

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Inneren Medizin  
Medizinische Klinik 4 (Nephrologie)  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Thimoteus Speer

**Die Wirkung drei neuer Substanzen auf mesenchymale Stamm-/  
Stromazellen in der lokalen und systemischen Inflammation**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Malin Sophie Kállai  
  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2024

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem  
Referent: Prof. Dr. Patrick Baer  
Korreferent/in: Prof. Dr. Frank Günther Behrens  
  
Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2024

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	7
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	9
1 Zusammenfassung.....	10
2 Abstract.....	12
3 Einleitung .....	13
3.1 Mesenchymale Stromazellen .....	13
3.1.1 Definition und Allgemeine Charakteristika .....	13
3.1.2 Herkunft und besondere Untergruppen.....	14
3.1.3 Immunmodulatorische Eigenschaften .....	15
3.1.3.1 Wirkung auf die humorale und zelluläre Immunantwort .....	15
3.1.3.2 Verhalten im entzündlichen Mikroklima .....	17
3.1.3.2.1 LPS und MSC.....	18
3.1.3.2.2 Systemisches Entzündungsmilieu und MSC .....	18
3.1.4 Ausblick: Aktuelle Studien bei Nierenerkrankungen.....	19
3.2 Niclosamid .....	21
3.3 Berberin .....	22
3.4 Gedunin .....	23
3.5 Motivation und Ziele dieser Arbeit.....	23
4 Material .....	25
4.1 Geräte .....	25
4.2 Verbrauchsmaterialien .....	26
4.3 Chemikalien und Lösungen.....	27

4.4	Medien und Mediensupplemente .....	28
4.5	Antikörper (Durchflusszytometrie).....	29
4.6	PCR-Primer.....	29
5	Methoden .....	30
5.1	Zellkultur .....	30
5.1.1	Kultivierung von Mesenchymalen Stamm-/Stromazellen .....	30
5.1.2	Kulturmedium.....	30
5.1.3	Herkunft der Liposuktionsaspirate.....	31
5.1.4	Isolation von ASC aus Liposuktionsaspiraten .....	31
5.1.5	Umsetzen der Zellen.....	32
5.1.6	Zellzahlbestimmung .....	32
5.2	Zellstimulation .....	33
5.2.1	Simulation einer lokalen Inflammation mit LPS .....	33
5.2.2	Simulation einer systemischen Inflammation .....	33
5.2.3	Niclosamid .....	33
5.2.4	Berberin .....	33
5.2.5	Gedunin .....	34
5.3	Zellcharakterisierung mittels Durchflusszytometrie .....	34
5.4	Nachweismethoden.....	35
5.4.1	Zellviabilität .....	35
5.4.1.1	XTT-Assay.....	35
5.4.1.2	LDH-Assay.....	35
5.4.2	RNA-Nachweis durch qPCR .....	36
5.4.2.1	RNA-Isolation.....	36
5.4.2.2	RT-Reaktion.....	36
5.4.2.3	Quantitative RT-PCR.....	37
5.4.3	Immunoassays.....	38

5.5	Statistik .....	38
6	Ergebnisse .....	40
6.1	Simulation einer lokalen Entzündung .....	40
6.2	Simulation einer systemischen Entzündung.....	41
6.3	Durchflusszytometrie.....	42
6.4	Niclosamid .....	43
6.4.1	Zelltoxische Konzentration .....	43
6.4.2	Effekte von Niclosamid bei Kostimulation mit LPS.....	46
6.4.2.1	Auswertung der qPCR ohne Vorstimulation.....	46
6.4.2.2	Auswertung der qPCR nach Vorstimulation.....	47
6.4.2.3	ELISA .....	48
6.4.3	Effekte von Niclosamid bei Kostimulation mit Cytomix.....	49
6.4.3.1	Auswertung der qPCR ohne Vorstimulation.....	50
6.4.3.2	Auswertung der qPCR nach Vorstimulation.....	51
6.4.3.3	ELISA .....	52
6.5	Berberin .....	53
6.5.1	Zelltoxische Konzentration .....	53
6.5.2	Effekte von Berberin bei Kostimulation mit LPS .....	56
6.5.2.1	qPCR .....	56
6.5.2.2	ELISA .....	57
6.5.3	Effekte von Berberin bei Kostimulation mit Cytomix.....	58
6.5.3.1	qPCR .....	59
6.5.3.2	ELISA .....	60
6.6	Gedunin .....	61
6.6.1	Zelltoxische Konzentration .....	61
6.6.2	Effekte von Gedunin bei Kostimulation mit LPS .....	64
6.6.2.1	qPCR .....	64

6.6.2.2	ELISA .....	65
6.6.3	Effekte von Gedunin bei Kostimulation mit Cytomix.....	66
6.6.3.1	qPCR .....	66
6.6.3.2	ELISA .....	68
7	Diskussion.....	70
7.1	Verwendung und Stimulation von ASC .....	70
7.2	Stimulation der ASC.....	71
7.2.1	Modifikation.....	71
7.2.2	Ergebnisse der entzündlichen Stimulation .....	73
7.3	Niclosamid .....	75
7.4	Berberin .....	76
7.5	Gedunin .....	77
7.6	Mögliche Fehlerquellen im Versuchsaufbau und der Durchführung.....	78
7.7	Zusammenfassung und Ausblick .....	79
8	Literaturverzeichnis .....	81
9	Schriftliche Erklärung .....	95
10	Danksagung .....	96

## Abkürzungsverzeichnis

ASC	Adipöse mesenchymale Stamm-/Stromazelle(n)
BBR	Berberin
BM-MSC	Mesenchymale Stamm-/Stromazelle(n) aus dem Knochenmark
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CNI	Calcineurin-Inhibitoren
COX	Cyclooxygenase
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GED	Gedunin
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoklonale Antikörper
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MSC	Mesenchymale Stamm-/Stromazelle(n)
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NCL	Niclosamid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
qPCR	Quantitative PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSG-6	Tumornekrosefaktor-stimulierendes Gen 6 Protein
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Bestimmung der Stimulationsdauer für die qPCR. ....	40
Abbildung 2 Auswertung der qPCR bei Stimulation mit LPS. ....	41
Abbildung 3 Auswertung der qPCR bei Stimulation mit Cytomix. ....	42
Abbildung 4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker .....	43
Abbildung 5 Histogramme der Bestimmung von CD-54. ....	43
Abbildung 6 Relative Zytotoxizität von NCL. ....	45
Abbildung 7 Effekte von Niclosamid unter LPS in der qPCR. ....	47
Abbildung 8 qPCR-Ergebnisse nach einstündiger Vorstimulation mit NCL und anschließender LPS-Gabe. ....	48
Abbildung 9 Effekte von Niclosamid bei LPS-Stimulation im ELISA. ....	49
Abbildung 10 Effekte von Niclosamid bei Cytomix-Stimulation. ....	51
Abbildung 11 qPCR-Ergebnisse nach einstündiger Vorstimulation mit Niclosamid und anschließender Cytomix-Gabe .....	52
Abbildung 12 Effekte von Niclosamid nach Cytomix-Gabe im ELISA. ....	53
Abbildung 13 Zytotoxische Wirkung von Berberin. ....	55
Abbildung 14 Effekte von Berberin bei LPS-Gabe. ....	57
Abbildung 15 Effekte von Berberin nach LPS-Gabe im ELISA. ....	58
Abbildung 16 Effekte von Berberin bei Cytomix-Stimulation in der qPCR. ....	60
Abbildung 17 Effekte von Berberin nach Cytomix-Gabe im ELISA. ....	61
Abbildung 18 Zytotoxische Effekte von Gedunin. ....	63
Abbildung 19 Effekte von Gedunin bei LPS-Gabe in der qPCR. ....	65
Abbildung 20 Effekte von Gedunin nach LPS-Stimulation im ELISA. ....	66
Abbildung 21 Effekte von Gedunin bei Cytomix-Gabe in der qPCR. ....	68
Abbildung 22 Effekte von Gedunin nach Cytomix-Stimulation im ELISA. ....	69



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Kriterien zur Definition von MSC nach der International Society for Cellular Therapy <sup>5</sup> .....	14
Tabelle 2 Geräte.....	25
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 4 Chemikalien und Lösungen .....	27
Tabelle 5 Medien und Mediensupplemente.....	28
Tabelle 6 Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	29
Tabelle 7 Primer .....	29

## 1 Zusammenfassung

In Deutschland leidet ca. jeder zehnte Mensch über 40 Jahren an einer chronischen Einschränkung seiner Nierenfunktion. Nicht wenige davon sind im Laufe der Erkrankung auf eine Nierenersatztherapie angewiesen. Die Ursachen für eine Nierenschädigung sind vielfältig. Als neuartiger und vielversprechender Therapieansatz werden aktuell Mesenchymale Stamm-/Stromazellen (MSC) als Therapeutikum für diverse Nierenerkrankungen getestet. Erste Ergebnisse klinischer Phase-I-Studien zeigen, dass MSC sicher als Immunsuppressivum nach Nierentransplantation angewendet werden können. Auch für weitere Erkrankungen der Niere sind erste klinische Studien am Laufen. MSC gelten als regenerativ, immunsupprimierend und antientzündlich. Dennoch gibt es noch einige Limitationen. Nach der Transplantation der Zellen ist das Wachstum der Zellen oft eingeschränkt und es kommt zur vermehrten Apoptose. Auch wird immer wieder ein paradoxes und entzündungsförderndes Verhalten der MSC am Wirkort beobachtet. Ein wichtiger Lösungsansatz ist eine in vitro Vorbehandlung der MSC zur Modulation der zellulären Eigenschaften. In dieser Arbeit wurden drei Substanzen und Arzneimittel auf ihre Fähigkeit untersucht, die entzündungshemmenden Eigenschaften der MSC zu verbessern und die entzündungsfördernden zu unterdrücken. Der Fokus lag hierbei auf dem Arzneimittel Niclosamid und den beiden bisher noch nicht zugelassenen Substanzen Berberin und Gedunin, die alle in vitro und in vivo bereits erste vielversprechende antientzündliche Wirkungen bewiesen haben. Für diese Arbeit wurden MSC aus Fettgewebe isoliert (ASC) und mit LPS oder einem Cytokin-Mix (Mischung aus TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ ) sowie den drei Substanzen stimuliert. Untersucht wurden im Anschluss die mRNA-Expressionen der gängigsten proinflammatorischen (TNF- $\alpha$ , IL-6, TLR-4, ICAM-1, HLA-DR) und antiinflammatorischen Marker (IDO, IL-10), sowie mittels ELISA die Protein-Freisetzung von IL-6 und IL-8. Die vielversprechendsten Ergebnisse ließen sich durch Berberin hervorrufen. Hier zeigte sich eine deutliche Senkung der IL-8-Konzentration im ELISA. Die Anwendung des Gedunin hatte keine signifikante Wirkung auf die ASC. Niclosamid hingegen scheint widererwarten sogar entzündungsfördernd zu wirken, in dem es die IL-6-, ICAM-1-mRNA-Expression

steigerte und die IDO-mRNA-Expression absenkte. Unter den drei getesteten Substanzen hat Berberin die beste Wirkung bewiesen. Nach weiterer Testung könnte eine Anwendung mit Berberin als in vitro Präkonditionierung von MSC vielversprechend sein. Die Verwendung von Niclosamid hingegen sollte vermieden werden, die Wirkung von Gedunin müsste genauer untersucht werden.

## 2 Abstract

In Germany, around one in ten people over the age of 40 suffers from chronically impaired kidney function. Quite a few of them are dependent on renal replacement therapy as the disease progresses. There are many different causes of kidney damage. Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) are currently tested as a novel and promising therapeutic approach for various kidney diseases. Initial results of clinical phase I studies show that MSC can be used safely as an immunosuppressive agent after kidney transplantation. Initial clinical trials are also underway for other kidney diseases. MSC are considered to be regenerative, immunosuppressive and anti-inflammatory. However, there are still some limitations. After cell transplantation, cell growth is often restricted and apoptosis increases. Paradoxical and pro-inflammatory behaviour of the MSC at the site of action is also repeatedly observed. An important approach is the in vitro pretreatment of MSC to modulate the cellular properties. In this work, three substances and drugs were investigated for their ability to improve the anti-inflammatory properties of MSC and suppress the pro-inflammatory ones. The focus was on the drug Niclosamide and the two yet unapproved substances Berberine and Gedunine, all of which have already demonstrated promising anti-inflammatory effects in vitro and in vivo. For this study, MSC were isolated from adipose tissue (ASC) and stimulated with LPS or a cytokine mix (mixture of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$ ) and the three substances. The mRNA expressions of the most common pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-6, TLR-4, ICAM-1, HLA-DR) and anti-inflammatory markers (IDO, IL-10) were then examined, as well as the protein release of IL-6 and IL-8 using ELISA. The most promising results were obtained with berberine. It showed a clear reduction in the IL-8 concentration in the ELISA. The use of Gedunine had no significant effect on the ASC. Niclosamide, on the other hand, unexpectedly even appears to have a pro-inflammatory effect by increasing IL-6 and ICAM-1 mRNA expression and lowering IDO mRNA expression. Of the three substances tested, Berberine proved to have the best effect. After further testing, an application with Berberine as in vitro preconditioning of MSC could be promising. However, the use of Niclosamide should be avoided and the effect of Gedunine should be investigated in more detail.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Mesenchymale Stromazellen

##### 3.1.1 Definition und Allgemeine Charakteristika

Mesenchymale Stroma-/Stammzellen (MSC) sind multipotente Zellen mit immunmodulatorischen sowie regenerativen Eigenschaften<sup>1</sup> und der Fähigkeit, sich in vitro in verschiedene Gewebe, wie Fett-, Knochen und Knorpelgewebe zu differenzieren.<sup>2</sup> Die Zellen sind in den 1970er Jahren erstmals von Friedenstein et al. beschrieben worden.<sup>3</sup> Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe an Zellen<sup>4</sup>, die nach ihrer Isolation alle die von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie („International Society for Cellular Therapy“) gesetzten Mindestanforderungen erfüllen müssen.<sup>5</sup> Damit eine Zellpopulation als MSC deklariert werden darf, müssen folgende drei Kriterien erfüllt sein: Sie müssen unter Standardkulturbedingungen plastikadhärent sein. Weiterhin müssen spezifische Oberflächenmarker auf  $\geq 95$  % der Zellen exprimiert sein (CD105, CD73, CD90). Oberflächenmarker, die für hämatopoetische Zelllinien charakteristisch sind (CD14, CD45, CD34, CD19), dürfen nur bei  $\leq 2$  % der Zellen nachgewiesen werden. Als drittes Kriterium gilt, dass die Zellen sich in vitro in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren lassen müssen.<sup>5</sup> Im Gegensatz zu Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)II-Molekülen, wie z. B. dem humanen Leukozytenantigen (HLA)-DR, die unter Standardkulturbedingungen nicht nachgewiesen werden dürfen, ist es möglich MHC I-Moleküle unter Standardbedingungen nachzuweisen.<sup>2</sup> MHC II-Moleküle können nach Stimulation mit Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) auf der Zelloberfläche von MSC nachgewiesen werden.<sup>2,5</sup> Bis dato ist noch kein Oberflächenmarker bestimmt worden, der charakteristisch und damit Alleinstellungsmerkmal für MSC ist.<sup>1,4,6</sup>

Tabelle 1 Kriterien zur Definition der MSC nach der International Society for Cellular Therapy<sup>5</sup>

1	Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen	
2	Exprimierte Oberflächenmarker 1. CD105 2. CD73 3. CD90	Nicht exprimierte Oberflächenmarker 1. CD45 2. CD34 3. CD14 oder CD11b 4. CD19 oder CD79α 5. HLA-DR
3	Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten	

### 3.1.2 Herkunft und besondere Untergruppen

MSC können aus den verschiedensten Geweben des menschlichen Körpers gewonnen werden.<sup>7–15</sup> Am bekanntesten und besten untersucht sind MSC aus Knochenmark, Fettgewebe und Nabelschnurgewebe, aber sie können auch z. B. aus der Zahnpulpa oder der Riechschleimhaut gewonnen werden.<sup>2,6,14–16</sup> Die Gewinnung von MSC aus dem Knochenmark (BM-MSK) stellt für den Patienten oft eine schmerzhafteste Prozedur dar.<sup>15</sup> Als vielversprechende Alternative zu BM-MSK bieten sich daher MSC aus Fettgewebe, sogenannte adipöse MSC (ASC), an.<sup>16</sup> Nicht nur die Entnahme ist risikoärmer und weniger schmerzhaft,<sup>14</sup> auch fällt das Fettgewebe oft als Abfallprodukt nach Liposuktionen an und stellt daher eine ergiebige und zuverlässige Quelle für ASC dar.<sup>15</sup> Die Ausbeute bei Isolation aus dem Fettgewebe ist höher als beim Knochenmark.<sup>15</sup> Wie vorher bereits erwähnt, handelt es sich bei den MSC um eine heterogene Gruppe an Zellen.<sup>1</sup> MSC unterschiedlicher Ursprungsgewebe unterscheiden sich leicht in ihren Eigenschaften und der Expression von Antigenen.<sup>1,13,14,17,18</sup> Die Arbeit von Zhou et al. zeigt, dass ASC im Vergleich zu BM-MSK eine homogenere Immunantwort liefern und vermutlich auch ein stabileres und verlässlicheres Therapieergebnis erzielen.<sup>17</sup> Ebenso vermerken Waldner et al. etwas bessere immunregulatorische Eigenschaften der ASC im Vergleich zu den BM-MSK.<sup>13</sup> Auch im Vergleich mit weißem Fettgewebe zeigen

ASC eine homogenere Immunantwort.<sup>19</sup> Weiterhin scheinen ASC, sich besser für allogene Transplantationen zu eignen.<sup>17</sup> Denn Zhou et al. stellen fest, dass die Immunreaktion auf ASC bei ihren Empfängern geringer ausfällt als bei BM-ASC.<sup>17</sup> Im Vergleich zu MSC aus der Riechschleimhaut fällt auf, dass ASC in vitro schneller proliferieren. Allerdings zeigen sie sich in der angesprochenen Arbeit weniger immunmodulatorisch als MSC aus der Riechschleimhaut.<sup>14</sup> Interessant sind auch die Ergebnisse von Peng et al., die nahelegen, dass es sogar in ASC-Isolationen verschiedene Subpopulationen gibt.<sup>13,20</sup> Die Kultivierung scheint, einen wichtigen Einfluss auf die Zellen zu nehmen.<sup>6,20,21</sup> Schon in Passage 1 gleichen sich die Oberflächenmarker der ASC aneinander an.<sup>20</sup> Mit höheren Passagen verlieren ASC zunehmend ihre Telomeraseaktivität und das Risiko für eine maligne Transformation steigt.<sup>6</sup>

### 3.1.3 Immunmodulatorische Eigenschaften

MSC besitzen einige wertvolle Eigenschaften: sie sind in der Lage, Zellen vor der Apoptose, die durch Trauma, Strahlung oder chemischen Noxen induziert wurde, zu schützen.<sup>4</sup> Auch nehmen sie Einfluss auf die Proliferation von Zellen und verbessern die Angiogenese durch Produktion von Wachstumsfaktoren, wie den Transforming Growth Factor (TGF)  $\beta$ , Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF).<sup>1,4</sup> Aufgrund ihrer Eigenschaft als Stammzelle können sich MSC zu verschiedenen Zelllinien ausdifferenzieren und so dadurch beispielsweise defekte Zellen ersetzen.<sup>1</sup> Das Merkmal, das die MSC allerdings am interessantesten macht, ist ihre Fähigkeit, immunmodulatorisch zu wirken.<sup>1,4,6,8,12,16,18,22–32</sup>

#### 3.1.3.1 Wirkung auf die humorale und zelluläre Immunantwort

Durch die Sekretion verschiedener Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (wie z. B. Interleukin (IL)-6, IL-10, IL-33, Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), TGF $\beta$ , Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sowie durch eine direkte Zell-Zell-Interaktion nehmen MSC auf nahezu jede an der Immunantwort beteiligte Zelle Einfluss.<sup>17,23,33</sup> Gut untersucht sind die Effekte auf dendritische Zellen (DC)<sup>30,34</sup>, Monozyten und

Makrophagen<sup>4,18,30,32</sup>, natürliche Killerzellen (NK-Zellen)<sup>30</sup> und Lymphozyten<sup>4,30,34</sup>. Durch Sekretion von IL-6, IL-10 und PGE<sub>2</sub> hemmen MSC die Differenzierung und Migration von DC.<sup>18,34,35</sup> Auch beeinflussen sie die Chemokin- und Zytokinproduktion der DC.<sup>30,35</sup> Makrophagen werden durch die von MSC hochregulierte Cyclooxygenase (COX) 2 und dem dadurch vermehrt ausgeschütteten PGE<sub>2</sub> aktiviert.<sup>32</sup> Über Sekretion von IDO, Tumornekrosefaktor-stimulierendes Gen 6 Protein (TSG-6) und PGE<sub>2</sub> regulieren sie das Verhältnis zwischen dem proinflammatorischen M1- und dem antiinflammatorischen M2-Phenotyp zugunsten des M2-Typs, der IL-10 produziert.<sup>1,18,30,32</sup> Dies ist z. B. nach Aktivierung des Toll-Like-Rezeptor (TLR)-4 und in einem Sepsis-Modell beobachtet worden.<sup>32</sup> Auch die Inkubation Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierter Makrophagen mit dem Überstand von MSC kann die Konzentrationen von Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  senken, die Produktion von IL-6 steigt jedoch an.<sup>36</sup> Allerdings scheinen MSC auch die Makrophagen-Infiltration in Tumore, das Tumorwachstum, die Metastasierung und die Therapieresistenz zu fördern.<sup>18</sup> Die Aktivierung und Migration von Monozyten wird durch MSC gehemmt.<sup>4,18</sup> Grundsätzlich können MSC im Knochenmark die Hämatopoese und die Freisetzung von Leukozyten in die Blutbahn hemmen, sie halten die Zellen in einem unreifen Zustand.<sup>1</sup> Auch während einer Entzündung hemmen MSC die Reifung und Proliferation der naiven T-Zellen zu T<sub>H1</sub>- und T<sub>H17</sub>-Zellen durch Expression von IDO, TGF- $\beta$ , HGF, Programmed Cell Death 1 Ligand 1 (PD-L1) und PGE<sub>2</sub> und verbessern die T<sub>H2</sub>-Immunantwort und die Aktivierung von T<sub>reg</sub>-Zellen.<sup>1,4,18,30,34,37</sup> Wenig ist bisher zur Interaktion zwischen MSC und B-Zellen bekannt. Vermutlich hemmen MSC im Rahmen einer systemischen Infektion die Freisetzung von Immunglobulinen und die Proliferation von B-Zellen über CC-Chemokinlingand 2 (CCL2).<sup>1,30</sup> Die Interaktion zwischen NK-Zellen und MSC ist bisher nicht abschließend geklärt. Zum einen hemmen MSC die Funktionen der NK-Zellen.<sup>1,30</sup> Dies geschieht direkt und indirekt durch Sekretion von IDO, IL-10, TGF- $\beta$  und PGE<sub>2</sub>. Letztere reduzieren die Sezernierung von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen.<sup>1</sup> Andererseits ist in vitro auch beobachtet worden, dass NK-Zellen in der Lage sind, MSC zu lysieren.<sup>38,39</sup> Auch wenn MSC als wenig immunogen gelten<sup>6,37</sup>, weisen präklinische und klinische Studien daraufhin, dass auch MSC durch ihre



MHC-Expression in vivo eine Alloreaktion auslösen können.<sup>4,40</sup> Unstimulierte MSC exprimieren wenig MHC I.<sup>6</sup> ASC exprimieren sogar weniger als BM-ASC.<sup>17</sup> Dennoch kann diese Expression in vitro zur Lyse durch NK-Zellen führen.<sup>38,39</sup> Rasmussen et al. stellen fest, dass es dennoch einen löslichen Faktor zu geben muss, der MSC vor der Zellyse schützt.<sup>22</sup> Hierfür ist z.B. eine hohe Konzentration von IFN- $\gamma$  in der Umgebung relevant.<sup>38,39</sup> Ebenso spielt auch die Stimulierung der TLR-Rezeptoren auf MSC eine Rolle.<sup>41</sup> Insbesondere die Induktion des TLR-3-Rezeptors schützt MSC effektiv vor der Lyse durch NK-Zellen.<sup>41</sup>

### 3.1.3.2 Verhalten im entzündlichen Mikroklima

Für die immunregulatorische Wirkung der MSC ist das richtige Mikroklima von Interesse. Im Rahmen einer Entzündung migrieren MSC in inflammatorisch veränderte Gewebe.<sup>6,34</sup> Angezogen und stimuliert durch die hohen Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  passen sie die eigene Sekretion diverser Zytokine an und exprimieren vermehrt Rezeptoren, über die sie Einfluss auf den vorherrschenden entzündlichen Zustand und die Immunzellen nehmen.<sup>1,4,18,23,34,42,43</sup> An Mäusen zeigt sich, dass transplantierte MSC vor allem in den hochinflammatorischen Phasen durch Senkung der TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Sekretion wirken. In der anschließenden Phase der chronischen Entzündung schlagen sie nicht an.<sup>44</sup> Bei einer in Mäusen erzeugten Leberentzündung haben transplantierte MSC erfolgreich die Serumkonzentrationen von IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , aber auch IL-10 gesenkt.<sup>45</sup> Auch bei einem Colitis-Modell an Ratten sind ASC erfolgreich als Therapeutikum eingesetzt worden.<sup>29</sup> Allerdings gibt es auch Hinweise, dass das hochentzündliche Milieu die MSC vorzeitig altern lässt und ihre immunsupprimierenden Eigenschaften dämpft.<sup>1</sup> Gewebeeigene MSC scheinen ihre Eigenschaften zu verändern und wirken nicht so effizient wie transfundierte MSC von gesunden Menschen.<sup>18</sup> Sicher ist, dass das entzündliche Klima die immunmodulatorischen Eigenschaften der MSC beeinflusst, aber letztlich kann nicht sicher vorausgesagt werden, dass sie anti- und nicht proinflammatorisch wirken.<sup>9</sup> Auch ergibt sich das Problem, dass MSC bei in vivo-Anwendung schlecht überleben.<sup>46</sup> Denn bis zu 90 % der transplantierten MSC sterben innerhalb einer

Woche nach Transplantation ab.<sup>47</sup> Ein mögliche Erklärung hierfür bietet ebendieses entzündliche Milieu, in dem die Zellen überleben müssen.

### 3.1.3.2.1 LPS und MSC

Die Reizung des TLR-4-Rezeptors mit LPS führt auch zu proinflammatorisch wirkenden MSC. Durch Stimulation mit LPS exprimieren MSC vermehrt proinflammatorische Marker wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL- und IL-1 $\beta$ , während die Expression anderer Marker wie TGF- $\beta$  und HGF sinkt.<sup>1,10,36,48</sup> Die Fähigkeit Lymphozyten, NK-Zellen oder DC zu hemmen, sinkt ebenso.<sup>1,18</sup> Auch führt die Anwesenheit von LPS zu einer Hochregulierung des NLRP3-Infammasoms, welches im Körper zu einer leichtgradigen systemischen Entzündung führt.<sup>49</sup> Zudem induzieren hohe Konzentrationen an LPS die Apoptose von MSC.<sup>7</sup> In vivo zeigt sich, dass in einem Modell für akute Leberentzündung LPS-stimulierte ASC die Proliferation von lymphomononukleären Zellen nicht gehemmt haben.<sup>45</sup> Auch führt die Therapie mit LPS-stimulierten ASC in vivo zu schlechteren Ergebnissen bei der Therapie von Lungenschäden und Diabetischer Nephropathie.<sup>1</sup>

### 3.1.3.2.2 Systemisches Entzündungsmilieu und MSC

Zu den Treibern einer systemischen Entzündung gehören vor allem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6.<sup>50,51</sup> In vitro zeigt sich, dass nicht nur LPS, sondern auch hohe Konzentrationen an TNF- $\alpha$  eine proinflammatorische Antwort in MSC auslösen und sie vermehrt in die Apoptose schicken.<sup>19,34</sup> Kadle et al. haben festgestellt, dass ihre in vitro-Behandlung mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  die Proliferation der MSC deutlich einschränkt.<sup>52</sup> Bei Anwesenheit von TNF- $\alpha$  regulieren MSC Wachstumsfaktoren runter und die antiinflammatorischen Moleküle IDO oder PD-L1 nicht hoch, interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (ICAM)-1 wird jedoch vermehrt exprimiert.<sup>34</sup> TNF- $\alpha$  blockiert die immunregulatorischen Fähigkeiten von MSC.<sup>34</sup> Auch haben English et al. beobachtet, dass die TGF- $\beta$ 1-Sekretion durch TNF- $\alpha$  gesenkt wird.<sup>43</sup> Im Gegensatz zu den Wirkungen von TNF- $\alpha$  scheinen die in vitro-Wirkungen von IFN- $\gamma$  zu stehen. So regulieren MSC in vitro z. B. HGF, PGE<sub>2</sub> und IDO hoch und hemmen die Lymphozytenreifung und -differenzierung.<sup>1,34,37,43</sup> In vivo zeigt sich

allerdings, dass auch die zusätzliche Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  keine deutliche Besserung bringt.<sup>4</sup> Auch Redondo-Castro et al. haben keinen positiven Effekt durch IFN- $\gamma$  festgestellt, dafür aber bei der Anwendung von IL-1.<sup>26</sup> Es zeigt sich auch, dass die immunsupprimierende Wirkung von IFN- $\gamma$  durch TNF- $\alpha$  wieder antagonisiert werden kann.<sup>34</sup> Bei Anwendung beider Zytokine produzieren MSC mehr IL-6, IL-8, ICAM-1.<sup>1,18</sup> Auch Xu et al. beschreiben, dass INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die Immunsuppression der MSC hemmt.<sup>42</sup> Sie postulieren, dass die microRNA-155, die MSC in Entzündung produzieren, hierbei eine wichtige Rolle spielt.<sup>42</sup> Papadopoulou et al. haben MSC mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  vorbehandelt. Sie haben bei der Anwendung dieser Zellen an ihren Ratten keinen Vorteil für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis (RA) erkennen können.<sup>24</sup> Auch die Proliferation von Kolonkarzinomzellen steigt durch die Behandlung von MSC mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  an.<sup>1</sup> Bei Kombinationen, die dem in dieser Arbeit verwendeten Cytomix aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  (siehe Kapitel 5.2.2) ähneln, zeigen MSC deutlich proinflammatorische Reaktionen durch z. B. die Erhöhung ihrer IL-1 $\beta$ -, IL-6-, IL-8-, IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression und die Senkung der HGF-Sekretion.<sup>1,26</sup>

### 3.1.4 Ausblick: Aktuelle Studien bei Nierenerkrankungen

Diverse Erkrankungen erhofft man, mit Hilfe der Transplantation von MSC zu heilen oder zu lindern. Besonders im Bereich der regenerativen Medizin und bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wird die Anwendung von MSC getestet. MSC sollen an die Orte der Schädigung wandern und Zellen und Gewebe wiederherstellen.<sup>14,19,20</sup> Auch als Anti-Tumor-Therapie sollen sie wirken.<sup>2,27</sup> Getestet wurden MSC bereits an den unterschiedlichsten Krankheitsbildern. Besonders im Fokus der Medizin liegen hier die Osteoarthritis, die RA, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Graft-versus-Host-Disease (GvHD) und die Sepsis.<sup>6,18,32,53,54</sup> Aber auch bei diversen Nierenerkrankungen kommen MSC als Therapeutikum in Frage.<sup>18,53,55</sup> Dafür sind aktuell 47 klinische Studien zur Anwendung von MSC bei Nierenerkrankungen registriert, 9 davon sind bereits abgeschlossen.<sup>56</sup> Die Transplantation von MSC soll vor allem bei Nierentransplantierten und Patienten mit akuter oder chronischer Nierenschädigung einen neuen Therapieansatz bieten.<sup>18,53–</sup>

<sup>55,57-65</sup> Die meisten publizierten Daten gibt es im Rahmen von Nierentransplantationen. Ziel ist, MSC als Ergänzung der immunsuppressiven Therapie zu verwenden, um die Dosis an Calcineurin-Inhibitoren (CNI) zu verringern oder zu ersetzen.<sup>57-59,63</sup> In der Neptun-Studie, einer Phase-1-Studie, ist sechs Monate nach Nierentransplantation eine allogene MSC-Transplantation bei den Patient:innen durchgeführt worden, gleichzeitig hat man die Dosis des CNI reduziert. In der Auswertung zeigen sich die MSC tolerogen, die Anwendung wird von den Autoren als sicher bewertet. Zwar stellen sie keinen Einfluss auf die an der Immunreaktion beteiligten Zellen fest, aber notieren sinkende TNF- $\alpha$  und IL-10-Serumkonzentrationen.<sup>59</sup> Das gleiche Team hat auch eine zweite Phase-I-Studie, die Triton-Studie, gestartet, bei der sechs und sieben Wochen nach Nierentransplantation MSC transplantiert worden sind. Der CNI ist eine Woche später abgesetzt worden. Auch hier scheint die Anwendung der MSC sicher zu sein. Die Patienten haben zudem u. a. niedrigere Blutdruckwerte und stabile Transplantate gezeigt. Bisher lässt sich die Wirkung noch nicht sicher auf die MSC zurückführen.<sup>57,58</sup> Auch eine Metanalyse kommt zu dem Schluss, dass MSC bei Nierentransplantation sicher anwendbar und genauso effektiv wie CNI sind. Insgesamt müssen aber weiterhin noch mehr Daten erhoben werden.<sup>63</sup> Auch bei Erkrankungen der renalen Gefäße wie der Nierenarteriosklerose und -stenose sind bereits erste Daten ausgewertet worden: Eine Phase-I-Studie stellt eine sichere Anwendung von MSC bei Injektion in die Nierenarteriengefäße und Besserung der Nieren- und Blutdruckwerte fest.<sup>55</sup> Die Daten werden in einer Meta-Analyse von klinischen und präklinischen Studien von Wang et al. bestätigt.<sup>65</sup> Bisher gibt es wenig klinische Studien zur MSC-Therapie bei diabetischer Nephropathie. Zwei Metaanalysen präklinischer Studien kommen zu dem Schluss, dass es in vivo deutliche Hinweise für eine erfolgreiche Anwendung gibt.<sup>60,61</sup> Gleiches gilt für die Anwendung bei Lupus-Nephritis.<sup>64</sup> Hickson et al. stellen fest, dass bei der diabetischen Nephropathie vorbehandelte MSC in vivo besser wirken als native.<sup>61</sup> Insgesamt weisen aber alle Autoren darauf hin, dass die Datenlage noch nicht ausreichend ist, um eine abschließende Stellungnahme über die Wirkung und Anwendung von MSC im Rahmen von Nierenerkrankungen zu erlauben.<sup>54,60,61,63-65</sup>

Ebenso sind die Follow-Up-Zeiten in den aktuellen klinischen Studien noch sehr kurz, sodass noch keine Aussagen zu den Langzeiteffekten der MSC getroffen werden können.<sup>54,60,63–65</sup>

### 3.2 Niclosamid

1958 vermarktete die Firma Bayer die Substanz Niclosamid (NCL) erstmals als Molluskuzid.<sup>66</sup> Erst später erkannte man die antihelmethischen Eigenschaften des NCLs.<sup>66</sup> In Deutschland wird das Medikament aktuell unter dem Handelsnamen „Yomesan“ als Bandwurmmittel von der Firma Bayer vertrieben.<sup>67,68</sup> Da es sich bei NCL um einen bereits zugelassenen Wirkstoff handelt<sup>67</sup>, bietet er sich besonders für die Umnutzung und Weitererforschung seiner Eigenschaften an. Im Fokus aktueller Forschungen stehen vor allem NCLs antitumoröse und antiinflammatorische Eigenschaften.<sup>66</sup> So konnten Lee et al. in vitro eine hemmende Wirkung auf Ösophaguskarzinomzellen nachweisen.<sup>69</sup> Auch für weitere Karzinomarten wurden antikanzerogene Effekte festgestellt<sup>66</sup>, die ersten klinischen Studien zur antikanzerogenen Wirkung von NCL laufen bereits.<sup>66</sup> Im Blickfeld dieser Arbeit stehen allerdings die entzündungshemmenden Eigenschaften des NCLs. In vitro als auch in vivo sind an diversen entzündlich stimulierten Zellarten und in verschiedenen Mausversuchen entzündungsdämpfende Effekte beobachtet worden.<sup>70–74</sup> Eine Hemmung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-12 bei LPS-induzierten DC zeigt sich ebenso.<sup>72</sup> Thatikonda et al. beschreiben eine Senkung proinflammatorischer Marker wie ICAM-1 durch NCL bei mit LPS stimulierten Makrophagen.<sup>73</sup> Liang et al. haben die Wirkung von NCL auf RA-Fibroblasten-ähnliche-Synoviozyten, die mit TNF- $\alpha$  induziert wurden, untersucht.<sup>71</sup> Auch hier zeigt sich eine Hemmung proinflammatorischer Zytokine.<sup>71</sup> In Mausversuchen wirkte die Gabe von NCL entzündungshemmend.<sup>71–73,75,76</sup> Zum Beispiel haben Mäuse nach Gabe von NCL weniger stark ausgeprägte psoriatische Hautveränderungen als Mäuse die kein NCL erhalten.<sup>73</sup> Ebenso hat sich in den Hautproben der mit NCL behandelten Mäuse weniger IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  nachweisen lassen, wodurch die Autoren auf eine entzündungshemmende Wirkung des NCLs schließen.<sup>73</sup> Genauso zeigen sich bei Mäusen, bei denen eine intrazerebrale Blutung ausgelöst wurde, das

postinterventionelle Hirnödeme sowie die entzündlichen Marker IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  durch die NCL-Behandlung reduziert.<sup>75</sup> Auch Liang et al. stellen fest, dass die Entzündungsreaktion der RA bei Mäusen durch eine NCL-Behandlung reduziert wird.<sup>71</sup> Zusammenfassend zeigt der Arzneistoff NCL ein deutliches Potenzial für eine Entzündungshemmung.<sup>66,70–75</sup> Zum aktuellen Zeitpunkt sind noch keine Forschungsergebnisse, die die Wirkung von NCL auf mesenchymale Stromazellen untersuchen, veröffentlicht. Daher eignet sich dieser Arzneistoff besonders für die Überprüfung, ob durch NCL die Entzündungsreaktion von Mesenchymalen Stammzellen moduliert werden kann.

### 3.3 Berberin

Auch wenn Berberin (BBR) heutzutage chemisch hergestellt wird, ist die Substanz, die aus Berberitze und vielen weiteren Heilpflanzen gewonnen wird, schon seit rund 3000 Jahren ein fester Bestandteil der Traditionellen Chinesischen und Ayurvedischen Medizin.<sup>77</sup> Das Isochinolinalkaloid hat antientzündliche, antibakterielle und antioxidative Eigenschaften.<sup>77</sup> Neuere in vitro-Studien zeigen, dass BBR einen entzündungshemmenden Effekt auf Makrophagen in einem entzündlichen Milieu hat.<sup>78,79</sup> Es fördert die Polarisation in Richtung der antiinflammatorischen M2-Makrophagen und senkt die Konzentrationen der ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokine, wie IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ .<sup>79</sup> Die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 wird durch den Einfluss von BBR erhöht.<sup>80</sup> Auch in vivo-Experimente zeigen, dass proentzündliche Marker wie IL-6 und TNF- $\alpha$  durch BBR gesenkt und antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 erhöht werden können, und lassen vermuten, dass die Behandlung mit BBR z. B. die Entstehung von Gichtanfällen, allergischer Kontaktdermatitis und Sepsis dämpfen könnte.<sup>78,80–82</sup> Lin et al. zeigen in ihren Versuchen, dass übergewichtige Mäuse unter Gabe von BBR weniger proinflammatorische Zytokine ausschütten und ihr Energiestoffwechsel, sowie ihre Glukosetoleranz steigt.<sup>80</sup> Es gibt auch bereits erste Studien, die einen Einfluss von BBR auf MSC untersuchen.<sup>83,84</sup> Beispielweise ist in vitro durch die Applikation BBR-behandelter MSC das Überleben oxidativ gestresster Neuronen verbessert worden.<sup>84</sup> Dieser antioxidative Effekt auf die MSC

ist für die Erweiterung der Therapiemöglichkeiten der Alzheimer Demenz relevant.<sup>84</sup> Auch Pang et al. haben ein verbessertes Zellüberleben von ASC in Hypoxie und Nahrungsmangel durch BBR in vitro, sowie in vivo beobachtet, welches bei klinischer Anwendung wie z.B. MSC-Transplantationen wichtig ist.<sup>83</sup> Bisher noch offen ist die Frage, wie BBR die inflammatorische Modulation von MSC beeinflusst. Ein antiinflammatorischer Einfluss auf MSC kann den therapeutischen Einsatz von MSC erweitern und verbessern. Daher soll in dieser Arbeit nun untersucht werden, ob BBR die entzündungshemmenden Wirkungen der ASC verbessert, ähnlich wie es bereits in Makrophagen nachgewiesen ist.<sup>78,79</sup>

### 3.4 Gedunin

Das Limonoid Gedunin (GED) ist bisher bekannt als Inhibitor des Hitzeschockproteins 90 und steht damit eher im Fokus bei der Therapie maligner Tumoren.<sup>85</sup> Allerdings werden GED neben seinen antitumorösen Eigenschaften auch antiallergische und antientzündliche Wirkungen zugeschrieben.<sup>85,86</sup> Neue Studien zeigen, dass GED ebenso in der Lage ist, LPS-induzierte Entzündungen einzudämmen: Borges et al. zeigen an Makrophagen, dass die IL-6, IL-1 $\beta$  sowie die NO-Sekretionen durch GED gedämpft sind und eine Erhöhung der IL-10 und Hämoxygenase-1-Produktion stattfindet.<sup>87,88</sup> Diese Ergebnisse haben sie in vivo bestätigt.<sup>88</sup> Bisher gibt es noch keine Arbeiten, die eine Wirkung von GED auf MSC untersuchen. Da GED eine vielversprechende antientzündliche Wirkung zu haben scheint, wird diese Arbeit die Wirkungen von GED auf entzündliche stimulierte MSC untersuchen.

### 3.5 Motivation und Ziele dieser Arbeit

Bislang sind MSC noch nicht endgültig charakterisiert und die genauen Funktionen der einzelnen Subpopulationen vollständig verstanden. Es ist von Wichtigkeit, das Überleben und die immunsupprimierende Wirkung von MSC in dem komplexen Mikroklima, auf welches sie nach ihrer Transplantation treffen, zu verbessern. Ein Ansatz dafür ist die Behandlung mit einer Substanz, um MSC zu modulieren. Um MSC sicher und erfolgreich als Zell-Therapeutika im Rahmen von (Nieren)-

Erkrankungen anzuwenden, müssen sie ein Gleichgewicht zwischen Schädigung und Regeneration herstellen und erhalten. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Wirkungen von drei Substanzen, NCL, BBR und GED, auf die immunregulatorischen Eigenschaften und die Proliferation der MSC untersucht.



## 4 Material

### 4.1 Geräte

Table 2 **Geräte**, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

<b>Produkt</b>	<b>Firma, Sitz</b>
Autoklav (CertoClav CV-EL 12L)	<i>CertoClav</i> , Leonding, Österreich
Brutschrank	<i>Heraeus</i> , Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	<i>BD Biosciences</i> , San Jose, USA
ELISA reader (Apollo LB 911)	<i>Berthold Technologies</i> , Bad Wildbad, Deutschland
Feinwaage (EMB 200-3)	<i>Kern</i> , Balingen, Deutschland
Fluoreszenzmessgerät (FLUOstar)	<i>BMG LABTECH</i> , Ortenberg, Deutschland
Lichtmikroskop (Axiovert 10)	<i>Zeiss</i> , Oberkochen, Deutschland
Mehrkanalpipette	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, USA
Mikropipetten	<i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland
Mikroröhrchen-Schüttler mit Thermostat (Thermo-Shaker TS-100)	<i>Kisker Biotech GmbH + Co. KG</i> , Steinfurt, Deutschland
Multipipetteur	<i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (PipetBoy)	<i>INTEGRA Biosciences GmbH</i> , Biebertal, Deutschland
Spektralfotometer (NanoDrop ND-1000)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, USA
Sterilbank (Lamim Air HB2448)	<i>Heraeus</i> , Hanau, Deutschland
Thermo-Cycler (ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System)	<i>Applied Biosystems</i> , Waltham, USA
Thermo-Cycler (Primus 96)	<i>MWG Biotech</i> , Ebersberg, Deutschland
Vortexer	<i>Fisons Scientific Equipment</i> , Ipswich, Vereinigtes Königreich

Wasserbad	<i>GFL Technology</i> , Burgwedel, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	<i>Scherf-Präzision Europa GmbH</i> , Meiningen, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	<i>Heraeus</i> , Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Mikro 22R)	<i>Hettich GmbH &amp; Co. KG</i> , Kirchlingern, Deutschland

## 4.2 Verbrauchsmaterialien

Table 3 Verbrauchsmaterialien, die für diese Arbeit verwendet wurden.

<b>Produkt</b>	<b>Firma, Sitz</b>
Analysensieb (125 µM)	<i>Retsch GmbH</i> , Haan, Deutschland
Combitips (TipOne)	<i>Starlab International GmbH</i> , Hamburg, Deutschland
ELISA-Platten (Nunc MaxiSorp 96-Loch)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, USA
Filter (0,45 µM)	<i>Merck Millipore</i> , Billerica, USA
Handschuhe (Vasco-Nitril)	<i>B. Braun</i> , Melsungen, Deutschland
Messpipetten (Costar 2 mL; 5 mL; 10 mL; 25 mL)	<i>Corning Inc.</i> , Corning, USA
PCR-Gefäße	<i>VWR</i> , Darmstadt, Deutschland
PCR-Gefäßstreifen	<i>VWR</i> , Darmstadt, Deutschland
PCR-Platten	<i>ABgene</i> , Epsom, Vereinigtes Königreich
PCR-Plattenversiegelungen, selbstklebend	<i>ABgene</i> , Epsom, Vereinigtes Königreich
Reagenzreservoirs	<i>VWR</i> , Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL)	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> ; 75cm <sup>2</sup> )	<i>Greiner Bio-One</i> , Frickenhausen, Deutschland

Zellkulturplatten (12-, 24-, 96-Loch)	<i>Greiner Bio-One</i> , Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	<i>Greiner Bio-One</i> , Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL; 50 mL)	<i>Greiner Bio-One</i> , Frickenhausen, Deutschland

### 4.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 4 Chemikalien und Lösungen.

<b>Produkt</b>	<b>Firma, Sitz</b>
Bovines Serumalbumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Burlington, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Burlington, USA
ELISA-Kits (IL-6; IL-8)	<i>ImmunoTools</i> , Friesoythe, Deutschland
Ethanol (100 %)	<i>AppliChem</i> , Darmstadt, Germany
Ethanol (70 %)	<i>Carl Roth GmbH + Co KG</i> , Karlsruhe, Deutschland
HOT FIREPol <sup>®</sup> EvaGreen <sup>®</sup> qPCR Mix Plus (5x)	<i>Solis Biodyne</i> , Tartu, Estland
Isopropanonol (100 %)	<i>Carl Roth GmbH + Co KG</i> , Karlsruhe, Deutschland
LDH-Zytotoxizitäts-Kit	<i>Roche Holding AG</i> , Basel, Schweiz
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	<i>Invitrogen</i> , Carlsbad, USA
Methanol (100 %)	<i>Carl Roth GmbH + Co KG</i> , Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (0,9 %)	<i>Fresenius SE &amp; Co. KGaA</i> , Bad Homburg v. d. Höhe, Deutschland
NucleoZOL	<i>MACHERY-NAGEL</i> , Düren, Deutschland

Pancoll (1,077 g/mL)	<i>PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland</i>
Paraformaldehyd (PFA)	<i>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>
PCR-Puffer (10x, w/o MgCl <sub>2</sub> )	<i>Invitrogen, Carlsbad, USA</i>
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>
Random hexamers	<i>Invitrogen, Carlsbad, USA</i>
Reverse Transkriptase	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>
RiboLock RNase Inhibitor	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>
Rnase-/Dnase-freies Wasser	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	<i>AppliChem, Darmstadt, Deutschland</i>
TMB ELISA Substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	<i>Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich</i>
Trypanblau	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>
Trypsin/EDTA	<i>Lonza Group AG, Basel, Schweiz</i>
TWEEN 20	<i>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>
Typ 1 Collagenase	<i>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>
XTT-Proliferationsassay-Kit	<i>AppliChem, Darmstadt, Germany</i>
β-Mercaptoethanol	<i>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>

#### 4.4 Medien und Mediensupplemente

*Tabelle 5 Medien und Mediensupplemente*, die für die Kultivierung der ASC und die Versuche dieser Arbeit verwendet wurden.

<b>Produkt</b>	<b>Firma, Sitz</b>
Berberinchlorid (No. B3251-5G)	<i>Sigma-Aldrich, Burlington, USA</i>
Dexamethason (Injektionslösung, 4 mg)	<i>Ratiopharm, Ulm, Deutschland</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>
Fetales Kälberserum (FCS)	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA</i>
Gedunin (No. 17328)	<i>Cayman Chemical, Ann Arbor, USA</i>

IFN- $\gamma$	<i>PeproTech</i> , Hamburg, Deutschland
IL-1 $\beta$	<i>PeproTech</i> , Hamburg, Deutschland
LPS ultrapure	<i>InvivoGen</i> , San Diego, USA
Niclosamid (No. N3510-250G)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Burlington, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, USA
TNF- $\alpha$	<i>ImmunoTools</i> , Friesoythe, Deutschland

#### 4.5 Antikörper (Durchflusszytometrie)

Tabelle 6 Antikörper für die Durchflusszytometrie, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Firma, Sitz
Anti-Human CD105 APC	<i>ImmunoTools</i> , Friesoythe, Deutschland
Anti-Human CD54 APC	<i>ImmunoTools</i> , Friesoythe, Deutschland
Anti-Human CD73 PerCP	<i>ImmunoTools</i> , Friesoythe, Deutschland
Anti-Human HLA-DR FITC	<i>ImmunoTools</i> , Friesoythe, Deutschland

#### 4.6 PCR-Primer

Alle Primer wurden von *Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*, Carlsbad, USA bezogen.

Tabelle 7 Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Sequenz	Länge
<b>Aktin</b> NM_001101.5	<b>Forward:</b> ACTGGAACGGTGAAGGTGAC <b>Reverse:</b> AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT	169 bp
<b>HLA-DR</b> NM_019111.5	<b>Forward:</b> CGCTCAGGAATCATGGGCTA <b>Reverse:</b> GCCTCAAAGCTGGCAAATCG	186 bp
<b>ICAM-1</b> NM_000201.3	<b>Forward:</b> CAACCTCAGCCTCGCTATGG <b>Reverse:</b> CGGGGCAGGATGACTTTTGA	135 bp
<b>IDO</b> NM_002164.6	<b>Forward:</b> TTTACCAAATCCACGATCA <b>Reverse:</b> CAGGACGTCAAAGCACTGAA	189 bp

<b>IL-10</b> NM_000572.3	<b>Forward:</b> TACCTGGAGGAGGTGATGC <b>Reverse:</b> GGCCTTGCTCTTGTTTTTCAC	147 bp
<b>IL-6</b> NM_001371096.1	<b>Forward:</b> AAAGATGGCTGAAAAAGATGGATGC <b>Reverse:</b> ACAGCTCTGGCTTGTTCCCTCACTAC	150 bp
<b>TLR-4</b> NM_003266.4	<b>Forward:</b> CCCGACAACCTCCCCTTCTC <b>Reverse:</b> GGGCTAAACTCTGGATGGGGT	211 bp
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> NM_000594.4	<b>Forward:</b> CGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAG <b>Reverse:</b> CACCAGCTGGTTATCTCTCAGCTC	354 bp

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Kultivierung von Mesenchymalen Stamm-/Stromazellen

Die ASC wurden in Zellkulturflaschen oder Loch-Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank inkubiert. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt. Das alte Nährmedium wurde unter sterilen Bedingungen abgesaugt und neues mit einer Pipette hinzugegeben. Die Wachstumsdichte und Zellform wurde regelmäßig mikroskopisch beurteilt, um eine Ausdifferenzierung der Zellen zu vermeiden.

#### 5.1.2 Kulturmedium

DF10:           450 mL DMEM  
                  50 mL FBS  
                  5 mL Pen/Strep (10.000 U/mL Penicillin, 10.000 µg/mL Streptomycin)

Als Standardmedium wurde die Zellen mit DF10 versorgt. Das Medium wurde aus einer Flasche DMEM (450 mL), 50 mL FBS und 5 mL Pen/Strep hergestellt.

### 5.1.3 Herkunft der Liposuktionsaspirate

Die ASC wurden aus Liposuktionsaspiraten der Rosenpark Klinik, Darmstadt isoliert. Das genutzte Fettgewebe wurde anonymisiert bezogen, eine konkrete Zuordnung der Liposuktionsaspirate zu einer Spenderin oder zum Spender war somit nicht möglich.

### 5.1.4 Isolation von ASC aus Liposuktionsaspiraten

Lösungen: Typ 1 Collagenase

PBS

Pancoll (Dichte 1,077 g/mL)

0,9 % NaCl

Zur Isolierung wurden frische Liposuktionsaspirate verwendet (Lagerung max. 24 h bei 6-12 °C). Es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Für eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden acht 50 mL-Röhrchen mit je 30 mL Fett befüllt. Für die Gewebeerddauung wurden 100 mg Typ 1 Collagenase in 20 mL PBS gelöst. Dieser Ansatz wurde steril durch einen 0,45 µm-Filter gefiltert. Jedes Röhrchen mit Fett wurde mit je 2,5 mL der Enzymldsung und 12,5 mL PBS aufgefüllt. Die Ansätze wurden anschließend bei 37 °C im Wasserbad für 45 bis 60 min inkubiert. Dabei wurde das Enzym-Fett-Gemisch regelmäßig durchmischt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Mit einer 5 mL-Pipette wurde seitlich durch das Fett gestochen, um das Pellet abzusaugen und in ein neues 50 mL-Röhrchen zu überführen. Zur vollständigen Gewinnung des Pellets wurden die acht Röhrchen nochmals zentrifugiert und das restliche Pellet entnommen. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das neue Röhrchen mit dem gesammelten Pellet wurde ebenfalls bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde einmal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in 20 mL NaCl-Lösung gelöst. Der Ansatz wurde nun durch ein 125 µm-Analysensieb gedrückt. Ein neues 50 mL-Röhrchen wurde mit 14 mL Pancoll (Dichte 1,077 g/mL) befüllt und der gesiebte Ansatz vorsichtig mit einer 5 mL-Pipette

aufpipettiert. Die Röhren wurden nun bei 400 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Es ergaben sich nun verschiedene Phasen, von oben nach unten: eine hellrote, eine farblose mit einem roten Ring in der Mitte und ein rotes Pellet. Die ASC befanden sich in der Phase mit dem roten Ring. Zur Gewinnung wurde das obere Drittel abgesaugt, also die rote Phase und Teile der klaren Phase, und dann wurde vorsichtig der rote Ring mit einer Pipette entnommen und in ein neues 50ml-Röhren überführt. Der Rest wurde verworfen. Das Röhren wurde mit NaCl aufgefüllt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 10 bis 12 mL DF10 gelöst und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt. Die Zellen wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

### 5.1.5 Umsetzen der Zellen

Lösungen: PBS  
Trypsin/EDTA 1x  
DF10

Es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Zellen wurde im Verhältnis 1:3 oder 1:4 passagiert. Das Nährmedium wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die ASC mit Trypsin/EDTA aus ihrer Zellkulturflasche gelöst. Unter dem Lichtmikroskop wurde das vollständige Ablösen der Zellen kontrolliert. Das Zell-Trypsin-Gemisch wurde nun in Nährmedium aufgenommen und ein passendes Röhren überführt. Das Gemisch wurde bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in DF10 aufgenommen und in die neuen Zellkulturflaschen oder -platten überführt.

### 5.1.6 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde Trypanblau 1:2 mit den gelösten Zellen vermischt. Die Neubauerzählkammer wurde vorbereitet und mit den gefärbten



Zellen befüllt. Es wurde vier bis acht Quadrate gezählt. Die Menge der Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Summe aller gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Anzahl der Zellen} / \text{mL}$$

## 5.2 Zellstimulation

### 5.2.1 Simulation einer lokalen Inflammation mit LPS

Um speziell den TLR-4-Rezeptor zu aktivieren, wurden ASC mit LPS ultrapure stimuliert. Die notwendige Konzentration von LPS wurde durch die Stimulation mit Konzentrationen von 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL und 1 µg/mL LPS im Medium ermittelt. Ausgewertet wurden die RNA-Expressionen mittels einer quantitativen PCR (qPCR). Um die notwendige Zeit der Stimulation zu bestimmen, wurden die Zellen für 2 h, 4 h, 24 h, 48 h und 72 h stimuliert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit einer qPCR.

### 5.2.2 Simulation einer systemischen Inflammation

Während einer systemischen Inflammation spielen die Zytokine TNF-α, IFN-γ und IL-1β eine wichtige Rolle als Entzündungsmediatoren. Daher wurden die Zellen hierfür mit einem Mix aus 200 U/mL IFN-γ, 10 U/mL TNF-α und 25 U/mL IL-1β (Cytomix) stimuliert und anschließend eine qPCR zum Nachweis durchgeführt.

### 5.2.3 Niclosamid

NCL stammte von der Firma Sigma Aldrich und wurde in Pulverform bezogen worden. Für die Stammlösung von 10 mM wurden 3,2 mg/mL NCL in DMSO gelöst.

### 5.2.4 Berberin

BBR in Form von Berberinchlorid stammte von der Firma Sigma Aldrich und wurde in Pulverform bezogen worden. Als Stammlösung wurde 10 mM BBR angesetzt. Dafür wurden 3,7 mg/mL Berberinchlorid in Methanol gelöst.

### 5.2.5 Gedunin

GED stammte von der Firma Cayman Chemical und wurde als kristalliner Feststoff bezogen. Für die verwendete 2 molare Stammlösung wurden 1 mg/mL GED in Ethanol gelöst.

### 5.3 Zellcharakterisierung mittels Durchflusszytometrie

Lösungen: PBS

PFA 1%

Monoklonale Antikörper (mAb)

Für die Zellcharakterisierung der ASC wurde eine Durchflusszytometrie verwendet. ASC wurden hierfür zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA gelöst. Die gelösten ASC wurden in PBS aufgenommen und bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in PBS gelöst. Die nun gelösten Zellen wurden gleichmäßig in die Durchflusszytometrie-Analyse-Röhrchen verteilt und erneut bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand in den Röhrchen wurde vorsichtig entfernt. Die gewählten mAb wurden hinzugegeben und gut gevortext. Verwendet wurden folgende fluoreszenzmarkierte mAb: CD-73-PerCP, CD-105-APC, HLA-DR-FITC und CD-54-APC. Nach einer 15-minütigen Inkubation in Dunkelheit wurden die ASC mit 2 mL PBS gewaschen und anschließend bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Die Pellets wurden anschließend in 200 µL 1 %igen PFA fixiert und resuspendiert. Vor der Messung wurden die Zellen gut gevortext und dann mit dem Durchflusszytometer analysiert.

## 5.4 Nachweismethoden

### 5.4.1 Zellviabilität

#### 5.4.1.1 XTT-Assay

Um die zytotoxischen Konzentrationen von NCL, BBR und GED bei ASC zu ermitteln, wurde ein XTT-Zytotoxizitätsassay verwendet. Für die Durchführung des XTT-Assays wurden 5000 Zellen pro Well auf 96-Loch-Platten ausgesät, welche über 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mit je 100 µL Stimulationsmedium (3-6 Löcher pro Stimulationskonzentration) für weitere 48 Stunden inkubiert. Die XTT-Lösung wurde mit dem Aktivierungsreagenz gemischt und zu den Zellen gegeben. Als Leerwert wurden Löcher mit reinem DF10-Medium und aktivierter XTT-Lösung verwendet. Die Platte wurde anschließend nochmal für vier bis sechs Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Auswertung wurde die optische Dichte bei 492 nm und 620 nm als Referenz vermessen. Um die mittlere optische Dichte jeder Konzentration zu berechnen, wurde der Leerwert von allen gemessenen Werten abgezogen und anschließend die Mittelwerte bestimmt.

#### 5.4.1.2 LDH-Assay

Mit dem Assay „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ von Roche wurde die Menge der von ASC freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium bestimmt. Dafür wurde der Überstand stimulierten Zellen (gleiche Stimulation wie für das XTT-Assay, siehe 5.4.1.1) abgenommen und abzentrifugiert, um Zelldetritus zu entfernen. 50 µL dieses Überstands wurden 1:2 mit PBS verdünnt. Das Kit wurde nach Anleitung verwendet. Dafür wurde der Katalysator im Verhältnis 1:45 mit dem Farbgemisch vermischt. Je 100 µL dieses Reaktionsgemischs wurden zu den verdünnten Überständen gegeben. Für die Bestimmung von Leerwerten wurde reines DF10-Medium mit dem Reaktionsgemisch vermengt. Die mit den Reagenzien bearbeiteten Platten wurden bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 20-30 min inkubiert, bis eine Farbreaktion sichtbar wurde. Die Auswertung erfolgte mittels eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Readers bei 495 nm Wellenlänge.

## 5.4.2 RNA-Nachweis durch qPCR

### 5.4.2.1 RNA-Isolation

Lösungen: NucleoZOL  
Isopropanol  
70 %iger Ethanol  
100 %iger Ethanol  
RNase/Dnase freies Wasser

Es wurde semi-steril gearbeitet. Zur RNA-Isolation wurde das vorhandene Medium abgesaugt. Auf eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden 500 µL NucleoZOL für die Zellyse gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgetragen und das Lysat mit einer Pipette in ein Eppi überführt. Zu den 500 µL Lysat wurden 200 µL Dnase/Rnase freies Wasser gegeben. Die Eppis mit den Lysat-Wasser-Gemischen wurden gut gevortext und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurden sie bei 12.000 g für 15 min zentrifugiert. Währenddessen wurden neue Eppis mit je 500 µL Isopropanol vorbereitet. 500 µL des Überstands wurden zum Isopropanol gegeben. Die Reste der Zelllysate wurden verworfen. Die Eppis mit dem Isopropanol-RNA-Gemisch wurden gut gevortext und 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie bei 12.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die RNA setzte sich am Boden als weißes Pellet ab. Zweimal wurde die RNA mit 70 %igen Ethanol, ein drittes Mal mit 100 %igen Ethanol gewaschen. Im letzten Schritt wurden die isolierten RNA-Pellets in 20 bis 30 µL Rnase/Dnase freiem Wasser gelöst. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 5.4.2.2 RT-Reaktion

Lösung für 20 µL cDNA:

- 2 µL MgCl<sub>2</sub>
- 1 µL PCR 10x Puffer
- 1 µL dNTP Mix
- 1 µL β-Mercaptoethanol

1  $\mu\text{L}$  Random Hexamers  
0,5  $\mu\text{L}$  Rnase Inhibitor  
0,25  $\mu\text{L}$  Reverse Transkriptase

Es wurde semi-steril auf Eis gearbeitet. Für die RT-Reaktion wurden 1  $\mu\text{g}$  oder 500 ng RNA gelöst in 11,25  $\mu\text{L}$  Rnase/Dnase freiem Wasser verwendet. Die RNA wurde in PCR-Röhrchen pipettiert. Für den Master-Mix wurden die oben aufgeführten Substanzen, bis auf die Enzyme, aufgetaut und vermischt. Pro PCR-Röhrchen wurden 8,75  $\mu\text{L}$  Master-Mix hinzugegeben. Die Enzyme wurden als letztes hinzugefügt. Im Cycler wurden die Proben in cDNA umgeschrieben und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

#### 5.4.2.3 Quantitative RT-PCR

Lösungen: HOT FIREPol<sup>®</sup> EvaGreen<sup>®</sup> qPCR Mix  
RNase/DNase freies Wasser  
Primer-Mix

Es wurde semi-steril gearbeitet und eine 96-Loch-PCR-Platte verwendet. Pro Loch wurden 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 13,2  $\mu\text{L}$  Wasser, 4  $\mu\text{L}$  HOT FIREPol<sup>®</sup> EvaGreen<sup>®</sup> qPCR Mix und 0,8  $\mu\text{L}$  Primer-Mix pipettiert. Die PCR-Platte wurde abzentrifugiert. Für die qPCR wurden 40 Zyklen gewählt. Die cDNA wurde zunächst bei 95 °C für zwölf Minuten denaturiert. Anschließend folgte die Quantifizierung in einem Rhythmus von Denaturierung bei 95 °C, Annealing bei 63 °C, Replikation bei 72 °C. Während der Vervielfältigung der cDNA maß das PCR-Gerät nach jedem Zyklus die Fluoreszenz. Da die vom Gerät gemessene Fluoreszenz proportional zum Amplifikationsprodukt ist, ließen sich Rückschlüsse über die relative Menge der Dann nach jedem Zyklus ziehen. In der letzten Phase wurde die Schmelzkurve bestimmt. Dafür heizte das PCR-Gerät in 15 min gleichmäßig von 60 °C auf 90 °C auf. Mit Hilfe der Schmelzkurve ließ sich die Reinheit der Amplifikationsprodukte überprüfen.

### 5.4.3 Immunoassays

Um die mit der qPCR erhaltenen Ergebnisse auf Proteinebene zu verifizieren, wurden Assays zur Detektion von humanem IL-6- und IL-8-Protein im Zellkulturüberstand durchgeführt. Bei beiden ELISAs handelte es sich um Sandwich-ELISAs. ASCs wurden in 24-Loch-Platten ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90 % wurden die ASC stimuliert und für 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Überstände wurden in Eppis überführt. Um Zellreste zu entfernen, wurden die Überstände bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Über Nacht wurden Maxi-Sorp-96-Loch-Platten mit dem Fangantikörper (Verdünnung 1:100 in PBS) bei Raumtemperatur beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten für eine Stunde mit 300 µL/Loch Reagenzlösung (PBS + 0,05 % Tween20 + 2 % BSA) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu hemmen. Anschließend wurden die Standardreihe (1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 10 pg/mL, 0 pg/mL) und die Proben in der Reagenzlösung verdünnt und je 100 µL/Loch in Duplikaten aufgetragen. Die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten mit 300 µL/Loch Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween20) fünfmal gewaschen und der Detektorantikörper (100 µL/Loch, Verdünnung 1:100 in Reagenzlösung) wurde aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert. Nach weiteren fünf Waschzyklen wurde Poly-HRP Streptavidin (100 µL/Loch, Verdünnung 1:1000 in Reagenzlösung) für 30 min auf die Platten gegeben. Die Überstände wurden fünfmal abgewaschen und die Platten mit 100 µL/Loch TMB-Substrat entwickelt. Die Farbreaktion wurde nach ca. 10 min mit 50 µL/Well 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Im ELISA-Reader wurde die Platten bei 450 nm und dem Referenzfilter 620 nm gemessen.

### 5.5 Statistik

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen dieser Arbeit erfolgte mittels Microsoft Excel und GraphPad Prism 9. Alle Versuchsergebnisse wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Die anschließende statische Auswertung erfolgte im Falle einer Normalverteilung mit einer Repeated measures ANOVA, im Falle von

fehlenden Werten mit einer Mixed-Effects Analyse. Wenn keine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte, erfolgte ein Friedman's Test. Bei zusätzlich fehlenden Werten wurde paarweise Wilcoxon-Tests durchgeführt.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Simulation einer lokalen Entzündung

Um speziell den TLR-4-Rezeptor zu aktivieren, wurden ASC mit LPS ultrapure stimuliert. Die notwendige Konzentration von LPS wurde durch die Stimulation mit Konzentrationen von 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL und 1 µg/mL LPS im Medium ermittelt. Untersucht wurden die RNA-Expressionen von ICAM-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  mittels einer qPCR. Die Konzentration 100 ng/mL LPS ultrapure zeigte die effizienteste Stimulation und wurde daher bei allen nachfolgenden Versuchen verwendet. Um die notwendige Zeit der Stimulation zu bestimmen, wurden die Zellen für 2 h, 4 h, 24 h, 48 h und 72 h stimuliert (Abbildung 1). Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit einer qPCR. Es zeigte sich, dass für die Beurteilung der mRNA-Expressionen in der qPCR eine Dauer von vier Stunden am geeignetsten ist. Daher wurden ASC für die Auswertung mit der qPCR in allen nachfolgenden Versuchen für vier Stunden stimuliert.

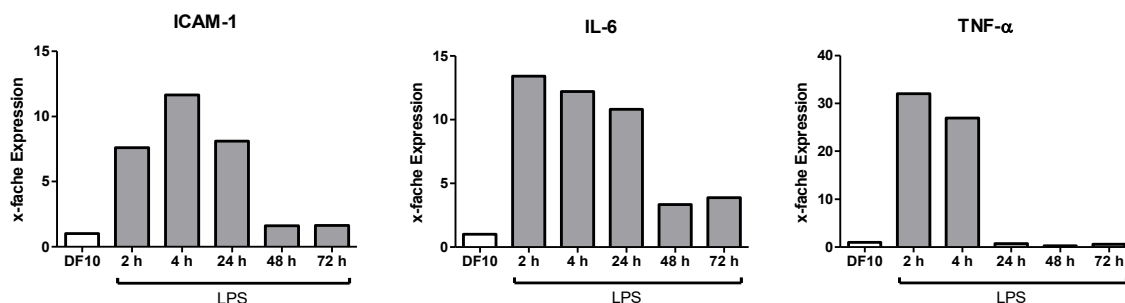


Abbildung 1 **Bestimmung der Stimulationsdauer für die qPCR.** LPS ultrapure wurde in der Konzentration 100 ng/mL verwendet. n = 1.

Die weitere statistische Auswertung zeigte, dass die Marker ICAM-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  sich mit LPS 100 ng/mL nach vier Stunden hochsignifikant stimulieren ließen (Abbildung 2). Ebenso konnteIDO signifikant stimuliert werden. Bei HLA-DR, IL-10 und TLR-4 ließ sich keine signifikante Stimulation durch LPS nachweisen, von einer erfolgreichen Stimulation könnte man optisch jedoch ausgehen.



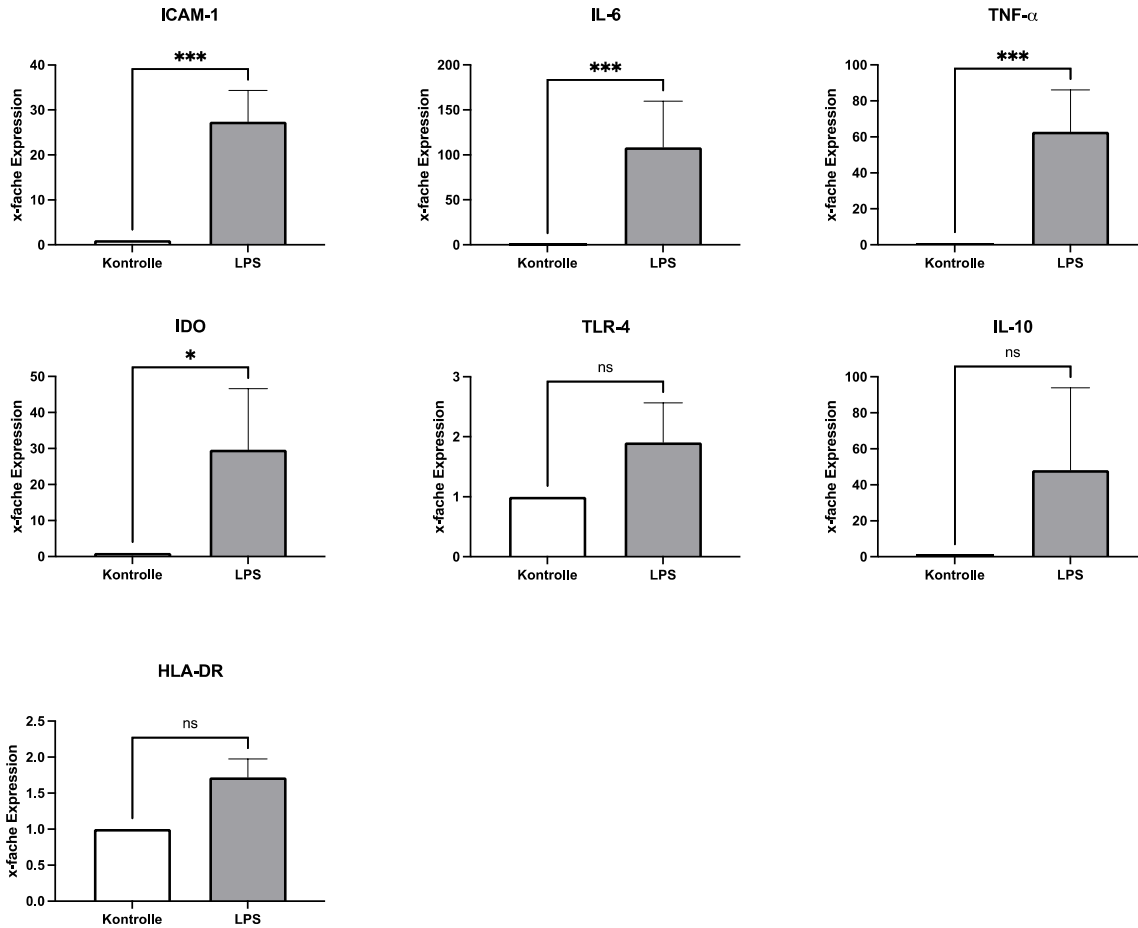
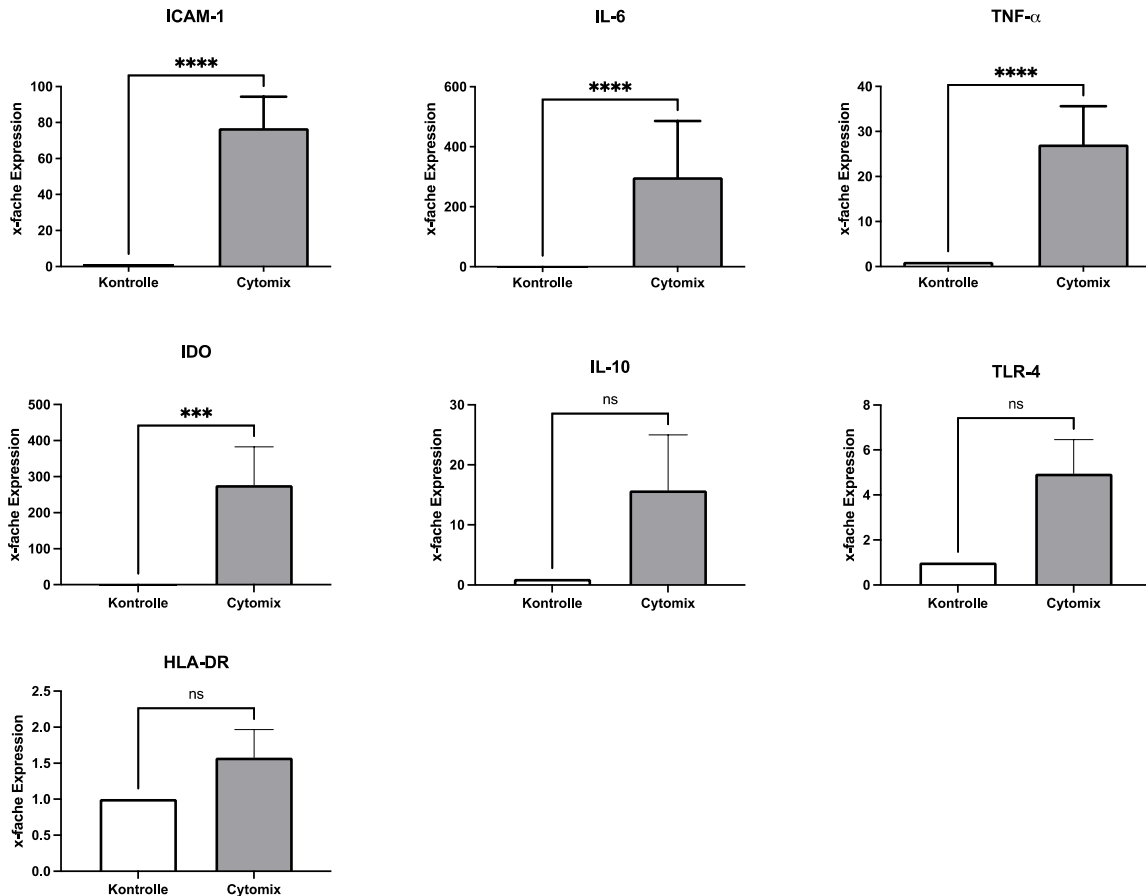


Abbildung 2 Expression von ICAM-1 (n=13), IL-6 (n=12), TNF-α (n=13), IDO (n=6), TLR-4 (n=9), IL-10 (n=8) und HLA-DR (n=3) nach einer vierstündigen Stimulation der ASC mit LPS 100 ng/mL. Alle gezeigten Daten sind mit dem Wilcoxon-Test ausgewertet worden. \*\*\* p = 0,0001 – 0,001; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus Kontrolle.

## 6.2 Simulation einer systemischen Entzündung

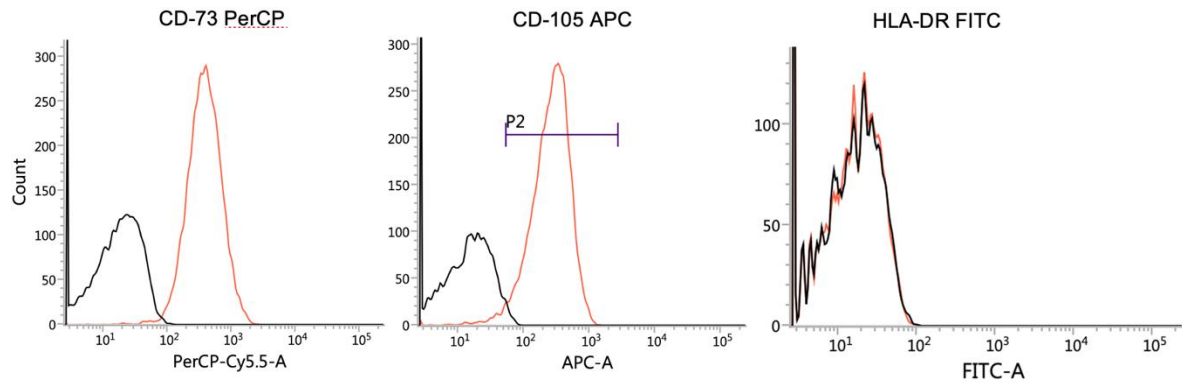
ASC wurden mit einem Cytokinmix (Cytomix) stimuliert. Als Nachweismethode wurde auch hier die Expression spezifischer Marker mittels qPCR gewählt. Eine vierstündige Stimulation mit Cytomix zeigte sich als sehr effektiv. Die Marker ICAM-1, IL-6, TNF-α und ICAM-1 ließen sich hochsignifikant durch den Cytomix stimulieren (Abbildung 3). Die Expression von IL-10, HLA-DR und TLR-4 schienen durch den Cytomix ebenso stimuliert, jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 3** Expression von ICAM-1 (n=20), IL-6 (n=23), TNF- $\alpha$  (n=15), IDO (n=11), IL-10 (n=9), TLR-4 (n=4) und HLA-DR (n=10) nach einer vierstündigen Stimulation der ASC mit Cytomix. Alle gezeigten Daten sind mit dem Wilcoxon-Test ausgewertet worden. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p = 0,0001 - 0,001$ ; ns = nicht signifikant versus Kontrolle.

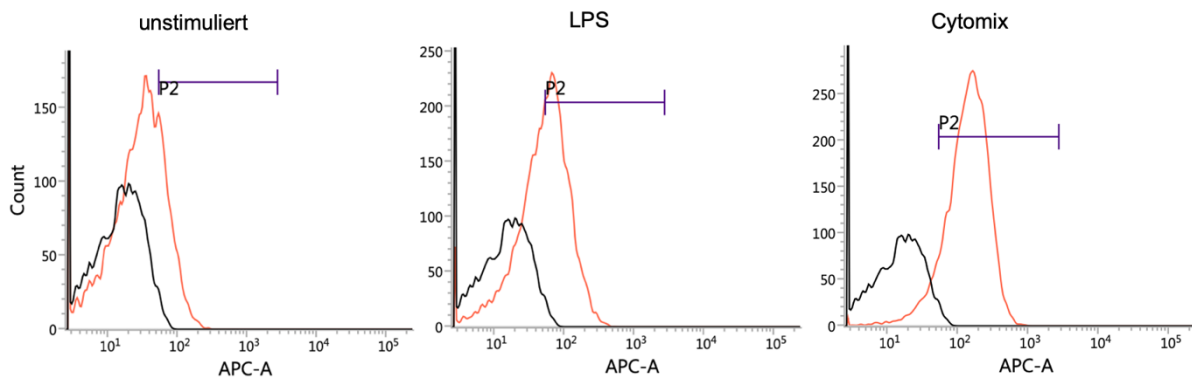
### 6.3 Durchflusszytometrie

Die ASC wurden über die Oberflächenmarker, die sie exprimieren und die, die sie nicht exprimieren dürfen, charakterisiert. Da die Zellisolationsmethode für ASC und deren Charakterisierung in der nephrologischen Arbeitsgruppe bereits hinreichend etabliert und publiziert ist, wurden nur drei dieser Oberflächenmarker untersucht. Hierfür wurden CD73-PerCP-, CD105-APC- und HLA-DR-FITC-Antikörper verwendet. Für die Oberflächenproteine CD73 und CD105 zeigten sich unsere ASC positiv und für HLA-DR negativ (Abbildung 4). Dieses Ergebnis entspricht den Definitionskriterien von ASC.<sup>5</sup>



**Abbildung 4** Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker CD-73, CD-105 und HLA-DR (Charakteristische Histogramme).

Ebenso wurde das Oberflächenprotein CD54 (ICAM-1) untersucht. ICAM-1 sollte bei entzündlicher Stimulation hochreguliert werden. Daher wurden unstimulierte, mit LPS und mit Cytomix stimulierte ASC mit dem CD54-APC Antikörper gefärbt. Die entzündlich stimulierten ASC zeigten etwas mehr CD54 als die unstimulierten ASC (Abbildung 5).



**Abbildung 5** Histogramme der durchflusszytometrischen Bestimmung von CD-54 (ICAM-1) bei unstimulierten, mit LPS stimulierten und mit Cytomix stimulierten ASC.

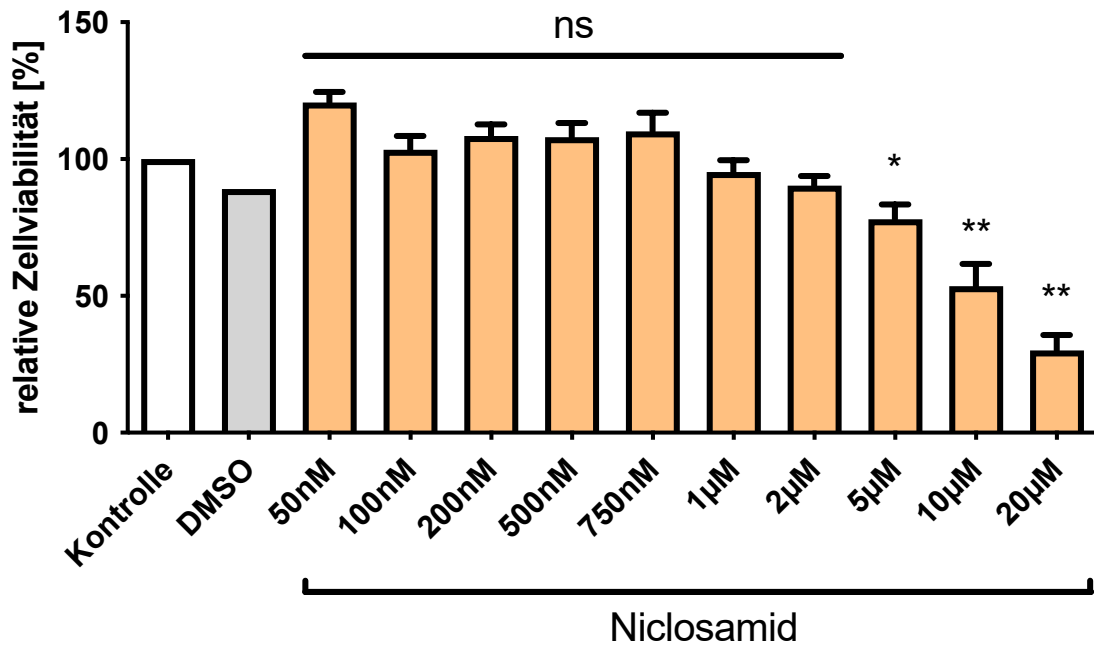
## 6.4 Niclosamid

### 6.4.1 Zelltoxische Konzentration

Die zelltoxische Konzentration von NCL wurde mit einem XTT-Assay und einem LDH-Zytotoxizitäts-Assay ermittelt (Abbildung 6). Es wurden 5000 Zellen/Well auf 96-Wellplatten ausgesät und mit NCL (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 750 nM, 1

$\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) für 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das XTT-Assay zeigte ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  NCL aufwärts eine statistisch signifikante Senkung der Anzahl lebender Zellen. Die verwendete DMSO-Konzentration schien keine zelltoxische Wirkung zu zeigen. Im LDH-Assay wurde die LDH-Freisetzung der ASCs unter Einwirkung von NCL in den Konzentrationen 100 nM, 200 nM, 500 nM, 750 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  bestimmt. Im LDH-Assay konnte zwar ab keiner Konzentration eine statistisch signifikante Erhöhung der Zytotoxizität festgestellt werden, allerdings zeigte sich optisch ein Anstieg der Zytotoxizität mit steigender NCL-Konzentration. Die Konzentration von 750  $\mu\text{M}$  zeigte eine leicht signifikante Erhöhung. Dieses Ergebnis im LDH-Assay ist mit dem Ergebnis des XTT-Assays vereinbar. Um eine zelltoxische Wirkung von NCL zu vermeiden, wurde in allen weiterführenden Versuchen eine maximale Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  NCL verwendet.

## A XTT-Assay



## B LDH-Assay

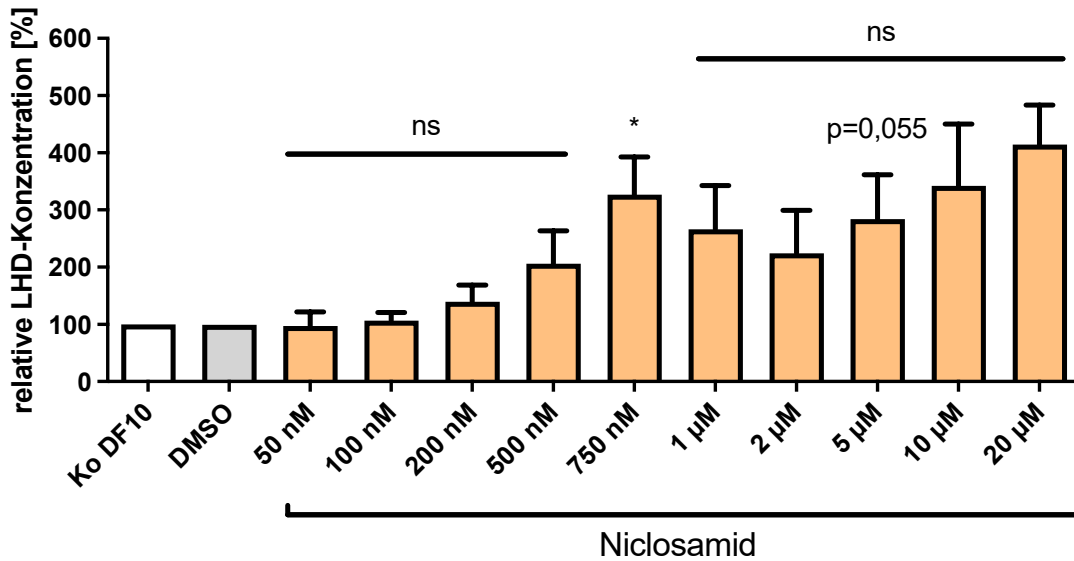


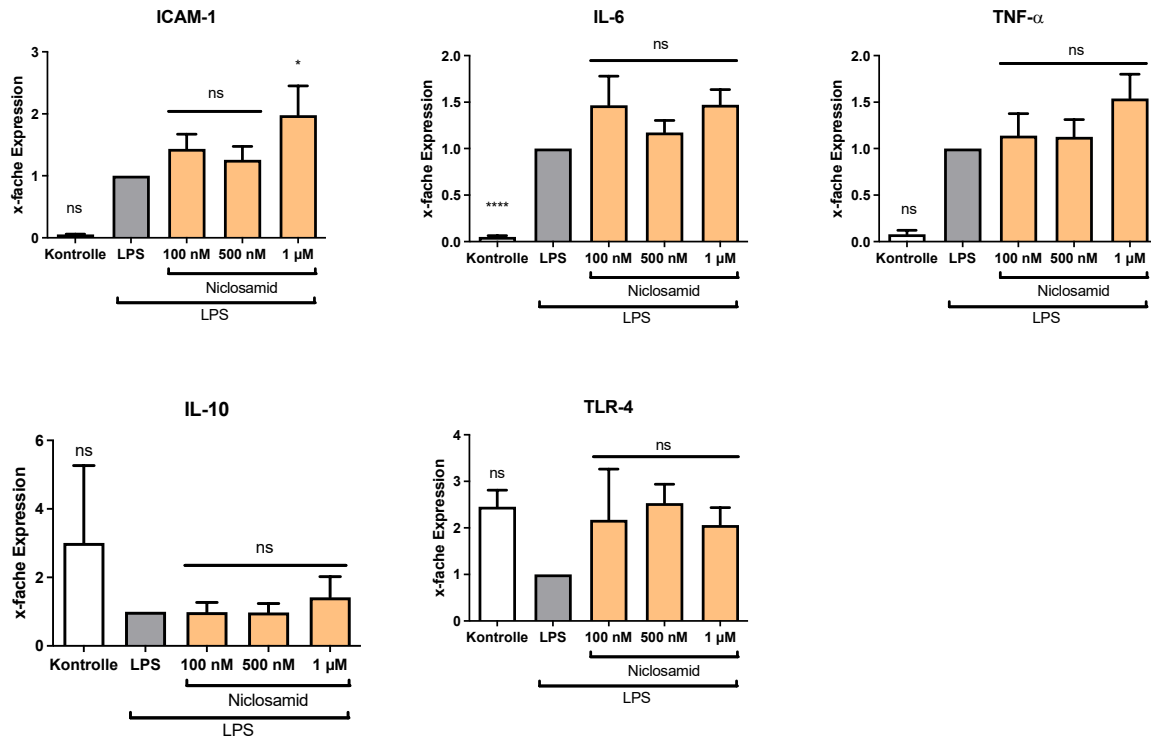
Abbildung 6 Relative Zytotoxizität von NCL im XTT- (A) und LDH- (B) Assay. A: Das Zellwachstum der ASC ist ab einer Konzentration von 5 µM NCL statistisch signifikant gesenkt. B: Im LDH-Assay konnte nur bei einer Konzentration von 750 µM eine statistisch signifikante Erhöhung der Zytotoxizität festgestellt werden. n = 10. MTW ± SEM. \*\* p = 0,001 – 0,01; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus Kontrolle. A: Mixed-effects Analyse, B: Wilcoxon-Tests.

## 6.4.2 Effekte von Niclosamid bei Kostimulation mit LPS

In den folgenden Versuchen wurde betrachtet, welchen Einfluss NCL auf die Freisetzung ausgewählter pro- und antiinflammatorischer Faktoren bei LPS stimulierten ASC hat. Ebenso wurde untersucht, ob die Vorbehandlung der ASC mit NCL (1 h) die Zellen beeinflusst. Hierfür wurde die mRNA-Expression charakteristischer Marker (ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4 und IL-10) mittels qPCR bestimmt. Anschließend wurde die Protein-Expression von IL-6 und IL-8 mittels Immunoassays quantifiziert.

### 6.4.2.1 Auswertung der qPCR ohne Vorstimulation

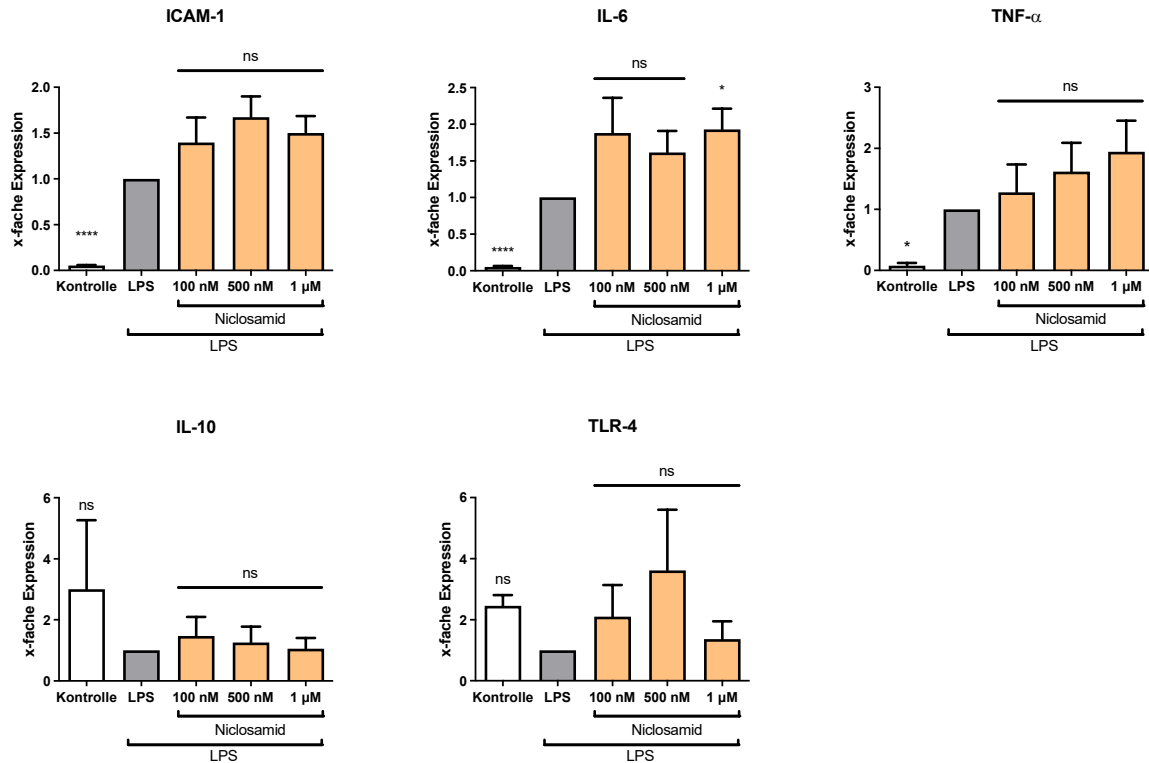
Um zu überprüfen, ob NCL die inflammatorischen Effekte von LPS ultrapure auf ASC verändert, wurden die Zellen mit LPS ultrapure 100 ng/mL und die Versuchsproben zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen von NCL (100 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M) behandelt. In der Vergleichsprobe wurden ASC mit reinem DF10 kultiviert. Die Stimulation wurde nach vier Stunden beendet, die RNA wurde isoliert und mittels qPCR wurden die mRNA-Expressionen von ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4 und IL-10 bestimmt (Abbildung 7). Die erwartete Hemmung der ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4-Expression durch NCL zeigte sich nicht. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ICAM-1-Expression beim 1  $\mu$ M NCL. Ein signifikanter Anstieg des antiinflammatorischen Mediators IL-10 durch die Kostimulation mit NCL konnte ebenso nicht beobachtet werden. Zusammenfassend konnte in der Auswertung kein entzündungshemmender Effekt von NCL nachgewiesen werden.



**Abbildung 7** Effekte von NCL auf die mRNA-Expression von ICAM-1 (n = 7), IL-6 (n = 7), TNF-α (n = 7), TLR-4 (n = 4) und IL-10 (n = 5) bei LPS-Stimulation von ASC. Die statistischen Angaben beziehen sich auf den Vergleich mit der LPS-Stimulation. NCL konnte keinen antientzündlichen Effekt bei den untersuchten Markern hervorrufen. Die Ergebnisse sind als MTW ± SEM dargestellt. \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus LPS-Stimulation. ICAM-1: Friedman-Test, IL-6: RM one-way ANOVA, TNF-α: Friedman-Test, IL-10: Wilcoxon-Tests, TLR-4: RM one-way ANOVA.

#### 6.4.2.2 Auswertung der qPCR nach Vorstimulation

Es wurde weiterhin untersucht, ob eine einstündige Vorbehandlung mit NCL in 100 nM, 500 nM, 1 µM vor Zugabe von LPS einen Effekt auf die Expression von ICAM-1, IL-6, TNF-α, TLR-4 und IL-10 hat. 1 µM NCL zeigte eine leicht signifikante Erhöhung des Markers IL-6. Weiterhin zeigten die mit NCL vorbehandelten ASC keine statistisch signifikanten Expressionsveränderungen zu den Zellen mit reiner LPS-Stimulation (Abbildung 8).



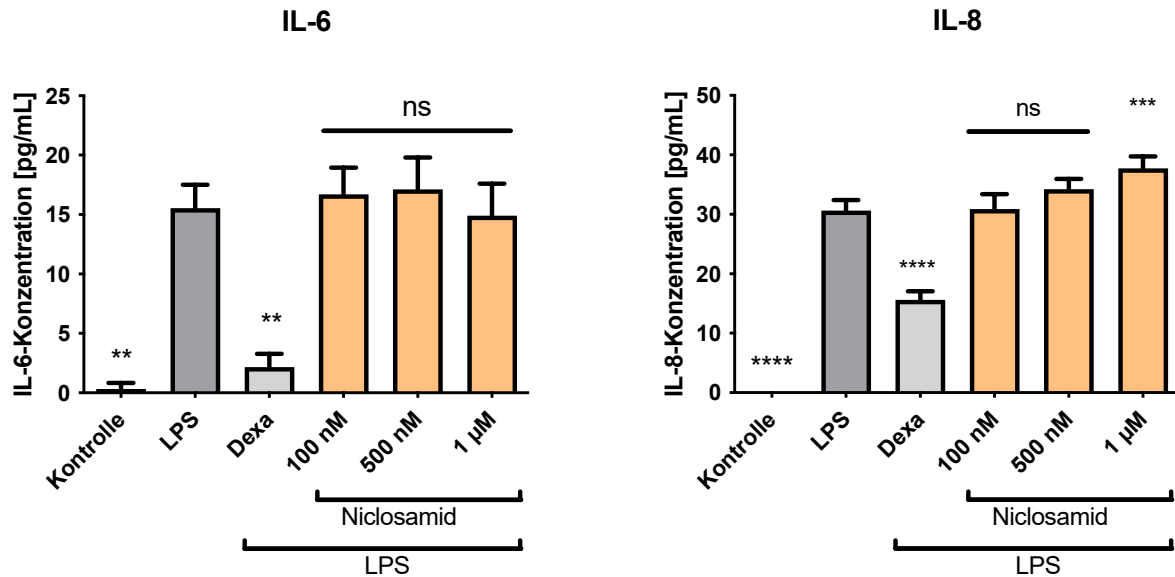
**Abbildung 8 Effekte in der qPCR nach einstündiger Vorstimulation der ASC mit NCL.** Es zeigte sich kein statistisch signifikanter antientzündlicher Einfluss von NCL. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt (n = 7). \*\*\*\* p < 0,0001; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus LPS-Stimulation. ICAM-1: Mixed-effects Analyse, IL-6: Mixed-effects Analyse, TNF- $\alpha$ : Wilcoxon-Tests, IL-10: Wilcoxon-Tests, TLR-4: Mixed-effects Analyse.

### 6.4.2.3 ELISA

Um die qPCR-Ergebnisse zu validieren, wurde zusätzlich die Protein-Expression von IL-6- und IL-8 mittels Immunoassays bestimmt. ASC wurden dafür auf 24-Well-Platten ausgesät und für 48 h mit LPS ultrapure 100 ng/mL stimuliert. Die Versuchsproben enthielten zusätzlich NCL in den Konzentrationen 100 nM, 500 nM und 1  $\mu$ M. Um zu zeigen, dass sich die Protein-Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 unter LPS-Stimulation hemmen lässt, wurde eine Probe mit LPS ultrapure und 10  $\mu$ M Dexamethason stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen wurden mit Hilfe von ELISAs für IL-6 und IL-8 bestimmt. Im unstimulierten Zustand zeigten die ASCs wenig bis keine Freisetzung von IL-6 oder IL-8. Durch die Stimulation mit LPS stieg die Konzentration beider Zytokine stark an. Es zeigte sich kein signifikanter hemmender Effekt von NCL auf die Freisetzung von IL-6 und IL-8. Im Gegensatz



dazu zeigte sich bei IL-8 sogar eine signifikante Erhöhung durch NCL 1  $\mu$ M. Das Dexamethason 10  $\mu$ M konnte die IL6- und IL8-Freisetzung signifikant reduzieren (Abbildung 9).



**Abbildung 9** Effekte von NCL auf die Zytokine IL-6 und IL-8 bei LPS-Stimulation im ELISA. Während NCL keine Hemmung zeigt, konnte Dexamethason die Ausschüttung von IL-6 und IL-8 erfolgreich reduzieren. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt (n=8). \*\*\*\* p < 0,0001; \*\*\* p = 0,0001 – 0,001; \*\* p = 0,001 – 0,01; ns = nicht signifikant versus LPS-Stimulation. IL-6: Wilcoxon-Tests; IL-8: Mixed-effects Analyse.

### 6.4.3 Effekte von Niclosamid bei Kostimulation mit Cytomix

Ein Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob NCL einen anti-entzündlichen Einfluss auf ASC, die zuvor mit dem proinflammatorischen Cytomix (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN) stimuliert wurden, hat. In einem weiteren Versuch wurde ermittelt, ob eine einstündige Vorbehandlung der ASC mit NCL effektiv ist. Parallel zur Stimulation mit LPS wurden auch hierfür mit der qPCR die Expression pro- sowie antiinflammatorischer Faktoren (ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ,IDO, HLA-DR, IL-10) bestimmt. Ebenso wurden die Effekte von NCL auf die Zytokine IL-6 und IL-8 im ELISA untersucht.

#### 6.4.3.1 Auswertung der qPCR ohne Vorstimulation

Für diese Versuche wurden ASC gleichzeitig mit dem Cytomix und NCL in verschiedenen Konzentrationen (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM und 1  $\mu$ M) über vier Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. Zum Vergleich wurden die ASC auch mit Cytomix, aber ohne NCL stimuliert. Als Kontrolle diente eine unstimulierte Probe (reines DF10-Nährmedium). Anschließend wurde die RNA isoliert und die Expression der Zytokine ICAM-1, IL-6, IDO, TNF- $\alpha$ , HLA-DR und IL-10 mittels qPCR untersucht (Abbildung 10). Nach der statistischen Auswertung zeigte sich, dass die proinflammatorische Zytokine ICAM-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Negativkontrolle durch den Cytomix statistisch signifikant hochreguliert wurden. Eine signifikante Senkung dieser Zytokine durch NCL konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso wurde die Expression der antiinflammatorisch wirkenden IDO durch den Cytomix im Vergleich zum DF10 nicht signifikant gesteigert. Im Gegensatz dazu konnte die IDO-Expression durch NCL tendenziell gesenkt werden, bei 200 nM NCL sogar leicht signifikant. Es wurde kein statistisch signifikanter Einfluss auf IL-10 und HLA-DR durch NCL bei den hier stimulierten ASC nachgewiesen werden.

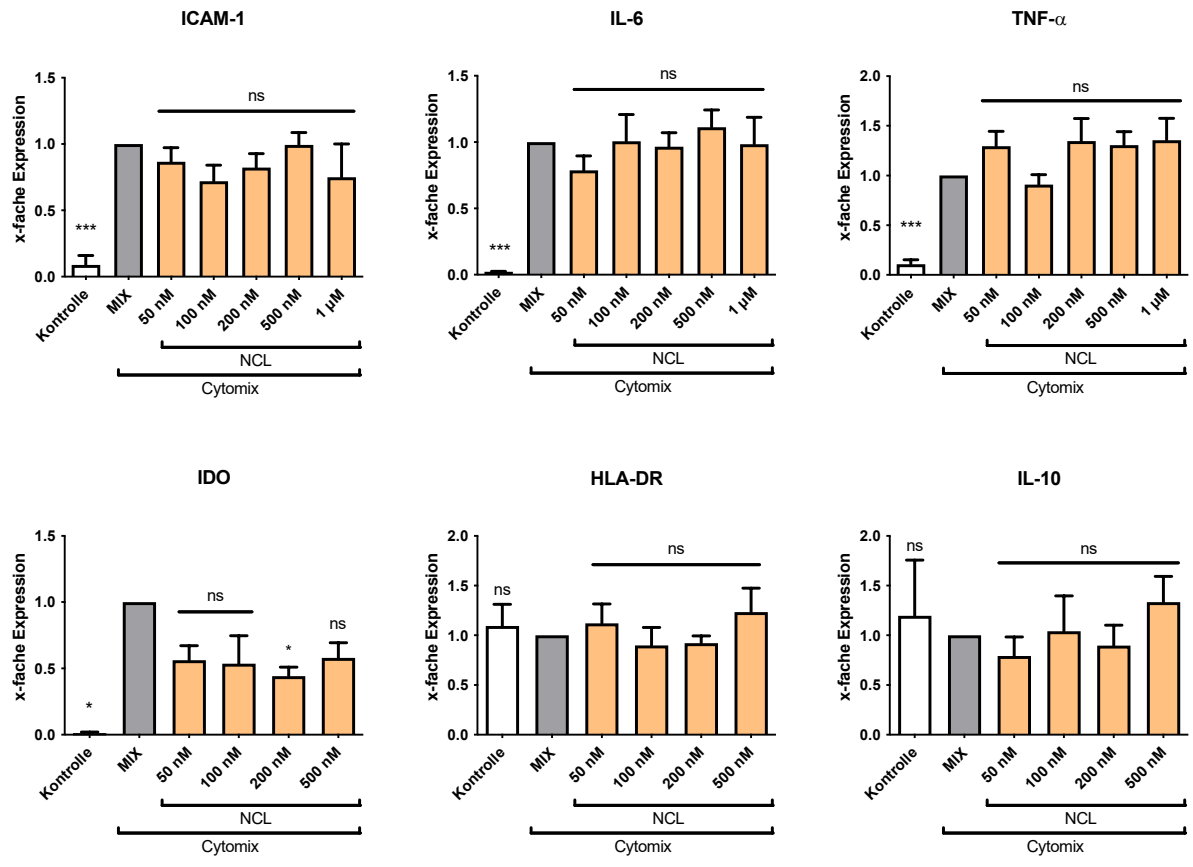


Abbildung 10 Effekte von NCL auf die mRNA-Expression von ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IDO, HLA-DR und IL-10 bei Cytomix-Stimulation von ASC. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt (n = 12). \*\*\* p = 0,0001 – 0,001; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus Cytomix. ICAM-1: Wilcoxon-Tests; IL-6: Wilcoxon-Tests; TNF- $\alpha$ : Wilcoxon-Tests; IDO: Wilcoxon-Tests; HLA-DR: Mixed-effects Analyse; IL-10: Mixed-effects Analyse.

### 6.4.3.2 Auswertung der qPCR nach Vorstimulation

Die ASC wurden für diese Versuche für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen NCL (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM und 1  $\mu$ M) bei Standardbedingungen vorbehandelt. Danach wurde zusätzlich Cytomix zu den Zellen gegeben und sie wurden parallel zu den Versuchen in Kapitel 6.4.3.1 für weitere vier Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert. Mit der qPCR wurden die Expressionsmuster von ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IDO, IL-10 und HLA-DR untersucht (Abbildung 11). Es zeigte sich, dass die Zellen sich durch Hinzugabe von Cytomix erfolgreich zur Hochregulation von ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und IDO stimulieren lassen. Eine Beeinflussung von HLA-DR und IL-10 konnte nicht beobachtet werden. Bei der IDO zeigte sich auch in der Vorstimulation

gesenkt, hier ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  NCL. Für alle weiteren Faktoren konnte für keine der verwendeten NCL-Konzentrationen eine signifikante Änderung festgestellt werden.

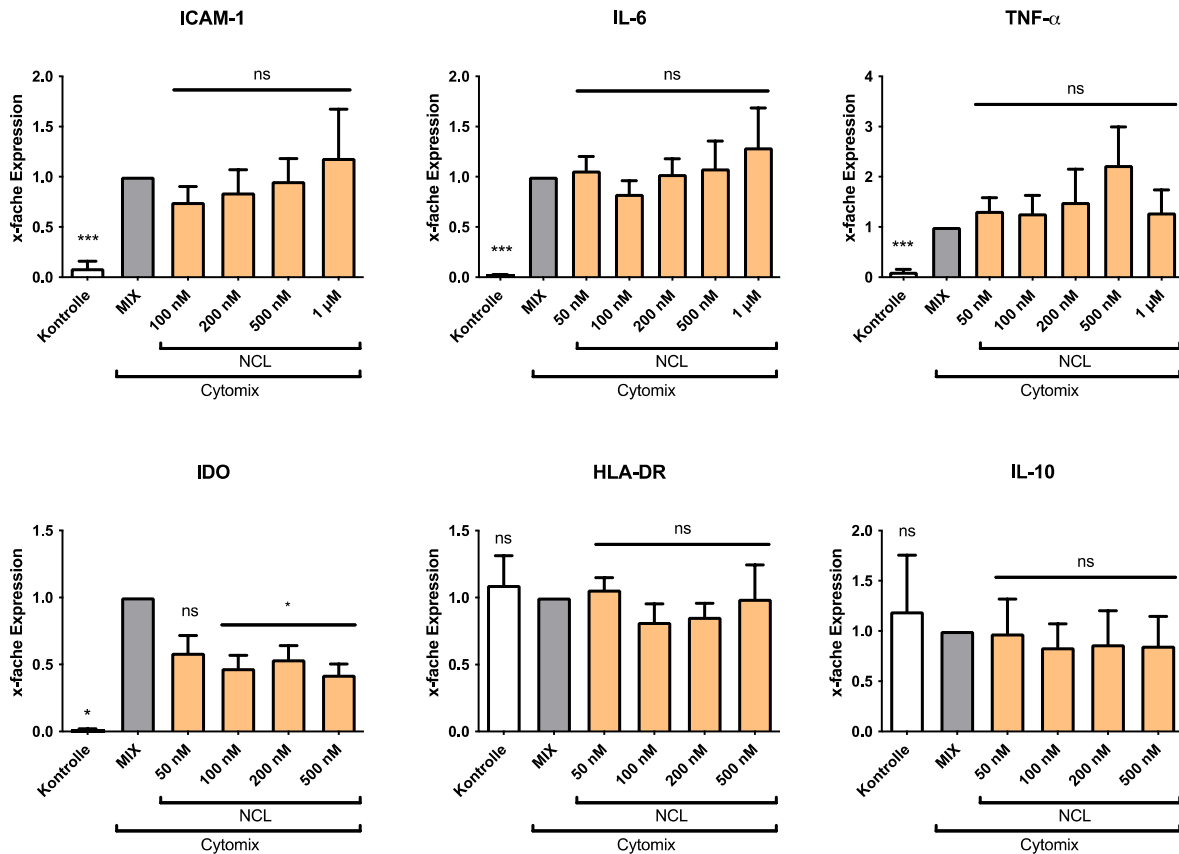


Abbildung 11 qPCR-Ergebnisse von ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IDO, HLA-DR und IL-10 nach einer einstündigen Vorstimulation mit NCL bei Cytomix-Stimulation der ASC. Nur bei IDO zeigte sich eine leicht signifikante Senkung. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt ( $n = 12$ ). \*\*\*  $p = 0,0001 - 0,001$ ; \*  $p = 0,01 - 0,05$ ; ns = nicht signifikant versus MIX. ICAM-1: Wilcoxon-Tests; IL-6: Wilcoxon-Tests; TNF- $\alpha$ : Wilcoxon-Tests; IDO: Wilcoxon-Tests; HLA-DR: Mixed-effects Analyse; IL-10: Mixed-effects Analyse.

### 6.4.3.3 ELISA

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus Kapitel 6.4.3.1 und Kapitel 6.4.3.2 wurde ein IL-6- und IL-8-ELISA durchgeführt. ASC wurden hierfür in 24-Well-Platten mit Cytomix, den Versuchsproben mit NCL und Cytomix und einer Kontrolle mit 10  $\mu\text{M}$  Dexamethason und Cytomix stimuliert. NCL wurde in den Konzentrationen 100 nM, 200 nM, 500 nM und 1  $\mu\text{M}$  hinzugegeben. Die unstimulierten Kontrollproben enthielten nahezu kein IL-6 bzw. IL-8. Die Stimulation mit Cytomix zeigte eine

hochsignifikante Stimulation der Protein-Freisetzung von IL-6 und IL-8. Es zeigte sich in der weiteren Auswertung keine statistisch signifikante Hemmung von IL-6 und IL-8 durch NCL. Dexamethason senkte im Vergleich zur Cytomix-Stimulation statistisch signifikant die Konzentration von IL-6 und IL-8 (Abbildung 12).

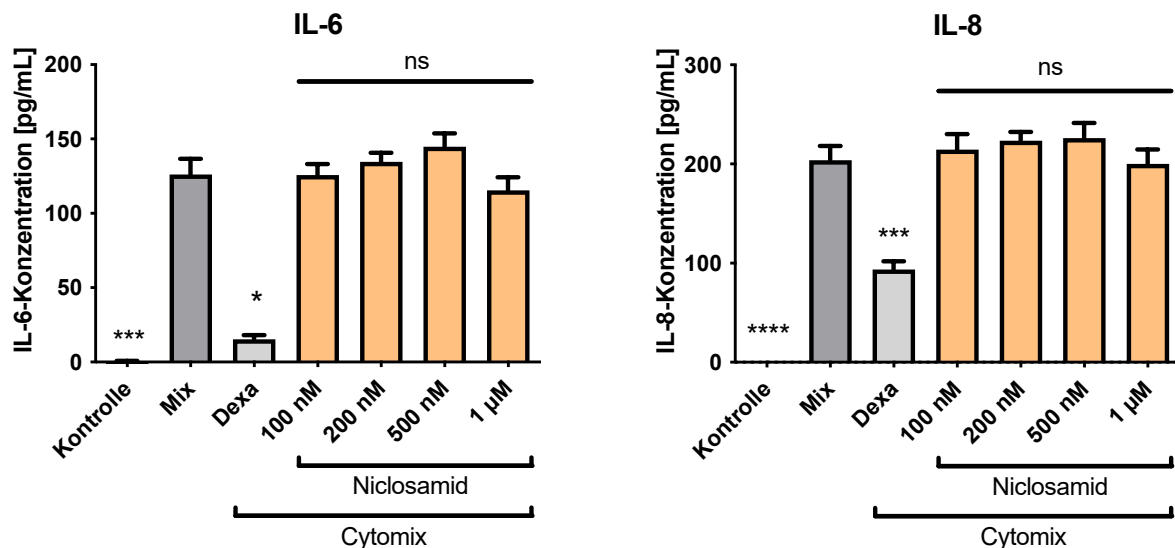


Abbildung 12 Effekte von NCL auf die Zytokine IL-6 und IL-8 bei Cytomix-Stimulation im ELISA. Während NCL keine signifikanten Effekte zeigte, konnte Dexamethason beide Interleukine signifikant hemmen. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt (n=8). \*\*\*\* p < 0,0001; \*\*\* p = 0,0001 – 0,001; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus MIX. IL-6: Friedman-Test; IL-8: RM one-way ANOVA.

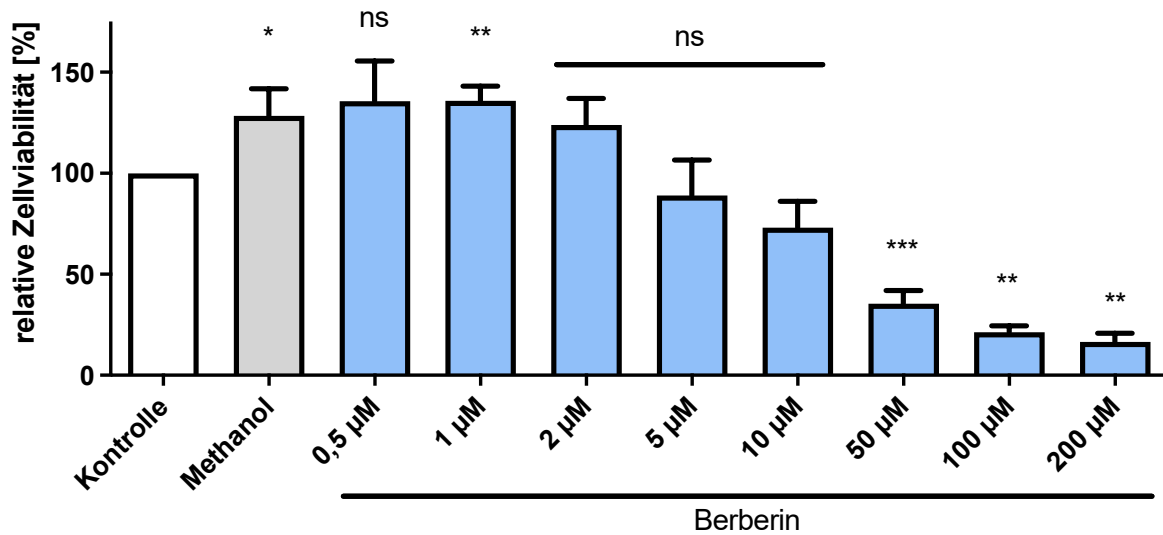
## 6.5 Berberin

### 6.5.1 Zelltoxische Konzentration

Um die optimale Arbeitskonzentration für die folgenden Experimente mit BBR zu ermitteln, wurde die zelltoxische Konzentration von BBR für ASC ermittelt. Diese Konzentration wurde mittels eines XTT- und LDH-Assays bestimmt (Abbildung 13). Für die Durchführung der Assays wurden die ASC gezählt und auf 96-Well-Platten mit je 5000 Zellen pro Well ausgesät. Die Platten wurden nach Anwachsen mit BBR stimuliert. Als Stimulationskonzentrationen wurden 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M BBR gewählt. Ebenso sollte eine zelltoxische Wirkung des Lösungsmittels Methanol (1:200) ausgeschlossen werden. Basis war DF10 als Nährmedium. Nach 48-stündiger Inkubation wurden beide Assays

durchgeführt. Es zeigte sich im XTT-Assay ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  BBR eine statistische signifikante zytotoxische Wirkung. Da in den Konzentrationen ab 5  $\mu\text{M}$  ( $88,9 \pm 17,46 \%$  (MTW  $\pm$  SEM)) aufwärts ebenso, auch wenn nicht statistisch signifikant, eine Zellminderung zu beobachten war, wurde als Arbeitskonzentration für BBR 2  $\mu\text{M}$  gewählt. Im LDH-Assay konnte zwar keine statistisch signifikante Erhöhung der LDH nachgewiesen werden, dennoch zeigte sich schon bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ( $130 \pm 28,17 \%$ ) BBR eine optische, wenn auch nicht signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung. In den niedrigen Konzentrationen konnte für NCL eine signifikante Erhöhung der Zellviabilität im XTT-Assay beobachtet werden.

## A XTT-Assay



## B LDH-Assay

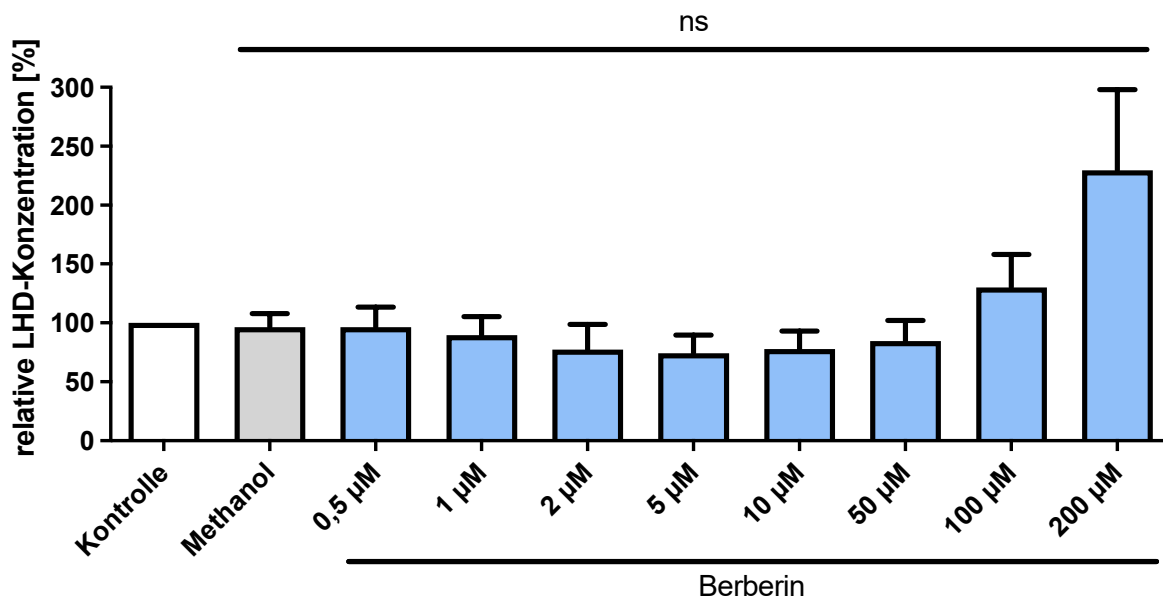


Abbildung 13 Zytotoxische Wirkung von BBR auf ASC. Dargestellt sind die Werte aus **A** XTT-Assays (n=11) und **B** LDH-Assays (n=7) als MTW ± SEM. Im XTT-Assay zeigte sich ab einer Konzentration von 50 µM BBR eine statistisch signifikante Senkung der Zellviabilität. \*\*\* p = 0,0001 – 0,001; \*\* p = 0,001 – 0,01; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus Kontrolle. XTT-Assay: Wilcoxon-Tests; LDH-Assay: Mixed-effects Analyse.

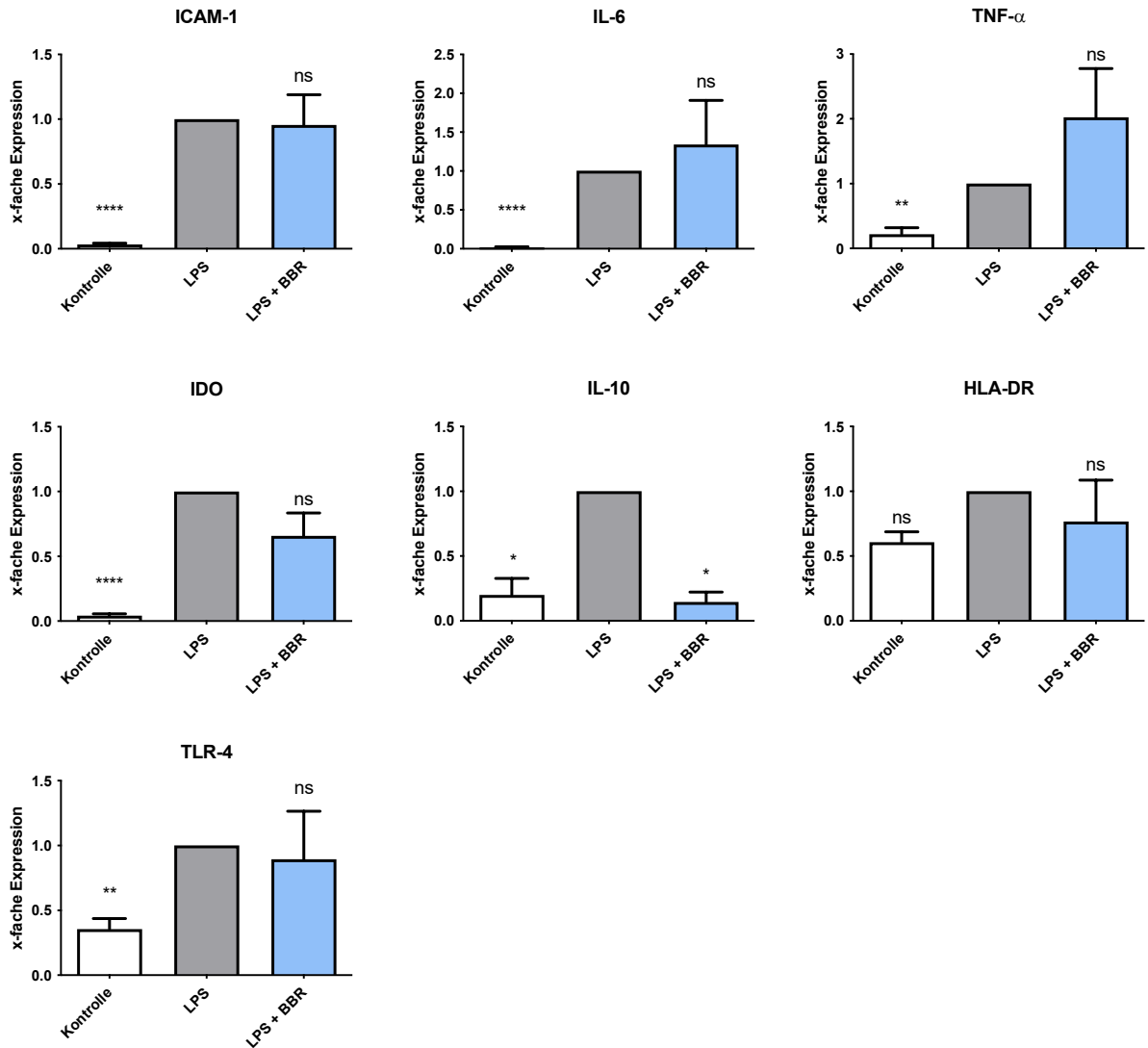
## 6.5.2 Effekte von Berberin bei Kostimulation mit LPS

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die Substanz BBR eine entzündungshemmende Wirkung auf mit LPS-stimulierte ASC hat. Untersucht wurden mRNA-Expression pro- und antiinflammatorischen Marker mittels qPCR und die Protein-Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 im ELISA.

### 6.5.2.1 qPCR

In DF10 kultivierte ASC wurden mit LPS ultrapure (100 ng/mL) und BBR (2  $\mu$ M) stimuliert und für vier Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. Als Kontrollprobe wurden ASC mit reinem DF10 inkubiert. Nach vier Stunden wurde die RNA isoliert und für die qPCR vorbereitet. Es wurde die mRNA-Expression der proinflammatorischen Marker ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4 und der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IDO sowie von HLA-DR untersucht (Abbildung 14). Nach der statistischen Auswertung zeigten die unstimulierte Kontrollen signifikant weniger ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IDO, IL-10 und TLR-4 DO als die mit LPS-stimulierten Proben enthielten. Statistisch gesehen ließ sich nur HLA-DR durch die Stimulation mit LPS nicht beeinflussen. Bei IL-10 konnte eine leicht signifikante Senkung durch BBR nachgewiesen werden. Für alle restlichen Marker ergab sich in der statistischen Auswertung kein signifikanter Effekt durch BBR im Vergleich mit den LPS-stimulierten Proben.





**Abbildung 14 Relative Expressionen von IL-6, ICAM-1, TNF-α, IDO, TLR-4, IL-10 und HLA-DR in der qPCR nach Stimulation mit BBR und LPS.** Bei IL-10 zeigte sich durch BBR eine leicht signifikante Senkung, alle restlichen Marker blieben durch BBR unbeeinflusst. Dargestellt sind die Daten als MTW ± SEM (n=4). \*\*\*\* p < 0,0001; \*\* p = 0,001 – 0,01; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus LPS. Alle Marker: RM one-way ANOVA.

### 6.5.2.2 ELISA

Es wurde ein IL-6- und ein IL-8-ELISA durchgeführt, um die qPCR-Ergebnisse zu validieren (Abbildung 15). Hierfür wurden ASC mit 100 ng/mL LPS ultrapure und die Versuchssprobe zusätzlich 2 µM BBR stimuliert. Als Vergleichssprobe wurde eine Stimulation mit 10 µM Dexamethason und LPS verwendet. Die Kontrollprobe blieb unstimuliert. In der statistischen Auswertung zeigte sich, dass die unstimulierten

Proben eine statistisch signifikant niedrigere Konzentration der untersuchten Zytokine enthielten als die mit LPS stimulierten. Das im hier Fokus stehende BBR konnte hingegen keine signifikante Senkung der IL-6- und IL-8-Konzentrationen hervorrufen. Die Dexamethason-Kontrolle senkte andererseits die Sekretion von IL-6 und IL-8 signifikant. IL-6 wurde in der Dexamethasonprobe mit einer Konzentration von  $0,63 \pm 0,11$  pg/ml (MTW  $\pm$  SEM) nachgewiesen, IL-8 mit  $0,43 \pm 0,18$  pg/mL (MTW  $\pm$  SEM). Die LPS-stimulierten ASC enthielten im Vergleich dazu  $1,74 \pm 0,38$  pg/mL (MTW  $\pm$  SEM) IL-6 und  $2,83 \pm 0,84$  pg/mL (MTW  $\pm$  SEM) IL-8.

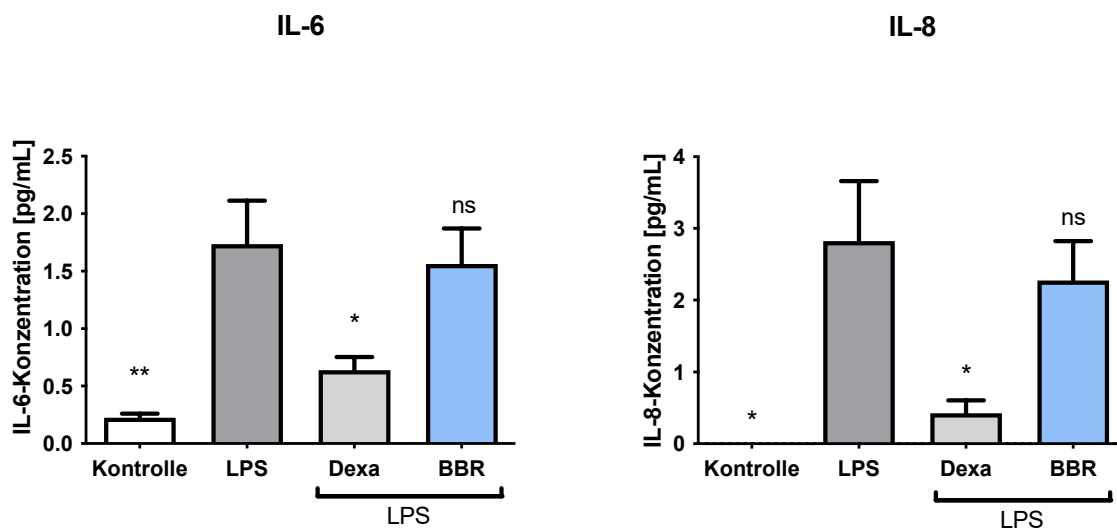


Abbildung 15 Effekte von BBR auf die Zytokine IL-6 und IL-8 bei LPS-Stimulation von ASC im ELISA. BBR senkte die Zytokine nicht signifikant, Dexamethason schon. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt (n=8). \*\* p = 0,001 – 0,01; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus LPS. IL-6 und IL-8: RM one-way ANOVA.

### 6.5.3 Effekte von Berberin bei Kostimulation mit Cytomix

Parallel zu den Versuchen in Kapitel 6.5.2 wurden hierfür ASC mit Cytomix sowie BBR (2  $\mu$ M) stimuliert. Untersucht wurden mittels qPCR die mRNA-Expression der Marker ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4, IL-10,IDO sowie HLA-DR. Ebenso wurde mittels ELISAs für die Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 in das Zellkulturmedium bestimmt.

### 6.5.3.1 qPCR

Für diese Versuche wurden ASC mit Cytomix und BBR (2  $\mu$ M) stimuliert. Zum Vergleich wurden eine unstimulierte und eine nur mit Cytomix stimulierte Probe inkubiert. Nach vier Stunden wurde die Stimulation beendet und die RNA isoliert. Mit einer qPCR wurden die proinflammatorischen Marker ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und TLR-4 untersucht, genauso wie die antiinflammatorischen Marker IL-10 und IDO und HLA-DR (Abbildung 16). Die statistische Auswertung ergab, dass die unstimulierten Proben statistisch signifikant weniger ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und IDO als die reinen Cytomix-Proben enthielten. Bei TLR-4 könnte man den Unterschied ebenso vermuten, auch wenn er keine statistische Signifikanz aufwies. Keinen wesentlichen Unterschied zwischen den unstimulierten und mit Cytomix-stimulierten Proben sah man hingegen bei IL-10 und HLA-DR. Ebenso zeigte keine der untersuchten Proben mit BBR und Cytomix einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Cytomix-Stimulationen. Eine geringe Senkung von IL-6, IL-10 und HLA-DR könnte vermutet werden.

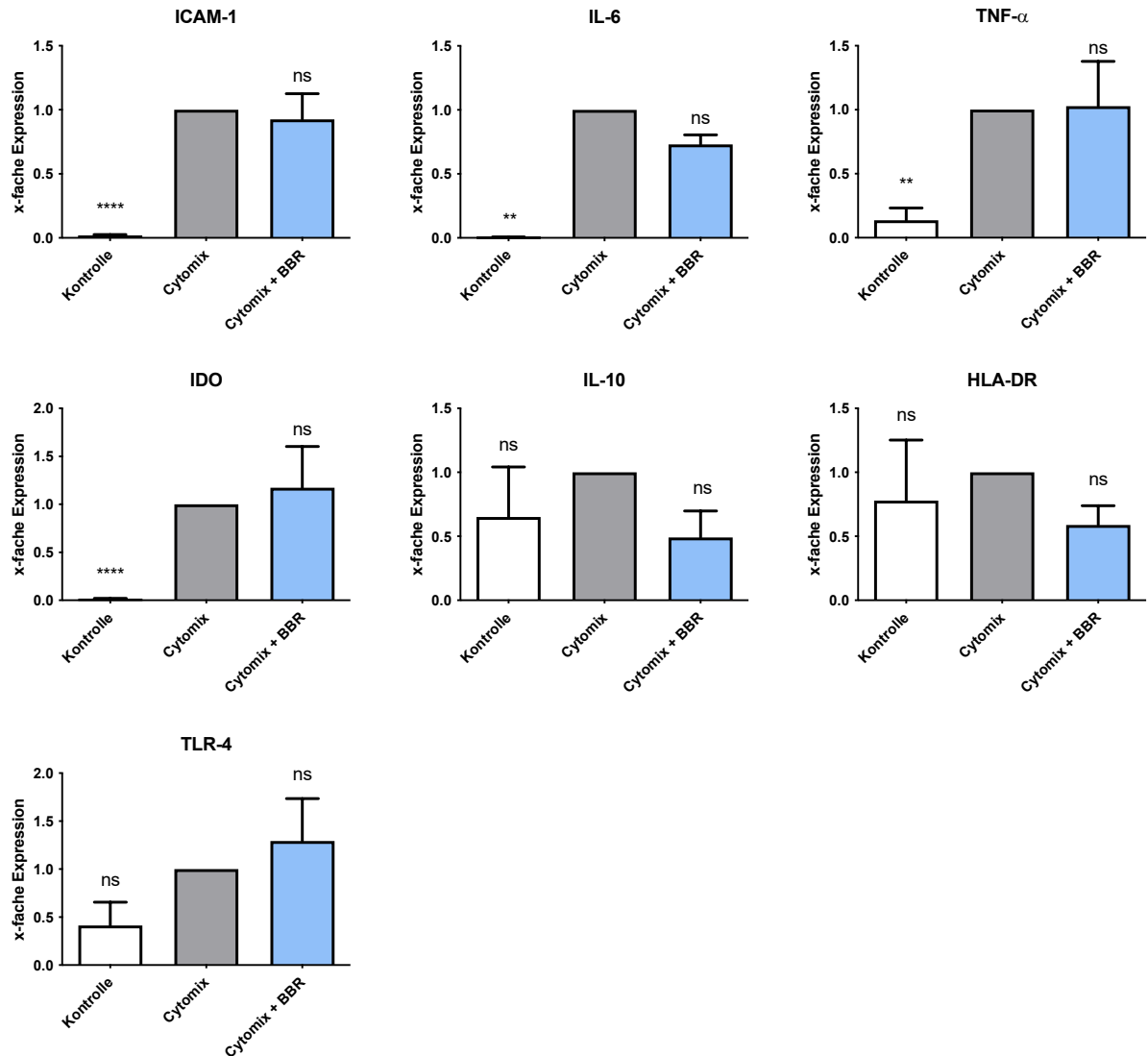
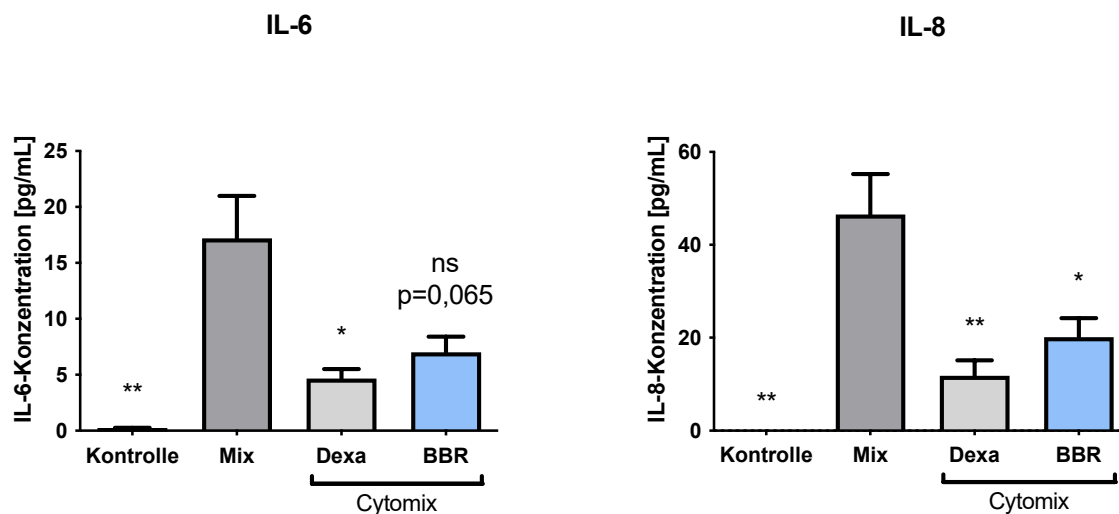


Abbildung 16 Effekte von BBR bei den in der qPCR untersuchten Markern ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4, IL-10, IDO und HLA-DR bei mit Cytomix stimulierten ASC. BBR schien keinen der untersuchten Marker zu beeinflussen. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt, n=4. \*\* p = 0,001 – 0,01; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus Cytomix, ICAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-10, IDO: RM one-way ANOVA; IL-6, TLR-4: Friedman-Test.

### 6.5.3.2 ELISA

Für diesen Versuch wurden ASC mit Cytomix stimuliert. Die Versuchsprobe enthielt zusätzlich 2  $\mu$ M BBR. Zur einer Vergleichsprobe wurde zusätzlich zum Cytomix 10  $\mu$ M Dexamethason hinzugegeben. Ebenso wurden eine Probe mit DF10 zum Vergleich inkubiert. Die Zellen wurden für 48 Stunden stimuliert. Es wurden die IL-6- und die IL-8-Konzentrationen mittels ELISA ermittelt (Abbildung 17). Es zeigte sich in der statistischen Auswertung eine erfolgreiche Erhöhung von IL-6 und IL-8 in

den Cytomixproben im Vergleich zu den unstimulierten Proben. In der Versuchssprobe mit BBR konnte eine signifikante Senkung der IL-8-Konzentration ( $20,1 \pm 4,15$  pg/mL) im Vergleich zur Stimulation mit Cytomix ( $46,54 \pm 8,68$  pg/mL) nachgewiesen werden. Die Hemmung von IL-6 ( $7,01 \pm 1,39$  pg/mL) unter BBR im Vergleich zum Cytomix ( $17,19 \pm 3,81$  pg/mL) zeigte sich nicht signifikant, dennoch könnte man eine Hemmung durch BBR vermuten ( $p=0,065$ ). Auch die Positivkontrollen mit Dexamethason zeigten eine signifikante Senkung beider untersuchten Zytokine (IL-6:  $4,65 \pm 0,86$ ; IL-8:  $11,84 \pm 3,29$  pg/mL).



**Abbildung 17 Effekte von BBR auf die IL6- und IL8-Konzentration bei Stimulation mit Cytomix im ELISA.** BBR senkte die IL-8 Konzentration signifikant, bei IL-6 könnte ebenso eine Senkung vermutet werden. Dargestellt sind Daten aus ELISAs (n=8) als MTW  $\pm$  SEM. \*\*  $p = 0,001 - 0,01$ ; \*  $p = 0,01 - 0,05$ ; ns = nicht signifikant versus Cytomix. IL-6 und IL-8: RM one-way ANOVA.

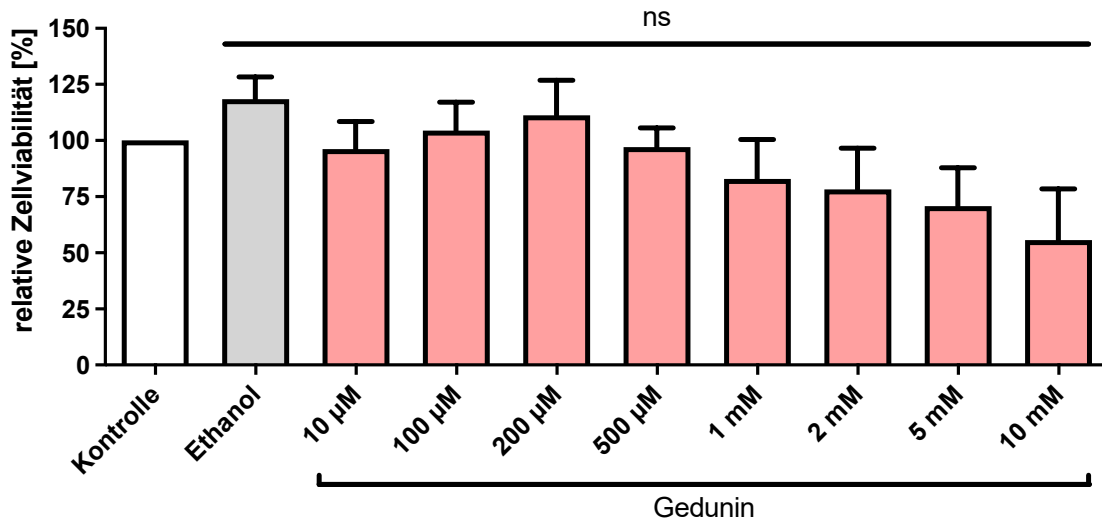
## 6.6 Gedunin

### 6.6.1 Zelltoxische Konzentration

Um eine Arbeitskonzentration für die Stimulationen mit GED zu ermitteln, wurde mittels XTT- und LDH-Assay die zytotoxische Konzentration bestimmt (Abbildung 18). 5000 ASC wurden pro Loch in 96-Loch-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit GED in den Konzentrationen 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 2 mM, 5 mM und 10 mM stimuliert. Die Stimulation wurde nach 48 Stunden beendet und mittels XTT- und LDH-Assay ausgewertet. In der statistischen Auswertung konnte

weder im XTT- noch im LDH-Assay eine signifikante zelltoxische Schwelle festgestellt werden. Da jedoch im XTT-Assay ab einer Konzentration von 1 mM ( $83 \pm 7,44$  %) eine leichte Zellminderung in den Löchern zu sehen war, wurde für alle nachfolgenden Versuche mit GED eine Arbeitskonzentration von 200  $\mu$ M gewählt. Auch die LDH schien, wenn auch nicht signifikant, bei einer Konzentration von 10 mM ( $134 \pm 28,47$  %) erhöht.

## A XTT-Assay



## B LDH-Assay

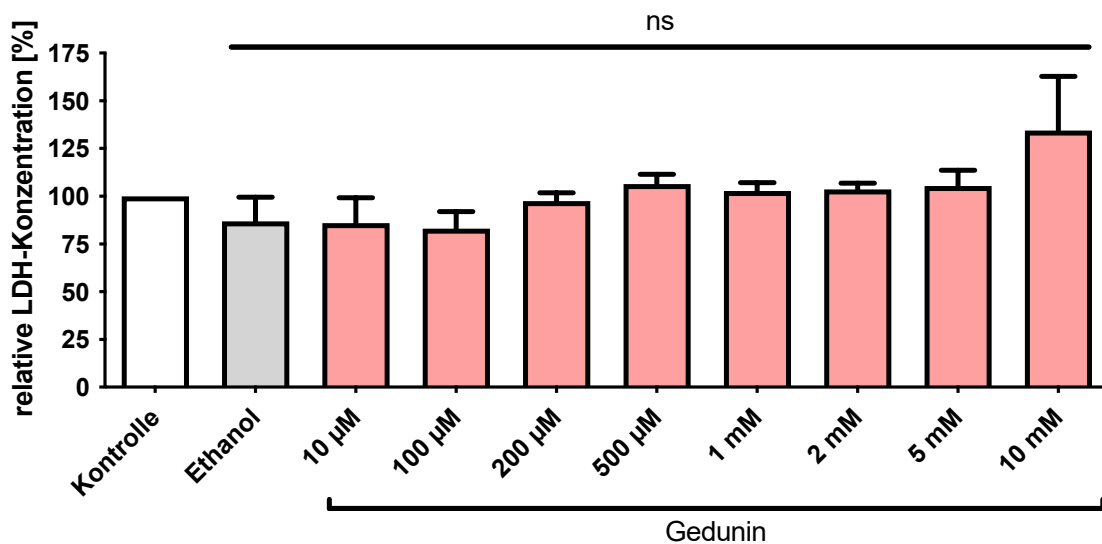


Abbildung 18 Zytotoxische Effekte von GED auf ASC. Dargestellt werden in **A** Daten aus XTT-Assays ( $n=14$ ), in **B** aus LDH-Assays ( $n=9$ ). Ethanol wurde in der Verdünnung 1:4000 verwendet. Es zeigte sich keine signifikante Zytotoxizität durch GED. Jedoch schien die Viabilität ab 1 mM reduziert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler gezeigt. MTW  $\pm$  SEM. ns = nicht signifikant versus Kontrolle. XTT: Wilcoxon-Tests; LDH: Mixed-effects Analyse.

## 6.6.2 Effekte von Gedunin bei Kostimulation mit LPS

Ziel dieser der nachfolgend beschriebenen Versuche war es, zu untersuchen, ob GED in der Lage ist, bei mit LPS-stimulierten ASC proinflammatorische Zytokine zu senken und antiinflammatorische zu erhöhen. Verglichen wurden die Versuchsproben immer einer Stimulation mit LPS ohne weiteren Zusatz. Untersucht wurden ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4, IL-10, IDO und HLA-DR-mRNAs in der qPCR. Mittels eines ELISAs wurde die Protein-Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 überprüft.

### 6.6.2.1 qPCR

Für die Untersuchung mit der qPCR wurden HLA-DR, die proinflammatorischen Marker ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4 gewählt, sowie die antiinflammatorischen Marker IL-10 und IDO ausgewählt. ASC wurden hierfür über vier Stunden bei Standardbedingungen mit LPS ultrapure 100 ng/mL inkubiert. Die Versuchsprobe enthielt zusätzlich 200  $\mu$ M GED. Zum Vergleich wurde noch eine unstimulierte Probe inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Stimulation beendet, die RNA isoliert und für die qPCR vorbereitet. Die Auswertung ergab eine statistisch erfolgreiche Stimulation der ASC durch LPS bei ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IDO, IL-10 und TLR-4 (Abbildung 19). Lediglich bei IL-10 zeigte sich in der mit GED inkubierten Probe eine signifikante Senkung zur Probe mit LPS. Ansonsten zeigte kein weiterer untersuchter Marker eine statistisch signifikante Änderung durch GED.



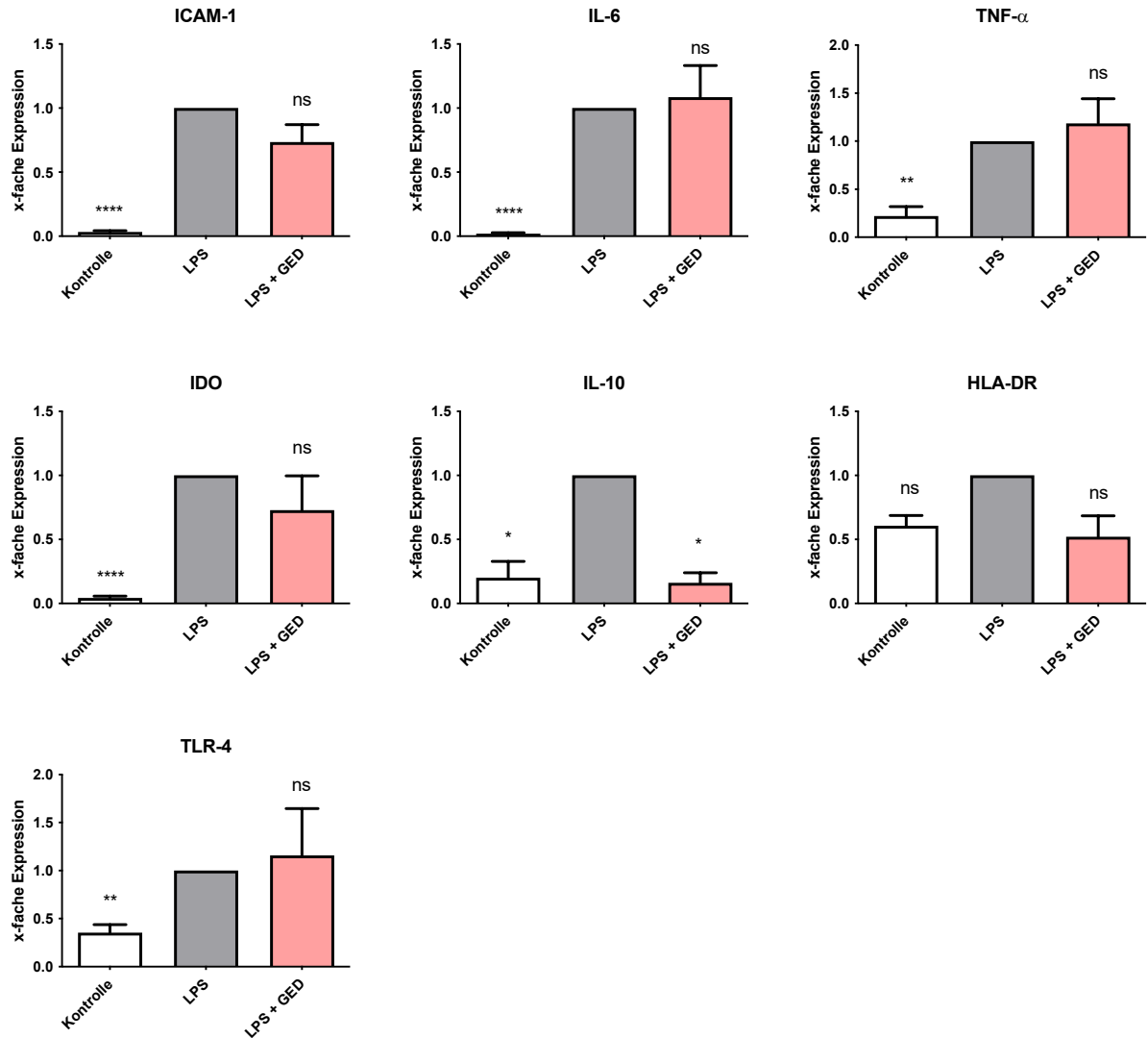
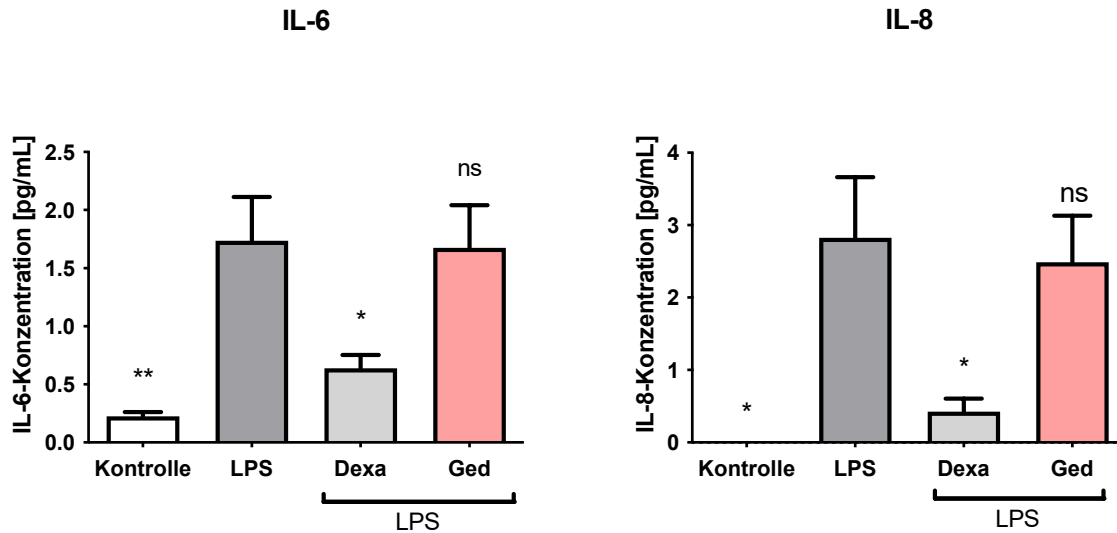


Abbildung 19 Effekte von GED bei den in der qPCR untersuchten Markern ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4, IL-10, IDO und HLA-DR von ASC nach LPS-Stimulation. Bei IL-10 zeigte sich eine signifikante Senkung durch GED, auf alle weiteren Marker schien GED keine Wirkung zu zeigen. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt (n = 4). \*\* p = 0,001 – 0,01; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus LPS, alle Marker: RM one-way ANOVA.

### 6.6.2.2 ELISA

Die Zytokinkonzentrationen von IL-6 und IL-8 wurden mittels ELISA ermittelt. ASC wurden mit LPS stimuliert. In der Versuchsprobe wurde zusätzliche GED mit der Konzentration 200  $\mu$ M hinzugegeben. In der Positivkontrolle wurde dem LPS 10  $\mu$ M Dexamethason zugegeben. Eine Probe wurde mit reinem DF10 inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Stimulation beendet und die ELISAs wurden durchgeführt. In der statistischen Auswertung (Abbildung 20) konnte keine statistisch signifikante

Hemmung der IL-6-Konzentration (LPS:  $1,74 \pm 0,38$ ; GED:  $1,68 \pm 0,37$  pg/mL) und der IL-8-Konzentration (LPS:  $2,83 \pm 0,84$ ; GED:  $2,49 \pm 0,64$  pg/mL) durch GED nachgewiesen werden. Das Dexamethason der Vergleichsprobe erzeugte sowohl bei IL-6 ( $0,64 \pm 0,11$  pg/mL) als auch für das Zytokin IL-8 ( $0,43 \pm 0,18$  pg/mL) eine statistisch signifikante Senkung.



**Abbildung 20** Effekte von Dexamethason und GED auf die IL6- und IL8-Sekretion nach LPS-Stimulation. Die Konzentrationen wurden mit eines ELISAs ermittelt. Dexamethason konnte beide Zytokine signifikant senken, während durch GED keine signifikante Senkung zu beobachten war. Dargestellt sind Daten aus acht Experimenten als MTW  $\pm$  SEM. \*\*  $p = 0,001 - 0,01$ ; \*  $p = 0,01 - 0,05$ ; ns = nicht signifikant versus LPS, IL-6 und IL-8: RM one-way ANOVA.

### 6.6.3 Effekte von Gedunin bei Kostimulation mit Cytomix

Um festzustellen, ob GED eine Wirkung auf ASC, die mit Cytomix stimuliert wurden hat, wurden diverse Marker (ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4, IL-10,IDO und HLA-DR) mittels qPCR untersucht. Ebenso wurde mit ELISAs die Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 bewertet.

#### 6.6.3.1 qPCR

Wie bereits bei den mit LPS stimulierten ASC (siehe Kapitel 6.6.2.1) wurden auch bei diesen Versuchen in der qPCR die mRNA-Expressionen von ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4, IL-10,IDO sowie HLA-DR durch mit Cytomix stimulierte ASC betrachtet.

Die Proben wurden mit Cytomix stimuliert, die Versuchsprobe enthielt zusätzlich 200  $\mu\text{M}$  GED. Als Kontrolle wurde eine Probe mit DF10 inkubiert. Nach vierstündiger Stimulation wurde die RNA isoliert und für die qPCR vorbereitet. Die statistische Auswertung (Abbildung 21) zeigte eine erfolgreiche Stimulation durch den Cytomix. Eine signifikant erhöhte Expression von ICAM-1, TNF- $\alpha$  und IDO wurde gezeigt. Für die Expression von IL-6 könnte derselbe Effekt vermutet werden, auch wenn sich keine Signifikanz darstellte ( $p=0,068$ ). Einen signifikanten, antiinflammatorischen Effekt von GED konnte allerdings für keinen der untersuchten Marker nachgewiesen werden. Das Zytokin IL-10 war auch hier tendenziell gesenkt als weiter erhöht.

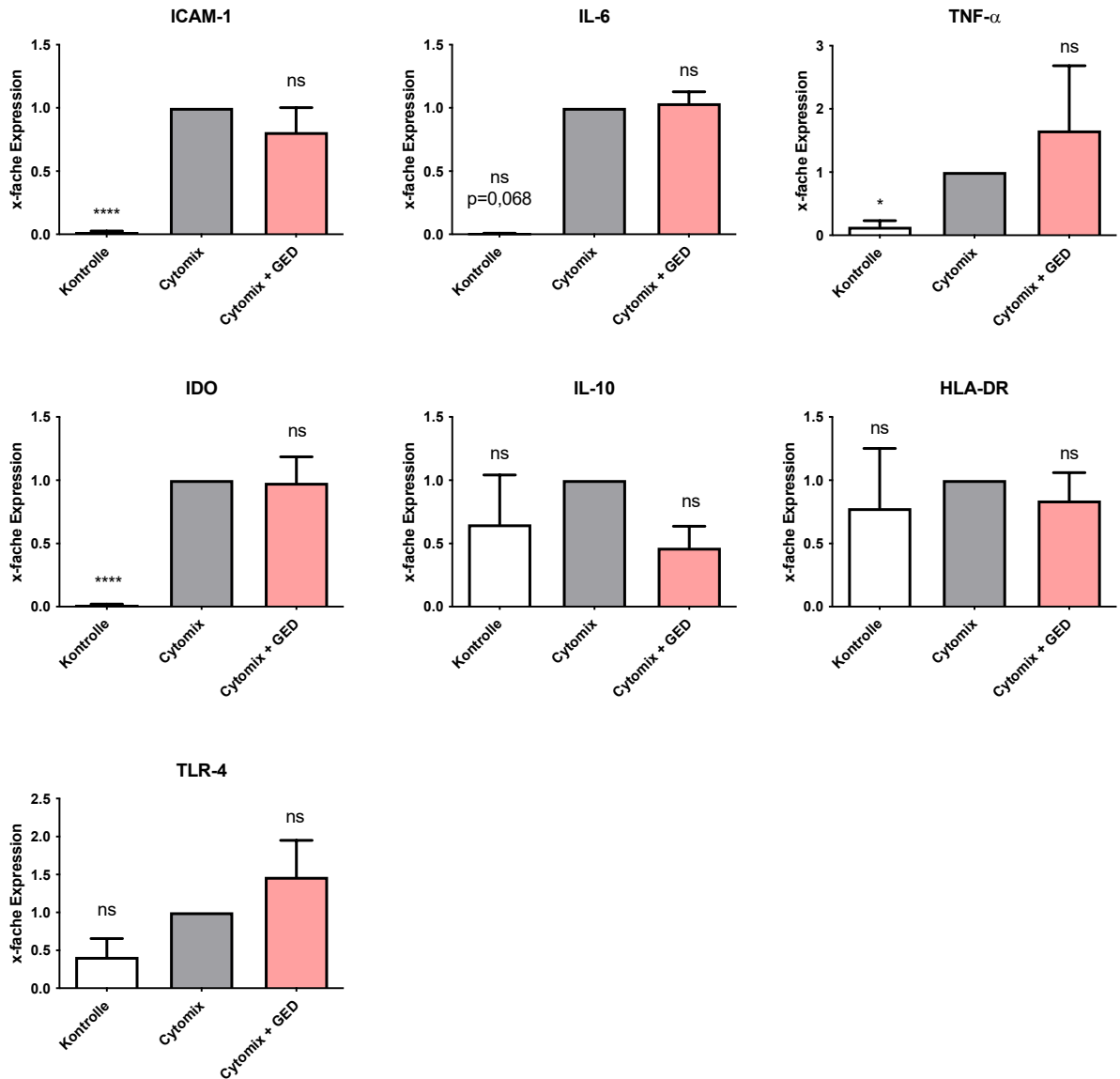
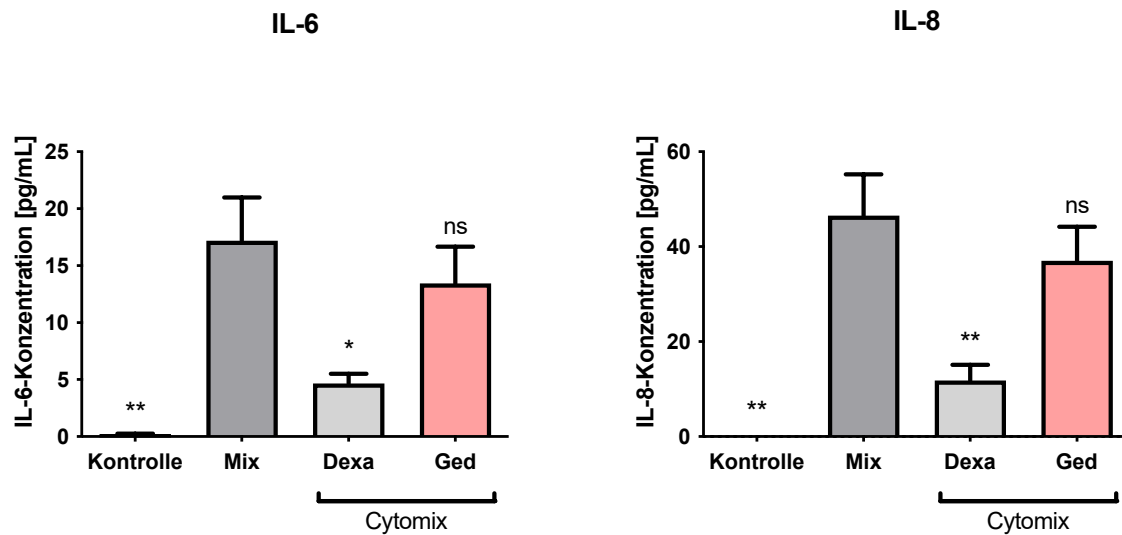


Abbildung 21 Effekte von GED bei den in der qPCR untersuchten Markern ICAM-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4, IL-10, IDO und HLA-DR bei mit Cytomix stimulierten ASC. Die Ergebnisse sind als MTW  $\pm$  SEM dargestellt (n = 4). \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus Cytomix, ICAM-1, IDO, IL-10, HLA-DR: RM one-way ANOVA; IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4: Friedman-Test.

### 6.6.3.2 ELISA

Wie in den vorigen ELISAs wurde auch der Einfluss von GED auf die mit Cytomix stimulierten ASC im IL-6- und IL-8-ELISA bestimmt. Die ASC wurden mit der Cytomix-Mischung stimuliert. Die Versuchsproben enthielten zusätzlich 200  $\mu$ M GED. Eine Vergleichsprobe enthielt Cytomix mit 10  $\mu$ M Dexamethason. In der statistischen Auswertung zeigte sich keine signifikante Senkung der bestimmten

Zytokinkonzentrationen im Zellkulturmedium (Abbildung 22). Ein leichter, nicht-signifikanter Einfluss von GED könnte jedoch vermutet werden, da IL-8 in der Versuchsprobe (MTW  $37 \pm 7,19$  pg/mL) im Vergleich zur Cytomixprobe ( $46,54 \pm 8,68$  pg/mL) reduziert wurde. Auch IL-6 ist von  $17,19 \pm 3,81$  auf  $13,44 \pm 3,22$  pg/mL durch GED gesenkt worden. Das Dexamethason senkte die untersuchten Zytokine IL-6 ( $4,56 \pm 0,86$ ) und IL-8 ( $11,84 \pm 3,29$ ) signifikant.



**Abbildung 22** Effekte von Dexamethason und GED auf die IL-6- und IL-8-Konzentration bei mit Cytomix stimulierten ACS. Die Konzentrationen wurden mit eines ELISAs ermittelt. Dexamethason konnte beide Zytokine signifikant senken, während durch GED keine signifikante Senkung zu beobachten war. Es handelt sich um Daten aus Versuchen dargestellt als MTW  $\pm$  SEM (n = 8). \*\* p = 0,001 – 0,01; \* p = 0,01 – 0,05; ns = nicht signifikant versus Mix, IL-6 und IL-8: RM one-way ANOVA.

## 7 Diskussion

Als vielversprechende Therapeutika bei diversen entzündlichen Erkrankungen wie der Sepsis, RA, GvHD, aber auch einigen Nierenerkrankungen werden MSC in aktuellen Studien untersucht.<sup>6,31,89,90</sup> Die Reduktion der oft erhöhten proinflammatorischen Zytokine ist therapeutisch für die Heilung diverser Erkrankungen wichtig.<sup>91</sup> Da jedoch in der Anwendung bisher noch eine unzureichende Wirkung und wenige unerwünschte Effekte beobachtet worden sind<sup>40</sup>, stellt sich die Frage, wie man die Wirkungen von transplantierten MSC beeinflussen kann. Das Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob sich ASC durch ausgewählte und vielversprechende Substanzen in ihrer proinflammatorischen Entzündungsantwort auf inflammatorische Stimuli hemmen lassen. Betrachtet worden sind das Medikament NCL, welches sich als bereits zugelassenes Medikament besonders anbietet,<sup>66–68</sup> das Isochinolinalkaloid BBR, das schon seit Jahrtausenden in der Traditionellen Chinesischen Medizin Verwendung findet,<sup>77</sup> und das bisher noch am wenigsten erforschte Limonoid GED.<sup>85</sup> Während für alle drei Substanzen bereits Daten zu entzündungshemmenden Eigenschaften an diversen Zellarten vorliegen,<sup>71,73–75,79–81,87,88,92</sup> gibt es bisher noch keine Forschungsergebnisse, die eine Wirkung der Substanzen auf entzündlich stimulierte MSC untersuchen.

### 7.1 Verwendung und Stimulation von ASC

MSC lassen sich aus diversen Geweben isolieren.<sup>1</sup> Auch wenn MSC aus verschiedenen Geweben grundlegend die gleichen Eigenschaften aufweisen, zeigen sich dennoch Unterschiede in der Wirkung zwischen verschiedenen Populationen.<sup>6,13,14,17,20</sup> Für diese Arbeit sind aus Fettgewebe gewonnene MSC verwendet worden. ASC sind im Vergleich zu BM-ASC beispielsweise weniger immunogen und zeigen einen stabileren therapeutischen Effekt.<sup>13,17</sup> Auch isolierte ASC bestehen aus Subpopulationen, die sich von Mensch zu Mensch unterscheiden können.<sup>20</sup> Bisher ist noch nicht abschließend erforscht, wie viele Subgruppen es gibt und welche Eigenschaften diese genau haben. Bereits die Kultivierung der MSC scheint einen Einfluss auf Expression der Oberflächenmarker zu nehmen und die

MSC somit zu verändern.<sup>20</sup> Dementsprechend könnte auch die zelluläre Antwort von ASC je nach Passage variieren. In dieser Arbeit wurden ASC in den Passagen 1 und aufwärts verwendet. Bei der Auswertung der Daten fallen eher höhere Standardabweichungen trotz oft vielfacher Versuchswiederholungen auf. Einen Grund dafür bietet die Heterogenität aufgrund stark variierender Subpopulationen. Auch lässt sich nicht sagen, ob ASC verschiedener Passagen unterschiedlich auf die Substanzen reagiert haben. Daher könnte es hilfreich sein, in zukünftigen Experimenten sich auf die Verwendung einer einzelnen Passage zu beschränken. Zudem sollte noch weitere Erforschung der Subpopulationen und ihrer Unterschiede erfolgen, um die Zell-Heterogenität in den Versuchen mit ASC zu beschränken und bessere Aussagen über die therapeutische Effizienz zu treffen.

## 7.2 Stimulation der ASC

Ein grundlegendes Ziel einer in vitro Vorbehandlung von ASC ist, die klinische Anwendbarkeit zu verbessern.<sup>46</sup> Daher sind hier verschiedene Substanzen an entzündlich stimulierten ASC untersucht worden. Ein Problem in der Anwendung von MSC am Menschen ist das eingeschränkte Überleben der Zellen nach Zell-Transplantation.<sup>7,25</sup> Neben Hypoxie<sup>46</sup> schickt auch eine hohe Konzentration an Entzündungsmediatoren die MSC in die Apoptose.<sup>7,10</sup> Zudem lässt sich bisher nicht vorhersagen, ob MSC anti- oder doch proinflammatorisch reagieren.<sup>93</sup> Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es eine MSC-Subgruppe gibt, die proinflammatorisch wirkt: durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  ruft die CD317-positive MSC-Subgruppe in einem Hautmodell Gewebeschäden hervor, die CD317-negative hingegen nicht.<sup>93</sup> Wie viele weitere Subgruppen es gibt und wie diese wirken, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht.

### 7.2.1 Modifikation

Die Idee, MSC durch diverse Substanzen in vitro zu modifizieren, ist nicht komplett neu: In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise die Wirkung der Vorbehandlung mit Zolendronsäure auf MSC untersucht.<sup>94</sup> Eine Vorbehandlung führt zu einer gesteigerten Proliferation, sowie einer vermehrten osteogenen

Differenzierung der MSC. Von den Autoren wird ein dosisabhängiger Effekt der Zoledronsäure beschrieben: Eine hohe Konzentration an Zoledronsäure ruft eine entgegengesetzte Reaktion zu einer niedrigen hervor.<sup>94</sup> In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene nicht zelltoxische Konzentrationen von NCL untersucht worden. Hierbei zeigen sich keine konzentrationsabhängigen Änderungen. Bei BBR und GED ist hingegen nur eine nicht zytotoxische Konzentration ermittelt und verwendet worden. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Änderung der verwendeten Substanzkonzentrationen die Reaktion der ASC beeinflusst. Insbesondere für BBR sollte in Zukunft überprüft werden, ob eine andere Konzentration veränderte Ergebnisse erzielt. Die Ermittlung der zytotoxischen Schwelle bei GED hat sich als schwierig gestaltet. Daher sollte in zukünftigen Experimenten geklärt werden, ob die Dosis zu niedrig angesetzt worden ist.

Nicht nur mit Zoledronsäure<sup>94</sup> sind MSC vorbehandelt worden, auch weitere Arbeiten, betrachten eine Vorbehandlung mit einem Medikament oder einer ähnlichen Substanz.<sup>10,46,94-97</sup> Oft liegt der Fokus der Arbeiten auf dem Überleben und der Differenzierungsfähigkeit der MSC, teilweise werden auch sehr spezifische Effekte getestet.<sup>46,94,97</sup> Einige Arbeiten beschäftigen sich aber auch mit der Beeinflussung der immunregulatorischen Eigenschaften durch Vorbehandlung.<sup>10,95,96</sup> So ist bei einer Vorbehandlung mit Angiotensin II nachgewiesen worden, dass Angiotensin II Einfluss auf die parakrine Sekretion der MSC nimmt.<sup>96</sup> Eine Vorbehandlung mit Astragalosid IV kann die Expression des TLR4-Rezeptors der MSC hemmen.<sup>95</sup> Auch niedermolekulare Verbindungen verbessern bereits in vitro die immunregulatorischen Eigenschaften von MSCs.<sup>98</sup> Im Rattenmodell zeigte sich, dass eine Behandlung der MSC mit *Atractylodes macrocephala*-Polysaccharid nicht nur das Anwachsen am Entzündungsort beeinflusst, sondern auch positive Auswirkungen auf die Zytokinexpression der transplantierten MSCs erzielt.<sup>99</sup> Die Modifizierung durch ein Medikament oder einer anderen Substanz ist also grundlegend möglich. Dies bestätigt sich auch in dieser Arbeit bei der Behandlung mit BBR. Wichtig zu erwähnen ist, dass es sich bei der erwähnten Literatur meistens um Vorbehandlungen handelt, sodass man in zukünftigen Experimenten klären



muss, ob eine Gabe von BBR vor dem entzündlichen Stimulus stärkere Ergebnisse liefert. Gleiches gilt für GED. Bei NCL hat eine einstündige Vorbehandlung stattgefunden, die keinen Unterschied zu den Proben, die direkt mit NCL und entzündlichem Stimulus behandelt worden sind, zeigt. Auch bisher nur wenig erforscht ist die Kombinationen mit einem entzündlichen Stimulus, wie LPS oder Cytomix. Besonders interessant erscheint hier jedoch die Arbeit von Wang et al., die eine antiinflammatorische Wirkung von N-Acetylcystein (NAC) auf LPS-stimulierte MSC nachweist.<sup>10</sup> So kann die Vorbehandlung mit NAC die Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 der MSC senken.<sup>10</sup> Svensson et al. zeigen, dass MSC, die durch LPS stimuliert und gleichzeitig mit Pyrophosphat behandelt werden, das Überleben und die osteogene Differenzierung der MSC steigern.<sup>97</sup> Auch diese Arbeit zeigt, dass durch die Substanz BBR der entzündliche Stimulus (LPS oder Cytomix) teilweise antagonisiert werden kann.

### 7.2.2 Ergebnisse der entzündlichen Stimulation

Die entzündliche Stimulation durch LPS und Cytomix zeigt sich in dieser Arbeit erfolgreich und stimmt überwiegend mit den bisher bekannten Ergebnissen aus der Literatur überein. Sowohl durch den Cytomix als auch durch LPS wird die IL-6-mRNA-Expression angeregt. Es ist nachgewiesen, dass bereits isolierte und kultivierte MSC IL-6 exprimieren und sezernieren.<sup>14,18,23,100</sup> Diese Expression wird aber durch eine proentzündliche Mikroumgebung weiter verstärkt, was in dieser Arbeit bestätigt wird.<sup>23,101–103</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich auch mit denen von Jafari et al., die ebenso eine vermehrte Expression von IL-6 und auch weiteren proinflammatorischen Markern nach LPS-Stimulation beobachten konnten.<sup>14</sup>IDO wird von unstimulierten ASC wenig exprimiert.<sup>37,52,104,105</sup> Kommt allerdings ein entzündlicher Stimulus hinzu, geht die IDO- und auch die ICAM-1 Expression hoch, so auch in dieser Arbeit.<sup>23,37,52,105,106</sup> Eine stimulierbare IL-10-mRNA-Expression bei proinflammatorischer Stimulation von ASC kann nicht nachgewiesen werden. Auch wenn IL-10 eine wichtige Rolle bei der Immunregulation durch MSC spielt, so sind es eher nicht die MSC, die IL-10 direkt sekretieren.<sup>101</sup> Beschrieben ist, dass IL-10 indirekt über die Stimulation von M2-

Makrophagen oder T<sub>reg</sub>-Zellen freigesetzt wird.<sup>18,23,104</sup> In dieser Arbeit zeigt sich eine hohe Varianz bei der IL-10-Sekretion. Es ist möglich, dass ASC einiger Spender IL-10-mRNA exprimieren, andere aber nicht. Insgesamt kann hier statistisch keine IL-10-Expression durch proinflammatorische Stimulierung nachgewiesen werden. HLA-DR wird von MSC konstitutiv nicht exprimiert, das ist eines der Definitionskriterien zur Charakterisierung von MSC in vitro.<sup>5</sup> Es ist jedoch möglich, durch IFN- $\gamma$  die HLA-DR-Expression auf MSC zu induzieren.<sup>2,5,107</sup> He et al. z. B. haben an ihren MSC keine HLA-DR-Expression nach IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Stimulation nachweisen können.<sup>104</sup> Damit gehen auch die Ergebnisse dieser Arbeit einher. Im Gegensatz zu dieser Arbeit haben Kim et al. durch Stimulierung mit einer hohen Dosis IFN- $\gamma$  eine HLA-DR-Expression bei ASC festgestellt.<sup>107</sup> Da in dieser Arbeit keine isolierte Stimulation mit IFN- $\gamma$  stattgefunden hat, lassen sich die Ergebnisse nur bedingt vergleichen. Natürlich sollte in weiteren Studien beobachtet werden, ob die ASC eine Alloreaktion auslösen. Erstmal deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die Immunogenität durch die entzündlichen Stimuli nicht gesteigert wird. Als klassisches proinflammatorisches Zytokin ist TNF- $\alpha$  nicht nur zur Stimulierung verwendet worden, sondern es ist auch geprüft worden, ob die entzündliche Stimulation eine weitere TNF- $\alpha$ -Produktion anregt. Die Literatur ist sich hier etwas uneinig. Tomchuck et al. beobachten bei TLR4-Aktivierung mit LPS einen deutlichen Anstieg in der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression.<sup>101</sup> Zum gleichen Ergebnis gelangen auch weitere Forschungsgruppen.<sup>102,103</sup> Im Kontrast dazu steht die Arbeit von van den Berk et al., die weder durch LPS noch durch TNF- $\alpha$  eine erhöhte Expression oder Sekretion von TNF- $\alpha$  bei ihren MSC festgestellt haben.<sup>108</sup> In der hier vorgelagerten Arbeit reagieren die ASC sowohl auf LPS mit einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Expression, als auch bei der Verwendung des Cytomix. Zu keiner signifikanten Änderung kommt es hingegen bei der TLR-4-mRNA-Expression. Das könnte an der nur vierstündigen Stimulationsdauer liegen. Denn während Tomchuck et al. feststellen, dass kurzfristig die TLR-4-Expression nicht hochgeht, so stellen van den Berk et al. fest, dass eine Langzeitkultivierung zu einer vermehrten TLR-4-Expression führt.<sup>101,108</sup> Zusammenfassend reagieren die hier untersuchten ASC auf die LPS- und die Cytomix-Stimulation gleich. Es zeigt sich überwiegend die Aktivierung

proinflammatorischer Marker (IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1), aber ebenso ist durch die entzündliche Stimulation die mRNA des antiinflammatorischen Moleküls IDO hochreguliert.

### 7.3 Niclosamid

Durch die Anwendung von 1  $\mu$ M NCL kann bei Ko-Stimulation mit LPS eine Erhöhung der ICAM-1-mRNA-Expression beobachtet werden. Die Vorstimulation in der gleichen Konzentration führt zu einer Erhöhung von IL-6. Im ELISA wird diese Induktion der IL-6-Expression auf Proteinebene jedoch nicht bestätigt. Allerdings war hier die Konzentration von IL-8 erhöht. In der Stimulation mit Cytomix führt 200 nM NCL ohne Vorstimulation zu einer Erniedrigung von IDO. Bei den Versuchen mit einstündiger Vorstimulation zeigte IDO durch alle NCL-Konzentrationen gesenkt. Alle Veränderungen, die NCL bewirkte, zeigen proinflammatorische Tendenzen. Bis dato gibt es keine Veröffentlichungen, die eine NCL-Stimulation an MSC untersuchen. Zum Vergleich stehen nur Ergebnisse aus Experimenten mit anderen Zelllinien. Thatikonda et al. halten fest, dass wenn sie RAW 264.7 Maus-Makrophagen eine Stunde mit NCL vorbehandeln und dann LPS aussetzen, proinflammatorische Zytokinkonzentrationen (u. a. IL-6, TNF- $\alpha$ ) deutlich gesenkt werden.<sup>73</sup> Bei TNF- $\alpha$ -stimulierten Gefäßendothelzellen reduziert NCL die ICAM-1-Expression.<sup>74</sup> Einer der wichtigsten antientzündlichen Mechanismen der MSC läuft über die Hochregulierung von IDO, bei entzündlicher Stimulation regulieren MSC die IDO Expression hoch.<sup>23,37,52,106</sup> Eine Verstärkung dieses Effekts wäre also wünschenswert. Durch Anwendung von NCL ist eindeutig eine Senkung festgestellt worden, die durch Vorstimulation tendenziell verstärkt wird. Die Veränderungen in den mRNA-Expressionen bestätigen, dass NCL auf ASC wirkt und die Anwendung funktioniert hat. Zwar sind die Ergebnisse nicht gänzlich homogen und es ist auch nicht auszuschließen, dass es Fehler in der Durchführung gegeben hat (siehe Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), jedoch zeigen die ASC eine eindeutige proinflammatorische Tendenz, die vermutlich durch Vorbehandlung mit NCL verstärkt wird. Warum NCL proinflammatorisch zu wirken scheint, ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden und müsste in zukünftigen

Experimenten geklärt werden. Zusammenfassend kommt diese Arbeit daher zu dem Schluss, dass sich NCL nicht zur antientzündlichen Modulation von MSC eignet.

#### 7.4 Berberin

Mit dieser Arbeit kann eine erste entzündungshemmende Wirkung von BBR auf ASC nachgewiesen werden. BBR, wichtiger Bestandteil der traditionell chinesischen Medizin<sup>77</sup>, wurde bereits in diversen *in vitro*-, aber auch *in vivo*-Studien als entzündungshemmend beschrieben.<sup>51,78,80,81,91,92,109–113</sup> Besonders seine Wirkung auf Makrophagen ist gut untersucht.<sup>78–80,92,110,113</sup> Aber auch bei Colon- oder Lungenepithelzellen senkt BBR beispielsweise die TNF- $\alpha$  oder IL-8 Expression.<sup>51,111</sup> Auch bei den hier verwendeten ASC bewirkt BBR eine Senkung der durch Cytomix-induzierten IL-8-Konzentration auf Proteinebene. Der hemmende Effekt von Dexamethason zeigt sich im Vergleich jedoch intensiver. Die Inhibierung der IL-6 Expression ist zwar statistisch ( $p = 0,065$ ) nicht signifikant, optisch ist diese Tendenz im ELISA jedoch zu erkennen. Einen Grund für die nicht so ausgeprägten Ergebnisse könnte die verwendete Konzentration bieten. Möglicherweise ist eine Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  BBR nicht ausreichend hoch, um die wirksamste Reaktion zu erzielen. In vergleichbaren Arbeiten, bei denen MSC und auch ASC mit BBR inkubiert worden sind, ist 10  $\mu\text{M}$  BBR als gängigste Konzentration verwendet worden.<sup>83,84,114–117</sup> In dieser Arbeit sind mit der Durchführung von XTT- und LDH-Assays für ASC zelltoxische Konzentrationen ausgeschlossen worden. Aufgrund optisch eingeschränkter Zellviabilität bei 10  $\mu\text{M}$  ist daher die Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  BBR ausgeklammert worden. In zukünftigen Versuchen sollte überprüft werden, ob eine höhere Konzentration wie z. B. 10  $\mu\text{M}$  BBR eine stärkere Wirkung erzielt. Interessant ist auch, dass bereits viele *in vitro*-Daten bestehen, die die antiinflammatorische Wirkung von BBR auf LPS-induzierte Makrophagen belegen.<sup>79,81,91,92,110,111,113</sup> So reduziert BBR beispielsweise die IL-6- und TNF- $\alpha$ -Expression von Makrophagen.<sup>79,81,91,92</sup> Die Arbeit von Zhou et al. weist sogar hemmende Wirkung von BBR auf LPS-induzierten BM-ASC nach: die osteogene Differenzierung wird durch BBR wieder erhöht.<sup>116</sup> Auch *in vivo* kann BBR die Expressionen, aber auch Serumwerte von IL-6 und TNF- $\alpha$  bei Mäusen mit Colitis

oder COPD senken.<sup>109,111,112</sup> Auf die hier verwendeten ASC nimmt BBR allerdings keinen nachweislichen antiinflammatorischen Einfluss. Festzuhalten ist, dass Zhou et al. BBR die stärksten Ergebnisse mit einer Konzentration 10  $\mu\text{M}$  erzielt haben, aber auch bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  BBR eine Senkung von z. B. IL-6 zeigen. Ebenso sind keine ASC verwendet worden, sondern BM-MSCs, die aufgrund der MSC-Heterogenität anders auf BBR als ASC reagieren könnten.<sup>17,116</sup> Eine Wirkung auf LPS-stimulierte ASC kann diese Arbeit nicht bestätigen. Eine Wirkung zeigt sich jedoch bei den mit Cytomix-stimulierten ASC, in dem TNF- $\alpha$  stimulierender Bestandteil ist. Adipozyten, die mit TNF- $\alpha$  inkubiert worden sind, zeigen bei Vorbehandlung mit BBR eine Senkung der TNF- $\alpha$ - und IL-6-Expression.<sup>110</sup> Es ist also möglich, dass mit einer höheren Konzentration BBR ein stärkeres Ergebnis erzielt werden kann, welches auch im Vergleich zur hemmenden Wirkung von Dexamethason stärker abschneiden könnte. Dies müsste in zukünftigen Experimenten getestet werden.

Als interessantes Nebenergebnis zeigt sich eine Steigerung der Viabilität bei 1  $\mu\text{M}$  BBR. Pang et al. halten fest, dass BBR das Überleben von ASC in Hypoxie und bei Nahrungsmangel, welches nach Transplantation nach wie vor eine Schwachstelle darstellt, verbessert.<sup>83</sup> Zhang et al. zeigen in ihren Experimenten, dass BBR das Überleben von vorstimulierten MSC verbessert.<sup>114</sup> Auch wenn diese Arbeit nicht das Ziel hat, einen proliferationsfördernden Effekt der Substanzen auf ASC zu untersuchen, ist durch die Gabe von 1  $\mu\text{M}$  BBR eine leichte Vitalitätssteigerung im XTT-Assay zu beobachten. Um dieses Ergebnis zu bestätigen müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Mit BBR ist also eine vielversprechende Substanz identifiziert, die eine neue Lösung für die Modifikation von MSC darstellt.

## 7.5 Gedunin

An anderen Zellen wie Makrophagen kann gezeigt werden, dass GED unter entzündlicher Stimulation entzündungshemmend wirkt, z. B. senkt es IL-6 und IL-1 $\beta$  und erhöht die IL-10 Expression.<sup>87</sup> Bisher gibt es keine Veröffentlichungen, die ein vergleichendes Ergebnis an MSC zeigen. Es ist möglich, dass GED keine

Wirkung auf MSC hat. Dennoch muss bedacht werden, dass sich in dieser Arbeit keine zytotoxische Konzentration gezeigt hat und die Dosis von 200  $\mu\text{M}$  daher vielleicht zu niedrig angesetzt war. In anderen Arbeiten wirkte GED an Makrophagen und neutrophile Granulozyten in Konzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$ .<sup>87,88,118</sup> Eine Zytotoxizität stellt sich bei Makrophagen ab 100  $\mu\text{M}$ , bei Neutrophilen ab 400  $\mu\text{M}$  GED ein.<sup>118,119</sup> Wenn die Konzentration tatsächlich zu niedrig angesetzt worden ist, dann kann das erklären, warum GED keine Wirkung zeigt. Festzuhalten ist ebenso, dass bei der Bestimmung der zytotoxischen Schwelle auch keine Verbesserung der Proliferation auffällt. In der Literatur wird bisher jedoch nicht beschrieben, dass GED eine solche Wirkung hat. Die hier getesteten Konzentrationen sprechen allerdings eher gegen eine Verbesserung in der Proliferation durch GED. Eine Wiederholung der Experimente mit höheren Konzentrationen könnte andere Ergebnisse liefern. In der Auswertung zeigt sich eine Senkung der IL-10-mRNA-Expression bei LPS-Stimulation. Da MSC im Allgemeinen und unsere ASC ebenso nur sehr geringen Mengen an IL-10 exprimieren, ist es unwahrscheinlich, dass das Zytokin tatsächlich gesenkt worden ist. Vermutlich handelt es sich bei geringer Versuchsanzahl um eine statistische Abweichung. Natürlich wäre eine tatsächliche Senkung von IL-10 ein Hinweis für eine eher proinflammatorische Modulation der ASC. In zukünftigen Experimenten sollte daher die tatsächliche IL-10-Konzentration im Überstand bestimmt werden, um dieses Ergebnis zu bestätigen oder widerlegen.

## 7.6 Mögliche Fehlerquellen im Versuchsaufbau und der Durchführung

Zuletzt gehört wie zu jeder guten Arbeit, die Beantwortung der Frage, ob es eventuell in der Durchführung Fehler gegeben hat. Im Bereich des Materials und der Methoden muss beachtet werden, dass GED und BBR von Herstellerseite beide in Alkoholen gelöst werden müssen, welche bei Raumluft und Raumtemperatur schnell verdampfen. Insbesondere die Verwendung von kleinen Mengen, die für die Experimente gebraucht worden sind, ist dadurch beeinträchtigt worden. Es sind zwar größere Mengen verwendet worden, die anschließend schrittweise verdünnt worden sind, allerdings kann es dennoch durch das Verdampfen leichter zu ungenaueren Konzentrationen von BBR und GED gekommen sein. Leider ist es

auch bei manchen Versuchen zum Fehlen von Daten gekommen, z.B. weil die Menge der isolierten RNA sehr niedrig war. In diesen Fällen ist es nicht möglich gewesen, die Daten vollständig zu erheben. Die statistische Auswertung ist zwar nach Rücksprache mit dem Institut für Biometrie der Goethe-Universität passend zu den jeweiligen Datensätzen gewählt worden, dennoch kann es beim Vergleich zwischen ungleich großen Testwiederholungen zu einer Verzerrung kommen.

## 7.7 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit hat drei Substanzen untersucht, die potenziell als Kandidaten zur Entzündungshemmung in Frage kommen. Im Hauptfokus dieser Arbeit stand das Arzneimittel NCL: Zusammenfassend zeigt leider sich die Entzündungsantwort der verwendeten ASC weder bei LPS- noch bei Cytomix-Stimulation reduziert. NCL zeigt sogar eindeutig entzündungsfördernde Tendenzen auf die Zellen. In zukünftigen Experimenten könnte die Induktion von IL-6 und IL-8 durch die Untersuchung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B eindeutig bestätigt werden. Auch für GED kann kein entzündungsdämpfender Effekt beobachtet werden. Die Reaktion der ASC auf LPS oder Cytomix scheint durch GED gänzlich unbeeinflusst. Da keine eindeutige zytotoxische Schwelle nicht bestimmt werden könnte, wäre eine Wiederholung mit einer höheren Konzentration GED sinnvoll. Im Gegensatz zu NCL und GED zeigt BBR im Rahmen der Cytomix-Stimulation eine vielversprechende antiinflammatorische Wirkung. Die Konzentration von IL-8 ist bei den mit BBR behandelten und entzündlich stimulierten ASC deutlich reduziert, bei weiteren Markern kann sie vermutet werden. Auf die mit LPS-stimulierten ASC hat BBR jedoch keinen erkennbaren Einfluss. In Zukunft sollte eine Dosisanpassung auf bis 10  $\mu$ M BBR in vitro erfolgen mit Wiederholung der Experimente, um eine effizientere Dosis zu ermitteln. Die Bestätigung der Wirkung von BBR könnte in einem ersten Schritt durch die Untersuchung der Signalwege und Transkriptionsfaktoren (z. B. NF- $\kappa$ B) in vitro erfolgen. Interessant wäre es weiterhin in einem Zweikammer-Modell die direkte Wirkung auf verschiedene Nierenzellen in entzündlichem Milieu zu testen. In Zukunft wäre auch eine Untersuchung an Tieren mit akuter bis chronischer

Nierenschädigung denkbar, die parallel zur MSC-Transplantation eine Gabe BBR erhalten, um eine Wirkung in vivo zu untersuchen.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Munir H, Ward LSC, McGettrick HM. Mesenchymal Stem Cells as Endogenous Regulators of Inflammation. In: Owens BMJ, Lakins MA, eds. *Stromal Immunology. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1060. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2018:73-98. doi:10.1007/978-3-319-78127-3\_5
2. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(6):419-425. doi:10.1097/01.moh.0000245697.54887.6f
3. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik N V., Panasyuk AF, Keiliss-Borok I V. STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES. *Transplantation*. 1974;17(4):331-340. doi:10.1097/00007890-197404000-00001
4. Pers YM, Ruiz M, Noël D, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: state of the art and perspectives. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):2027-2035. doi:10.1016/j.joca.2015.07.004
5. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
6. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015;35(2):e00191. doi:10.1042/BSR20150025
7. Hou Y Sen, Liu LY, Chai JK, et al. Lipopolysaccharide pretreatment inhibits LPS-induced human umbilical cord mesenchymal stem cell apoptosis via upregulating the expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2521-2528. doi:10.3892/mmr.2015.3723
8. Liang Z, Yin X, Sun W, et al. Enhanced protection against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by autologous transplantation of adipose-derived stromal cells combined with low tidal volume ventilation in rats. *J Cell Physiol*. 2021;236(2):1295-1308. doi:10.1002/jcp.29936

9. Li Q, Li J, Sun L, et al. Exosomes derived from LPS-stimulated human thymic mesenchymal stromal cells enhance inflammation via thrombospondin-1. *Biosci Rep.* 2021;41(10). doi:10.1042/BSR20203573
10. Wang X, Jiang M, He X, Zhang B, Peng W, Guo L. N-acetyl cysteine inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in bone marrow mesenchymal stem cells by suppressing the TXNIP/NLRP3/IL-1 $\beta$  signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2020;22(4):3299-3306. doi:10.3892/mmr.2020.11433
11. Vij R, Stebbings KA, Kim H, Park H, Chang D. Safety and efficacy of autologous, adipose-derived mesenchymal stem cells in patients with rheumatoid arthritis: a phase I/IIa, open-label, non-randomized pilot trial. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1). doi:10.1186/S13287-022-02763-W
12. Orciani M, Caffarini M, Lazzarini R, et al. Mesenchymal Stem Cells from Cervix and Age: New Insights into CIN Regression Rate. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1-12. doi:10.1155/2018/1545784
13. Waldner M, Zhang W, James IB, et al. Characteristics and Immunomodulating Functions of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Across Defined Human Leukocyte Antigen Barriers. *Front Immunol.* 2018;9(JUL):24. doi:10.3389/FIMMU.2018.01642
14. Jafari M, Asghari A, Delbandi AA, et al. Priming TLR3 and TLR4 in human adipose- and olfactory mucosa-derived mesenchymal stromal cells and comparison of their cytokine secretions. *Cytotechnology.* 2020;72(1):57-68. doi:10.1007/s10616-019-00357-8
15. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A.* 2018;93(1):19-31. doi:10.1002/cyto.a.23242
16. Huaman O, Bahamonde J, Cahuascanco B, et al. Immunomodulatory and immunogenic properties of mesenchymal stem cells derived from bovine fetal bone marrow and adipose tissue. *Res Vet Sci.* 2019;124:212-222. doi:10.1016/j.rvsc.2019.03.017
17. Zhou W, Lin J, Zhao K, et al. Single-Cell Profiles and Clinically Useful Properties of Human Mesenchymal Stem Cells of Adipose and Bone Marrow

- Origin. *Am J Sports Med.* 2019;47(7):1722-1733. doi:10.1177/0363546519848678
18. Shi Y, Wang Y, Li Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(8):493-507. doi:10.1038/s41581-018-0023-5
  19. Taha S, Volkmer E, Haas E, et al. Differences in the Inflammatory Response of White Adipose Tissue and Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1086. doi:10.3390/ijms21031086
  20. Peng Q, Alipour H, Porsborg S, Fink T, Zachar V. Evolution of ASC Immunophenotypical Subsets During Expansion In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences Article.* 2020;1408(21):1408. doi:10.3390/ijms21041408
  21. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2006;24(2):462-471. doi:10.1634/stemcells.2004-0331
  22. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation.* 2003;76(8):1208-1213. doi:10.1097/01.TP.0000082540.43730.80
  23. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014;6(5):552. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.552
  24. Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, et al. Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in preclinical models of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(10):1733-1740. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200985
  25. Chu X, Xu B, Gao H, et al. Lipopolysaccharides Improve Mesenchymal Stem Cell-Mediated Cardioprotection by MyD88 and stat3 Signaling in a Mouse Model of Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Stem Cells Dev.* 2019;28(9):620-631. doi:10.1089/scd.2018.0213
  26. Redondo-Castro E, Cunningham C, Miller J, et al. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic

- phenotype in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):79. doi:10.1186/s13287-017-0531-4
27. Peta KT, Ambele MA, Pepper MS. Similarities between Tumour Immune Response and Chronic Wound Microenvironment: Influence of Mesenchymal Stromal/Stem Cells. Zhang XL, ed. *J Immunol Res.* 2021;2021:1-11. doi:10.1155/2021/6649314
  28. Huang F, Thokerunga E, He F, Zhu X, Wang Z, Tu J. Research progress of the application of mesenchymal stem cells in chronic inflammatory systemic diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):1. doi:10.1186/s13287-021-02613-1
  29. Gao JG, Yu MS, Zhang MM, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate TNBS-induced colitis in rats by influencing intestinal epithelial cell regeneration, Wnt signaling, and T cell immunity. *World J Gastroenterol.* 2020;26(26):3750-3766. doi:10.3748/wjg.v26.i26.3750
  30. Diotallevi F, Di Vincenzo M, Martina E, et al. Mesenchymal Stem Cells and Psoriasis: Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):15080. doi:10.3390/ijms232315080
  31. Sun XY, Ding XF, Liang HY, et al. Efficacy of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):214. doi:10.1186/s13287-020-01730-7
  32. Prockop DJ, Youn Oh J. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation. *Molecular Therapy.* 2012;20(1):14-20. doi:10.1038/mt.2011.211
  33. Mahlaköiv T, Flamar AL, Johnston LK, et al. Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33. *Sci Immunol.* 2019;4(35):eaax0416. doi:10.1126/sciimmunol.aax0416
  34. Mohammadpour H, Pourfathollah AA, Zarif MN, Tahoori MT. TNF- $\alpha$  modulates the immunosuppressive effects of MSCs on dendritic cells and T cells. *Int Immunopharmacol.* 2015;28(2):1009-1017. doi:10.1016/j.intimp.2015.07.045
  35. Wheat WH, Chow L, Kurihara JN, et al. Suppression of Canine Dendritic Cell Activation/Maturation and Inflammatory Cytokine Release by Mesenchymal

- Stem Cells Occurs Through Multiple Distinct Biochemical Pathways. *Stem Cells Dev.* 2017;26(4):249-262. doi:10.1089/scd.2016.0199
36. Kono Y, Miyamoto A, Hiraoka S, Negoro R, Fujita T. Mesenchymal Stem Cells Alter the Inflammatory Response of C2C12 Mouse Skeletal Muscle Cells. *Biol Pharm Bull.* 2020;43(11):1785-1791. doi:10.1248/bpb.b20-00536
  37. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-Inflammatory Cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. Verfaillie CM, ed. *PLoS One.* 2010;5(2):e9016. doi:10.1371/journal.pone.0009016
  38. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006;107(4):1484-1490. doi:10.1182/blood-2005-07-2775
  39. Jewett A, Arasteh A, Tseng HC, et al. Strategies to Rescue Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) from NK Cell Mediated Cytotoxicity. Zimmer J, ed. *PLoS One.* 2010;5(3):e9874. doi:10.1371/journal.pone.0009874
  40. Wen YT, Ho YC, Lee YC, Ding DC, Liu PK, Tsai RK. The Benefits and Hazards of Intravitreal Mesenchymal Stem Cell (MSC) Based-Therapies in the Experimental Ischemic Optic Neuropathy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):2117. doi:10.3390/ijms22042117
  41. Giuliani M, Bennaceur-Griscelli A, Nanbakhsh A, et al. TLR Ligands Stimulation Protects MSC from NK Killing. *Stem Cells.* 2014;32(1):290-300. doi:10.1002/stem.1563
  42. Xu C, Ren G, Cao G, et al. miR-155 Regulates Immune Modulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells by Targeting TAK1-binding Protein 2. *Journal of Biological Chemistry.* 2013;288(16):11074-11079. doi:10.1074/jbc.M112.414862

43. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett.* 2007;110(2):91-100. doi:10.1016/j.imlet.2007.04.001
44. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005;106(5):1755-1761. doi:10.1182/blood-2005-04-1496
45. Yoshizumi Y, Yukawa H, Iwaki R, et al. Immunomodulatory Effects of Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Concanavalin A-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Cell Med.* 2017;9(1-2):21-33. doi:10.3727/215517916X693159
46. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1428-1442. doi:10.1111/jcmm.13492
47. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol.* 2005;23(7):845-856. doi:10.1038/nbt1117
48. Yu X, Quan J, Long W, et al. LL-37 inhibits LPS-induced inflammation and stimulates the osteogenic differentiation of BMSCs via P2X7 receptor and MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2018;372(2):178-187. doi:10.1016/j.yexcr.2018.09.024
49. Wang L, Chen K, Wan X, Wang F, Guo Z, Mo Z. NLRP3 inflammasome activation in mesenchymal stem cells inhibits osteogenic differentiation and enhances adipogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;484(4):871-877. doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.007
50. Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, et al. Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anaesthesist.* 2004;53(1):10-28. doi:10.1007/s00101-003-0626-4
51. Lee CH, Chen JC, Hsiang CY, Wu SL, Wu HC, Ho TY. Berberine suppresses inflammatory agents-induced interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  productions via the inhibition of I $\kappa$ B degradation in human lung cells. *Pharmacol Res.* 2007;56(3):193-201. doi:10.1016/j.phrs.2007.06.003
52. Kadle RL, Abdou SA, Villarreal-Ponce AP, et al. Microenvironmental cues enhance mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation and regulatory

- T-cell expansion. Camussi G, ed. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193178. doi:10.1371/journal.pone.0193178
53. Carstens MH, García N, Mandayam S, et al. Safety of Stromal Vascular Fraction Cell Therapy for Chronic Kidney Disease of Unknown Cause (Mesoamerican Nephropathy). *Stem Cells Transl Med*. 2023;12(1):7. doi:10.1093/STCLTM/SZAC080
  54. Bateman ME, Strong AL, Gimble JM, Bunnell BA. Concise Review: Using Fat to Fight Disease: A Systematic Review of Nonhomologous Adipose-Derived Stromal/Stem Cell Therapies. *Stem Cells*. 2018;36(9):1311-1328. doi:10.1002/STEM.2847
  55. Abumoawad A, Saad A, Ferguson CM, et al. In a Phase 1a escalating clinical trial, autologous mesenchymal stem cell infusion for renovascular disease increases blood flow and the glomerular filtration rate while reducing inflammatory biomarkers and blood pressure. *Kidney Int*. 2020;97(4):793-804. doi:10.1016/j.kint.2019.11.022
  56. Search Results | Beta ClinicalTrials.gov. Accessed June 26, 2023. <https://www.clinicaltrials.gov/search?distance=50&cond=Kidney%20Diseases&intr=Mesenchymal%20stem%20cells&page=1&limit=100>
  57. Meucci MC, Reinders MEJ, Groeneweg KE, et al. Cardiovascular Effects of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Therapy With Early Tacrolimus Withdrawal in Renal Transplant Recipients: An Analysis of the Randomized TRITON Study. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(24). doi:10.1161/JAHA.121.023300
  58. Reinders MEJ, Groeneweg KE, Hendriks SH, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell therapy with early tacrolimus withdrawal: The randomized prospective, single-center, open-label TRITON study. *Am J Transplant*. 2021;21(9):3055-3065. doi:10.1111/AJT.16528
  59. Dreyer GJ, Groeneweg KE, Heidt S, et al. Human leukocyte antigen selected allogeneic mesenchymal stromal cell therapy in renal transplantation: The Neptune study, a phase I single-center study. *Am J Transplant*. 2020;20(10):2905-2915. doi:10.1111/AJT.15910

60. Lin W, Li HY, Yang Q, et al. Administration of mesenchymal stem cells in diabetic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):43. doi:10.1186/s13287-020-02108-5
61. Hickson LJ, Abedalqader T, Ben-Bernard G, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Cell-Based Interventions in Experimental Diabetic Kidney Disease. *Stem Cells Transl Med.* 2021;10(9):1304-1319. doi:10.1002/sctm.19-0419
62. Swaminathan M, Kopyt N, Atta MG, et al. Pharmacological Effects of Ex Vivo Mesenchymal Stem Cell Immunotherapy in Patients with Acute Kidney Injury and Underlying Systemic Inflammation. *Stem Cells Transl Med.* 2021;10(12):1588-1601. doi:10.1002/sctm.21-0043
63. Zhao L, Hu C, Han F, et al. Induction therapy with mesenchymal stromal cells in kidney transplantation: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12:158. doi:10.1186/s13287-021-02219-7
64. Zhou T, Liao C, Li HY, Lin W, Lin S, Zhong H. Efficacy of mesenchymal stem cells in animal models of lupus nephritis: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):48. doi:10.1186/s13287-019-1538-9
65. Wang HS, Yi MY, Wu X, et al. Effects of mesenchymal stem cells in renovascular disease of preclinical and clinical studies: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2022;12(1):18080. doi:10.1038/S41598-022-23059-2
66. Chen W, Mook RA, Premont RT, Wang J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cell Signal.* 2018;41:89-96. doi:10.1016/j.cellsig.2017.04.001
67. Arzneimittel-Informationssystem. Accessed December 6, 2022. <https://portal.dimdi.de/amguifree/termsfuse.xhtml>
68. Yomesan® | Bayer Vital GmbH Deutschland. Accessed December 6, 2022. <https://produktinformation.bayer.de/yomesan>
69. Lee MC, Chen YK, Hsu YJ, Lin BR. Niclosamide inhibits the cell proliferation and enhances the responsiveness of esophageal cancer cells to



- chemotherapeutic agents. *Oncol Rep.* 2020;43(2):549-561. doi:10.3892/or.2019.7449
70. Sekulovski N, Whorton AE, Tanaka T, et al. Niclosamide suppresses macrophage-induced inflammation in endometriosis. *Biol Reprod.* 2020;2020(5):1011-1019. doi:10.1093/biolre/ioaa010
71. Liang L, Huang M, Xiao Y, et al. Inhibitory effects of niclosamide on inflammation and migration of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Inflammation Research.* 2015;64(3-4):225-233. doi:10.1007/s00011-015-0801-5
72. Wu CS, Li YR, Chen JJW, Chen YC, Chu CL, Pan IH. Antihelminthic niclosamide modulates dendritic cells activation and function. *Cell Immunol.* 2014;288(1-2):15-23. doi:10.1016/j.cellimm.2013.12.006
73. Thatikonda S, Pooladanda V, Godugu C. Repurposing an old drug for new use: Niclosamide in psoriasis-like skin inflammation. *J Cell Physiol.* 2020;235(6):5270-5283. doi:10.1002/jcp.29413
74. Huang M, Qiu Q, Zeng S, et al. Niclosamide inhibits the inflammatory and angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells. *Inflammation Research.* 2015;64(12):1023-1032. doi:10.1007/s00011-015-0888-8
75. Pan X, Song Y, He M, et al. Mitochondrial Uncouplers Confer Protection by Activating AMP-Activated Protein Kinase to Inhibit Neuroinflammation Following Intracerebral Hemorrhage. *Biol Pharm Bull.* 2020;43(8):1210-1219.
76. Shi M, Sekulovski N, Whorton AE, MacLean JA, Greaves E, Hayashi K. Efficacy of niclosamide on the intra-abdominal inflammatory environment in endometriosis. *FASEB Journal.* 2021;35(5). doi:10.1096/FJ.202002541RRR
77. Kumar A, Ekavali, Chopra K, Mukherjee M, Pottabathini R, Dhull DK. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *Eur J Pharmacol.* 2015;761:288-297. doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.068
78. Dinesh P, Rasool MK. Berberine, an isoquinoline alkaloid suppresses TXNIP mediated NLRP3 inflammasome activation in MSU crystal stimulated RAW 264.7 macrophages through the upregulation of Nrf2 transcription factor and

- alleviates MSU crystal induced inflammation in rats. *Int Immunopharmacol.* 2017;44:26-37. doi:10.1016/j.intimp.2016.12.031
79. Gong J, Li J, Dong H, et al. Inhibitory effects of berberine on proinflammatory M1 macrophage polarization through interfering with the interaction between TLR4 and MyD88. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):314. doi:10.1186/s12906-019-2710-6
80. Lin J, Cai Q, Liang B, et al. Berberine, a Traditional Chinese Medicine, Reduces Inflammation in Adipose Tissue, Polarizes M2 Macrophages, and Increases Energy Expenditure in Mice Fed a High-Fat Diet. *Medical Science Monitor.* 2019;25:87-97. doi:10.12659/MSM.911849
81. Liang Y, Zhang T, Zhao J, et al. Glucocorticoid receptor-mediated alleviation of inflammation by berberine: in vitro, in silico and in vivo investigations. *Food Funct.* 2021;12(23):11974-11986. doi:10.1039/D1FO01612A
82. Li H, Wang Y, Zhang H, et al. Yohimbine Enhances Protection of Berberine against LPS-Induced Mouse Lethality through Multiple Mechanisms. Idzko M, ed. *PLoS One.* 2012;7(12):e52863. doi:10.1371/journal.pone.0052863
83. Pang H, Zhou Y, Wang J, et al. Berberine Influences the Survival of Fat Grafting by Inhibiting Autophagy and Apoptosis of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:4795-4809. doi:10.2147/DDDT.S337215
84. Wen C, Huang C, Yang M, et al. The Secretion from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Pretreated with Berberine Rescues Neurons with Oxidative Damage Through Activation of the Keap1-Nrf2-HO-1 Signaling Pathway. *Neurotox Res.* 2020;38(1):59-73. doi:10.1007/s12640-020-00178-0
85. Braga TM, Rocha L, Chung TY, et al. Biological Activities of Gedunin—A Limonoid from the Meliaceae Family. *Molecules.* 2020;25(3):493. doi:10.3390/molecules25030493
86. Ferraris FK, Moret KH, Figueiredo ABC, Penido C, Henriques M das GMO. Gedunin, a natural tetranortriterpenoid, modulates T lymphocyte responses and ameliorates allergic inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2012;14(1):82-93. doi:10.1016/j.intimp.2012.06.002

87. Borges PV, Moret KH, Maya-Monteiro CM, et al. Gedunin Binds to Myeloid Differentiation Protein 2 and Impairs Lipopolysaccharide-Induced Toll-Like Receptor 4 Signaling in Macrophages. *Mol Pharmacol*. 2015;88(5):949-961. doi:10.1124/mol.115.098970
88. Borges PV, Moret KH, Raghavendra NM, et al. Protective effect of gedunin on TLR-mediated inflammation by modulation of inflammasome activation and cytokine production: Evidence of a multitarget compound. *Pharmacol Res*. 2017;115:65-77. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.015
89. Lalu MM, Sullivan KJ, Mei SH, et al. Evaluating mesenchymal stem cell therapy for sepsis with preclinical meta-analyses prior to initiating a first-in-human trial. *Elife*. 2016;5. doi:10.7554/eLife.17850.001
90. Leyendecker Jr. A, Pinheiro CCG, Amano MT, Bueno DF. The Use of Human Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Agents for the in vivo Treatment of Immune-Related Diseases: A Systematic Review. *Front Immunol*. 2018;9:2056. doi:10.3389/fimmu.2018.02056
91. Zhang H, Shan Y, Wu Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- $\kappa$ B signaling pathway in RAW264.7 cells. *Int Immunopharmacol*. 2017;52:93-100. doi:10.1016/J.INTIMP.2017.08.032
92. Wang Y, Zhou X, Zhao D, et al. Berberine inhibits free fatty acid and LPS-induced inflammation via modulating ER stress response in macrophages and hepatocytes. *PLoS One*. 2020;15(5):e0232630. doi:10.1371/journal.pone.0232630
93. Kay AG, Fox JM, Hewitson JP, et al. CD317-Positive Immune Stromal Cells in Human "Mesenchymal Stem Cell" Populations. *Front Immunol*. 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.903796
94. Hu L, Wen Y, Xu J, et al. Pretreatment with bisphosphonate enhances osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2017;26(2):123-132. doi:10.1089/SCD.2016.0173/FORMAT/EPUB
95. Li M, Yu L, She T, et al. Astragaloside IV attenuates Toll-like receptor 4 expression via NF- $\kappa$ B pathway under high glucose condition in mesenchymal

- stem cells. *Eur J Pharmacol.* 2012;696(1-3):203-209. doi:10.1016/J.EJPHAR.2012.09.033
96. Liu C, Fan Y, Zhou L, et al. Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin II enhances paracrine effects, angiogenesis, gap junction formation and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2015;188(1):22-32. doi:10.1016/J.IJCARD.2015.03.425
97. Svensson S, Palmer M, Svensson J, et al. Monocytes and pyrophosphate promote mesenchymal stem cell viability and early osteogenic differentiation. *J Mater Sci Mater Med.* 2022;33(1):11. doi:10.1007/s10856-021-06639-y
98. Cheng J, Feng Y, Feng X, et al. Improving the immunomodulatory function of mesenchymal stem cells by defined chemical approach. *Front Immunol.* 2022;13:1005426. doi:10.3389/FIMMU.2022.1005426
99. Zheng Z, Wang J. Bone marrow mesenchymal stem cells combined with *Atractylodes macrocephala* polysaccharide attenuate ulcerative colitis. *Bioengineered.* 2022;13(1):824-833. doi:10.1080/21655979.2021.2012954
100. Bunnell BA. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells.* 2021;10(12):3433. doi:10.3390/cells10123433
101. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells.* 2008;26(1):99-107. doi:10.1634/stemcells.2007-0563
102. Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, et al. Gender differences in injury induced mesenchymal stem cell apoptosis and VEGF, TNF, IL-6 expression: Role of the 55 kDa TNF receptor (TNFR1). *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(1):142-149. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.09.016
103. Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS. Role of Toll-Like Receptors on Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells.* 2006;24(12):2744-2752. doi:10.1634/stemcells.2006-0189
104. He H, Takahashi A, Mukai T, et al. The Immunomodulatory Effect of Triptolide on Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.686356

105. Oikonomopoulos A, Van Deen WK, Manansala AR, et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep.* 2015;5:16570. doi:10.1038/SREP16570
106. de Pedro MÁ, Gómez-Serrano M, Marinaro F, et al. IFN-Gamma and TNF-Alpha as a Priming Strategy to Enhance the Immunomodulatory Capacity of Secretomes from Menstrual Blood-Derived Stromal Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12177. doi:10.3390/ijms222212177
107. Kim JH, Jo CH, Kim HR, Hwang Y II. Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells from the periodontal ligament, umbilical cord, and adipose tissue. *Stem Cells Int.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/8429042
108. van den Berk LCJ, Jansen BJH, Siebers-Vermeulen KGC, et al. Mesenchymal stem cells respond to TNF but do not produce TNF. *J Leukoc Biol.* 2009;87(2):283-289. doi:10.1189/jlb.0709467
109. Li C, Xi Y, Li S, et al. Berberine ameliorates TNBS induced colitis by inhibiting inflammatory responses and Th1/Th17 differentiation. *Mol Immunol.* 2015;67(2):444-454. doi:10.1016/j.molimm.2015.07.013
110. Ye L, Liang S, Guo C, et al. Inhibition of M1 macrophage activation in adipose tissue by berberine improves insulin resistance. *Life Sci.* 2016;166:82-91. doi:10.1016/j.lfs.2016.09.025
111. Lee IA, Hyun YJ, Kim DH. Berberine ameliorates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation, enterobacterial growth and NF- $\kappa$ B activation. *Eur J Pharmacol.* 2010;648(1-3):162-170. doi:10.1016/j.ejphar.2010.08.046
112. Wang W, Zha G, Zou J jing, Wang X, Li C nian, Wu X jun. Berberine Attenuates Cigarette Smoke Extract-induced Airway Inflammation in Mice: Involvement of TGF- $\beta$ 1/Smads Signaling Pathway. *Curr Med Sci.* 2019;39(5):748-753. doi:10.1007/s11596-019-2101-8
113. Lee D, Bae J, Kim YK, et al. Inhibitory effects of berberine on lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and the high-mobility group box 1 release in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;431(3):506-511. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.143

114. Zhang W, Su X, Gao Y, et al. Berberine Protects Mesenchymal Stem Cells against Hypoxia-Induced Apoptosis in Vitro. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(8):1335-1342.
115. Tao K, Xiao D, Weng J, Xiong A, Kang B, Zeng H. Berberine promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells osteogenic differentiation via canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Toxicol Lett.* 2016;240(1):68-80. doi:10.1016/J.TOXLET.2015.10.007
116. Zhou R, Chen F, Liu H, et al. Berberine ameliorates the LPS-induced imbalance of osteogenic and adipogenic differentiation in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2021;23(5):350. doi:10.3892/mmr.2021.11989
117. Dong B, Liu X, Li J, et al. Berberine Encapsulated in Exosomes Derived from Platelet-Rich Plasma Promotes Chondrogenic Differentiation of the Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Biol Pharm Bull.* 2022;45(10):1444-1451. doi:10.1248/BPB.B22-00206
118. Conte F, Ferraris F, Costa T, et al. Effect of Gedunin on Acute Articular Inflammation and Hypernociception in Mice. *Molecules.* 2015;20(2):2636-2657. doi:10.3390/molecules20022636
119. Akihisa T, Nishimoto Y, Ogihara E, Matsumoto M, Zhang J, Abe M. Nitric Oxide Production-Inhibitory Activity of Limonoids from *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*. *Chem Biodivers.* 2017;14(6):e1600468. doi:10.1002/CBDV.201600468

## 9 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Wirkung drei neuer Substanzen und Arzneimittel auf mesenchymaler Stamm-/ Stromazellen in der lokalen und systemischen Inflammation

in der Medizinische Klinik 4 (Nephrologie) unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Patrick Baer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Frankfurt, 03.01.2024

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

## 10 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Patrick Baer für die Themastellung, die hervorragende Betreuung, seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Geiger und Herrn Prof. Dr. Dr. Speer, Leiter des Instituts für Nephrologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main, danke ich, da sie mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit in Ihrem Institut durchzuführen.

Besonderen Dank auch an Frau Prof. Dr. Herrmann vom Institut für Biostatistik und mathematische Modellierung für wertvolle Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung.

Frau Fay und Herrn Dr. Koch danke ich für viele hilfreiche Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Auch der Frankfurter Promotions Förderung danke ich für das Stipendium, durch welches ich fokussiert und zielstrebig meine Arbeit beginnen und durchführen konnte.

Bei meinen Eltern, Geschwistern und Freunden möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.