14 Vestweber, D. (2007). "Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium." *Immunol Rev*, 218: p. 178-96.
- 15 Jutila, M. A., L. Rott, E. L. Berg and E. C. Butcher (1989). "Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1." *J Immunol*, 143(10): 3318-24.
- 16 Lowe, J. B. (2002). "Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function." *Immunol Rev* 186: 19-36.
- 17 Janeway Jr CA, Travers P., Walport M., Shlomchik MJ. (2005). "innate immunity", Immunobiology, New Your, Garland Publishing, P37-100
- 18 Maciej M. Markiewshi and John D. Lambris. (2007). "The role of complement in inflammatory Diseases form behind the scenes into the spotlight". *The American Journal of Pathobogy*, Vol. 171, No. 3,715-727
- 19 Walport MJ. (2001). "complement: firs of two parts". *N Engl J Med*, 344: 1058-1066
- 20 Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. (2002). "Mast cells: a cellular ling between autoantibodies and inflammatory arthritis". *Science*, 297: 1689-1692
- 21 Takabayashi T, Vannier E, Clark BD, Margolis NH, Dinarello CA, Burke JF, Gelfand JA. (1996). "A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF- α and IL-1 β synthesis". *J Immunol*, 156: 3455-3460
- 22 Fischer WH, Jagels MA, Hugli TE. (1999). "Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a (desArg)". *J Immunol*, 162:453-459

- 23 Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, Ward PA. (2004). "C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells". *Am J Pathol*, 164:849–859
- 24 DiScipio RG, Daffern PJ, Jagels MA, Broide DH, Sriramarao P. (1999). „A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo". *J Immunol*, 162:1127–1136
- 25 Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann NC, Sarma JV, Mahdi F, Murphy HS, Speyer C, Lu KT, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA. (2002). "Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells". *J Immunol*, 169:5962–5970
- 26 Deetjen, Speckmann, Hescheler. (2006). *Physiologie*. 4. Auflage. Urban & Fischer, München, 366.
- 27 Earl W. Davie, Kazuo Fujikawa, Walter Kisiel. (1991). "The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation". *Biochemistry*, 30 (43), 10363-10370
- 28 Cancer Fact sheet N°297. World Health Organization. February 2014
- 29 World Cancer Report 2014
- 30 G. Steven Martin, (2003). "Cell signaling and cancer". *Cancer cell*. Vol. 4. 167-174
- 31 Natasha Zarich, Jose Lius Oliva, Natalia Martinez, Rocio Jorge, Alicia Ballester und Silvia Gutierrez-Eisman. (2006). "Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1". *Molecular Biology of the Cell*. 17 (8): 3591–7
- 32 : Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D and Zhang XF. (2001). "Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade". *Recent Progress in Hormone Research*. 56 (1): 127–55
- 33 Meloche S and Pouysseur J. (2007). "The ERK1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway as a Master Regulator of the G1- to S-Phase Transition." *Oncogene*, vol. 26: 3227–3239
- 34 Aoki, M., Blazek, E., and Vogt, P.K. (2001). "A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 136–141.
- 35 Rafalski, V. A.; Brunet, A (2011). "Energy metabolism in adult neural stem cell fate". *Progress in Neurobiology*. 93 (2): 182–203
- 36 Chien AJ, Moon RT. (2007). "WNTs and WNT receptors as therapeutic tools and targets in human disease processes". *Front Biosci* 12:448–457.
- 37 MacDonald BT, Tamai K, He X. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases". *Developmental Cell* 17 (1): 9–26.
- 38 Minde DP, Anvarian Z, Rüdiger SG, Maurice MM. (2011). "Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer?" (PDF). *Molecular Cancer* 10: 101.
- 39 Minde, David P.; Radli, Martina; Forneris, Frederico; Maurice, Madelon M.; Rüdiger, Stefan G. D. Buckle, Ashley M, ed. (2013). "Large Extent of Disorder in Adenomatous Polyposis Coli Offers a Strategy to Guard Wnt Signalling against Point Mutations". *PLoS ONE* 8 (10), e77257.
- 40 Komiya Y, Habas R. (2008). "Wnt signal transduction pathways". *Organogenesis*. 4 (2): 68–75.
- 41 Schlang T., Matsuda Y., Lienhard S., Huber A., and E Hynes N. (2007). "Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation". *Breast cancer Res*. 9(5): R63..
- 42 H.-J. Schmoll. K. Höffken, K. Possinger. (2006). "Kompendium Internistische Onkologie", *Springer Verlag*, S. 523-541
- 43 Hu, J. C. et al. (2009), "Comparative Effectiveness of Minimally Invasive vs Open Radical Prostatectomy". *JAMA* 302(14), S. 1557-1564
- 44 H.-J. Schmoll. K. Höffken, K. Possinger. (2006). "Kompendium Internistische Onkologie", *Springer Verlag* S. 541-650
- 45 M. Pfreundschuh: Prinzipien der medikamentösen Tumorthherapie, in: H.-J. Schmoll. K. Höffken, K. Possinger (2006). *Kompendium Internistische Onkologie*, *Springer Verlag*, S. 651-702

- 46 Molekulare Therapie in der Hämatologie/Onkologie, Uni-Med Verlag 2008
- 47 Europäische Arzneimittelagentur, abgerufen am 3. Januar 2016
- 48 Sankawa Y. *Oncology Research and Treatment* 2014;37(suppl4):2-5
- 49 Eggermont A et al. *J Cancer* 2011; 47:2150-57
- 50 M. K. Callahan, M. A. Postow, J. D. Wolchok: *Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy*. In: *Immunity*. Band 44, Nummer 5, Mai 2016, S. 1069–1078
- 51 S. Hoyer, S. Prommersberger u. a. (2014). "Concurrent interaction of DCs with CD4(+) and CD8(+) T cells improves secondary CTL expansion: It takes three to tango". *European journal of immunology*. Band 44, Nummer 12,, S. 3543–3559
- 52 C. Berger, C. J. Turtle, M. C. Jensen, S. R. Riddell. (2009). "Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity". *Current Opinion in Immunology*. Band 21, Nummer 2, S. 224–232
- 53 M. L. Davila, I. Riviere, X. Wang, S. Bartido, J. Park, K. Curran, S. S. Chung, J. Stefanski, O. Borquez-Ojeda, M. Olszewska, J. Qu, T. Wasielewska, Q. He, M. Fink, H. Shinglot, M. Youssif, M. Satter, Y. Wang, J. Hosey, H. Quintanilla, E. Halton, Y. Bernal, D. C. Bouhassira, M. E. Arcila, M. Gonen, G. J. Roboz, P. Maslak, D. Douer, M. G. Frattini, S. Giralt, M. Sadelain, R. Brentjens. (2014). "Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia". *Science translational medicine*. Band 6, Nummer 224, S. 224ra25
- 54 M. Mathew, R. S. Verma. (2009) "Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy". *Cancer Sci*. 100, S. 1359–1365 PMID 19459847 (Review)
- 55 da Rocha, A.B., Lopes, R.M. and Schwartzmann, G. (2001). "Natural products in anticancer-therapy". *Curr Opin Pharmacol*, 1: 364-9.
- 56 Cragg GM, Newman DJ. (2000). "Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions". *Expert Opin Investig Drugs*. (12):2783-97.
- 57 Harvey, A. (2000). "Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products", *Drug Discov Today*, 5: 294-300.
- 58 Mukherjee, A.K., Basu, S., Sarkar, N. and Ghosh, A.C. (2001). "Advances in cancer therapy with plant based natural products", *Curr Med Chem*, 8: 1467-86.
- 59 William J. Gradishar, Dimitry Krasnojon, Sergey Cheporov, Anatoly N. Makhson, Georgiy M. Manikhas, Alicia Clawson, Paul Bhar. (2009). "Significantly Longer Progression-Free Survival With nab-Paclitaxel Compared With Docetaxel As First-Line Therapy for Metastatic Breast Cancer". *Journal of Clinical Oncology*. Band 27, Nr. 22, 1, 3611-9.
- 60 M.E. Wall, M.C.Wani, C.E. Cook, K.H.Palmer, A.I.McPhail, G.A.Sim. (1966): "Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata". *J. Am. Chem. Soc.* 88, S. 3888–3890.
- 61 D. J. Adams, M. L. Wahl, J. L. Flowers, B. Sen, M. Colvin, M. W. Dewhirst, G. Manikumar, M. C. Wani. (2005). "Camptothecin analogs with enhanced activity against human breast cancer cells. II. Impact of the tumor pH gradient". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 57, Nr. 2, S. 145–154.
- 62 Hien, T.T. and White, N.J. (1993): Qinghaosu, *Lancet*, 341: 603-8
- 63 Eintrag zu *Ephedrin*. In: *Römpp Online*. Georg Thieme Verlag, abgerufen am 5. März 2011.
- 64 Kino, K., Sone, T., Watanabe, J., Yamashita, A., Tsuboi, H., Miyajima, H. and Tsunoo, H. (1991). "Immunomodulator, LZ-8, prevents antibody production in mice", *J Immunopharmacol*, 13, 1109-1115.
- 65 Wang, Y.Y., Khoo, K.H., Chen, S.T., Lin, C.C., Wong, C.H. and Lin, C.H. (2002). "Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of Ganoderma lucidum (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities", *Bioorg Med Chem*, 10: 1057-62
- 66 Zhang, J., Tang, Q., Zimmerman-Kordmann, M., Reutter, W. and Fan, H. (2002). "Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from Ganoderma lucidum", *Life Sci*, 71: 623-38.

- 67 Bao, X.F., Wang, X.S., Dong, Q., Fang, J.N. and Li, X.Y. (2002). "Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*", *Phytochemistry*, 59: 175-81.
- 68 Wang, S.Y., Hsu, M.L., Hsu, H.C., Tzeng, C.H., Lee, S.S., Shiao, M.S. and Ho, C.K. (1997). "The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes", *Int J Cancer*, 70: 699-705.
- 69 Wu YS1, Ho SY1, Nan FH2, Chen SN3. (2016). "Ganoderma lucidum beta 1,3/1,6 glucan as an immunomodulator in inflammation induced by a high-cholesterol diet". *BMC Complement Altern Med*.16(1):500.
- 70 Wu, T.S., Shi, L.S. and Kuo, S.C. (2001). "Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes", *J Nat Prod*, 64: 1121-2.
- 71 Min, B.S., Gao, J.J., Nakamura, N. and Hattori, M. (2000). "Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells", *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48: 1026-33.
- 72 Zhu, H.S., Yang, X.L., Wang, L.B., Zhao, D.X. and Chen, L. (2000). "Effects of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells", *Cell Biol Toxicol*, 16: 201-6.
- 73 Smina TP1, Nitha B2, Devasagayam TP3, Janardhanan KK4 (2017). "Ganoderma lucidum total triterpenes induce apoptosis in MCF-7 cells and attenuate DMBA induced mammary and skin carcinomas in experimental animals". *Mutat Res*. 813:45-51
- 74 Jiang D1, Wang L1, Zhao T1, Zhang Z1, Zhang R1, Jin J1, Cai Y1, Wang F1. (2017). "Restoration of the tumor-suppressor function to mutant p53 by *Ganoderma lucidum* polysaccharides in colorectal cancer cells". *Oncol Rep*. 37(1):594-600..
- 75 Ouyang MZ, Lin LZ, Lv WJ, Zuo Q, Lv Z, Guan JS, Wang ST, Sun LL, Chen HR, Xiao ZW. (2016). "Effects of the polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* on chemotherapy-related fatigue in mice". *Int J Biol Macromol*. 91:905-10.
- 76 Hsu, H.Y., Lian, S.L. and Lin, C.C. (1990). "Radioprotective effect of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst after X-ray irradiation in mice", *Am J Chin Med*, 18: 61-69.
- 77 Kim, K.C. and Kim, I.G. (1999). "Ganoderma lucidum extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation", *Int J Mol Med*, 4: 273-277.
- 78 Chen Y, Lv J, Li K, Xu J, Li M, Zhang W, Pang X. (2016). "Sporoderm-Broken Spores of *Ganoderma lucidum* Inhibit the Growth of Lung Cancer: Involvement of the Akt/mTOR Signaling Pathway". *Nutr Cancer*. 68(7):1151-60
- 79 el-Mekkawy, S., Meselhy, M.R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kawahata, T. and Otake, T. (1998). "Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*", *Phytochemistry*, 49: 1651-7.
- 80 Min, B.S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Bae, K.W. and Hattori, M. (1998). "Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease", *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 46: 1607-12.
- 81 Kim, Y.S., Eo, S.K., Oh, K.W., Lee, C. and Han, S.S. (2000). "Antiherpetic activities of acidic protein bound polysacchride isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons", *J Ethnopharmacol*, 72: 451-8.
- 82 Kubo, M., Matsuda, H., Nogami, M., Arichi, S. and Takahashi, T. (1983). "Ganoderma lucidum. Effects on disseminated intravascular coagulation", *Yakugaku Zasshi*, 103: 871-7.
- 83 Kanmatsuse, K., Kajiwara, N., Hayashi, K., Shimogaichi, S., Fukinbara, I., Ishikawa, H. and Tamura, T. (1985). "Studies on *Ganoderma lucidum*. I. Efficacy against hypertension and side effects", *Yakugaku Zasshi*, 105: 942-7.
- 84 Kim, D.H., Shim, S.B., Kim, N.J. and Jang, I.S. (1999). "Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*". *Biol Pharm Bull*, 22: 162-164.
- 85 Yoon, S.Y., Eo, S.K., Kim, Y.S., Lee, C.K. and Han, S.S. (1994). "Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics", *Arch Pharm Res*, 17: 438-42.
- 86 Akihisa T. et al (2007). "Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*"; *Chem Biodivers*; 4(2); S. 224-231

- 87 Tasaka, K., Mio, M., Izushi, K., Akagi, M. and Makino, T. (1988). "Anti-allergic constituents in the culture medium of *Ganoderma lucidum*. (II). The inhibitory effect of cyclooctasulfur on histamine release", *Agents Actions*, 23: 157-160.
- 88 Shieh Y.H. et al.(2001) "Evaluation of the hepatic and renal-protective effects of *Ganoderma lucidum* in mice"; *Am J Chin Med*; 29(3-4); S. 501-507
- 89 Zeng Q, Zhou F, Lei L, Chen J, Lu J, Zhou J, Cao K, Gao L, Xia F, Ding S, Huang L, Xiang H, Wang J, Xiao Y, Xiao R, Huang J. (2017). "Ganoderma lucidum polysaccharides protect fibroblasts against UVB-induced photoaging". *Mol Med Rep*.15(1):111-116.
- 90 Kim JW, Kim HI, Kim JH, Kwon OC, Son ES, Lee CS, Park YJ. (2016). "Effects of Ganodermanondiol, a New Melanogenesis Inhibitor from the Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*". *Int J Mol Sci*. 27;17(11), 1798-810.
- 91 Li K, Zhuo C, Teng C, Yu S, Wang X, Hu Y, Ren G, Yu M, Qu J. (2016). "Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice". *Int J Biol Macromol*. 93(Pt A):904-912.
- 92 Guo SS, Cui XL, Rausch WD. (2016). "Ganoderma Lucidum polysaccharides protect against MPP(+) and rotenone-induced apoptosis in primary dopaminergic cell cultures through inhibiting oxidative stress". *Am J Neurodegener Dis*.;5(2):131-44..
- 93 Baets, S., Vandamme, E.J., (2001). "Extracellular Tremella polysaccharides: structure, properties and applications". *Biotechnology Letters*, 23(17):1361-1366.
- 94 Ma, L., Lin, Z., (1992). "Effect of Tremella polysaccharide on IL-2 production by mouse splenocytes". *Acta Pharmaceutica Sinica*, 27:1-4 (in Chinese).
- 95 Wang, L., Huang, H.Y., Wei, Y.Y., Li, X.X., Chen, Z.X., (2009). "Characterization and anti-tumor activities of sulfated polysaccharide SRBPS2a obtained from defatted rice bran". *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(4):427-431.
- 96 Kiho, T., Kochi, M., Usui, S., Hirano, K., Aizawa, K., Inakuma, T., (2001). "Antidiabetic effect of an acidic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia* and its degradation product (TAP-H)". *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24(12), 1400-3
- 97 Du X, Zhang J, Yang Y, Ye L, Tang Q, Jia W, Liu Y, Zhou S, Hao R, Gong C, Pan Y. (2009). "Structural elucidation and immuno-stimulating activity of an acidic heteropolysaccharide (TAPA1) from *Tremella aurantialba*". *Carbohydr Res*. 31;344(5):672-8
- 98 Du XJ, Zhang JS, Yang Y, Tang QJ, Jia W, Pan YJ. (2010). "Purification, chemical modification and immunostimulating activity of polysaccharides from *Tremella aurantialba* fruit bodies". *J Zhejiang Univ Sci B*.;11(6):437-42.
- 99 Du X, Zhang J, Lv Z, Ye L, Yang Y, Tang Q. (2014). "Chemical modification of an acidic polysaccharide (TAPA1) from *Tremella aurantialba* and potential biological activities" *Food Chem*. 2014 Jan 15;143:336-40
- 100 Deng C, Sun Y, Fu H, Zhang S, Chen J, Xu X. (2016). "Antioxidant and immunostimulatory activities of polysaccharides extracted from *Tremella aurantialba* mycelia". *Mol Med Rep*.;14(5):4857-4864.
- 101 Zhang ZC, Lian B, Huang DM, Cui FJ. (2009). "Compare activities on regulating lipid-metabolism and reducing oxidative stress of diabetic rats of *Tremella aurantialba* broth's extract (TBE) with its mycelia polysaccharides (TMP)". *J Food Sci*.;74(1):H15-21.
- 102 C.Michael Hogan. (2011). "Brown algae". E.Monosson & C.J.Cleveland. Encyclopedia of Earth. National Council for Science and the Environment..
- 103 Wolfram Braune (2008). "Meeresalgen. Ein Farbbildführer zu den verbreiteten benthischen Grün- Braun- und Rotalgen der Weltmeere". *Gantner, A R; Alflage*:1
- 104 Cannel RJ. (2006). "Algae as a source of biologically active products". *Pestic Sci*.;39:143–53.
- 105 Payghami N, Jamili S, Rustaiyan A, Saeidnia S, Nikan M, Gohari AR. (2014). "Alpha-amylase inhibitory activity and sterol composition of the marine algae, *Sargassum glaucescens*". *Pharmacognosy Res*. 7(4):314-21.
- 106 Chao-Yan Zhang, Wen-Hui Wu, Jue Wang and Min-Bo Lan. (2012). "Antioxidant Properties of Polysaccharide from the Brown Seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and Its Effects on Calcium Oxalate Crystallization". *Mar. Drugs* 10, 119-130.

- 107 Chao-Yan Zhang, Ting-Kong, Wen-Hui Wu and Min-Bo Lan. (2013). "The Protection of Polysaccharide from the Brown Seaweed *Sargassum graminifolium* against Ethylene Glycol-Induced Mitochondrial Damage". *Mar. Drugs*, 11, 870-880.
- 108 Granert, C.; Raud, J.; Xie, X.; Lindquist, L.; Lindbom, L. (1994). "Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit". *J. Clin. Invest.* 93, 929–936
- 109 Cumashi, A.; Ushakova, N.A.; Preobrazhenskaya, M.E.; D'Incecco, A.; Piccoli, A.; Totani, L.; Tinari, N.; Morozevich, G.E.; Berman, A.E.; Bilan, M.I.; Usov, A.I.; Ustyuzhanina, N.E.; Grachev, A.A.; Sanderson, C.J.; Kelly, M.; Rabinovich, G.A.; Iacobelli, S.; Nifantiev, N.E. (2007). "A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds". *Glycobiology*, 17, 541–552.
- 110 Senni, K.; Gueniche, F.; Foucault-Bertaud, A.; Igondjo-Tchen, S.; Fioretti, F.; Collic-Jouault, S.; Durand, P.; Guezennec, J.; Godeau, G.; Letourneur, D. (2006). "Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis". *Arch. Biochem. Biophys.*, 445, 56–64..
- 111 Blondin, C.; Fischer, E.; Boisson-Vidal, C.; Kazatchkine, M.D.; Jozefonvicz, J. (1964). "Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed". *Mol. Immunol.*, 31, 247–253.
- 112 Tissot, B.; Montdargent, B.; Chevolot, L.; Varenne, A.; Descroix, S.; Gareil, P.; Daniel, R. (2003). "Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway". *Biochim. Biophys. Acta*, 1651, 5–16.
- 113 Tissot, B.; Daniel, R. (2003). "Biological properties of sulfated fucans: The potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human complement system". *Glycobiology*, 13, 29G–31G.
- 114 Tissot, B.; Gonnet, F.; Iborra, A.; Berthou, C.; Thielens, N.; Arlaud, G.J.; Daniel, R. (2005). "Mass spectrometry analysis of the oligomeric C1q protein reveals the B chain as the target of trypsin cleavage and interaction with fucoidan". *Biochemistry*, 44, 2602–2609.
- 115 Chen, D.; Wu, X.Z.; Wen, Z.Y. (2008). "Sulfated polysaccharides and immune response: promoter or inhibitor?" *Panminerva Med* 50, 177–183.
- 116 Leiro, J.M.; Castro, R.; Arranz, J.A.; Lamas, J. (2007). "Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C". *Agardh. Int. Immunopharmacol.* 7, 879–888.
- 117 Yang, J.W.; Yoon, S.Y.; Oh, S.J.; Kim, S.K.; Kang, K.W. (2006). "Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346, 345–350.
- 118 Do, H.; Pyo, S.; Sohn, E.H. (2010). "Suppression of iNOS expression by fucoidan is mediated by regulation of p38 MAPK, JAK/STAT, AP-1 and IRF-1, and depends on up-regulation of scavenger receptor B1 expression in TNF-alpha- and IFN-gamma-stimulated C6 glioma cells". *J. Nutr. Biochem.*, 21, 671-9
- 119 Bernardi, G. Springer, G.F. (1962). "Properties of highly purified fucan". *J. Biol. Chem.* 237, 75–80.
- 120 Pereira, M.S.; Mulloy, B.; Mourao, P.A.S. (1999). "Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae". *J. Biol. Chem.* 274, 7656–7667
- 121 Nishino, T.; Kiyohara, H.; Yamada, H.; Nagumo, T. (1991). "An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*". *Phytochemistry* 30, 535–539.
- 122 Nishino, T.; Yokoyama, G.; Dobashi, K.; Fujihara, M.; Nagumo, T. (1989). "Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities". *Carbohydr. Res.* 186, 119–129

- 123 Fatema, M.K.; Nonami, H.; Ducatti, D.R.B.; Gonçalves, A.G.; Duarte, M.E.R.; Nosedá, M.D.; Cerezo, A.S.; Erra-Balsells, R.; Matulewicz, M.C. (2010). "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis of oligosaccharides and oligosaccharide alditols obtained by hydrolysis of agaroses and carrageenans, two important types of red seaweed polysaccharides". *Carbohydr. Res.* 345, 275–283
- 124 Nishino, T.; Aizu, Y.; Nagumo, T. (1991). "The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity". *Thromb. Res.* 64, 723–731.
- 125 Chevolut, L.; Mulloy, B.; Ratiskol, J.; Foucault, A.; Collic-Jouault, S. (2001). A disaccharide repeatunit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr. Res.* 330, 529–535
- 126 Damonte, E.B.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.S. (2004). „Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents". *Curr. Med. Chem.* 11, 2399–2419.
- 127 Ghosh, T.; Chattopadhyay, K.; Marschall, M.; Karmakar, P.; Mandal, P.; Ray, B. (2009). "Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation". *Glycobiology*, 19, 2–15
- 128 Hidari, K.I.P.J.; Takahashi, N.; Arihara, M.; Nagaoka, M.; Morita, K.; Suzuki, T. (2008). "Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 91–95
- 129 Talarico, L.B.; Damonte, E.B. (2007). "Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans". *Virology* 363, 473–485
- 130 Ghosh, T.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B.; Sinha, S.; Ray, B. (2009). "Sulfated xylomannans from the red seaweed *Sebdenia polydactyla*: structural features, chemical modification and antiviral activity". *Antivir. Chem. Chemother.* 19, 235–242
- 131 Mohsen, M.S.A.; Mohamed, S.F.; Ali, F.M.; El-Sayed, O.H. (2007). "Chemical Structure and Antiviral Activity of Water-soluble Sulfated Polysaccharides from *Sargassum latifolium*". *J. Appl. Sci. Res.* 3, 1178–1185
- 132 Rocha de Souza, M.; Marques, C.; Guerra Dore, C.; Ferreira da Silva, F.; Oliveira Rocha, H.; Leite, E. (2007). "Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds". *J. Appl. Phycol.* 19, 153–160
- 133 Wang, J.; Liu, L.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Qi, H.; Li, P. (2009) "Synthesized oversulphated, acetylated and benzoylated derivatives of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity *in vitro*". *Food Chem.* 114, 1285–1290
- 134 Wang, J.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Song, H.; Li, P. (2010). „Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*". *Int. J. Biol. Macromol.* 46, 6–12
- 135 Stanley, E.R. (1997). "Murine bone marrow-derived macrophages". *Methods Mol Biol.* 75:301-4.
- 136 A.N.DE Belder and Kirsti Garnath. (1973). "Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans" *Carbohydrate Research*, 30 375-378.
- 137 Moon, E.Y., Han, J.J., Rhee, D.K. and Pyo, S. (1998). "Aflatoxin B1-induced suppression of nitric oxide production in murine peritoneal macrophages". *J Toxicol Environ Health A*, 55: 517-30.
- 138 Kenji chiba, Yoshiki Yanagawa, Yumi Masuuchi, Hirotoshi Katoka, Takafumi Kawaguchi, Makio Ohtsuki and Yukio Hoshino. (2015). "FTY720, a Novel Immunosuppressant, Induces Sequestration of Circulating Mature Lymphocytes by Acceleration of Lymphocyte Homing in Rats. I. FTY720 Selectively Decreases the Number of Circulating Mature Lymphocytes by Acceleration of Lymphocyte Homing". *Journal of Immunology*, 190:5037-5044
- 139 Liu Y, Zhang J, Tang X, Yang Y, Guo Q, Wang Q, Wu D, Cui SW. (2014). "Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β -D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*". *Carbohydr. Polym.* Jan 30:101: 968-74
- 140 Zhang K, Liu Y, Zhao X, Tang X, Dornedde J, Zhang J, Fan H. (2017). "Anti-inflammation properties of GLP58, a sulfated polysaccharide from *Ganoderma lucidum*". *Int. J. Bio. Macromol. Sep.* 1-8

- 141 CY Zhang, Ting-K, WH W, MB Lan. (2013). "the protection of Polysaccharide from the brown Seaweed *Sargassum graminifolium* against Ethylene Glycol-Induced Mitochondrial Damage" *Mar. Drugs* 11, 870-880
- 142 CY Zhang, WH Wu, J Wang and MB Lan. (2012). "antioxidant Properties of Polysaccharide from the Brown Seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn) and Its Effects on Calcium Oxalate Crystallization". *Mar. Drugs* 10, 119-130.
- 143 Zuckermann FA, Husmann RJ. (1996). "Funktional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells", *Immunology*. 87(3): 500-12.
- 144 Sullivan YB, Landay AL, Zack JA, Kitchen SG, Al-Harhi L. (2001). "Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells." *Immunology*. 103(3):270-80.
- 145 Kägi, B.; Ledermann, K.; Bürki, R. (1994). "Molecular Mechanisms of Lymphocyte-mediated Cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo." *Annu. Rev. Immunol.* 12 S. 207-232
- 146 Fisher, G.H.; Rosenberg, E.J.; Straus, S.E.; Dale, J.K.; Middleton, L.A.; Lin, A.Y.; Strober, W.; Leonard, M.J.; Puck, J.M. (1995) "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Cell* 81 S. 935-946
- 147 Cummings R.D. (1999). "Structure and function of the selectin ligand PSGL-1" *Journal of Medical and Biological Research*, 32(5) 519-528
- 148 Helen Fu, Ellen L Berg, Naoya Tsurushita. (1997). "Fine mapping of the epitopes of humanized anti-L-selectin monoclonal antibodies HuDREG-55 and HuDREG-200" *Immunology Letters*, 59 (2) 71-77
- 149 Tedder, T. F., D. A. Steeber, A. Chen, and P. Engel. (1995). "The selectins: vascular adhesion molecules". *FASEB J.* 9: 866–873.
- 150 Stein, J. V., A. Rot, Y. Luo, M. Narasimhaswamy, H. Nakano, M. D. Gunn, A. Matsuzawa, E. J. Quackenbush, M. E. Dorf, and U. H. von Andrian. (2000). "The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6CKine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripherallymph node high endothelial venules". *J. Exp. Med.* 191: 61–76.
- 151 Steeber, D. A., P. Engel, A. S. Miller, M. P. Sheetz, and T. F. Tedder. (1997). "Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes". *J. Immunol.* 159: 952–963
- 152 Hariharan Subramanian, Jamison J. Grailer, Kimberly C. Ohlrich, Amy L. Rymaszewski, Jessica J. Loppnow, Masanari Kodera, Rochelle M. Conway, and Douglas A. Steeber. (2012). "Signaling through L-Selectin Mediates Enhanced Chemotaxis of Lymphocyte Subsets to Secondary Lymphoid Tissue Chemokine". *J of Immunology*, 188: 3223-3236
- 153 Butcher E. C., and L. J. Picker. (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis". *Science* 272:60.
- 154 James P Lodolce, David L Boone, Sophia Chai. Rachel E Swain, Themistocles Dassopoulos, Shanthi Trettin, Averil Ma (1998). "IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation". *Immunity* 9 (5), 669-76.
- 155 A. Salas, M. Sans, A. Soriano, J.C. Reverter, D.C. Anderson, J.M. Pique, J. Panes. (2000). "Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism". *Gut*. 47 88-96.
- 156 M. Kenig, V. Gaberc-Porekar, I. Fonda, V. Menart. (2008). "Identification of the heparin-binding domain of TNF-alpha and its use for efficient TNF-alpha purification by heparin-Sepharose affinity chromatography". *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. A.* 867 119-125.
- 157 Humphries M.J. (2000). "Integrin structure". *Biochem. Soc. Trans.* 28, Nr. 4, S. 311-339
- 158 Hynes, R.O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines". *Cell* 110, 673-387.

- 159 Alam, N., Goel, H.L., Zarif, M.J., Butterfield, J.E., Perkins, H.M., Sansoucy, B.G., Sawyer, T.K., and Languino, L.R. (2007). "The integrin-growth factor receptor duet". *J. Cell. Physiol.* 123, 649-653.
- 160 Jokinen J., Dadu E., Nykvist P., Käbylä J. (2004). "Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils". *J Biol Chem.* Jul 23; 279(30), 31956-63.
- 161 Schlang T., Matsuda Y., Lienhard S., Huber A., and E Hynes N. (2007). "Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation". *Breast cancer Res.* 9(5): R63.
- 162 Chen AJ., Moore EC., Lonsdorf AS., Kulikauskas RM., Rothberg BG., Berger AJ., Major MB., Hwang ST., Rimm DL., Moon RT. (2009). "Activated Wnt/ β -catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model". *Proc Natl Acad Sci USA.* Jan 27; 106(4): 1193-8
- 163 SY Lin, W Xia, JC Wang, KY Kwong. (2000). " β -catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression". *Natl Acad Sci USA.* Apr 11; 97(8): 4262-6
- 164 Kimura Y, Taniguche M and Baba K. (2002). "Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance". *Anticancer Res.* 22; 22(6A): 3309-3318
- 165 Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. (2000). "Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction". *Apoptosis* Nov; 5(5): 415-8
- 166 Lix, Fang P, Mai J, et al. (2013). "Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers". *J Hematol Oncol* 6(19)
- 167 Connor KM, Subbaram S, Regan KJ, Nelson KK, Mazurkiewicz JE, Bartholomew PJ, Aplin AE, Tai YT, Aguirre-Ghiso J, Flores SC, Melendez JA. (2005). "Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation". *J Biol Chem.* 280: 16916-16924
- 168 Jauba B (2003). "DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling" *Biochem. Pharmacol.* 66, 1547-1554.
- 169 Zhou K., Ahn J., Wilson SH., Prives C. (2001). "A role for p53 in base excision repair" *EMBO J* 20:914-923.
- 170 Q. J. Tang, J. S. Zhang, M. Zimmermann-Kordmann, W. Reutter and H. Fan. (2000). "Activation of macrophages by GLIS: a fraction purified from *Ganoderma Lucidum*". *Archives of Pharmacology.* 362, 18-27
- 171 Laux, I., Khoshnan, A., Tindell, C., Bae, D., Zhu, X., June, C. H., Effros, R. B. & Nel, A. (2000). "Response differences between human CD4(+) and CD8(+) T-cells during CD28 costimulation: implications for immune cell-based therapies and studies related to the expansion of double-positive T-cells during aging" *Clin. Immunol.* 96, 187-197.
- 172 Michelina Nascimbeni, Eui-Cheol Shin, Luis Chiriboga, David E. Kleiner, and Barbara Rehmann. (2004). "Peripheral CD4₊CD8₊ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions". *BLOOD*, VOLUME 104 (2), 478-86
- 173 Nana H. Overgaard, Ji-Won Jung, Raymond J. Steptoe, and James W. Wells. (2016). "CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage?". *Journal of Leukocyte Biology* Vol.97, No.1, pp:31-38, October
- 174 Paliard X, Malefijt RW, de Vries JE, Spits H. (1988). "Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4₊ T-cell clones". *Nature*; 335:642-4.
- 175 Wang, L., Wildt, K. F., Castro, E., Xiong, Y., Feigenbaum, L., Tessarollo, L., Bosselut, R. (2008). "The zinc finger transcription factor *Zbtb7b* represses CD8-lineage gene expression in peripheral CD4⁺ T cells". *Immunity* 29, 876-887.
- 176 Reis, B. S., Rogoz, A., Costa-Pinto, F. A., Taniuchi, I., Mucida, D. (2013). "Mutual expression of the transcription factors *Runx3* and *ThPOK* regulates intestinal CD4⁺ T cell immunity". *Nat. Immunol.* 14, 271-280.
- 177 Sullivan, Y. B., Landay, A. L., Zack, J. A., Kitchen, S. G., Al-Harhi, (2001). "Upregulation of CD4 on CD8⁺ T cells: CD4^{dim}CD8^{bright} T cells constitute an activated phenotype of CD8⁺ T cells". *Immunology* 103, 270-280.

- 178 Kitchen, S. G., Jones, N. R., LaForge, S., Whitmire, J. K., Vu, B. A., Galic, Z., Brooks, D. G., Brown, S. J., Kitchen, C. M., Zack, J. A. (2004). "CD4 on CD8(+) T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8727–8732.
- 179 Kitchen, S. G., LaForge, S., Patel, V. P., Kitchen, C. M., Miceli, M. C., Zack, J. A. (2002). "Activation of CD8 T cells induces expression of CD4, which functions as a chemotactic receptor". *Blood* 99, 207–212.
- 180 Mucida, D., Husain, M. M., Muroi, S., van Wijk, F., Shinnakasu, R., Naoe, Y., Reis, B. S., Huang, Y., Lambolez, F., Docherty, M., Attinger, A., Shui, J. W., Kim, G., Lena, C. J., Sakaguchi, S., Miyamoto, C., Wang, P., Atarashi, K., Park, Y., Nakayama, T., Honda, K., Ellmeier, W., Kronenberg, M., Taniuchi, I., Cheroutre, H. (2013.) "Transcriptional reprogramming of mature CD4⁺ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes". *Nat. Immunol.* 14, 281–289.
- 181 Desfrancois, J., Moreau-Aubry, A., Vignard, V., Godet, Y., Khammari, A., Dr'eno, B., Jotereau, F., Gervois, N. (2010). "Double positive CD4CD8 alphabeta T cells: a new tumor-reactive population in human melanomas". *PLoS ONE* 5, e8437
- 182 Samee, H.; Li, Z.X.; Lin, H.; Khalid, J.; Wang, B.P. (2009). "In vivo study of antiallergenicity of ethanol extracts from *Sargassum tenerrimum*, *Sargassum cervicorne* and *Sargassum graminifolium* turn". *Eur. Food Res. Technol.* 229, 435–441.
- 183 Zhang CY, Wu WH, Wang J and Lan MB. (2012). "Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn) and its effects on calcium oxalate crystallization" *Mar.Dru.*, 10, 119-130
- 184 Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule" *Annu Rev Biochem*, 63: 175-95
- 185 Lepoivre M, Flaman JM, Henry Y. (1992). "Early loss of the tyrosyl radical in ribonucleotidoreductase of adenocarcinoma cells producing nitric oxide". *J Biol Chem* 267:22994–23000.
- 186 Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family" *Annu. Rev. Immunol.* 27: 519–550.
- 187 Garmi.Y., Rinott.G., Dotan.S., Elkabets M., Rider P., Voronov.E., and Apte.Ron N. (2011). "Microenvironment-Derived IL-1 and IL-17 Interact in the control of Lung Metastasis". *J Immunology.* 186:3462-3471.
- 188 Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system". *Nat. Rev. Immunol.* 9: 162–174.
- 189 Philip R, Epstein LB. (1986). "Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1". *Nature.* 10:323(6083): 86-9
- 190 al-Sarireh, B. and Eremin, O. (2000). "Tumour-associated macrophages (TAMS):disordered function, immune suppression and progressive tumour growth", *J Coll Surg Edinb*, 45: 1-16.
- 191 Feng. M. , Chen. J. Y. , R. W.-Tsukamoto, Volkmer J-P , Po Yi Ho. (2015). "Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: Roles of TLR and Btk". *Proc Natl Acad Sci USA.* 17;112(7):2145-50
- 192 Vollmers HP and Brändlein S. (2009). "Natural antibodies and cancer". *N Biotechnol* 25: 294-298
- 193 Ollert, M.W., David, K., Vollmert, C., Juhl, H., Erttmann, R., Bredehorst, R. and Vogel, C.W.(1997). "Mechanisms of in vivo anti-neuroblastoma activity of human natural IgM", *Eur J Cancer*, 33: 1942-8.
- 194 M Díaz-Zaragoza, R Hernández-Ávila¹, R Rodríguez, D Arenas-Aranda and P Ostoa – Saloma- (2015). "Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer". *ONCOLOGY REPORTS* 34: 1106-1114
- 195 S. Brandlein, T. Pohle, N. Ruoff, E. Wozniak, H.-K. Müller-Hermelink and H. P. Vollmers. (2003). "Natural IgM Antibodies and Immunosurveillance Mechanisms against Epithelial Cancer Cells in Humans". *CANCER RESEARCH* 63, 7995–8005, November 15
- 196 C.A. Janeway and P. Travers. (1997). *Immunologie.* 2.Aufl. Berlin

- 197 Roy Noy and Jeffrey W. Pollard. (2014). "Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy". *Immunity*. 17; 41(1): 49–61.
- 198 Richard A. Flavell, Shomyseh Sanjabi, Stephen H. Wrzesinski, and Paula Licona-Limón. (2010). "The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β ". *Nat Rev Immunol*. 10(8): 10.1038/nri2808.
- 199 Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" *Immunity*. 30:626–35.
- 200 Nam JS, et al. (2008). "An anti-transforming growth factor beta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments". *Cancer Res*. 68:3835–43.
- 201 Christopher A. Klebanoff^{1,2}, Luca Gattinoni², and Nicholas P. Restifo. (2006). "CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy". *Immunol Rev*. 211: 214–224.
- 202 Takaku S, et al. (2010). "Blockade of TGF-beta enhances tumor vaccine efficacy mediated by CD8(+) T cells". *Int J Cancer*. 126:1666–74.
- 203 Helen Fu, Ellen L Berg, Naoya Tsurushita. (1997). "Fine mapping of the epitopes of humanized anti-L-selectin monoclonal antibodies HuDREG-55 and HuDREG-200". *Immunology Letters*, 59 d(2) 71-77
- 204 Steeber, D. A., P. Engel, A. S. Miller, M. P. Sheetz, and T. F. Tedder. (1997). "Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes". *J. Immunol*. 159: 952–963
- 205 Hariharan Subramanian, Jamison J. Grailer, Kimberly C. Ohlrich, Amy L. Rymaszewski, Jessica J. Loppnow, Masanari Kodera, Rochelle M. Conway, and Douglas A. Steeber. (2012). "Signaling through L-Selectin Mediates Enhanced Chemotaxis of Lymphocyte Subsets to Secondary Lymphoid Tissue Chemokine". *J of Immunology*, 188: 3223-3236
- 206 W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen. (2000). "Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1". *Cell*, 103, 467.
- 207 J. Fritzsche, S. Alban, R. J. Ludwig, S. Rubant, W.-H. Boehncke, G. Schumacher, G. Bendas, (2006). "The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity" *Biochem. Pharmacol*. 72, 474-85
- 208 D. Simonis, K. Christ, S. Alban, G. Bendas. (2007). "Affinity and kinetics of different heparins binding to P- and L-selectin". *Semin. Thromb. Hemost*. 33, 534
- 209 Marie Weinhart, Dominic Groger, Sven Enders, Sebastian B. Riese, Jens Dervede, Rajesh K. Kainthan, Donald E. Brooks, Rainer Haag. (2011). "The Role of Dimension in Multivalent Binding Events: Structure–Activity Relationship of Dendritic Polyglycerol Sulfate Binding to L-Selectin in Correlation with Size and Surface Charge Density". *Macromol. Biosci*. 11, 1088–1098
- 210 Maciej M. Markiewski and John D. Lambris. (2007). "The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight". *Am J Pathol*. 171(3): 715–727
- 211 Julia Spratte, Henriette Meyer zu Schwabedissen, Nicole Endlich, Marek Zygmunt, Herbert Fluhr. (2012). "Heparin inhibits TNF- α signaling in human endometrial stromal cells by interaction with NF- κ B". *Mol Hum Reprod* 19 (4): 227-236
- 212 NH Chen, JW Liu, JJ Zhong. (2010). „ Ganoderic acid T inhibits tumor invasion in vitro and in vivo through inhibition of MMP expression". *Pharmacological Reports*, 62: 150-163
- 213 NH Chen, JJ Zhong. (2011). „ p53 is important for the anti-invasion of ganoderic acid T in human carcinoma cells". *Phytomedicine*, 18: 719-725
- 214 GS Wu, JJ Lu, JJ Guo, YB Li, W Tan, YY Dang. (2012). „ Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cycle arrest and apoptosis in human breast cells". *Fitoterapia*, 83:408-414
- 215 L Zhou, P Shi, NH Chen, JJ Zhong. (2011). „ Ganoderic acid Me induces apoptosis through mitochondria dysfunctions in human colon carcinoma cells". *Process biochemistry*, 46: 219-225

- 216 RM Liu, JJ Zhong. (2011). „Ganoderic acid MF and S induce mitochondria mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells“. *Phytomedicine*, 18:349-355.
- 217 Li X, Fang P, Mai J, et al. (2013). "Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers". *J Hematol Oncol.* 6 (19).
- 218 Schumacker PT. (2006). "Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword". *Cancer Cell.* 10 (3): 175–6
- 219 Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, Papathanasopoulos P, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Petsas T, Dougenis D. (2007). "Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis". *In Vivo.* 21(1):123-32
- 220 Davies MA. (2012). "The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma". *Cancer J.* 18(2):142-7
- 221 Wang Z, He C, Liu L, Ma N, Chen X, Zheng D, Qiu GH. (2017). „PHA665752 inhibits the HGF-stimulated migration and invasion of cells by blocking PI3K/AKT pathway in human cell line uveal melanoma" *Neoplasma.* 3:64. 377-388
- 222 W Tang, W Tang, JW Liu, WM Zhao, DZ Wie, JJ Zhong. (2006). „ Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cell2“. *Life sciences* 80: 205-211

8. Veröffentlichungen

Publikation

Kai Zhang, Yanfang Liu, Xiangli Zhao, Qingjiu Tang, Jens Dervedde, Jingsong Zhang, Hua Fan. (2017). "Anti-inflammatory properties of GLPss58, a sulfated polysaccharide from *Ganoderma lucidum*". *Int J Biol Macromol.* (2018) Feb;107: 486-493.

Xuejiao Zhang, **Kai Zhang**, Rainer Haag. „Multi-stage, charge conversional, stimuli-responsive nanogels for therapeutic protein delivery". *Biomater Sci* (2015) Nov;3 (11): 1487-96

Kai Zhang, Yanfang Liu, Xiangli Zhao, Wenhan Wan, Jingsong Zhang, Hua Fan "GLPss58 inhibits proliferation of melanoma through activation of Wnt/ β -catenin signaling" under preparation

Xiangli Zhao, **Kai Zhang**, Peter Daniel, Natali Wisbrun, Hendrik Fuchs, Hua Fan. „Delayed graft rejection of skin transplantation in CD26^{-/-} mice". *Cellular & Molecular Immunology*. Akzeptiert, in Drucken.

Abstracts

Kai Zhang, Yanfang Liu, Xiangli Zhao, Jens Dervedde, Jingsong Zhang, Hua Fan. "Anti-inflammatory activities of sulfated polysaccharide GLPss58 from *Ganoderma lucidum*". *4th Deutsch-chinesische Gesellschaft für Molekulare Medizin und molekulare Pharmakologie (DCMP) Symposium on Life Sciences*. (2017).

Xiangli Zhao, **Kai Zhang**, Peter Daniel, Natali Wisbrun, Hendrik Fuchs, Hua Fan. "Deficiency of CD26 results in a reduction of allogeneic skin graft rejection". *4th Deutsch-chinesische Gesellschaft für Molekulare Medizin und molekulare Pharmakologie (DCMP) Symposium on Life Sciences*. (2017).

Kai Zhang, Yanfang Liu, Qingjiu Tang, Xiangli Zhao, Jingsong Zhang, Hua fan. „Bioactive compounds of *Ganoderma lucidum* and their functional mechanisms". *2017 Second International Symposium on Food and Health, ISFH (Shanghai)*. (2017).

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Ich danke eine Große Anzahl von Menschen für ihre Hilfe und Beratung während des gesamten Projekts.

Als erste möchte ich meine Betreuerin, Fran Priv. Doz. Dr. Hua Fan, meine tiefe Dankbarkeit aussprechen, der mir eine Möglichkeiten zur Promotion bot und mir während dieser Zeit auch Subervision, Unterstützung und Ermutigung gab. Weiterhin möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig für die Annahme als Zweitbetruer an der Freie Universität Berlin bedanken.

Prof. Dr. Rudolf Tauber danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut meine Arbeit durchzuführen. Insbesondere möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Dervedde für die hilfreiche theoretische und praktische Hilfe bedanken, ganz besonders jedoch bei Dr. Sebastian Riese, Dr. Christian Kühne und Frau Luise Kosel. Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der AG Fuchs und AG Funke-Kaiser danken, für viele Kleinigkeiten und Hifestellungen, die meinen Laboralltag erleichtert haben. Weiterhin danke ich Doktorand Xiangli Zhao, die mit stets Hilfe geboten haben und in Seminaren die Ergebnisse diskutierten.

Roland und Elfriede Schauer-Stipfung danke ich für finanzielle unterstützung.

Ich bekanke mich hertzlich an Prof. Jingsong Zhang und Dr. Yanfang Liu an der Shanghai Akademie für landwirtschaftliche Wissenschaften sowie Prof. Jiangfeng Xu und Dr. Canyan Zhang an der Shanghai Ozean Universität für die Proben Verfügung und freundliche Zusammenarbeit

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Frau Nisi Chen für ihr Vertrauen und ihr Verständnis bedanken.

10.Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

