

Lipide als Transport- und Signalmoleküle. Untersuchungen in Makrophagen und Neuronen

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Sabrina Häbel

aus
Viersen

Bonn, den 14.12.2017

Angerfertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert

2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Menche

Tag der Promotion: 28.02.2018

Erscheinungsjahr: 2018

Für meine Familie

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert für die Diskussionen, die Ratschläge, die gute Betreuung und das Ermöglichen dieser Arbeit trotz aller Widrigkeiten und Rückschläge bedanken.

Herrn Prof. Dr. Menche danke ich für die Übernahme des Koreferats und die Hilfestellungen bei meiner synthetischen Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Galinski möchte ich mich ebenfalls für die Diskussionen und Ratschläge bedanken, sowie die Bereitstellung des Hydroxyectoins und ^{13}C -markierten Ectoins.

Dr. Britta Eiberger sage ich danke für die Kooperation. Für mich war es ein neues und spannendes Thema.

Ein großer Dank geht an Dr. Nadine Hagen-Euteneuer für die herzliche Aufnahme im Arbeitskreis und die Einführung in die biologischen Arbeitstechniken. Schade, dass du uns leider verlassen musstest.

Dr. Bernadette Beiden und Andrea Raths aus der Abteilung Sandhoff danke ich für die Hilfe der densitometrischen Aufnahmen bzw. die Hilfe bei den Arbeiten in der Zellkultur.

Ein besonderer Dank gilt Lilly Hofmann für die Aufnahme zahlreicher GCMS-Spektren und ihrer vielen Hilfe bei deren Auswertung.

Bei Lüllie, Bernhard, Sania, Alex und Pia möchte ich mich herzlich bedanken für die Unterstützung bei den synthetischen Arbeiten. Vielen Dank an Bettina und Tobit! Ihr seid die Besten!

Vielen Dank an die GANG. Ihr seid die Geilsten!

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Gerda und Ferdinand, ohne die ich niemals so weit gekommen wäre. Vielen Dank nicht nur für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums, sondern vor allem für die seelische und moralische. Ich habe euch von ganzem Herzen lieb!

Der wohl größte Dank geht an meinen Mann Jan. Deine Unterstützung bei einer der schwersten Entscheidungen, die ich getroffen habe, ist unübertrefflich. Danke, dass du immer für mich da bist. Du bist ein Phänomen. Ich liebe dich!

Publikationen und Posterbeiträge

Publikation:

Oliver Tress, Sabrina Häbel, Carina Bönisch, Thorsten Sistig, Gerhild van Echten-Deckert, Karl Schilling and Britta Eiberger (manuskript in preparation); „Cerebellar development and miRNAs: How granule cells pull the strings/take the driver’s seat. Proper cerebellar development depends on granule cell specific miRNAs. Dicer deficiency in granule cells causes cerebellar abnormalities.“

Poster:

Sabrina Reis, Jan Ruland, Erwin Galinski and Gerhild van Echten-Deckert; “Laurylhydroxyectoine: A new inflammation-protective compound?” DGZ Köln, März 2015.

Inhaltsverzeichnis

0	Einführung.....	1
1	Ectoinderivate – Wirkung und Mechanismus	4
1.1	Lebensräume extremophiler Organismen und deren Überlebensstrategien.....	4
1.2	Kompatible Solute.....	5
1.3	Wirkweise kompatibler Solute	7
1.4	Anwendungsgebiete kompatibler Solute.....	7
1.4.1	Stabilisierung von Biomolekülen	8
1.4.2	Wirkung auf Zellen	9
1.4.3	Industrielle Anwendungen	10
1.5	Entzündungen.....	11
1.5.1	Angeborene Immunantwort.....	11
1.5.2	Adaptive Immunantwort	12
1.5.3	Entzündungsmediatoren der Immunantwort	12
1.5.4	Regulierung von NF- κ B	14
1.6	Ceramide	15
1.7	Motivation	15
1.8	Ergebnisse und Diskussion.....	17
1.8.1	Synthese der Ectoinderivate	17
1.8.2	Untersuchung der entzündungsvorbeugenden Wirkung der Ectoinderivate in kultivierten Makrophagen	20
1.8.3	Aufnahme von ^{13}C -Laurylectoin in Säugerzellen	26
1.9	Zusammenfassung und Ausblick	29
2	Lipide im Kleinhirn – Dicer fl/fl; Math1-Cre-Mäuse	31
2.1	Das Kleinhirn	31
2.2	Dicer	31
2.3	Phosphatidylinositole	32
2.4	Motivation	34

2.5	Ergebnisse und Diskussion.....	35
2.6	Zusammenfassung und Ausblick	38
3	Zusammenfassung	40
4	Experimenteller Teil.....	42
4.1	Analytische Methoden.....	42
4.1.1	Magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR)	42
4.1.2	Massenspektrometrie (MS)	42
4.1.3	Gaschromatographie mit Massenspektrometriekopplung (GCMS).....	43
4.1.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	43
4.2	Synthesen	43
4.2.1	5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäure-hydrochlorid (Hydroxyectoinhydrochlorid).....	43
4.2.2	5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäuremethylester- hydrochlorid (Methylhydroxyectoin).....	44
4.2.3	5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäuredodecylester (Laurylhydroxyectoin)	45
4.2.4	2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäurehydrochlorid (Ectoinhydrochlorid)	46
4.2.5	2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäuredodecylester (¹³ C- Laurylectoin)	46
4.2.6	Laurylether mit Schutzgruppe	47
4.2.7	Schutzgruppe abspalten.....	48
4.3	Zelllinien	49
4.3.1	Makrophagen.....	49
4.3.2	Murine embryonale Fibroblasten (MEFs).....	49
4.3.3	Körnerzellen und Gewebe des Kleinhirns.....	49
4.4	Kultivierung der Zellen	49
4.4.1	Auftauen der Zellen.....	50
4.4.2	Umsetzung der Zellen	50

4.4.3	Einfrieren der Zellen	50
4.4.4	Aussäen der Zellen	51
4.4.5	Vorinkubation mit Ectoinderivaten bzw. CTAB.....	51
4.4.6	Behandlung der Zellen mit LPS	52
4.4.7	Inkubation der Zellen mit ¹³ C-Laurylectoin.....	52
4.5	Untersuchung der Genexpression auf RNA-Ebene.....	52
4.5.1	RNA-Isolation	52
4.5.2	RNA-Quantifizierung mittels Photometer	53
4.5.3	RNA Qualifizierung mittels Agarosegelelektrophorese	54
4.5.4	Reverse Transkription	54
4.5.5	Quantitative real time PCR (qRT-PCR).....	55
4.5.6	Auswertung der qRT-PCR	56
4.6	Untersuchung auf Lipidebene	57
4.6.1	Zellernte für Lipide	57
4.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	57
4.6.3	Aufarbeitung der Lipide (van Echten-Deckert 2000)	58
4.6.4	Dünnschichtchromatographie.....	60
5	Literaturverzeichnis.....	61
6	Anhang	77

0 Einführung

Lipide sind größtenteils hydrophobe Naturstoffe, die grob in verseifbar und nicht verseifbar eingeteilt werden können. Die meisten Lipide sind amphiphil, d.h. sie besitzen einen lipophilen Kohlenwasserstoffrest (Schwanzgruppe) und eine polare hydrophile Kopfgruppe. In polaren Lösungsmitteln bilden sie Micellen, Liposome oder Membranen aus Doppelschichten aus. Allgemein werden Lipide in sieben Gruppen unterteilt (Abbildung 1): Fettsäuren, Triacylglyceride, Wachse, Phospholipide (Phosphoglyceride und Sphingomyline), Sphingolipide, Lipopolysaccheride und Isoprenoide (Steroide, Carotinoide) (Löffler 2002).

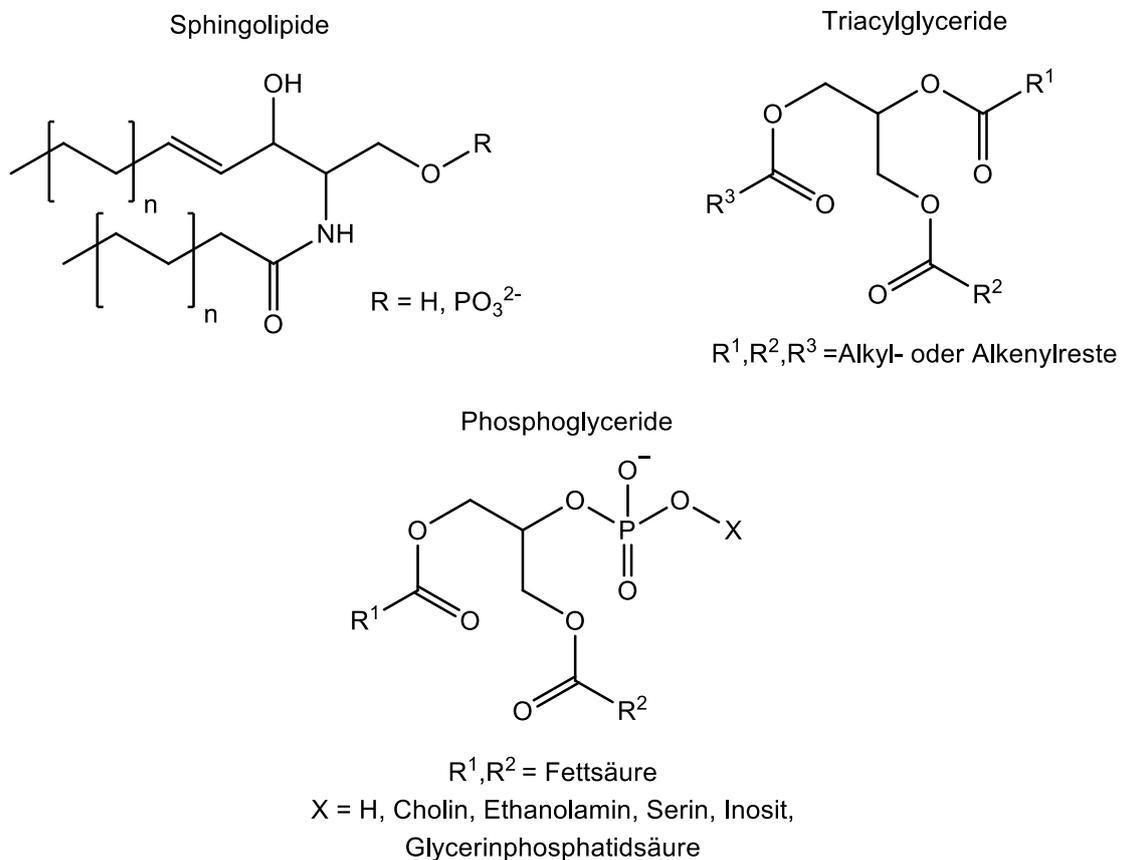


Abbildung 1: allgemeine Strukturen ausgewählter Lipidgruppen.

In lebenden Organismen haben Lipide verschiedene biologische Funktionen. Sie kommen als Brennstoffe, Hormone, Cofaktoren, fettlösliche Vitamine und Pigmente vor (Horn 2009). Allerdings dienen sie hauptsächlich als Energiespeicher, Signalmoleküle und Strukturkomponenten zellulärer Membranen. Die Zellmembran besteht aus einer zweilagigen Schicht von Lipiden, der sog. Lipiddoppelschicht und bildet damit eine hydrophobe Barriere. Sie grenzt den Zytoplasmaraum nach außen hin ab und ermöglicht so einen kontrollierten

Stoffaustausch mit der Umgebung (Wallach und Knüfermann 1973). Um nun ein kleines polares hydrophiles Molekül, in die Zelle bringen zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum einen können diese Moleküle z.B. mit Hilfe von Liposomen (Torchilin 2000), zum anderen durch das Anbringen eines Lipidankers in die Zelle geschleust werden (Wedeking et al. 2014).

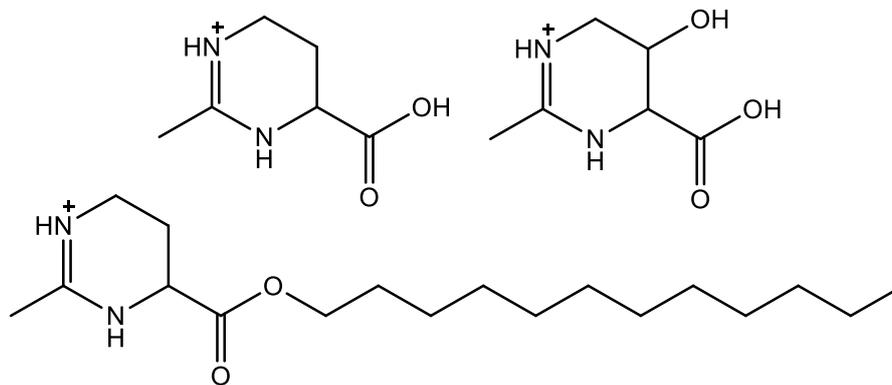


Abbildung 2: Strukturen von Ectoin, Hydroxyectoin und Laurylectoin.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll das für seine protektiven und entzündungsvorbeugenden Eigenschaften bekannte kompatible Solut Ectoin und sein Derivat Hydroxyectoin (Wei et al. 2009) mit Hilfe eines Lipidankers (Abbildung 2) in die Zelle eingeschleust (Wedeking et al. 2014) werden. Anschließend sollen ihre entzündungsvorbeugenden Wirkungen auf kultivierte Makrophagen getestet werden. Desweiteren soll durch ein ^{13}C -Markierungsexperiment die Aufnahme und der Stoffwechselweg von Ectoin in Säugerzellen untersucht werden.

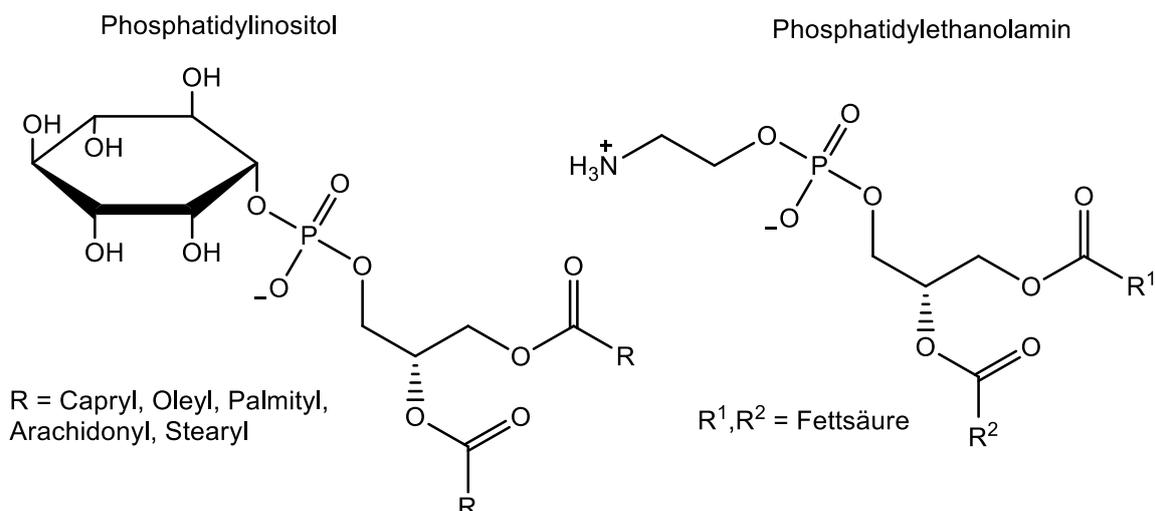


Abbildung 3: Strukturen von Phosphatidylinositol und Phosphatidylethanolamin.

Im zweiten Teil der Arbeit geht es um Lipide, die wichtige Signalfunktionen in Zellen erfüllen. Hier wird der Zusammenhang zwischen der Endonuklease Dicer und der Lipidzusammensetzung von neuronalen Membranen untersucht. Hierfür wird ein Mausmodell eingesetzt, in dem Dicer gewebsspezifisch in Körnerzellen des Kleinhirns ausgeschaltet wurde. In diesem Mausmodell (Dicer fl/fl; Math1-Cre) konnte bereits ein Defizit im Wachstum von Körnerzellen, sowie eine verminderte Proliferation und erhöhte Apoptose im Kleinhirn gezeigt werden (Tress et al. unveröffentlicht). Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stehen vor allen Dingen Phospholipide (Abbildung 3).

1 Ectoinderivate – Wirkung und Mechanismus

1.1 Lebensräume extremophiler Organismen und deren Überlebensstrategien

Extremophile Organismen haben eine hohe Anpassungsfähigkeit an extreme Umweltbedingungen, die im Allgemeinen als lebensfeindlich betrachtet werden. Aufgrund ihrer speziellen Anpassung können sie dort überleben, wo andere Organismen nicht existieren können, sie sind also Nischenbewohner. Zu diesen Nischen zählen enorm heiße bzw. kalte Lebensräume, wie z.B. Geysire (Thermophile) oder die Arktis bzw. Antarktis (Psychrophile und Kryophile), extreme pH-Werte, wie z.B. basische Biotope oder Industrieabwässer (Alkaliphile und Acidophile), hydrostatische Drücke, wie z.B. die Tiefsee (Barophile) und sehr hohe Salzkonzentrationen, wie z.B. Salzseen oder auf gepökelten Lebensmitteln (Halophile).

Die Extremophilen haben im Laufe der Evolution verschiedene Schutzmechanismen entwickelt um die extremen Lebensräume erfolgreich zu besiedeln. Diese Anpassungsstrategien betreffen alle Zellbestandteile wie Membranen, Proteine, Cytosol und Nucleinsäuren. Die Membranen der Thermophilen sind durch ihre Zusammensetzung so modifiziert, dass diese wesentlich starrer sind, während die Psychrophilen sehr flexible Membranen besitzen, die auch bei tiefen Temperaturen noch flüssigkristallin sind (Vreeland et al. 1984; Adams et al. 1990; Adams und Russell 1992).

Die halophilen Mikroorganismen gehören hauptsächlich den Domänen der *Archaea* und *Bacteria* an (Trüper und Galinski 1986; Galinski und Trüper 1994) aber auch im Reich der *Eukarya* gibt es salzliebende Lebewesen, wie die Grünalge *Dunaliella salina* (Ben-Amotz und Avron 1973; Avron 1986), xerophile Hefen und Fadenpilze.

Damit diese Organismen in extrem salinen Biotopen überleben können (Reed 1984), haben sie zwei verschiedene Strategien entwickelt um die innere Osmolarität zu regulieren. Die eine Gruppe der extremen halophilen Organismen akkumuliert größere Mengen an Salzen wie Kaliumchlorid im Cytosol. Sie gleichen den osmotischen Gradienten über die Zellmembran nach dem sogenannten „Salt-in“-Verfahren aus und verhindern somit ein Austrocknen der Zellen durch Wasseraustritt entlang des osmotischen Gradienten (Oren 1986; Galinski 1995). Diese Organismen sind in der Lage auch in gesättigten Salzlösungen noch zu wachsen. Die erhöhte Ionenstärke im Zellinneren bedingt allerdings eine weitreichende Anpassung des Enzymapparates an eine hohe Salinität (> 10% (w/v) NaCl) im Medium, sodass bei einem plötzlichen Abfall der Salinität die Zellen lysieren.

Die andere Gruppe akkumuliert kleine organische Moleküle im Cytosol. Diese Methode wird „Organic-Osmolyte-Strategie“ genannt und mindert ähnlich wie bei der „Salt-in-Strategie“ den osmotischen Druck auf die Zellmembran (Galinski 1995; Wood 1999). Aber im Gegensatz zu KCl beeinträchtigen die organischen Moleküle nicht die Stoffwechselaktivitäten der Zellen und werden deshalb auch kompatible Solute genannt (Brown 1976). Wenn es also zu einer Senkung der Ionenstärke im Medium kommt, können diese Organismen flexibel reagieren und die angereicherten Solute über die sogenannten mechanoselektiven Kanäle schnell ausschleusen. Dadurch wird ein Bersten der Zelle durch verstärkten Wassereinstrom verhindert (Sukharev et al. 1997; Blount und Moe 1999; Biggin und Sansom 2001). Die Stoffwechselaktivität bleibt dabei voll erhalten, da die Enzyme nicht an den Osmostress angepasst werden müssen und die Zellen so auch bei niedriger Salinität überlebensfähig sind (Oren 2002). Aus diesem Grund ist diese Strategie in der Natur weit verbreitet, nicht nur in Bakterien (Ventosa et al. 1998) und einigen *Archaea* (Roessler und Muller 2001), sondern auch in Eukaryonten, wie pilzartigen, pflanzlichen, tierischen und menschlichen Zellen (Burg und Ferraris 2008; Yancey 2005).

1.2 Kompatible Solute

Zu den kompatiblen Soluten zählen Verbindungen verschiedener Stoffklassen, wie z.B. Zucker (Trehalose und Saccharose), Polyole (Glycerin, Sorbit, Mannit, α -Glycosylglycerin und Mannosylglycerin), N-acetylierte Diaminosäuren (N-acetylglutaminylglutaminamid), Betaine (Glycinbetain und Derivate), Aminosäuren (Prolin, Glutamate, Glutamin und Alanin) und Derivate von Aminosäuren (Pastor et al. 2010). Zu letzterer Gruppe zählen auch Ectoine (Ectoin und Hydroxyectoin).

Alle haben gemeinsam, dass sie klein, gut wasserlöslich und bei physiologischem pH-Wert neutral sind, keine großen polaren Bereiche besitzen und in molaren Mengen im Zellinneren angehäuft werden können ohne den Zellstoffwechsel negativ zu beeinflussen (Galinski 1995; da Costa et al. 1998). Die kompatiblen Solute können von den Organismen entweder aus dem Medium aufgenommen oder neu synthetisiert werden, wobei die Aufnahme energetisch günstiger ist (Oren 1999).

Der biochemische Stoffwechselweg zur Produktion von Ectoin in *Chromohalobacter salexigens* ist in Abbildung 4 dargestellt. Dabei wird im ersten Schritt L-Aspartat mit Hilfe der Aspartatkinase (AsK) phosphoryliert. Im zweiten Schritt wird L-4-Aspartylphosphat mit AsD (L-Aspartat- β -semialdehyddehydrogenase) zu L-Aspartat- β -semialdehyd umgesetzt. Dieses wiederum reagiert mit Glutamat, katalysiert durch das Enzym EctB (L-

Diaminobutansäuretransaminase), unter Abspaltung von 2-Oxoglutarat zu L-2,4-Diaminobutyrat, welches im nächsten Schritt acetyliert wird. Das entstehende N γ -Acetyl-L-2,4-diaminobutyrat (NADA) wird schließlich durch das Enzym EctC (Ectoinsynthase) zyklisch kondensiert zu Ectoin. Die Hauptroute zur Darstellung von Hydroxyectoin ist die Hydroxylierung von Ectoin durch das Enzym EctD (Ectoinhydroxylase). Allerdings ist hier die Rückreaktion unter Sauerstoffverbrauch bevorzugt, sodass vermutet wird, dass es noch eine weitere Route für die Darstellung von Hydroxyectoin aus NADA geben muss. Bei dieser ist aber noch nicht geklärt, welche Reagenzien und Enzyme eine Rolle spielen (Pastor et al. 2010).

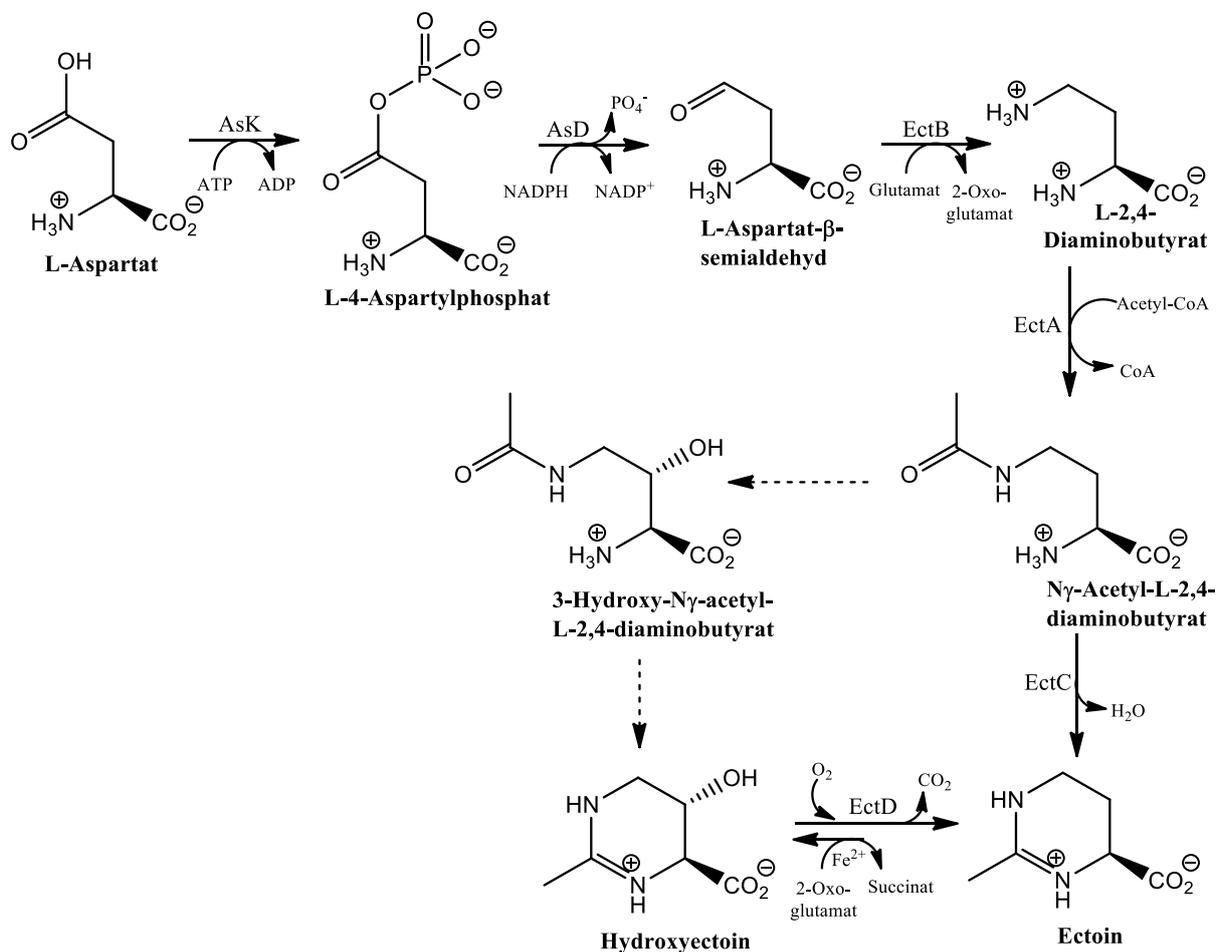


Abbildung 4: Stoffwechselweg zur Synthese von Ectoin in *C. salexigens* (Pastor et al. 2010).

So lassen sich kompatible Solute wie Ectoin und Hydroxyectoin unter Hochsalzbedingungen in Bakterien wie *Halomonas elongata* oder *Maricococcus halophilus* anreichern und aus der Trockenbiomasse isolieren. Ein sehr einfaches Verfahren stellt dabei das „Bacterial Milking“ zur Produktion von Ectoin dar (Sauer und Galinski 1998). Bei diesem wird die Salinität des Mediums gesenkt nachdem die Zellen bei hoher Salinität große Mengen an

Ectoin produziert haben. Dadurch schleusen die Bakterien das Solut ins Medium, welches dann chromatographisch aufgereinigt werden kann. Die Zellen selber bleiben dabei intakt und können mehrfach „gemolken“ werden. Durch diese Methode kann Ectoin im Gegensatz zur chemischen Synthese stereoselektiv erhalten werden. Allerdings ist die Methode auf die jeweilige Substanz beschränkt, die in den Bakterien selber als Endprodukte akkumuliert werden.

1.3 Wirkweise kompatibler Solute

Der biophysikalische Hintergrund dieser protektiven Effekte kompatibler Solute ist Gegenstand verschiedener Theorien, die sich hauptsächlich mit der Wirkung auf Proteine beschäftigen und unter denen das „*preferential exclusion*“-Modell das bisher bekannteste sein dürfte (Arakawa und Timasheff 1983, 1985; Timasheff 2002). Nach diesem Modell wird die native Struktur eines Proteins in Anwesenheit kompatibler Solute stabilisiert, da diese von der Hydrathülle des Proteins ausgeschlossen werden und das Protein somit eine kompaktere Struktur einnimmt, um den Kontakt mit den Soluten zu minimieren (Pastor et al. 2010). Weitergehende Modelle führen den „*osmophobic effect*“ ein, der das Peptidrückgrat als ursächlich für die Stabilisierung von Proteinen durch Solute beschreibt (Liu und Bolen 1995; Qu et al. 1998; Wang und Bolen 1997). Dem gegenüber steht die „*water replacement*“-Theorie (Clegg et al. 1982; Crowe et al. 1990), bei der die Organismen nach Wasserverlust von über 50% ihre Zellstruktur schützen, indem sie kompatible Solute statt Wasser aufnehmen, die dann mit der Oberfläche in Wechselwirkung treten. Dieser Austausch scheint sich vor allem in Regionen mit extrem wenig Wasser zu lohnen.

1.4 Anwendungsgebiete kompatibler Solute

Viele der bisher untersuchten Substanzen, die *in vivo* als Osmolyte fungieren, haben *in vitro* eine stabilisierende Wirkung auf eine Vielzahl unterschiedlicher Biomoleküle gezeigt. Die Firma Bitop (Witten) hat deshalb auf Basis der kompatiblen Solute eine Reihe von Zusätzen (BioStab_{SERIES}) zur Stabilisierung verschiedener Biomoleküle wie Proteine, DNA, RNA und Antikörper entwickelt. Die Hauptbestandteile sind Ectoin und Hydroxyectoin (bitop AG 04.07.2007).

1.4.1 Stabilisierung von Biomolekülen

Enzyme sind im Laboralltag verschiedenen Stressfaktoren, wie Gefrier-, Hitze-, Trocken- oder Oxidationsstress, ausgesetzt. Das ständige Einfrieren und Auftauen führt bei Enzymen häufig zu Schädigungen und somit zu einer verminderten Enzymaktivität. Anhand des Modellenzymes Lactat Dehydrogenase (LDH) konnten verschiedene Arbeitsgruppen (Lippert und Galinski 1992; Göller und A. Galinski 1999; Barth et al. 2000; Andersson et al. 2000; Borges et al. 2002; Nakagawa et al. 2015) zeigen, dass Betain und Ectoine Enzyme vor einer Schädigung bewahren können. Insbesondere Hydroxyectoin gilt zurzeit als einer der besten Protein stabilisatoren, die auf dem Markt erhältlich sind. Dessen stabilisierende Wirkung auf das Modellenzym RNaseA konnte mittels Kalorimetrie gezeigt werden (Knapp et al. 1999). Durch Fluoreszenzspektroskopie wurde zudem nachgewiesen, dass die Schutzwirkung von Ectoinen auf LDH auf einer Stabilisierung der Proteinstruktur beruht (Göller und A. Galinski 1999). Die Denaturierung findet erst bei höherer Temperatur in Anwesenheit von kompatiblen Soluten statt (Ullah 1988). Ectoine verfügen außerdem über Radikalfängereigenschaften und können somit biologische Materialien gegen radikalische Oxidation durch Hydroxyradikale ($\text{HO}\cdot$) schützen (Smirnov und Cumbes 1989).

Die Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* führt in vielen Fällen zu einer Fehlfaltung und Bildung sogenannter „Inclusionbodies“. Diese reduzieren die Ausbeute an nativem Protein erheblich bzw. machen eine aufwendige Renaturierung der fehlgefalteten Proteine notwendig, die wiederum zu Verlusten führt. Die Zugabe von kompatiblen Soluten führt bei der Produktion eines Immuntoxines unter Osmostress zu einer höheren Ausbeute an nativ gefaltetem Enzym (Barth et al. 2000). Zahlreiche menschliche Erkrankungen wie Alzheimer und Morbus Parkinson lassen sich auf falsch gefaltete Proteine zurückführen (Norrby 2011). In einem *in vitro*-Modell konnte gezeigt werden, dass Ectoin die Aggregation von Insulin-Amyloiden hemmt (Arora et al. 2004). Amyloide sind fibrillär vorliegende, unlösliche Ablagerungen von abnorm veränderten Proteinen außerhalb der Zelle. Auch bei Prionkrankheiten führt eine falsche Faltung des Prionproteins zu fatalen Krankheitsverläufen (Colby und Prusiner 2011). Hierbei konnte Ectoin *in vitro* die Aggregation des Prionproteinfragments 106-126 hemmen und so die Toxizität der Prionen senken (Kanapathipillai et al. 2008). Auch eine wärmeinduzierte Aggregation von rekombinanten menschlichen Interferonen kann durch die Zugabe von Ectoin oder Hydroxyectoin signifikant reduziert werden (Salmannejad und Nafissi-Varcheh 2017).

Neben der Wirkung auf Proteine wurde auch die Wechselwirkung von kompatiblen Soluten mit Nukleinsäuren gezeigt. Während Salze wie NaCl die Schmelztemperatur von DNA

erhöhen, ist von kompatiblen Soluten wie Betain, Prolin und Ectoinen bekannt, dass sie die Schmelztemperatur doppelsträngiger DNA verringern können (Lapidot et al. 1999; Schnoor et al. 2004; Kurz 2008). Dies ist vor allem für GC-reiche DNA-Fragmente von Vorteil, da sie im Vergleich zu AT-reichen Sequenzen eine höhere Schmelztemperatur aufgrund ihrer größeren Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen besitzen (Rees et al. 1993; Baskaran et al. 1996; Henke et al. 1997). Ferner wird die Anbindung von chemischen Polymerase-Inhibitoren wie Actinomycin D unterbunden (Aloni et al. 1993), so dass die Isolierung und Aufreinigung vereinfacht und die Lagerstabilität der DNA erhöht wird. Zusätzlich kann die Ausbeute der DNA-Amplifikation durch die Zugabe kompatibler Solute gesteigert werden. Sie stabilisieren die Polymerase, wodurch auch problematische DNA-Fragmente amplifiziert werden können (Lapidot et al. 1999). Ectoine sind zudem in der Lage DNA vor dem Abbau einiger Restriktionsenzyme wie *EcoRI*, *AvaI* oder *DraI* zu schützen bzw. deren Abbau nahezu vollständig zu verhindern (Aloni et al. 1993; Lapidot et al. 1999). Über die Wirkung kompatibler Solute auf RNA ist bislang nicht viel bekannt, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Solute einen destabilisierenden Effekt auf RNA-Sekundärstrukturen haben, während Tertiärstrukturen in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen sowohl stabilisiert als auch destabilisiert werden können (Lambert und Draper 2007).

Desweiteren haben Ectoine auch einen Effekt auf biologische Lipidmembranen. Sie erhöhen die Mobilität der Lipidkopfgruppe durch Steigerung der Oberflächenhydratisierung und rufen somit eine stärkere Fluidität der Membran hervor (Harishchandra et al. 2010).

1.4.2 Wirkung auf Zellen

Ectoine können nicht nur Biomoleküle sondern auch ganze Zellen gegen verschiedene Stressfaktoren schützen (Bownik und Stepniewska 2016). Die Überlebensrate von getrockneten Zellen lässt sich durch den Zusatz von kompatiblen Soluten deutlich verbessern. Sie lassen sich so besser lagern, bei Bedarf rehydrieren oder als Starterkulturen verwenden (Louis et al. 1994). Die Zellen werden dabei hauptsächlich durch den Schutz der Membran vor Schädigungen beim Übergang von flüssigkristallin zu fest stabilisiert (Crowe et al. 1992; Hoekstra et al. 1997).

Auch die Auswirkungen von UV-A induzierten Hautschäden in Keratinozyten (Buenger und Driller 2004) und Immunzellen der Epidermis (Langerhanszellen) (Pfluecker et al. 2005) konnten durch die Zugabe von Ectoin vermieden werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Ectoin die Zellmembran vor SDS-bedingter Lyase schützt und die Wasserbarriere der

Haut erhöht (Graf et al. 2008). Dabei unterstützt Ectoin die zelleigenen Schutz- und Reparaturmechanismen (Bownik und Stepniewska 2016).

Die durch Inhalation von kohlenstoffhaltigen Nanopartikeln ausgelöste proinflammatorische Reaktion in Lungenepithelzellen bei Mäusen konnte durch den Einsatz von Ectoin gehemmt werden (Sydlik et al. 2013; Kroker et al. 2015). Dieser Effekt wird allerdings nicht beobachtet, wenn die Lungenentzündung durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) hervorgerufen wird (Sydlik et al. 2009).

Auch schützt Ectoin die Dünndarmschleimhaut vor Ischämie und Reperfusionsschäden, die bei Komplikationen nach einer Transplantation des Dünndarms auftreten können (Wei et al.; Pech et al. 2013). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Ectoin chronisch-entzündliche Darmerkrankungen bei Ratten auf molekularer Ebene reduzieren kann (Abdel-Aziz et al. 2015).

Das Derivat Laurylectoin ist in der Lage die LPS-induzierte Geneexpression proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Makrophagen zu hemmen (Wedeking et al. 2014). Auch die TNF- α induzierte Expression von IL-1, IL-6 und COX-2 in primären intestinalen Glattmuskelzellen von Ratten konnte reduziert werden (Wedeking et al. 2014).

1.4.3 Industrielle Anwendungen

Durch ihre vielfältigen protektiven Eigenschaften sind die kompatiblen Solute immer wieder in das Interesse der Konsumindustrie gerückt (Kunte et al. 2016). Die Firma Merck (Darmstadt) vertreibt Ectoin seit 2001 unter dem Markennamen RonaCare™ Ectoin als Wirkstoff für die Kosmetikindustrie (Merck KGaA 24.04.2001). Die Firma Marbert (Düsseldorf) und die Firma Sebapharma GmbH&Co.KG (Bad Salzig) haben seitdem Cremes mit dem Namen „Hydro-Cellive-Cream“ bzw. „Seba Med MIKRO 100“ auf dem Markt (Bartens 2001).

In Testreihen konnte gezeigt werden, dass u.a. epidermaler Wasserverlust beim Menschen und der negative Einfluss von Detergenzien auf die Cytoplasmamembranen von Erythrozyten (Bünger 1998, 1999), sowie die schädliche Wirkung von UV-Strahlen, die zu Hautrötung oder Hautkrebs führen können, drastisch reduziert werden konnten (Bünger 2000; Merck KGaA 12.09.2000).

Eine Kooperation der Firmen Bitop (Witten) und Aventis Pasteur (Leimen) befasste sich mit dem Zusatz von Ectoinderivaten zu Impfstoffen. Ferner wird an einer klinischen Studie zur

Reduktion toxischer Nebenwirkungen bei der Immuntoxintherapie von Lymphdrüsenkrebs durch Hydroxyectoin gearbeitet (bitop AG 04.07.2007).

Ectoin wird auch Nasensprays und Augentropfen zugesetzt um Schnupfen oder Entzündungen der Nasenschleimhäute sowie trockene Augen zu behandeln (Dwivedi et al. 2014). Einige Ergebnisse zeigen, dass ectoinhaltige Medikamente Entzündungen an Nasen und Augen ohne schwerwiegende Nebenwirkungen mindern (Werkhauser et al. 2014; Sonnemann et al. 2014; Eichel et al. 2014). Außerdem haben Studien gezeigt, dass Mund- und Rachensprays mit Ectoin sehr effektiv gegen Rachenschleimhaut- und Kehlkopfentzündungen, sowie entzündlichen Lungenkrankheiten sind (Muller et al. 2016; Unfried et al. 2016).

1.5 Entzündungen

Eine Entzündung ist eine physiologische Schutzfunktion des Organismus gegen Schäden durch mechanische Reize (Druck, Reibung, Verletzung oder Fremdkörper), thermische Reize (Wärme oder Kälte), Strahlung (UV, Infrarot, ionisierende Strahlung), chemische Reize (reizende und gesundheitsschädliche Stoffe wie z.B. Säuren, Laugen, Toxine oder entgleiste Enzyme) und Allergene oder Krankheitserreger (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten). Nicht nur Schäden oder Eindringlinge können eine Entzündung hervorrufen, sie können auch durch Krankheiten wie z.B. Asthma, Schuppenflechte, Morbus Chron oder Multiple Sklerose, chronisch werden. Üblicherweise äußert sich eine Entzündung durch Rötung, Schwellung, Überwärmung, Schmerz oder funktionelle Einschränkungen. Diese Entzündungszeichen werden durch die Aktivierung ortsständiger Immunzellen, Veränderung an Gefäßen und das Einwandern und die Aktivierung weiterer Immunzellen ausgelöst.

1.5.1 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort wird direkt nach dem Eindringen des Erregers aktiviert. Diese weisen eine Reihe von unveränderten Merkmalen auf, die sich eindeutig von den körpereigenen Zellen des infizierten Gewebes unterscheiden. Einige Bestandteile der Bakterienhülle (z.B. Lipopolysaccharide) oder bestimmte Strukturmerkmale von Nukleinsäuren (z.B. doppelsträngige RNA mancher Viren) kommen beim Menschen nicht vor und können daher leicht erkannt werden. Diese Merkmale werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet. Immunzellen erkennen diese PAMPs durch verschiedene Membranrezeptoren, die *pattern-recognition receptors* (PRRs) (Kumar et al. 2011). Eine Untergruppe dieser Rezeptoren sind *toll-like receptors* (TLRs), die Strukturen

von fast allen Erregertypen erkennen und daraufhin Signale auslösen, welche Immunzellen zur Produktion von Zytokinen und anderen Abwehrstoffen anregen (Armant und Fenton 2002). So unterschiedlich die eingedrungenen Erreger sind, so variabel ist auch der Ablauf der angeborenen Immunantwort. Welche Zellen und Faktoren beteiligt sind, in welcher Reihenfolge sie eingreifen und welche letztendlich für den Erfolg entscheidend sind, hängt stark von Art und Ort der jeweiligen Infektion ab. Dringen Bakterien beispielsweise in eine Hautwunde ein, kommen vor allem Makrophagen als erste mit ihnen in Berührung und leiten eine Abwehrreaktion ein. Die Makrophagen beginnen sofort mit der Phagozytose und Vernichtung der Erreger und setzen gleichzeitig viele Botenstoffe (z.B. TNF- α) frei, die die umliegenden Zellen aktivieren und den Einstrom weiterer Immunzellen (z.B. Endothelzellen) auslösen (Janeway 2009).

1.5.2 Adaptive Immunantwort

Wenn eine Infektion die angeborenen Abwehrmechanismen überwunden hat, wird die adaptive Immunantwort in Gang gesetzt. Der Krankheitserreger setzt seine Vermehrung fort und Antigene häufen sich an. Dies löst zusammen mit der durch die angeborene Immunantwort veränderte zelluläre Umgebung eine adaptive Immunantwort aus (Janeway 2009). Bei dieser werden antigenspezifische T- und B-Zellen aktiviert. Je nachdem welche Zellen aktiviert werden, handelt es sich um die zelluläre (T-Zellen) oder humorale (B-Zellen) Immunantwort (Kumar et al. 2011).

1.5.3 Entzündungsmediatoren der Immunantwort

Die im Laufe der Immunantwort ausgeschütteten Entzündungsmediatoren unterscheiden sich nicht nur in ihrer Wirkweise sondern auch in ihrer chemischen Struktur. Zu ihnen gehören sowohl niedermolekulare Verbindungen, wie Histamin, Serotonin, Prostaglandine und Leukotriene als auch höhermolekulare Verbindungen oder Proteine, wie Bradykinin, Substanz P, Komplementfaktoren und Zytokine (Mutschler et al. 2007).

Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um Proteine oder Glykoproteine, die zum einen regulatorische Funktionen bei der Zelldifferenzierung und dem Zellwachstum haben und zum anderen als Botenstoffe in der Zellabwehr dienen (Horn 2009). Sie werden hauptsächlich von Makrophagen, Monozyten und T-Zellen produziert (Feghali und Wright 1997; Dinarello 2000)

und in verschiedene Gruppen unterteilt: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. In dieser Arbeit sollen vor allem die entzündungshemmenden Effekte auf proinflammatorische Zytokine aus der Gruppe der Interleukine und Tumornekrosefaktoren untersucht werden.

Interleukine

Interleukine sind Signalstoffe die maßgeblich zur Kommunikation zwischen weißen Blutkörperchen beitragen. Ihre Wirkung ist sehr unterschiedlich. Viele üben einen proinflammatorischen Effekt aus und einige, wie das Interleukin-4 (IL-4), weisen auch antiinflammatorische Eigenschaften auf (Horn 2009).

Zu der Gruppe der Interleukine gehört das Interleukin-1 (IL-1). Dieses wird hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen synthetisiert und induziert dort die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren (z.B. andere Zytokine und Prostaglandine).

Auch das Interleukin-6 (IL-6) zählt zu den Interleukinen und wird ebenfalls in mononuklearen Phagozyten produziert (Horn 2009). Die Wirkung von IL-6 wird über den IL-6-Rezeptor vermittelt, der sich z.B. an der Membran vieler Leukozyten befindet. Es aktiviert und steuert lokale und systemische Entzündungsmediatoren, wie IL-1 und TNF- α (Ishihara und Hirano 2002; Kamimura et al. 2003).

Das Interleukin-10 (IL-10) gilt zwar oft als antiinflammatorisch, weil es aktivierte Makrophagen hemmt (Horn 2009), jedoch zeigt es gerade auch bei LPS-induzierten Entzündungen auch proinflammatorische Effekte (Lauw et al. 2000). Dabei hemmt es z.B. die Aktivierung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) durch LPS in Monozyten.

Ein weiteres proinflammatorisches Interleukin ist IL-17. Dieses wird von TH17-Zellen (spezieller Typ von T-Helferzellen) produziert und scheint an der Vermittlung des Entzündungsvorgangs in Fibroblasten beteiligt zu sein (Kolls und Linden 2004).

Tumornekrosefaktoren

Zu den Tumornekrosefaktoren (TNF) zählen 18 verschiedene Vertreter (Gaur und Aggarwal 2003), der am besten untersucht ist TNF- α . Es handelt sich dabei um ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 17 kDa (Shirai et al. 1985). TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten (Lenz et al. 2007) unter extrazellulären Stressfaktoren, Hitzeschock oder Pathogenen produziert. Dadurch ist TNF- α ein primärer Mediator der Immunregulation und Sepsis. Seine Wirkungen decken sich größten Teils mit denen von IL-1 (Horn 2009). TNF- α wirkt auf den TNF- α -Rezeptor Typ I, welcher auf

nahezu allen Zelltypen exprimiert ist (Locksley et al. 2001) und so die Produktion anderer Zytokine, Prostaglandin E_2 und Akute-Phase-Proteinen stimuliert, welche die Entzündungsreaktion weiterhin aufrecht erhalten.

Cyclooxygenasen

Es existieren mindestens zwei verschiedene Cyclooxygenasen, COX-1 und COX-2. Die Cyclooxygenase-2 (COX-2), auch Prostaglandinsynthase-2 (PGHS-2) genannt, ist ein Enzym, das wie Cyclooxygenase-1 (COX-1) Arachidonsäure zu Prostaglandin H_2 oxidiert (O'Neill und Ford-Hutchinson 1993). Während COX-1 konstitutiv exprimiert wird, wird die Synthese von COX-2 erst durch LPS oder verschiedene Mediatoren der Immunantwort, z.B. Zytokine, induziert (Simmons et al. 2004). Reguliert wird die Transkription der COX-2 unter anderem durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Newton et al. 1997).

1.5.4 Regulierung von NF- κ B

Die Entzündungsmediatoren der Immunantwort stehen unter der Kontrolle von NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird ubiquitär exprimiert und kommt im Zytoplasma von nahezu allen Zelltypen vor. Es sind derzeit ca. 500 Gene bekannt, darunter auch Zytokine und Prostaglandine (Chen et al. 1999; Lappas et al. 2002), die durch NF- κ B kontrolliert werden (Gilmore 2006). Bei NF- κ B handelt es sich nicht um ein einzelnes Protein, sondern um fünf bis sieben verschiedene Proteine, deren gemeinsames Kennzeichen eine Domäne von 300 Aminosäuren ist, die sogenannte Rel-Homologie-Domäne (Gilmore 2006). In den meisten Zellen liegt der NF- κ B Komplex, durch die Bindung an inhibitorische- κ B Proteine (I κ Ba), inaktiv im Zytoplasma vor. Seine Aktivierung erfolgt durch Wachstumsfaktoren, Zytokine (z.B. TNF- α oder IL-1 β) aber auch bakterielle und virale Antigene (z.B. Lipopolysaccharide) (Gilmore 2006). Diese Stressfaktoren aktivieren unterschiedliche Signalkaskaden, welche am Ende einen I κ B-Kinase-Komplex (IKK) aktivieren, welcher aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β , sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ besteht (Palsson-McDermott und O'Neill 2004). Diese Kinasen phosphorylieren das inhibitorische Protein I κ B (Takeda und Akira 2005), was zu einer Degradation von I κ B und der Freisetzung des aktivierten NF- κ B Komplexes führt. Im Zellkern angekommen reguliert dieser unter anderem die Transkription der verschiedenen proinflammatorischen Gene (Ghosh et al. 1998; Karin und Ben-Neriah 2000).

1.6 Ceramide

Die Ceramide zählen zu den Sphingolipiden, eine Untergruppe der Lipide. Sie bestehen aus einem Sphingosinmolekül, welches durch eine Amidbindung an eine Fettsäure gebunden ist (Abbildung 5). Sie kommen zusammen mit anderen Hauptbestandteilen in der menschlichen Hornhaut vor und bilden dort aufgrund ihrer amphiphilen Struktur Lipiddoppelschichten aus, mit denen sie die Haut vor dem Austrocknen schützt und das Eindringen von Fremdkörpern verhindert.

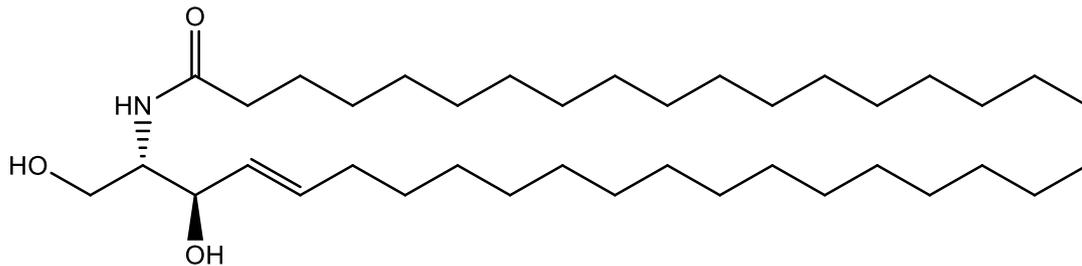


Abbildung 5: Struktur von Ceramid.

Neben dem Schutz der Haut besitzen Ceramide auch auf molekularer Ebene viele wichtige Funktionen. Sie sind nicht nur an der zellulären Stressantwort, Apoptose, Zelldifferenzierung und -alterung beteiligt, sondern auch an Neurodegeneration, Tumorbildung, Infektion und Inflammation (Hannun und Luberto 2000; Hannun und Obeid 2002; Luberto et al. 2002; Ruvolo 2003).

1.7 Motivation

Ectoin hat nicht nur einen stabilisierenden Einfluss auf Bakterien (Kapitel 1.1) und Makromoleküle (Kapitel 1.4.1), sondern auch auf Säugerzellen (Kapitel 1.4.2). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Ectoin eine protektive Wirkung in Säugergewebe zeigt (Wei et al. 2009; Pech et al. 2013) und mit Entzündungsprozessen interferiert (Wedeking et al. 2014). Die entzündungsprotektive Wirkung wurde durch einen lipophilen Anker um das zehnfache verbessert. Die inhibitorische Wirkung von 5 μ M Laurylectoin auf die LPS-induzierte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 sowie auf die Expression von TNF- α und COX-2 entsprach jener von 50 μ M Ectoin. Untersuchungen zum Einfluss von Ectoin und Laurylectoin auf die Translokation von NF- κ B in den Zellkern zeigten erwartungsgemäß eine signifikant höhere Wirksamkeit der lipophilen Verbindung (Wedeking et al. 2014). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der positiv geladene hydrophobe Ester zu 80 % zellassoziiert vorliegt. Hingegen waren es im Falle des

zwitterionischen hydrophilen Ectoins lediglich 3 %. Der Nachweis der Zellassoziation von Laurylectoin erfolgte indirekt über die Bestimmung von freigesetztem Ectoin. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ectoin mittels Laurylectoin als Transportmittel in eukaryontische Zellen geschleust werden kann. (Wedeking et al. 2014). Es wird dabei vermutet, dass Laurylectoin in der Zelle durch unspezifische Esterasen in seine Ausgangsstoffe Ectoin und 1-Dodecanol gespalten wird. Um diese Ergebnisse weiter abzusichern, sollen in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche lipophile Hydroxyectoinderivate synthetisiert werden. Zum einen ein Laurylester (Abbildung 6A) und zum anderen ein Laurylether (Abbildung 6B). Damit ließe sich dann nachweisen, ob der Ester tatsächlich von Esterasen gespalten wird, da der Ether vermutlich metabolisch stabil ist und daher nicht wieder in seine Edukte gespalten werden sollte. Zudem soll auch die entzündungsvorbeugende Wirkung dieser lipophilen Hydroxyectoinderivate in Makrophagenkulturen überprüft werden.

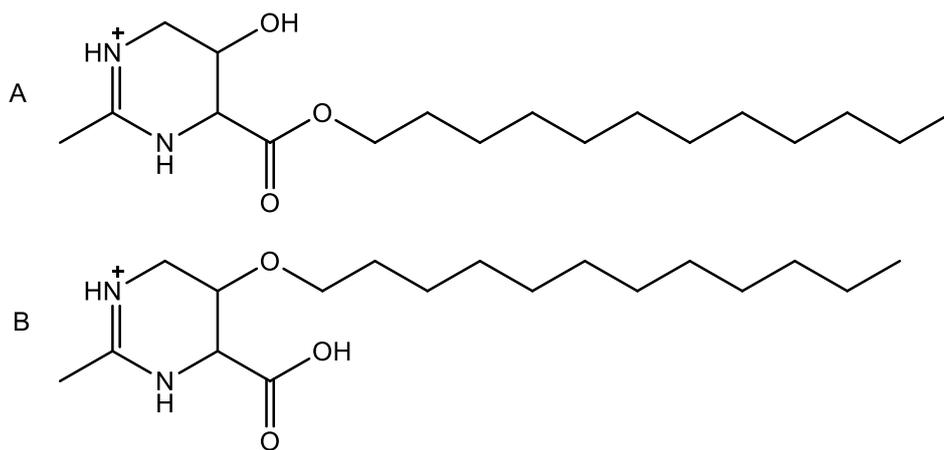


Abbildung 6: Struktur des Laurylesters (A) und Laurylethers (B).

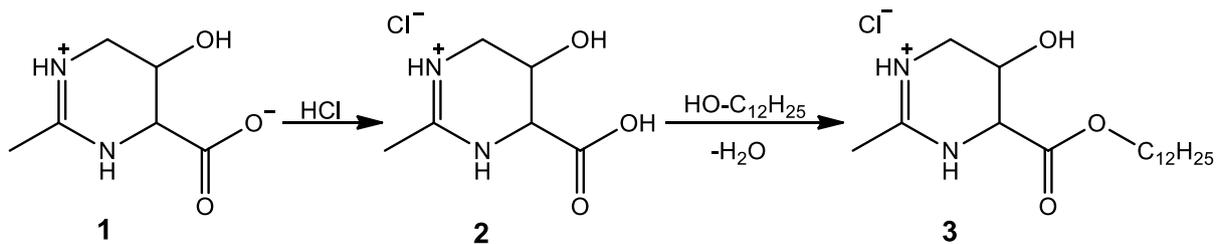
Wenn Laurylectoin wirklich durch Esterasen in der Zelle gespalten wird, stellt sich die Frage, was weiter mit dem freigesetzten Ectoin in der Zelle passiert. Wird es z.B. verstoffwechselt oder wieder aus der Zelle ausgeschleust? Hierfür soll die Biosynthese von ^{13}C -Ectoin und dessen Überführung in das entsprechende ^{13}C -Laurylectoin durchgeführt werden. So könnten mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie und HPLC-Messungen mögliche Stoffwechsel- und Abbauprodukte in Makrophagenkulturen identifiziert werden.

1.8 Ergebnisse und Diskussion

1.8.1 Synthese der Ectoinderivate

Synthese von Laurylhydroxyectoin

In einer zweistufigen Synthese wurde das Laurylhydroxyectoin in Anlehnung an die Literaturvorschrift von Wedeking *et al.* dargestellt (Wedeking *et al.* 2014).

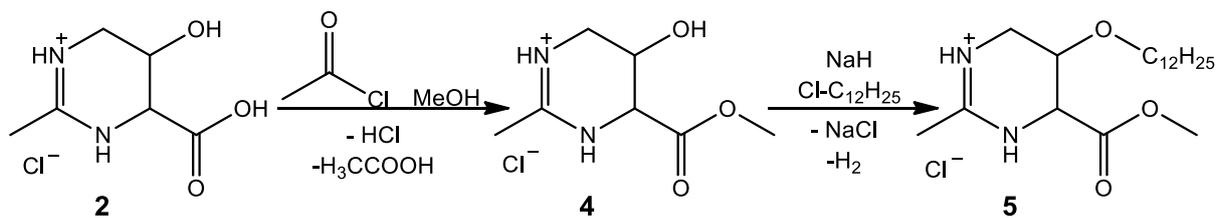


Schema 1: zweistufige Synthese von Laurylhydroxyectoin.

In der ersten Stufe wurde ausgehend von Hydroxyectoin (1) und Salzsäure bei Raumtemperatur Hydroxyectoinhydrochlorid (2) als farbloser, watteartiger Feststoff in einer quantitativen Ausbeute erhalten (Schema 1). Anschließend wurde 2 zusammen mit 1-Dodecanol, Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und katalytischen Mengen *p*-Dimethylaminopyridin (DMAP) bei Raumtemperatur gerührt. Nach drei Stunden und säulenchromatographischer Aufreinigung wurde Laurylhydroxyectoin (3) als farbloser, kristalliner Feststoff in einer Ausbeute von 2% erhalten (Schema 1). 3 konnte NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Die Signale des Lipidankers sind im Vergleich zum Edukt (1.28 ppm) leicht hochfeldverschoben (1.25 ppm). Die zweite Stufe wurde im Vergleich zur Literatur leicht abgewandelt (Wedeking *et al.* 2014). Um die Reaktionszeit zu verkürzen und die Ausbeute zu erhöhen wurden katalytische Mengen DMAP hinzugefügt. Allerdings erzielte dies nicht den gewünschten Effekt. Die Reaktionszeit ließ sich nicht verkürzen und auch die Ausbeute war schlechter als in der Literatur (15%) angegeben. Dies ist mit dem Unterschied zwischen dem in der Literaturvorschrift verwendeten Ectoin und Hydroxyectoin zu erklären. Die OH-Gruppe des Hydroxyectoins bildet mit der Carboxylgruppe eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung, die sehr stabil ist. Durch Variation der Lösungsmittel, Aktivierungsreagenzien wie DCC, Reaktionszeiten und Temperaturen ist es nicht gelungen die Ausbeute zu erhöhen.

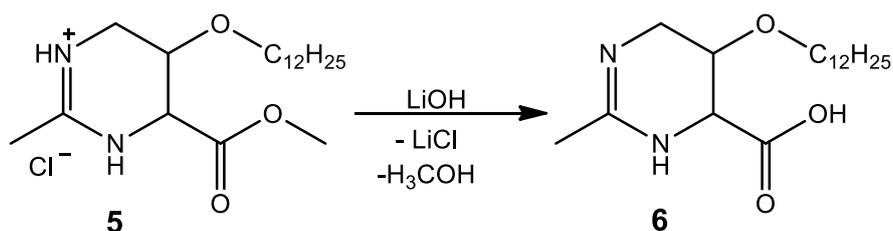
Synthese von Laurylether

Laurylether sollte in einer vierstufigen Synthese dargestellt werden. In der ersten Stufe wurde Hydroxyectoin mit Salzsäure in sein Hydrochlorid überführt (Schema 1) um die Löslichkeit zu erhöhen, da Hydroxyectoin nur gut in Wasser und anteilig in Methanol löslich ist. Beide Lösemittel sind für eine Ethersynthese ungeeignet. Im nächsten Schritt musste die Carboxylgruppe geschützt werden. Hierzu wurde **2** mit Acetylchlorid in Methanol umgesetzt. Unter Abspaltung von Salzsäure und Essigsäure wurde Methylhydroxyectoin (**4**) als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 90% erhalten (Schema 2).



Schema 2: 3. und 4. Stufe der Synthese von Laurylmethylether.

Dieser Schritt läuft über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus, wobei aus einer Säure ein Ester generiert wird. Bei der vierten Stufe wird die Hydroxygruppe von **4** mit Hilfe von Natriumhydrid und 1-Chlordodecan unter Freisetzung von Natriumchlorid und Wasserstoff verethert (Schema 2). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte der Laurylether als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 3% isoliert werden. Eine Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS)-Analyse zeigte, dass es sich eindeutig um das Produkt **5** handelte. Der Molekülpeak bei 341.1, der zugleich auch der Basispeak ist, und das Fragmentierungsschema sind charakteristisch für diese Verbindung. Der Mechanismus dieser Reaktion beruht auf dem der Williamson-Ethersynthese, welche ein Sonderfall der nukleophilen Substitution zweiten Grades (S_N²) ist, wobei das Alkoholat als Nukleophil dient. Im nächsten Schritt sollte die Schutzgruppe entfernt werden. Dazu wurde **5** zusammen mit einer 0.75 M Lithiumhydroxidlösung in 33% THF/Ethanol umgesetzt (Schema 3).

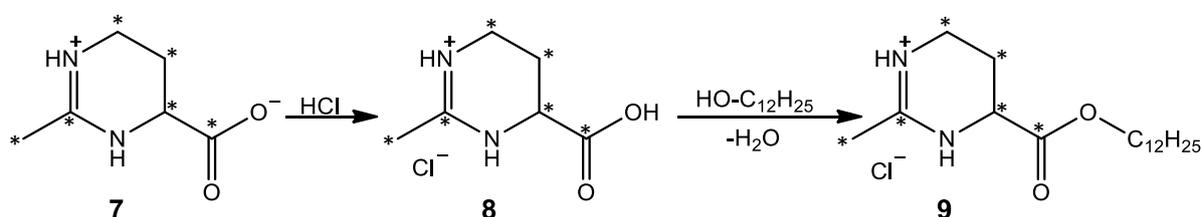


Schema 3: Verseifung des Laurylmethylethers.

Nach 23 Stunden bei Raumtemperatur und Extraktion mit Diethylether konnte das gewünschte Produkt weder mittels GCMS noch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Das NMR-Spektrum zeigte eine unselektive Reaktion. Dies lässt darauf schließen, dass das Lithiumhydroxid als Base wahrscheinlich zu stark (pK_B 0.18) ist und die Verbindung nicht nur verseift, sondern auch weiteren Spaltungsreaktionen unterzieht. Die Reaktion müsste mit einer milderen Base wie zum Beispiel Hydrogencarbonat (pK_B 7.48) wiederholt werden. Leider gelang es in dieser Arbeit aber nicht die Synthese von **5** zu reproduzieren, sodass eine Wiederholung mit einer schwächeren Base nicht möglich war.

Synthese von ^{13}C -Laurylectoin

Für die Synthese von ^{13}C -Laurylectoin wurde ^{13}C -markiertes Ectoin von der Arbeitsgruppe Galinski vom Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn über das *bacterial milking* Verfahren hergestellt. Dazu wurde ^{13}C -markiertes L-Aspartat zu einer *Halomonas elongata* Kultur gegeben. Diese synthetisieren über einen bekannten Stoffwechselweg unter Stressbedingungen ^{13}C -Ectoin, welches die Bakterien ins Medium abgeben und dann isoliert werden kann. Anschließend wurde es in einer zweistufigen Synthese in Anlehnung an die Literaturvorschrift von Wedeking *et al.* zu ^{13}C -Laurylectoin umgesetzt (Wedeking *et al.* 2014).



Schema 4: zweistufige Synthese des ^{13}C -markierten Laurylectoins.

Die erste Stufe wurde analog zur Literaturvorschrift durchgeführt. Bei der zweiten Stufe wurde anders als in der Literatur Dimethylaminopyridin (DMAP) in katalytischen Mengen hinzugefügt um die Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute zu erhöhen. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur in Acetonitril wurde aus **8** und 1-Dodecanol unter Abspaltung von Wasser der Ester **9** als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 16% erhalten (Schema 4). Dies weicht deutlich von der in der Literatur mit 36% angegebenen Ausbeute ab (Wedeking *et al.* 2014). Somit zeigte DMAP nicht den gewünschten Effekt.

1.8.2 Untersuchung der entzündungsvorbeugenden Wirkung der Ectoinderivate in kultivierten Makrophagen

Bestimmung der Wirkung von LOH auf die Transkription von proinflammatorischen Proteinen

Zunächst wurden die Ergebnisse von Wedeking *et al.* 2014 überprüft. Hierfür wurden Makrophagen vor dem Auslösen einer Entzündung mittels LPS mit Ectoin (E) bzw. Laurylectoin (LE) vorinkubiert. Danach wurde die Expression (Transkription) von Genen, die für bestimmte inflammatorische Proteine codieren, untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass LE die entzündungsvorbeugende Wirkung von Ectoin um ein Vielfaches verbesserte (Wedeking *et al.* 2014). Zudem war bekannt, dass Hydroxyectoin (OHE) eine ähnliche Wirkung hat wie Ectoin hat (Hagen-Euteneuer 2013). Deshalb wurde in der nun folgenden Untersuchung der Wirkung von Laurylhydroxyectoin (LOH) lediglich LE als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Transkription der Gene, die für die Interleukine IL-1, IL-6 und IL-10, sowie für den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und die Cyclooxygenase-2 (Cox-2) codieren, wurden in zwei verschiedenen Makrophagen Zelllinien (RAW 264.7 und J774) untersucht. Hierzu wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert, mit 5 μ M eines Ectoinderivats oder Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (Abbildung 7) vorinkubiert und anschließend mit Lipopolysacchariden (LPS) (100 ng/ml) behandelt.

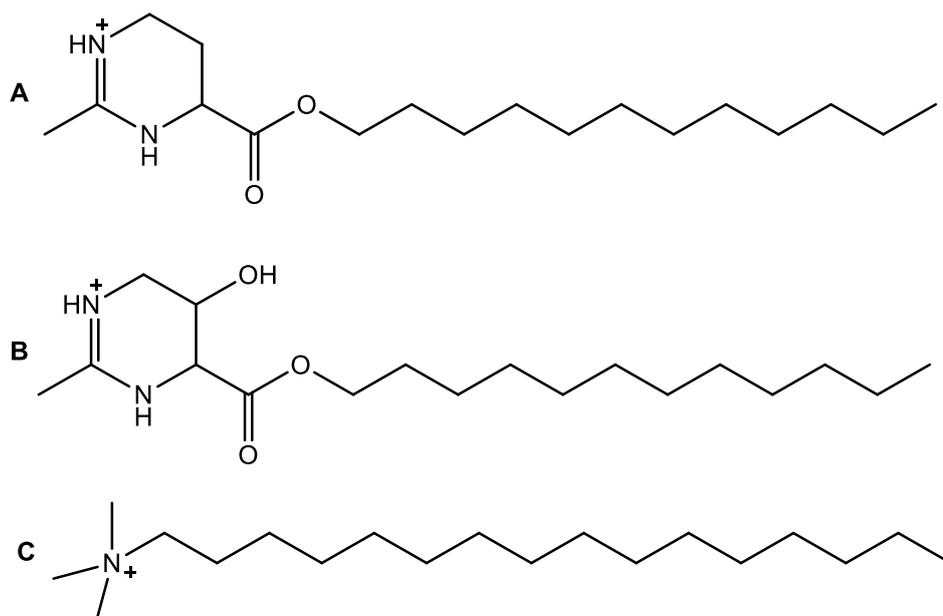


Abbildung 7: Strukturen von Laurylectoin (A), Laurylhydroxyectoin (B), Cetyltrimethylammoniumbromid (C).

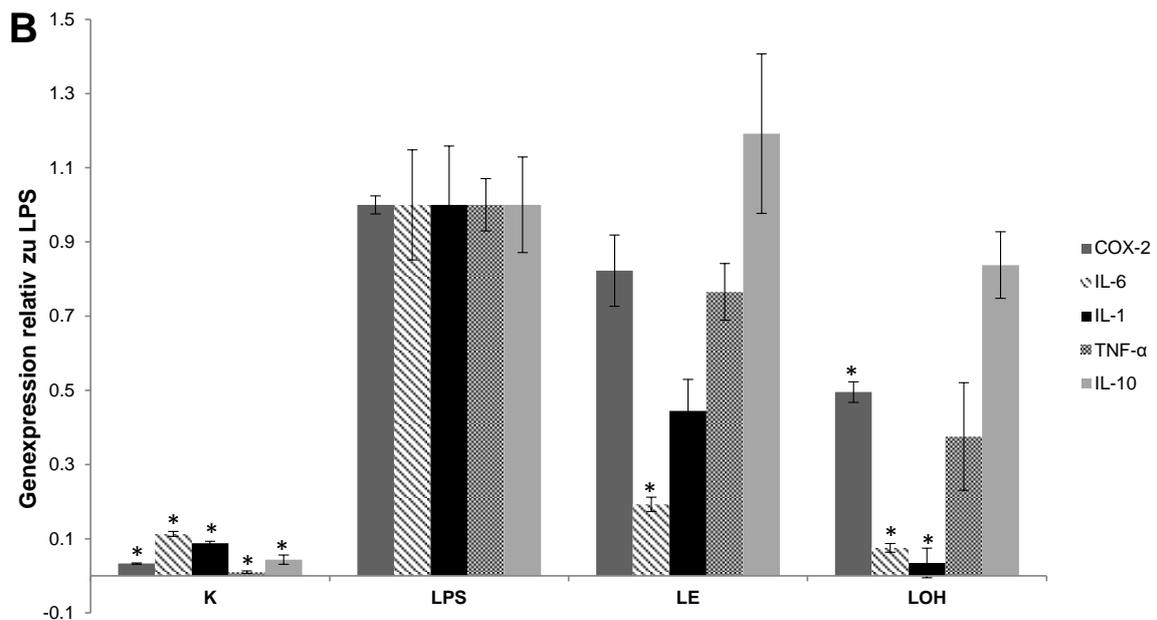
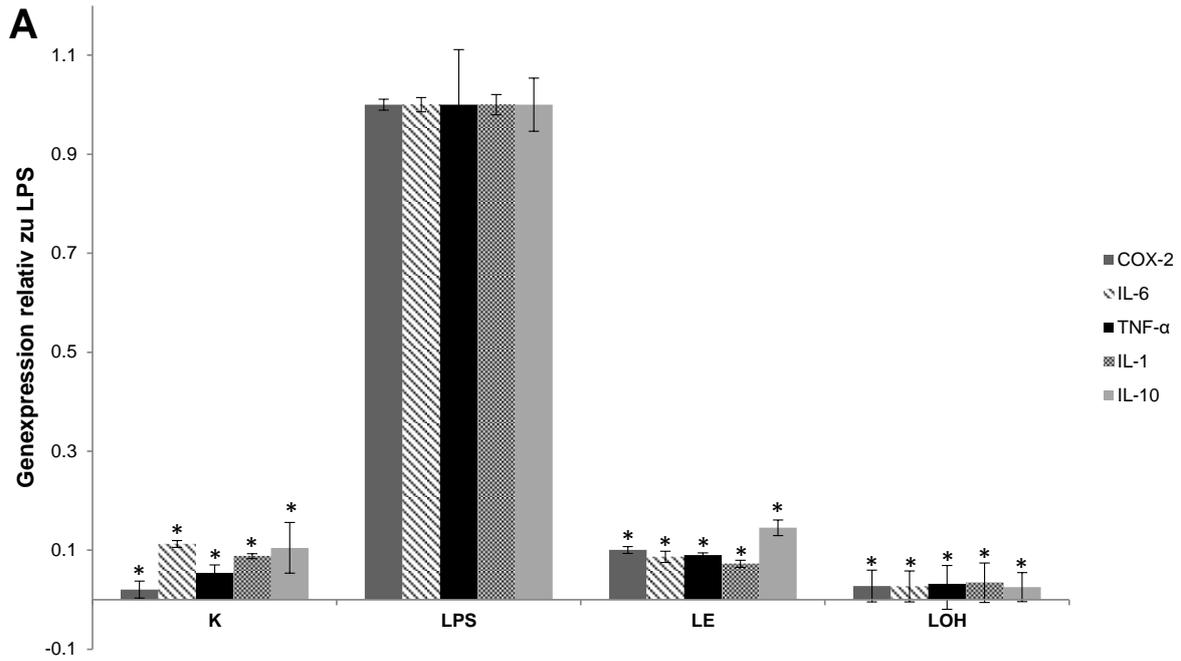


Abbildung 8: Wirkung von Laurylhydroxyectoin (LOH) auf LPS-induzierte COX-2, IL-1, IL-6, IL-10 und TNF- α Proteinexpression in RAW 264.7 (A) und J774 (B) Makrophagen. Die Zellen wurden eine Stunde mit jeweils 5 μ M LE (Positivkontrolle) bzw. LOH oder entsprechender Menge Lösungsmittel (Kontrollen, K) vorinkubiert. Anschließend wurde LPS (100 ng/mL) in alle Proben außer K hinzugegeben. Nach zwei Stunden wurde die gesamte RNA isoliert und mittels quantitativer real time PCR analysiert (siehe Kap. 4.5). * signifikant verschieden von LPS mit $p < 0,05$.

Nach Isolation der RNA und deren Qualifizierung mittels Agarosegelelektrophorese wurde ihre Quantität mit Hilfe eines Photometers bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren, bestimmt. Anschließend wurde die RNA auf eine einheitliche Konzentration

verdünnt, über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels real time PCR (siehe Kapitel 4.5.5) die Transkriptmengen der zu untersuchenden Proteine bestimmt.

In Abbildung 8A ist die LPS induzierte Proteinexpression in den RAW Makrophagen 246.7 dargestellt. Diese ist für alle fünf Proteine signifikant verschieden zu LPS. Im Fall von LOH werden alle Proteine im Vergleich zu LPS um 97% reduziert. Bei LE ist die Reduktion von IL-10-RNA um 85% am geringsten im Vergleich zu jener von COX-2, TNF- α , IL-1 und IL-6, bei denen die Expression auf 10% oder weniger (7 bzw. 9%) sinkt.

Demnach entsteht der Eindruck, dass die entzündungsvorbeugende Wirkung von LE bzw. LOH Zelltyp-abhängig ist und nicht auf alle Zellen übertragen werden kann. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedliche Wirkung auf die untersuchten Proteine in J-774 Makrophagen deren Heterogenität geschuldet ist. Während die RAW 264.7 Makrophagen ausschließlich adhären sind, d.h. in Zellkulturflaschen Monolayer ausbilden, sind J-774 Makrophagen nur zum Teil adhären während ein unbestimmter Teil als Suspension vorliegt, was zur Aggregatbildung führen kann. Aufgrund dieser Unterschiede könnte die entzündungsvorbeugenden Wirkungen von LE und LOH so verschieden ausfallen. In der heterogenen Zelllinie kann sich die Wirkung von LE bzw. LOH nicht immer gleich entfalten, wobei dies bei den Monolayern sehr wohl der Fall ist.

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den gemessenen Wirkungen nicht um unspezifische Detergenzeffekte handelt, wurde in Parallelexperimenten das strukturverwandte kationische Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) in die Untersuchungen mit aufgenommen. Wie in Abbildung 9 dargestellt, bewirkt CTAB auch eine Reduktion der Proteinexpression, die im Falle von IL-1 und IL-10 um 65% bzw. 63% beträgt. Allerdings ist diese Reduzierung der Expression nicht signifikant verschieden von jener in Gegenwart von LPS. Hingegen ist die Expression der Proteine, die für COX-2, IL-6 und TNF- α codieren ähnlich gering wie im Falle von LE und beträgt lediglich 13%, 18% bzw. 25%, der entsprechenden Proteinexpression in Gegenwart von LPS. Auf den ersten Blick lässt dieses Ergebnis vermuten, dass die beobachteten Wirkungen der Ectoinderivate unspezifischer Natur sind.

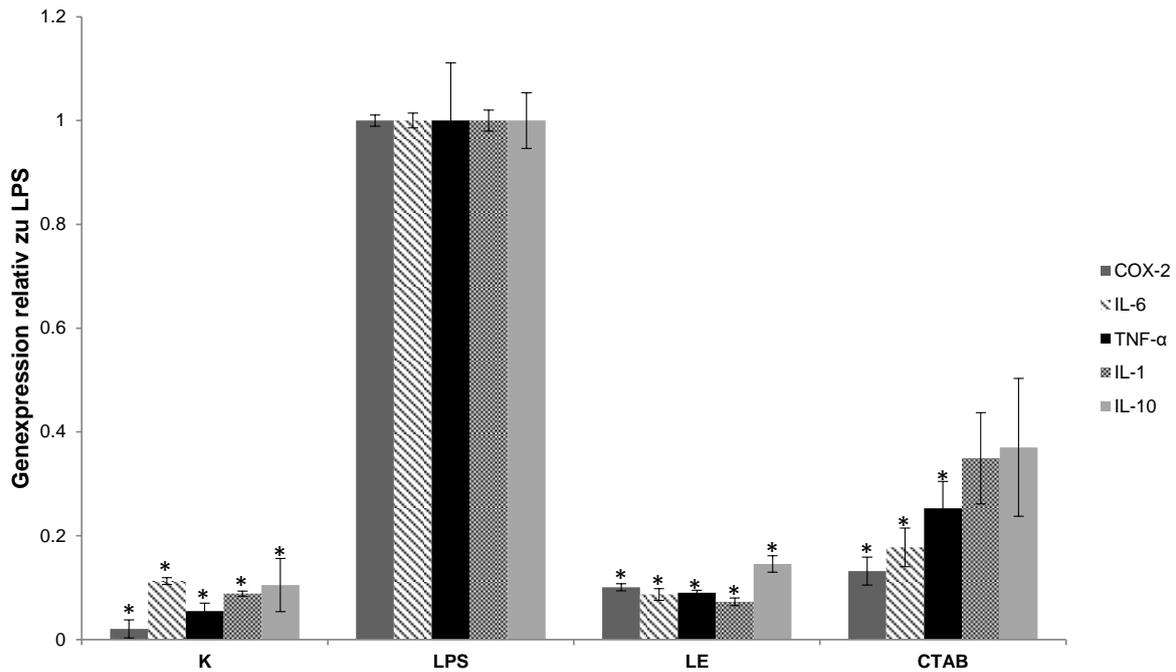


Abbildung 9: Wirkung von Laurylectoin (LE) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) auf LPS-induzierte COX-2, IL-1, IL-6, IL-10 und TNF- α Proteinexpression in RAW 264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden eine Stunde mit jeweils 5 μ M LE (Positivkontrolle) bzw. CTAB oder entsprechender Menge Lösungsmittel (Kontrollen, K) vorinkubiert. Anschließend wurde LPS (100 ng/mL) in alle Proben außer K hinzugegeben, die gesamte RNA nach zwei Stunden isoliert und mittels quantitativer real time PCR analysiert (siehe Kap. 4.5). * signifikant verschieden von LPS mit $p < 0,05$.

Betrachtet man allerdings die verheerende Auswirkung von CTAB auf die Zellmorphologie der Makrophagen, dann muss die zytotoxische Wirkung von CTAB, die bereits beim Zeitpunkt der Zugabe deutlich erkennbar ist (Abbildung 10) mitberücksichtigt werden. Mit zunehmender Inkubationszeit sterben weitere Zellen ab und die verbleibenden zeigen eindeutige Veränderungen wie die Phasenkontrastaufnahmen in Abbildung 10 zeigen. Diesen Effekt hat CTAB auch auf Bakterien und Pilze und wird daher als Desinfektionsmittel und Antiseptikum verwendet (Laemmli 1970). LE hat zwar auch einen wachstumsstörenden Effekt auf Bakterien (Wedeking 2005), nicht aber auf Säugerzellen, in denen es neben dem entzündungsvorbeugenden anscheinend auch einen zellschützenden Effekt selbst bei einer Konzentration von 25 μ M ausübt (Abbildung 10). Die Zellen sind anders als bei CTAB vollkommen intakt. Die Zelltoxizität bedingt durch CTAB könnte eine reduzierte Expression in den Makrophagen hervorrufen und somit den Anschein erwecken, dass es einen entzündungsvorbeugenden Effekt hat.

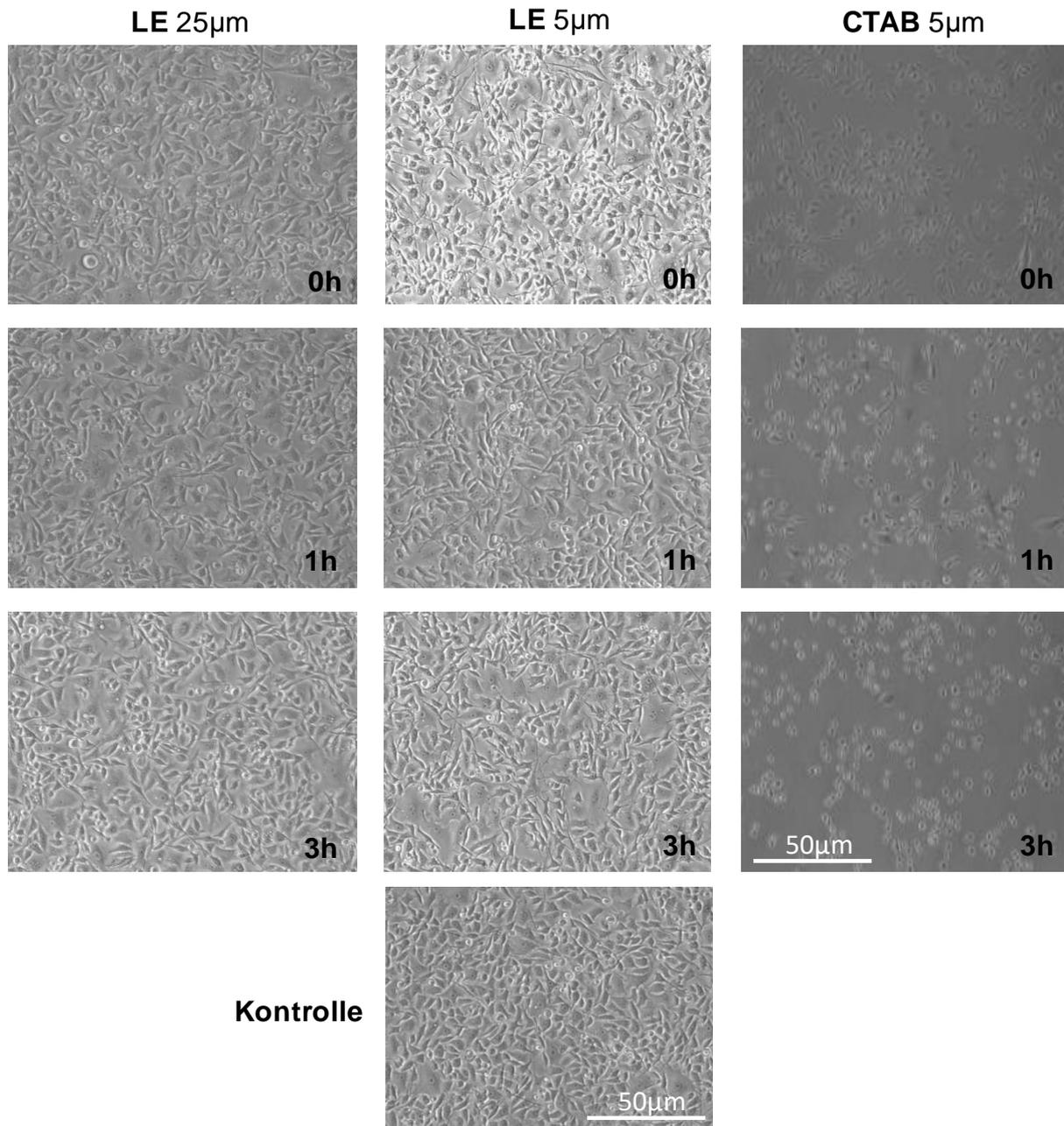


Abbildung 10: Phasenkontrastaufnahmen von RAW Makrophagen 264.7 nach insgesamt dreistündiger Inkubation mit 5 bzw. 25 µM LE, 5 µM CTAB und ohne Zusatz (Kontrolle).

Bestimmung des Ceramidgehalts

Ceramid ist bekanntlich ein wichtiges Mediatormolekül, welches dann vermehrt gebildet wird, wenn Zellen Stresssituationen wie z.B. Entzündungen ausgesetzt werden. Tatsächlich erhöht der Stressfaktor LPS den Ceramidgehalt in primären Darmmuskelzellen von Ratten signifikant (Wedeking 2012). Ähnlich führt Ischämie/Reperfusion in Dünndarmtransplantaten zum Ansteigen von Ceramid (Wei et al. 2009). Interessanterweise wirkten Ectoin und Laurylectoin diesem Anstieg von Ceramid in beiden Fällen entgegen.

Daher sollte zunächst überprüft werden, ob Ceramid auch in Makrophagen als Entzündungsmediator wirkt. Hierfür wurden Ceramide nach Behandlung der Makrophagen mit Ectoinderivaten (5 μ M) und Stimulation mit LPS (100 ng/ml) wie in Kapitel 4.6 beschrieben isoliert und visualisiert (Abbildung 11B).

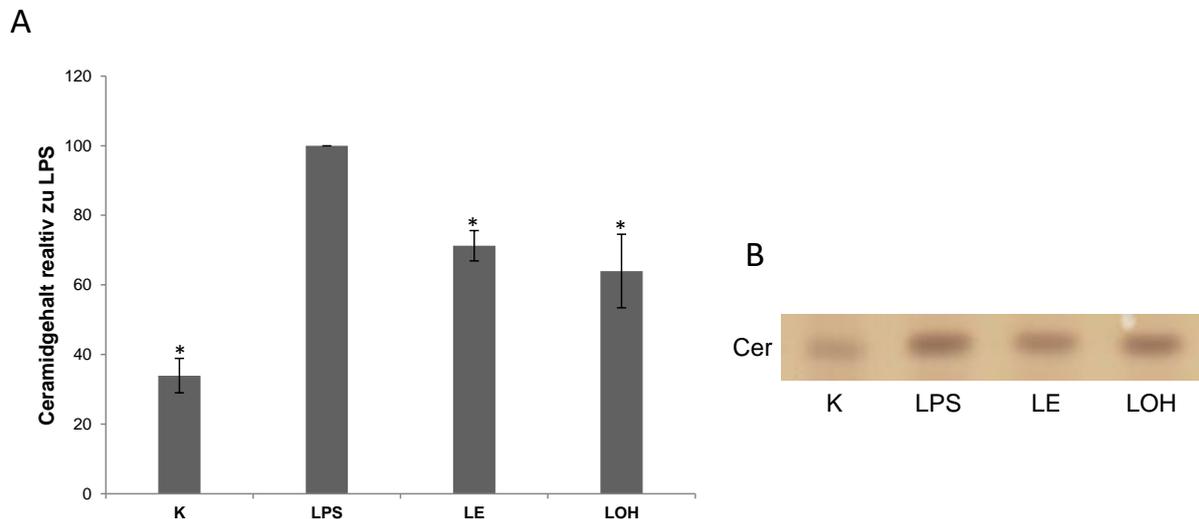


Abbildung 11: Bestimmung des Ceramidgehalts in RAW Makrophagen 264.7. Die Zellen wurden eine Stunde mit je 5 μ M LE (Positivkontrolle) bzw. LOH oder entsprechender Menge Lösungsmittel (Kontrollen, K) vorinkubiert. Anschließend wurde LPS (100 ng/ml) in alle Proben außer K hinzugegeben und die Zellen nach zwei Stunden bei 4°C geerntet. Nach Extraktion wurden die Lipide mittel DC (B) getrennt und quantifiziert (A) wie in Kapitel 4.6.3 und 4.6.4 beschrieben. * signifikant verschieden von LPS mit $p < 0,05$.

Das Experiment zeigt, dass die Vorbehandlung der Makrophagen mit LE bzw. LOH zu einer signifikanten Reduktion des durch LPS erhöhten Ceramidgehalts führte. Im Fall von LE wird der Gehalt von Ceramid im Vergleich zu LPS um 30% und bei LOH um 35% reduziert (Abbildung 11A). Allerdings liegen diese Ceramidmengen immer noch über dem der unbehandelten Makrophagen (Abbildung 11A, K).

Dieses Ergebnis korreliert mit der Reduktion der Proteinexpression nach Behandlung mit Ectoinderivaten. Wie oben gezeigt wurde, resultiert aus der LPS Stimulation u.a. die erhöhte Expression von TNF- α und IL-1. Dieses wiederum bewirkt die Anhebung des zellulären Ceramidgehalts (MacKichan und DeFranco 1999), welches durch die Vorinkubation mit LE bzw. LOH zum Teil verhindert wird.

1.8.3 Aufnahme von ^{13}C -Laurylectoin in Säugerzellen

Der Metabolismus von Ectoin wurde bislang vor allem in Bakterien untersucht (Severin et al. 1992). Auch der gesamte Ectoin-Stoffwechsel und -Abbau von *Halomonas elongata* konnte rekonstruiert bzw. identifiziert werden (Schwibbert et al. 2011). Um die Aufnahme und mögliche Verstoffwechslung von Ectoin in Säugerzellen zu untersuchen, wurde ^{13}C -markiertes Ectoin mit einem Lipidanker versehen (siehe Kap. 1.8.1). Mit dem so generierten ^{13}C -Laurylectoin wurden RAW Makrophagen 264.7 zunächst für drei Stunden inkubiert (siehe Kap. 4.4.7). Anschließend wurden das Inkubationsmedium, der Waschpuffer (PBS) und das Zellpellet mittels HPLC auf ^{13}C -Ectoin und deren eventuelle Abbauprodukte untersucht. Im Inkubationsmedium konnten zwischen 4 und 12% ^{13}C -Ectoin nachgewiesen werden. Eine genauere Aussage ist aufgrund der Überlagerung des Lösungsmittelsignals mit dem Signal für ^{13}C -Ectoin im UV/Vis-Spektrum nicht möglich. Der größte Anteil des ^{13}C -Ectoins mit 76% wurde über ^{13}C -NMR-Spektroskopie in den Zellen nachgewiesen. Dieses Ergebnis konnte unter gleichen Versuchsbedingungen auch vorher aber mit ^{12}C -LE in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Wedeking et al. 2014). Dabei konnten 80% Ectoin zellassoziiert wiedergefunden werden. Aufgrund dieser beiden Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass drei Stunden für eine Verstoffwechslung von Ectoin nicht ausreichend sein könnten. Somit wurden bei den nächsten Versuchen die Bedingungen variiert. Zunächst wurden die Zellen wie bisher für drei Stunden mit $25\ \mu\text{M}$ ^{13}C -Laurylectoin inkubiert. Anschließend wurden die Bedingungen wie folgt geändert:

- a. Das Medium wurde nach drei Stunden entfernt und abermals $25\ \mu\text{M}$ ^{13}C -Laurylectoin hinzugegeben. Die Zellen wurden für 24 Stunden weiter inkubiert.
- b. Das Medium wurde nach drei Stunden entfernt und Laurylectoin-freies Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden für 24 Stunden weiter inkubiert.
- c. Die Zellen wurden für 24 Stunden statt drei Stunden mit $25\ \mu\text{M}$ ^{13}C -Laurylectoin inkubiert.

Nach der Zellernte wurden sämtliche Inkubationsmedien und die entsprechenden Zellpellets mittels HPLC auf ^{13}C -Ectoin und eventuelle Abbauprodukte untersucht. Genau wie beim ersten Versuch war nach drei Stunden (Versuch a und b) im Medium kein ^{13}C -Ectoin nachzuweisen (Tabelle 1). Bei Versuch a wurde insgesamt die doppelte Menge ^{13}C -LE ($50\ \mu\text{M}$) hinzugefügt. Dieses wurde nach 24 Stunden überwiegend im Medium wiedergefunden ($43,5\ \mu\text{M}$). Diese Menge scheint die Zellen zu überfordern, da sie teilweise

vom Flaschenboden abgelöst und abgestorben waren (Abbildung 12). Bei Versuch b konnten von den 25 µM ¹³C-LE fast alles im Medium wiedergefunden werden (24,6 µM). Der Mediumwechsel scheint das Ausschleusen von ¹³C-Ectoin zu beschleunigen.

Versuch	Zellen nach 24 Std.	Medium nach 3 Std.	Medium nach 24 Std.
a	0,07%	0%	87,2% (43,5 µM)
b	0,13%	0%	98,5% (24,6 µM)
c	19,5%	-	überlagert*

Tabelle 1: ¹³C-Ectoingehalt in Medien und Zellpellets. * Keine Aussage möglich, da Überlagerung des Lösungsmittelsignals mit dem Signal für ¹³C-Ectoin im UV/Vis-Spektrum.

Im Zellpellet hingegen waren weniger als 1% (Versuch a und b) bzw. nur knapp 20% (Versuch c) ¹³C-Ectoin nachzuweisen (Tabelle 1). Bei Versuch c stellt sich anscheinend eine Art Gleichgewicht zwischen dem Zellinnern und -äußern ein. Dies könnte vermutlich daran liegen, dass kein Mediumwechsel vorgenommen wurde.

Da bei allen drei Versuchen fast 100% des eingesetzten ¹³C-Ectoins wiedergefunden werden konnte und auch mittels HPLC und ¹³C-NMR-Spektroskopie keine Abbauprodukte nachweisbar waren, ist davon auszugehen, dass die Zellen ¹³C-Laurylectoin aufnehmen und mittels Esterasen ¹³C-Ectoin freisetzen, aber nicht weiter metabolisieren oder das ¹³C-Laurylectoin an die Zelle andockt und nach Übergang ins Medium durch dieses verseift wird. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Galla sprechen aber für die erste Möglichkeit. Diese haben herausgefunden, dass Ectoin ohne Lipidanker die Membranfluidität zwar beeinflusst (Harishchandra et al. 2010), Laurylectoin hingegen aber keinen biophysikalischen Effekt zeigt (Galla 2017). Auch die gezeigten Ergebnisse zu den entzündungsvorbeugenden Wirkungen von Laurylectoinderivaten (siehe Kap. 1.8.2) sprechen dafür, dass ¹³C-Laurylectoin von den Zellen aufgenommen und mittels Esterasen gespalten wird. Das freigesetzte Ectoin scheint dann zunächst in den Zellen zu verbleiben (vgl. Tabelle 1; Medium nach 3 Std.) und seine entzündungsvorbeugende Wirkung zu entfalten. Es initiiert Ectoin anscheinend eine Signalkaskade, nimmt aber wahrscheinlich an dieser nicht teil, weil es nach 24 Stunden wieder unverändert aus der Zelle ausgeschleust wird (Tabelle 1; Medium nach 24 Std.). Nun stellt sich die Frage wie Ectoin wieder aus der Zelle ausgeschleust wird. Dafür stehen verschiedene Membrantransporter zur Verfügung. Eine Möglichkeit wären die sog. Aminosäuretransporter (SLC, *solute carrier*). Es gibt ca. 400 verschiedene Proteine, die sich in 52 Gruppen einteilen lassen. Sie transportieren geladene und ungeladene organische Moleküle, sowie anorganische Ionen. Aus den Arbeiten von Wedeking *et al.* 2014 ist bekannt,

dass freies Ectoin im Vergleich zu Laurylectoin nur zu 3% zellassoziiert vorliegt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die SLC-Transporter in diesem Zusammenhang keine große Rolle spielen. Das in der Zelle freigesetzte ^{13}C -Ectoin muss über einen anderen Weg ausgeschleust werden. Eine weitere Möglichkeit wären sogenannte ABC-Transporter. Diese sind Membranproteine, die als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Kasette aufweisen. Sie können spezifische Substrate über die Zellemembran transportieren. Damit können sie die Zellen vor Fremdmolekülen schützen, indem sie diese wieder aus der Zelle ausschleusen. Für diesen Prozess ist aufgrund der ATP-bindenden Kasette viel ATP notwendig. Wenn dieses aufgebraucht wird, sterben die Zellen ab. Bei Versuch a scheinen $50\ \mu\text{M}$ ^{13}C -Laurylectoin die Zellen zu überfordern und ihren ATP Speicher aufzubrechen, sodass sie absterben. Bei Versuch b und c hingegen scheint die ATP Menge noch auszureichen, um freigesetztes ^{13}C -Ectoin aus der Zelle zu schleusen, denn die Zellen sterben nicht ab (Abbildung 12).

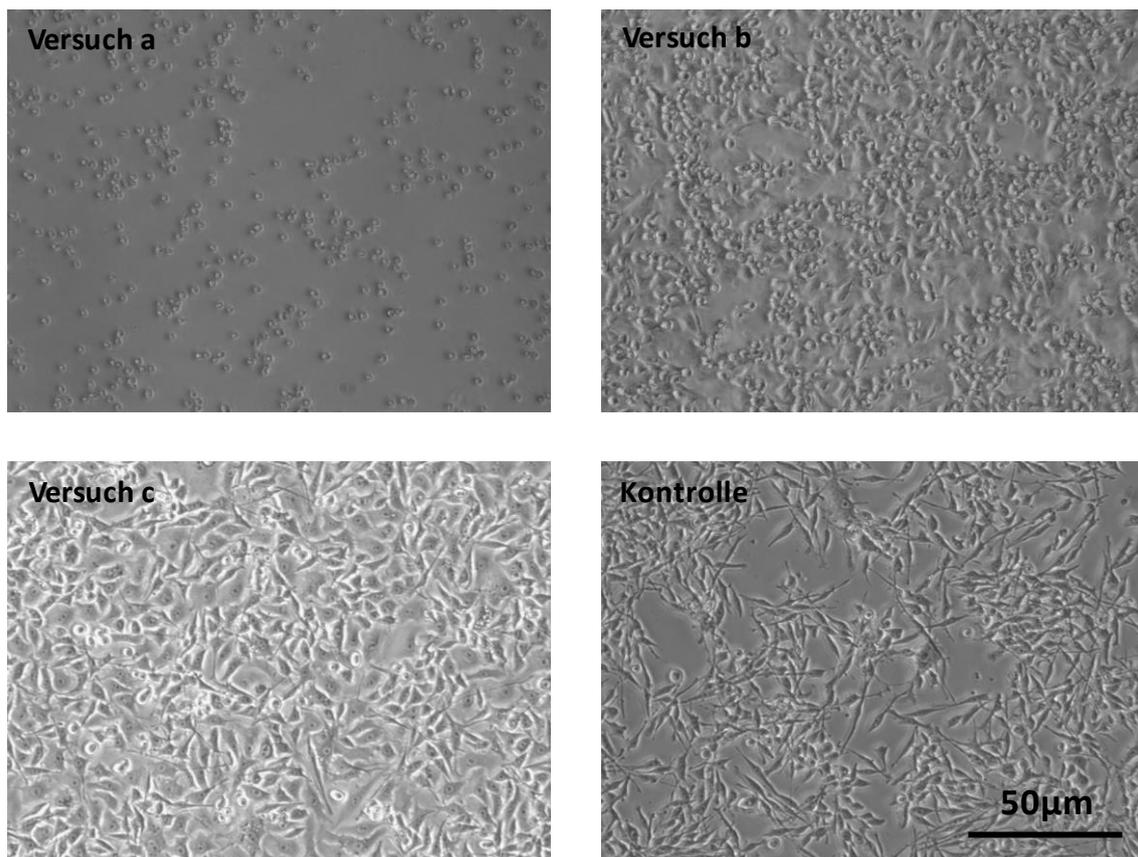


Abbildung 12: Phasenkontrastaufnahmen von RAW Makrophagen 264.7 der Versuche a, b und c nach jeweils 24 Stunden.

Durch weitere Versuche müsste diese Vermutung, dass es sich um die ABC Transporter handelt, untersucht werden. Dazu könnten die Versuchsbedingungen wie folgt verändert

werden. Nach Zugabe von 25 μM Laurylectoin müsste das Medium jeweils nach einer Stunde entfernt und auf Ectoin untersucht werden. So könnte festgestellt werden, wann die Zellen Ectoin wieder ausschleusen und ob sie es auf einmal oder sukzessive ins Medium abgeben. Als weiteren Versuche würde sich eine rtPCR- oder Western Blot-Untersuchung anbieten. Dort könnte eine Erhöhung der Expression von ABC Transportern festgestellt werden.

1.9 Zusammenfassung und Ausblick

Die in unserer Arbeitsgruppe gezeigten Ergebnisse zur entzündungsvorbeugenden Wirkung von Laurylectoin in Makrophagen (Wedeking et al. 2014) konnten in dieser Arbeit reproduziert werden. Dabei wurde diese Wirkung durch das neu synthetisierte Derivat Laurylhydroxyectoin (Abbildung 6A) sowohl bei den proinflammatorischen Proteinen IL-1, IL-6, COX-2 und TNF- α (Abbildung 8) als auch bei der Expression des Ceramidgehaltes (Abbildung 11) erhöht. In beiden Fällen wurde die entzündungsprotektive Eigenschaft verbessert.

Desweiteren sollte die These überprüft werden, ob Laurylectoin in den Zellen durch Esterasen gespalten wird und so das freigesetzte Ectoin seine entzündungshemmende Wirkung entfalten kann. Dazu sollte neben dem Laurylhydroxyectoin (Abbildung 6A) auch ein entsprechender Ether synthetisiert werden (Abbildung 6B). Über die Einführung einer Schutzgruppe an der Carbonsäurefunktion gelang es 3% des Ethers zu isolieren (Schema 2). Der Versuch die Schutzgruppe zu entfernen hingegen, gelang nicht (Schema 3). Die erneute Synthese des Ethers funktionierte ebenfalls nicht.

Die Arbeitsgruppe Galla hingegen konnte durch den Einsatz der Filmwaage und der Kalorimetrie aber feststellen, dass Laurylectoin keinerlei Einfluss auf die Membranfluidität hat (Galla 2017) im Gegensatz zu freiem Ectoin, welches sowohl einen Effekt auf Lipidmonoschichten als auch Lipiddoppelschichten hat (Harishchandra et al. 2010). Dabei wird bei Ectoin eine Hydrathülle gebildet, die mit den Lipidkopfgruppen der Doppelschicht interagiert, was zu einer Erhöhung der Membranfluidität führt. Bei Laurylectoin wird keine Hydrathülle gebildet. Dies liegt vermutlich einerseits an der Veresterung der Carbonsäure, wodurch der zwitterionische Charakter des Ectoins verloren geht. Andererseits könnte Laurylectoin auch Mizellen bilden und somit den beim Ectoin beobachteten Membraneffekt nicht zulassen. Zusammengenommen lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass Ectoin mit Hilfe des Lipidankers in die Zellen geschleust wird und durch die vorhandenen Esterasen wieder freigesetzt wird. Diese Überlegung wird durch die ^{13}C -Markierungsexperimente noch bestärkt. Dabei konnte festgestellt werden, dass ^{13}C -Ectoin nach drei Stunden Inkubation mit

¹³C-Laurylectoin zum größten Teil zellassoziiert vorliegt (Tabelle 1; Medium nach 3 Std.) und nach 24 Stunden fast vollständig wieder ausgeschleust wird (Tabelle 1; Medium nach 24 Std.). Mit Hilfe dieser Experimente konnte auch gezeigt werden, dass Ectoin in der Zelle vermutlich nicht abgebaut, sondern lediglich aufgenommen und wieder mittels sogenannter ABC-Transporter ins Medium abgegeben wird. Denn nach 24 Stunden wurde Ectoin fast ausschließlich im Medium nachgewiesen (Tabelle 1). Durch weitere Versuche könnte diese These noch unterstützt werden. Dazu sollte der Versuch wie folgt durchgeführt werden. Nach Zugabe des Inkubationsmediums (25 µM Laurylectoin) müsste jeweils nach einer Stunde der Ectoingehalt im Medium gemessen werden um zu wissen wann genau Ectoin von den Zellen ausgeschleust wird. Parallel dazu sollte mittels RT-PCR und Western Blot die Expression der ABC Transporter untersucht werden. Eine Erhöhung der Expression würde die gefundenen Ergebnisse zur Aufnahme und Abgabe unterstützen.

2 Lipide im Kleinhirn – Dicer fl/fl; Math1-Cre-Mäuse

2.1 Das Kleinhirn

Das Kleinhirn (*Cerebellum*) ist für die Koordination, Feinabstimmung, unbewusste Planung und das Erlernen von Bewegungsabläufen zuständig (Thompson und Steinmetz 2009). Makroskopisch wird das Kleinhirn in zwei Hemisphären und den Kleinhirnwurm, der die beiden Hälften verbindet, gegliedert. Sowohl der Wurm als auch die Hemisphären lassen sich in mehrere Abschnitte einteilen (Ackermann 2008). Allerdings wird die transversale Einteilung in anteriore (I-VI) und posteriore (VII-X) Lobuli am häufigsten verwendet (Herrup und Kuemerle 1997; Eisenman 2000). Die nach außen gewandte, nervenzellhaltige Schicht des Kleinhirns wird als Rinde (*Cortex*) bezeichnet, die im inneren liegende weiße Substanz als Mark. Die Rinde besteht aus drei Schichten, die jeweils eine charakteristische Auswahl von fünf verschiedenen Nervenzelltypen enthalten. In der Molekularschicht befinden sich die Stern- und Korbzellen. Die Purkinjezellschicht besteht fast ausschließlich aus Purkinjezellen und die Körnerzellschicht enthält Golgi- und Körnerzellen. Die Körnerzellen besitzen kleine, runde Zellkörper, die über vier kurze unverzweigte Dendriten verfügen, die je ein Axon in die Molekularschicht senden. Diese Axone spalten sich dort T-förmig auf und verlaufen dann als sog. Parallelfasern, die erregend auf Purkinjezellen wirken (Welsch 2005; Scholz 2003; Schünke 2006). Das Kleinhirn stellt lediglich 10% des Hirnvolumens dar, enthält aber 80% aller Neuronen, von denen die Körnerzellen ca. 85% ausmachen (Constantin 2016). In diesen wurde Dicer zelltypspezifisch ausgeschaltet.

2.2 Dicer

Dicer ist eine Endoribonuklease, die doppelsträngige RNA (dsRNA) in kurze, einzelsträngige Fragmente (reife micro-RNAs) schneidet. Diese Fragmente sind etwa 20 bis 25 Nukleotide lang und sind essentiell für den Mechanismus der RNA-Interferenz. Dabei schneidet das RNase-III-Enzym Dicer die pre-microRNAs (pre-miRNAs) in 17-24 Nukleotide lange ds-miRNAs. Dicer interagiert mit dem dsRNA-Bindeprotein TRBP, wodurch das miRNA-Duplex entwunden und einzelsträngig wird (Khraiwesh et al. 2010). Mutationen im *DICER1*-Gen werden mit frühkindlichem Lungentumor (pleuro-pulmonales Blastom) assoziiert (Manivel et al. 1988).

Die durch das *DICER1*-Gen erzeugten miRNA Moleküle haben eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle. Sie sind zum einen Regulatoren bei der Genübersetzung (Translation) nach der

Genüberschreibung (Transkription) (Bartel 2004), zum anderen regulieren sie 20 bis 30% der mRNA Moleküle (Lewis et al. 2005; Yeom et al. 2006). Ihre Art und Anzahl korreliert mit dem Entwicklungsstand der Zelle (Zellteilung, Differenzierung oder Apoptose). Sie greifen bspw. in die Prozesse der Neurogenese (Makeyev et al. 2007), Myogenese (Rao et al. 2006), Kardiogenese (Zhao et al. 2005) oder Hämatopoese (Chen et al. 2004) ein. Des Weiteren unterdrücken sie die Bildung von Tumorzellen (Lu et al. 2005; Suzuki et al. 2009) und sind für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und Erneuerung von embryonalen Stammzellen wichtig (Kim et al. 2009).

2.3 Phosphatidylinositole

Phosphatidylinositole sind Phosphatidsäuren des Inositols und gehören zu den Phosphoglyceriden. Sie sind amphiphile Membranlipide, das bedeutet sie haben eine hydrophile Kopfgruppe (Inositol) und eine hydrophobe Schwanzgruppe (Fettsäuren). Mit den Kohlenstoffketten (1,2-Diacylglycerol = DAG) sind sie in der Membran verankert und der Inositolring ragt ins Cytosol. Dort kann er reversibel an einer oder mehreren Positionen durch Phosphatidylinositol-Kinasen phosphoryliert bzw. durch Phospholipid-Phosphatasen dephosphoryliert werden (Lodish 2013). In Abbildung 13 ist schematisch die stufenweise Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (PI) dargestellt. Als Zwischenprodukt wird Phosphatidylinositol-4-phosphat (PIP) erhalten, welches schließlich durch die PIP-5 Kinase zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) umgesetzt wird (Abbildung 13).

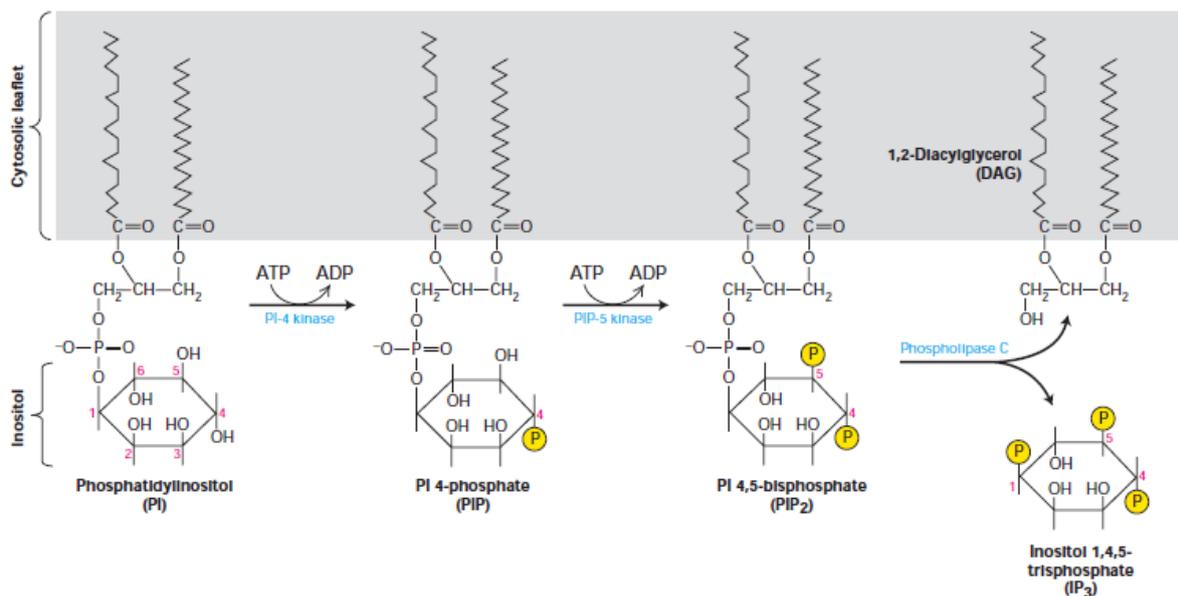


Abbildung 13: Synthese von sekundären Botenstoffe aus Phosphatidylinositol (PI) (Lodish 2013).

Durch die Phospholipase C (PLC) kann PIP₂ in 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) gespalten werden (Abbildung 13). Diese beiden Moleküle spielen in der intrazellulären Signalübertragung eine wichtige Rolle als sekundäre Botenstoffe (Karp 2005). DAG verbleibt nach der Spaltung an der Plasmamembran und aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche für verschiedene zelluläre Prozesse wie Zellwachstum und Differenzierung, Zellstoffwechsel und Transkriptionsaktivierung von Bedeutung sind. IP₃ hingegen diffundiert ins Cytosol und kann u.a. an den IP₃-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER) binden. Dieser Rezeptor fungiert gleichzeitig als Ca²⁺-Kanal. Die Bindung von IP₃ öffnet den Kanal und sorgt dafür, dass Ca²⁺-Ionen ins Cytoplasma einströmen können. Diese können dann wiederum unterschiedliche intrazelluläre Reaktionen auslösen (Karp 2005). Statt durch PLC gespalten zu werden, kann PIP₂ auch durch die PI-3 Kinase phosphoryliert werden (Abbildung 14).

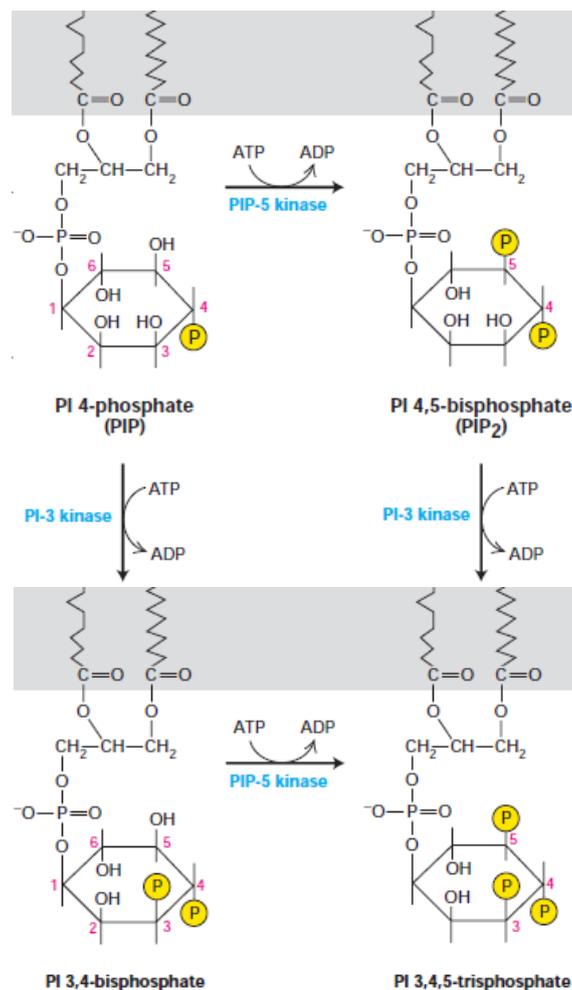


Abbildung 14: Bildung von Phosphatidylinositol 3-phosphaten (Lodish 2013).

Das generierte Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) interagiert mit der membrangebundenen Proteinkinase B (PKB). Durch diese Interaktion wird die Konformation des PKB-Moleküls verändert und kann von zwei weiteren Enzymen phosphoryliert werden. Diese Aktivierung ermöglicht der PKB die Dissoziation ins Cytosol und in den Kern, wo es eine Schlüsselfunktion in vielen weiteren Signalwegen einnimmt (Karp 2005). So löst der PI-3K/PKB-Signalweg u.a. die Zellteilung (Proliferation), das Zellwachstum und die Zellmigration aus und verhindert den programmierten Zelltod (Apoptose) (Lodish 2013). Eine Veränderung der Struktur von PI3-Kinasen kann zu Allergien, Entzündungen, Herzkrankheiten oder Krebs führen (Bleeker et al. 2012; Bleeker et al. 2014).

2.4 Motivation

miRNAs haben vielfältige und unterschiedliche Aktivitäten auf die neuronale Entwicklung. Deshalb entschied sich die Arbeitsgruppe Eiberger (Anatomisches Institut der Universität Bonn) deren Effekte auf die Entwicklung von Körnerzellen des Kleinhirns, welche eine große und leicht zugängliche Population an Neuronen darstellen, zu untersuchen. Sie schalteten das *DICER1*-Gen in den Körnerzellen aus und konnten zeigen, dass dies zu fehlenden miRNAs führt, was wiederum zu vermehrter Apoptose, erniedrigtem Wachstum und verminderter Migration der Körnerzellen führt. Die verminderte Migration der Körnerzellen lässt sich auch histologisch belegen (Abbildung 15). Bei sieben Tage alten *knockout*-Mäusen (*Dicer^{fl/fl}*; *Math1-Cre* oder KO) ist zum einen die äußere Körnerzellschicht in den anterioren Lobuli ausgedünnt und die Faltung abnormal im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen (*Dicer^{fl/fl}* oder K). Mit zunehmendem Alter wird der Unterschied noch deutlicher (Tress et al. unveröffentlicht).

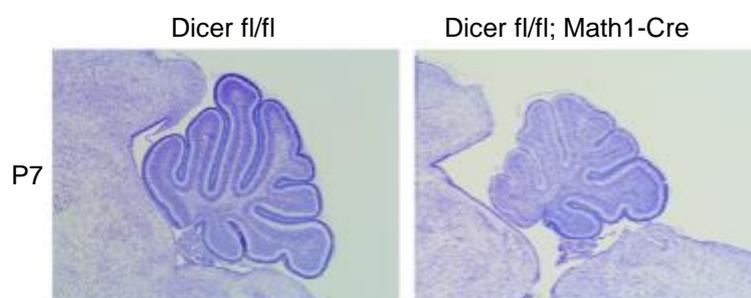


Abbildung 15: Körnerzellverlust und abnormale Faltung im Kleinhirn von *Dicer^{fl/fl}*; *Math1-Cre* Mäusen (Tress et al. unveröffentlicht).

Auch die Morphologie der Neuronen ist gestört, was auf eine Veränderung in der Plasmamembran zurückzuführen sein könnte. Daher sollten Analysen der Membranlipide durchgeführt werden. Der Gehalt von Sphingolipiden und Phosphorlipiden sollte mittels Dünnschichtchromatographie untersucht werden.

2.5 Ergebnisse und Diskussion

Zur Bestimmung des Gehaltes von Sphingolipiden wurde Gewebe des Kleinhirns von Dicer fl/fl- und Dicer fl/fl; Math1-Cre-Mäuse durch die Arbeitsgruppe Eiberger präpariert und wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben aufgearbeitet und visualisiert (Kapitel 4.6.4).

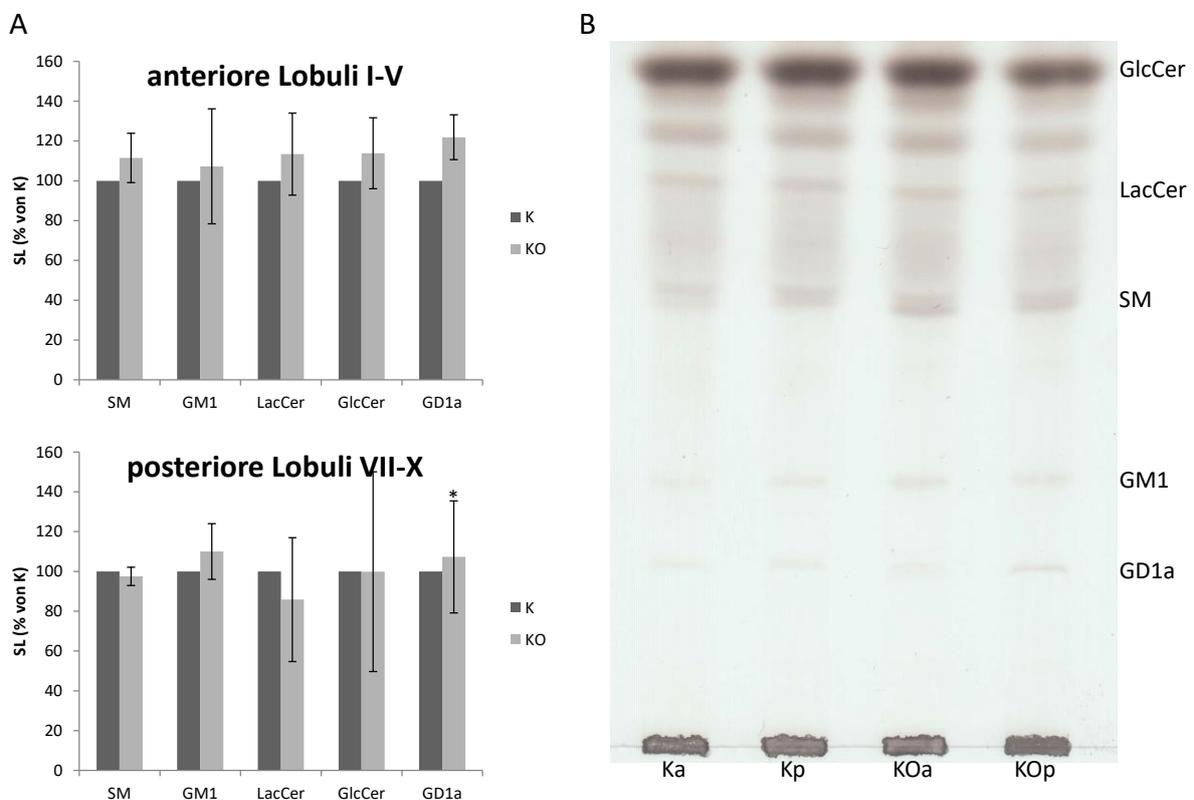


Abbildung 16: Bestimmung der Sphingolipide (SL) in anterioren (a) und posterioren (p) Lobuli des Kleinhirns von Kontroll (K)- und DICER-knockout (KO)-Mäusen. Die Sphingolipide wurden wie in Kapitel 4.6.3 und 4.6.4 beschrieben extrahiert, isoliert und mittels DC (B) getrennt und quantifiziert (A). GlcCer, Glycosylceramid; LacCer, Lactosylceramid; SM, Sphingomyelin; GM1, Monosialotetrahexosylgangliosid; GD1a, Gangliosid. * signifikant verschieden von K mit $p < 0,05$.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, konnte bei den Sphingolipiden jedoch in keiner der untersuchten Kleinhirnregionen ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Dicer-KO Cerebelli festgestellt werden.

Hinweise aus array-Untersuchungen zeigten, dass in Dicer-KO Körnerzellen die Expression der Phospholipase A₂ (PLA₂) erhöht ist (Tress et al. unveröffentlicht). Dieses Enzym aus der Familie der Esterasen katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden am β -Kohlenstoffatom. Dabei kommt es u.a. zur Freisetzung einer Fettsäure, bei der es sich oft um Arachidonsäure handelt und zur Bildung von Lysolipiden. Letztere können keine Lipiddoppelschichten mehr bilden, sondern neigen wie Detergenzien zu Mizellenbildung. Im Extremfall kommt es dann zur Membranlyse. Deshalb sollte der Gehalt von verschiedenen Phospholipiden und Arachidonsäure bestimmt werden.

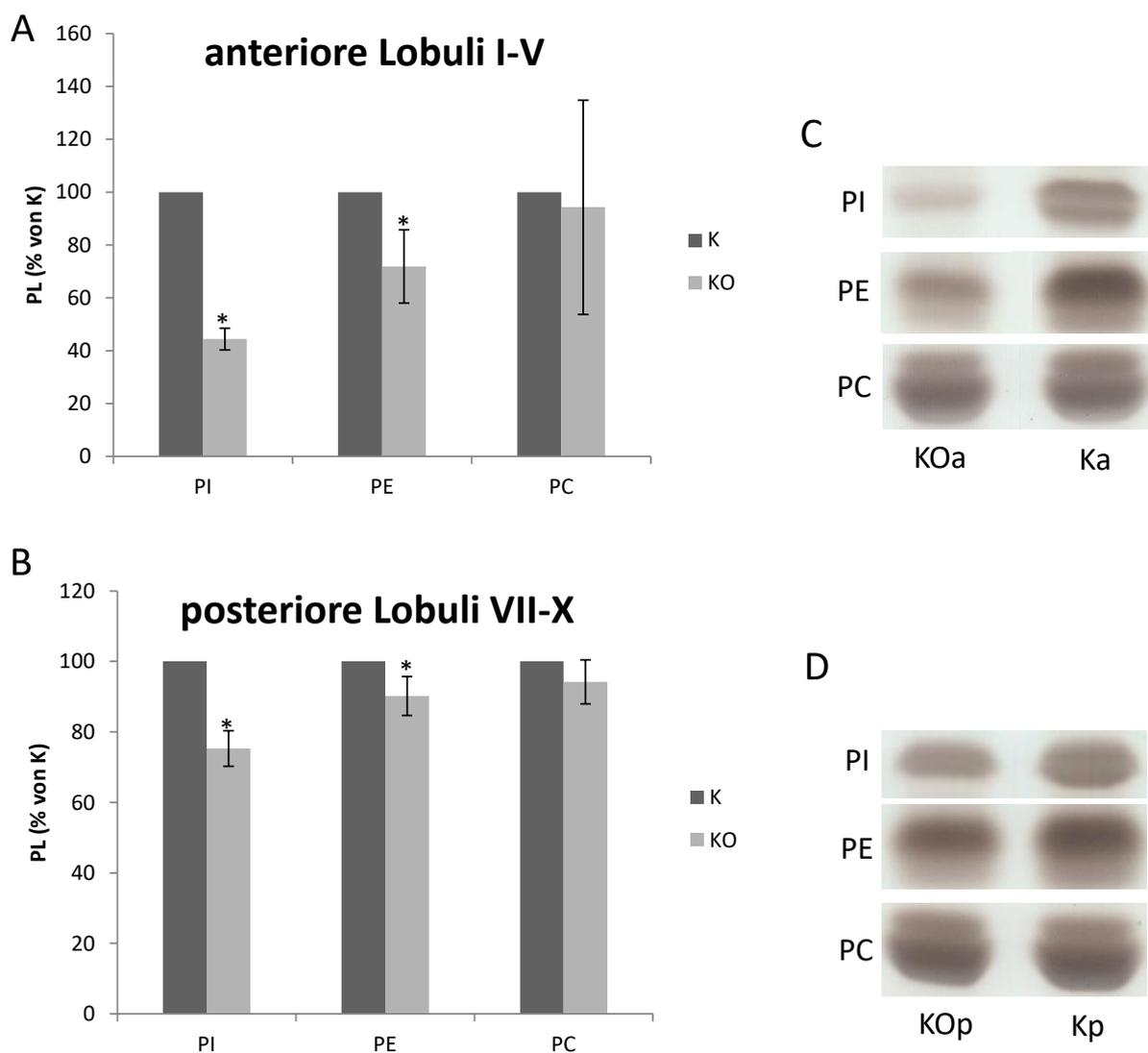


Abbildung 17: Bestimmung der Phospholipide (PL) in anterioren (a) und posterioren (p) Lobuli des Kleinhirns von Kontroll (K)- und Dicer-knockout (KO)-Mäusen. Die Phospholipide wurden wie in Kapitel 4.6.3 und 4.6.4 beschrieben extrahiert, isoliert und mittels DC (C, D) getrennt und quantifiziert (A, B). PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PI, Phosphatidylinositol. * signifikant verschieden von K mit $p < 0,05$.

Zur Bestimmung des Gehaltes von Phospholipiden wurde ebenfalls Gewebe des Kleinhirns von Dicer fl/fl- und Dicer fl/fl; Math1-Cre-Mäusen durch die Arbeitsgruppe Eiberger präpariert und wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben aufgearbeitet und visualisiert (Kapitel 4.6.4).

Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, nimmt der Gehalt der Phospholipide in den KOs im Vergleich zur Kontrolle ab. Dabei ist die stärkste Abnahme bei Phosphatidylinositol (PI) zu sehen, sowohl in den anterioren (um 56%) wie auch in den posterioren (um 25%) Lobuli. Der Gehalt an Phosphatidylethanolamin (PE) ist ebenfalls im Kleinhirngewebe der DICER-*knockout*(KO)-Mäuse niedriger als in den Kontrollen. In den anterioren Lobuli nimmt PE um 28% und in den posterioren Lobuli um 10% ab. In allen vier Fällen ist die Abnahme signifikant verschieden zur Kontrolle. Bei Phosphatidylcholin (PC) ist die Abnahme mit 10% in beiden Regionen am geringsten und auch nicht signifikant.

Bei der Arachidonsäure (AS) verhält es sich erwartungsgemäß umgekehrt (Abbildung 18). Der Gehalt nimmt beim KO im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 100% (anteriore Lobuli) bzw. 40% (posteriore Lobuli) zu.

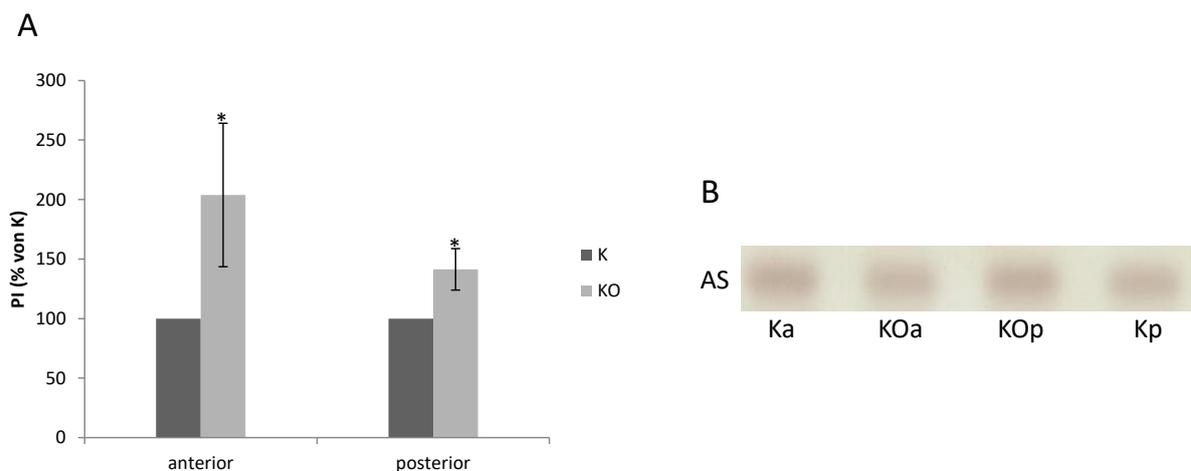


Abbildung 18: Bestimmung des Arachidonsäuregehalts in anterioren (a) und posterioren (p) Lobuli des Kleinhirns von Kontroll (K)- und DICER-*knockout*(KO)-Mäusen. Nach Extraktion (Kapitel 4.6.3) wurden die Lipide mittels DC (Kapitel 4.6.4) (B) getrennt und quantifiziert (A). AS, Arachidonsäure. * signifikant verschieden von K mit $p < 0,05$.

Die Arbeitsgruppe Eiberger suchte indes auch nach Gründen für die verminderte Proliferation und erhöhte Apoptose, die beide wahrscheinlich für die abnormale Faltung und den Körnerzellverlust verantwortlich sind. Die verminderte Proliferation wiesen sie u.a durch ein Markierungsexperiment mit Bromdesoxyuridin (BrdU) nach. Dieses wird von den Körnerzellen in die DNA eingebaut. Je höher die Teilungsrate der Zellen ist, desto mehr BrdU ist nachweisbar. In den Körnerzellen des Dicer^{fl/fl};Math1-Cre Kleinhirns wurde 20% weniger

BrdU nachgewiesen als in den Kontrollzellen (Tress et al. unveröffentlicht). Aus verschiedenen Arbeiten ist bekannt, dass das Protein Sonic Hedgehog (Shh) ein wichtiges Signalmolekül für die Proliferation von Vorläuferzellen der Körnerzellen ist (Dahmane und Ruiz-i-Altaba 1999; Wechsler-Reya und Scott 1999). In den *DICER*-KO Körnerzellen ist dieser Signalweg gestört (Liu et al. 2017). Liu *et al.* 2017 konnte durch Zugabe von Shh die verminderte Proliferation der Körnerzellen geringfügig verbessern. Es wurde mehr BrdU in die *DICER*-KO-Körnerzellen eingebaut als ohne Shh. (Liu et al. 2017). Dies gelang der Arbeitsgruppe Eiberger ebenso. Durch die Zugabe von Shh wurde in den *DICER*-KO Körnerzellen fast doppelt so viel BrdU eingebaut als ohne Shh (Tress et al. unveröffentlicht). Allerdings gelang es nicht den Wert der Kontrollzellen zu erreichen. Also scheint es keine signifikante Auswirkung auf den Sonic Hedgehog Signalweg zu geben. Sowohl die Targetbestimmungen von Liu *et al.* 2017 als auch die Array Untersuchungen der Arbeitsgruppe Eiberger weisen darauf hin.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Ursache für die verminderte Proliferation und die veränderten Lipidwerte stromabwärts im Signalweg liegen könnte. Der PI-3K/AKT/mTor-Signalweg steht in direkter Verbindung mit der Proliferation von Körnerzellen (King et al. 2015) und wird u.a. durch Shh angeschaltet (Peltier et al. 2007). Durch die erhöhte Expression der Phospholipase A₂ (PLA₂) wird das Phosphatidylinositol (PI) in den *DICER*-KO Körnerzellen offensichtlich vermehrt abgebaut. Dadurch steht möglicherweise der PI-3 Kinase das PI nicht mehr zur Verfügung, was zu einer Störung der Signalkaskade und zur beobachteten verminderten Proliferation bei erhöhter Apoptose führen könnte.

Experimentell könnte diese Vermutung durch Fütterungsversuche mit PI überprüft werden. Dadurch sollten im Optimalfall die verminderte Proliferation und Migration, sowie das gehemmte Wachstum und die vermehrte Apoptose rückgängig gemacht werden können.

2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die hier erzielten Ergebnisse lassen sich zusammen mit denen der Arbeitsgruppe Eiberger über den PI-3K/AKT/mTor-Signalweg erklären. Dieser Signalweg ist maßgeblich beteiligt an der Proliferation von Körnerzellen. Ist dieser gestört, nimmt die Zellteilung ab. Wie das Schema in Abbildung 19 zeigt, folgt aus der Erhöhung der PLA₂ ein Abbau von Phosphatidylinositol (PI) zu Arachidonsäure (AS). Da nur noch wenig PI vorhanden ist, findet die PI-3 Kinase kein Substrat mehr. So ist der weitere Signalweg gehemmt und folglich erhöht sich die Apoptose und die Proliferation sowie Migration nehmen ab. Auch konnte gezeigt werden, dass es nicht nur in der Migration einen Unterschied zwischen anterioren und

posterioren Lobuli gibt (Abbildung 15), sondern dass sich auch der Lipidgehalt in den Regionen deutlich unterscheidet (Abbildung 17). Dies bedeutet, dass die Math1-Cre in den anterioren Lobuli besser arbeitet als in den posterioren (Tress et al. unveröffentlicht).

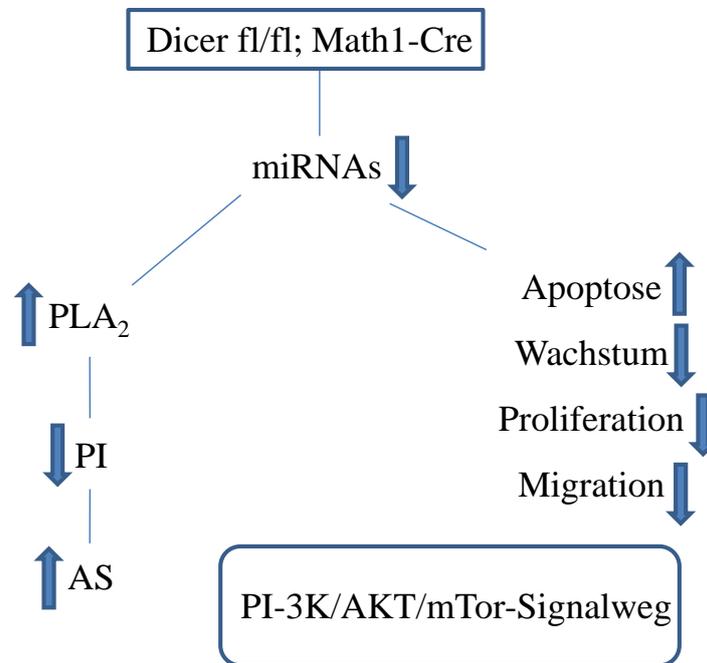


Abbildung 19: Schema über die Veränderungen im Kleinhirn von Dicer fl/fl; Math1-Cre Mäusen. Siehe Text für weitere Erläuterungen. miRNAs, microRNAs; PLA₂, Phospholipase A₂; PI, Phosphatidylinositol; AS, Arachidonsäure; PI-3K, Phosphatidylinositol-3Kinase; AKT, Proteinkinase B; mTOR, mechanistic Target of Rapamycin.

Um zu bestätigen, dass es sich tatsächlich um eine Störung des PI-3K/AKT/mTOR Signalwegs handelt, wäre ein sogenanntes *rescue experiment* nötig. Bei diesem würde PI auf Kulturen von Körnerzellen gegeben. So sollte die Störung des Signalweges aufgehoben werden und folglich die Proliferation, Migration und das Wachstum steigern, sowie die Apoptose vermindern.

3 Zusammenfassung

Lipide haben einen großen Anwendungsbereich und speziell in der Biochemie des lebenden Organismus wichtige Funktionen. Neben ihrer hauptsächlichsten Funktion als Energiespeicher und Strukturkomponenten der Zellmembranen konnten in dieser Arbeit auch zwei weitere wichtige Funktionen gezeigt und untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit konnte aufbauend auf die Ergebnisse von Wedeking *et al.* 2014, die die entzündungsvorbeugende Wirkung von Ectoin und Laurylectoin in Säugerzellen zeigen konnten, das kompatible Solut Hydroxyectoin mit Hilfe eines Lipidankers in Makrophagen transportiert werden. Dadurch konnte die entzündungsvorbeugende Wirkung von Hydroxyectoin in Makrophagen verbessert werden. Die Expression der proinflammatorischen Proteinen IL-1, IL-6, COX-2 und TNF- α (Abbildung 8) konnte durch Laurylhydroxyectoin (LOH) (Abbildung 6A) um 90 % gesenkt werden. Da eine Entzündungsreaktion Ceramid vermittelt abläuft, wurden auch der Ceramidgehalt in Makrophagen untersucht. Durch LOH konnte der Ceramidgehalt (Abbildung 11) signifikant gesenkt werden. Außerdem sollte die These überprüft werden, ob Laurylectoin in der Zelle durch Esterasen wieder in seine Ausgangsprodukte Ectoin und 1-Dodecanol gespalten wird. Dazu wurde zunächst versucht ein Laurylether (Abbildung 6B) zu synthetisieren und diesen mit LOH zu vergleichen. Allerdings zerfiel das Molekül beim Versuch die Schutzgruppe abzuspalten und eine Wiederholung der Synthese gelang nicht. Deshalb wurde dann mit Hilfe eines ^{13}C -Markierungsexperimentes untersucht, was mit Laurylectoin in die Zelle passiert nachdem es durch die Zellen aufgenommen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass Ectoin in der Zelle freigesetzt wird und anschließend wieder unverändert fast vollständig aus der Zelle ausgeschleust werden (Tabelle 1). Dies unterstützt die These, dass Laurylectoin in der Zelle durch Esterasen gespalten, seine entzündungsprotektive Wirkungen entfalten kann und wieder unverändert aus der Zelle ausgeschleust wird. Über diese Methode können so viele weitere kleine, hydrophobe Moleküle in Säugerzellen transportiert werden, um deren mögliche Vorteile besser nutzen zu können als ihre Wirkung es von außen zulassen würde.

Die zweite wichtige Funktion von Lipiden, die in dieser Arbeit gezeigt und untersucht werden konnte, ist ihre Funktion als Signalmolekül. Hier wurde der Zusammenhang zwischen der Endoribonuklease Dicer und der Lipidzusammensetzung von neuronalen Membranen untersucht. Hierfür wurde ein Mausmodell eingesetzt, in dem Dicer gewebsspezifisch in Körnerzellen des Kleinhirns ausgeschaltet wurde. In diesem Mausmodell (Dicer fl/fl; Math1-Cre) konnte bereits ein Defizit im Wachstum von Körnerzellen, sowie eine verminderte Proliferation und erhöhte Apoptose im Kleinhirn gezeigt werden. In dieser Arbeit konnte nun

ein möglicher Zusammenhang zwischen den beschriebenen Defiziten und der Abnahme der Phosphoglycerolipide (Abbildung 17) in den betroffenen Hirnregionen gezeigt werden. Die Abnahme des Lipidgehaltes hat vermutlich einen Einfluss auf den PI-3K/AKT/mTOR Signalweg, welcher wiederum Auswirkungen auf die Proliferation und die Apoptose im Kleinhirn hat. Dieses Ergebnis ist ein gutes Beispiel für die Signalfunktion von Lipiden in Zellen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Analytische Methoden

4.1.1 Magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der Zentralanalytik der chemischen Institute der Universität Bonn mit Spektrometern der Firma Bruker (Bruker AVI Mars300, Bruker AVI Terra400, Bruker AVIII HD Prodegy Pollux500 oder Bruker AVIII HD Cryo Sirius700) aufgenommen. Die jeweiligen Messfrequenzen, Temperaturen und das verwendete Lösungsmittel sind bei den Experimenten angegeben. Die Kalibrierung auf das Protonenrestsignal oder natürliche ^{13}C -Signal der deuterierten Lösungsmittel erfolgte gegen Tetramethylsilan (CD_3OD : $\delta_{\text{H}} = 3.31$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 49.0$ ppm; CDCl_3 : $\delta_{\text{H}} = 7.24$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77.0$ ppm; CD_2Cl_2 : $\delta_{\text{H}} = 5.32$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 53.8$ ppm; D_2O : $\delta_{\text{H}} = 4.79$ ppm). Die Referenzsubstanzen wurden in eine 1 mm Kapillare gefüllt und in einem 5 mm NMR-Rohr, welches das deuterierte Lösungsmittel enthielt, vermessen. Zur eindeutigen Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale wurden HH-COSY und CH-COSY (HMBC, HMQC) -, sowie DEPT-135- und DEPT-90-Experimente durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm MestReNova 7.1.1 verwendet. Für die Multiplizitäten der NMR-Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, ddt = Dublett von Dublett von Triplets, t = Triplett, q = Quartett, qi = Quintett, sept = Septett, m = Multiplett.

4.1.2 Massenspektrometrie (MS)

Die Aufnahme der Massenspektren wurde in der Zentralanalytik der chemischen Institute der Universität Bonn durchgeführt. An zwei Sektorfeldgeräten MAT 95 XL und MAT 90 der Firma Thermo Finnigen wurden Massenspektren mit der EI-Methode (Elektronstoß, *engl. electron impact*) und ESI-Methode (Elektronensprayionisation) aufgenommen.

Zur Auswertung der Spektren wurden Tabellen des Buches „Spektroskopische Methoden der organischen Chemie hinzugezogen“ (Hesse et al. 2005). Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Bedeutung der Signale werden nur Signale mit einer Intensität von 20 % oder mehr angegeben.

4.1.3 Gaschromatographie mit Massenspektrometriekopplung (GCMS)

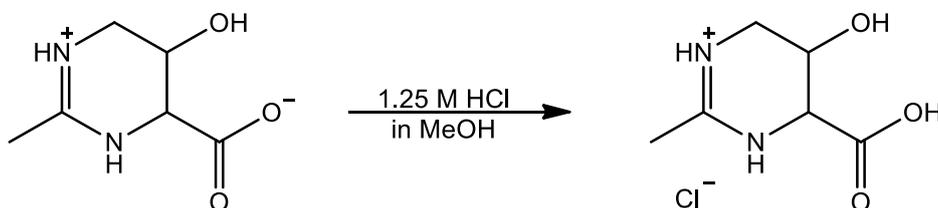
Die Aufnahme der GCMS-Spektren erfolgte am Institut für organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn. Es stand ein GCMS-QP2010 Ultra Gerät der Firma Shimadzu aus Kyoto, Japan zur Verfügung. Dieses ist mit einer ZB-5MSi Säule (l = 30 m, Ø = 0.25 mm, df = 0.25 µm) ausgestattet, welche eine stationäre Phase aus 5% Phenyl- und 95% Dimethylpolysiloxan enthält.

4.1.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Galinski im Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn durchgeführt.

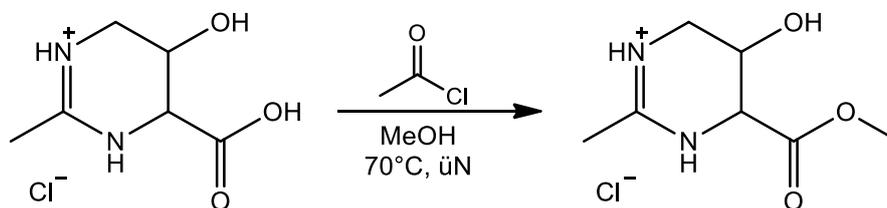
4.2 Synthesen

4.2.1 5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäurehydrochlorid (Hydroxyectoinhydrochlorid)

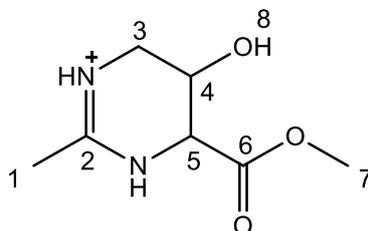


In einem 50 ml Rundkolben wurden 2.00 g (12.65 mmol) Hydroxyectoin in 10 ml dest. Wasser gelöst. Mit Hilfe einer Spritze wurden 1.05 ml (12.65 mmol) 12 molare Salzsäure hinzugefügt und der Kolben einige Minuten geschwenkt. Das Wasser wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend 10 ml getrocknetes Methanol hinzugegeben, welches sofort wieder unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der Rückstand wurde über Nacht am Vakuum getrocknet. Das Hydrochlorid (2.46 g, 12.65 mmol, quant.) wurde als farbloser, watteartiger Feststoff erhalten.

4.2.2 5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäuremethylester-hydrochlorid (Methylhydroxyectoin)



In einem 250 ml Rundkolben wurden 2.55 g (13.10 mmol) Hydroxyectoinhydrochlorid in 130 ml getrocknetem Methanol vorgelegt und mittels Eisbad auf 0°C gekühlt. Unter Rühren wurden bei dieser Temperatur 9.35 ml (10.29 g, 131.00 mmol) Acetylchlorid hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht refluxiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der farblose, ölige Rückstand wurde in 50 ml Cyclohexan aufgenommen und 24 h am Wasserabscheider erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Trocknen des Rückstandes am Vakuum, wurde der Methylester (2.46 g, 11.80 mmol, 90%) als farbloser, watteartiger Feststoff erhalten.



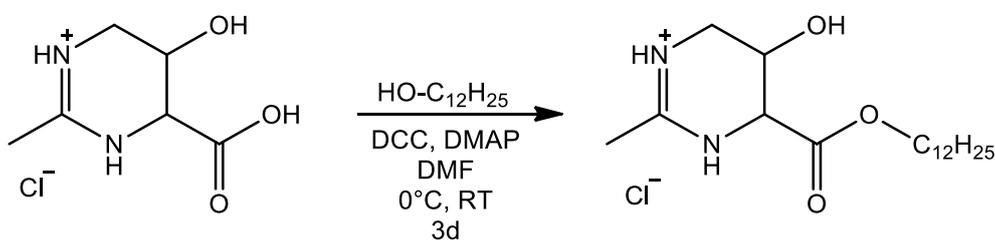
$^1\text{H-NMR}$: (CD_3OD , 400.1 MHz, 298 K, ppm):

2.30 (s, 3H, H-1), 3.29 (ddt, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 12.0$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 3.0$ Hz, H-3a), 3.41 (dt, 1H, $^2J(\text{H,H}) = 12.0$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 3.0$ Hz, H-3b), 3.77 (t, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 3.0$ Hz H-5), 4.28 (s, 1H, H-8), 4.43 (dd, 1H, $^3J(\text{H,H}) = 3.0$ Hz H-4), 4.95 (s, 3H, H-7).

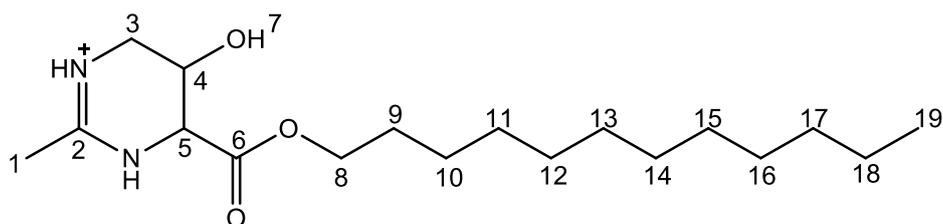
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR: (CD_3OD , 100.6 MHz, 298 K, ppm):

18.5 (s, 1C, C-1), 43.9 (s, 1C, C-3), 53.9 (s, 1C, C-7), 58.7 (s, 1C, C-5), 59.8 (s, 1C, C-4), 162.2 (s, 1C, C-2), 171.1 (s, 1C, C-6).

4.2.3 5-Hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäuredodecylester (Laurylhydroxyectoin)



In einem 250 ml Rundkolben wurden 2.5 g (12.85 mmol) Hydroxyectoinhydrochlorid in 50 ml DMF vorgelegt und mittels Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 3.9 g (19.27 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und katalytischen Mengen Dimethylaminopyrimidin (DMAP) wurde die Lösung für 15 min bei 0°C gerührt. Über einen Tropftrichter wurden 75 ml (59.8 mg, 32.11 mmol, 0.83 g · cm⁻³) 1-Dodecanol in 20 ml DMF bei 0°C hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei 0°C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und für 3 h bei dieser gerührt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfiel. Die Suspension wurde filtriert und der farblose Rückstand mit wenig Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden bis zur Trockne eingeeengt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung (SiO₂, CHCl₃:MeOH = 3:2, v/v, R_f = 0.67) wurde das Produkt (92 mg, 0.03 mmol, 2%) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H-NMR:(CDCl₃, 400.1 MHz, 298 K, ppm):

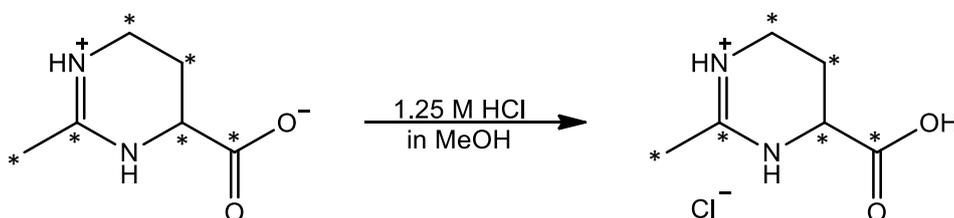
0.86 (t, 3H, ³J(H,H) = 8.0 Hz, H-19), 1.25 (m, 18H, H-10 bis H-18), 1.63 (qi, 2H, ³J(H,H) = 8.0 Hz, H-9), 2.21 (dd, 1H, ³J(H,H) = 4.0 Hz, H-4), 2.49 (s, 3H, H-1), 3.27 (dt, 1H, ²J(H,H) = 12.0 Hz, H-3a), 3.51 (ddt, 1H, ²J(H,H) = 12.0 Hz, H-3b), 4.14 (t, 2H, ³J(H,H) = 8.0 Hz, H-8), 4.33 (d, 1H, ³J(H,H) = 4.0 Hz, H-5).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR: (CDCl_3 , 100.6 MHz, 298 K, ppm):

14.3 (s, 1C, C-19), 22.8 (s, 1C, C-1), 25.9 (s, 1C, C-10), 29.5 bis 29.8 (m, 6C, C-11 bis C-16), 32.1 (s, 1C, C-9), 33.0 (s, 1C, C-17), 63.2 (s, 1C, C-8), 68.0 (s, 1C, C-5), 71.6 (s, 1C, C-4), 157.3 (s, 1C, C-6), 171.5 (s, 1C, C-6).

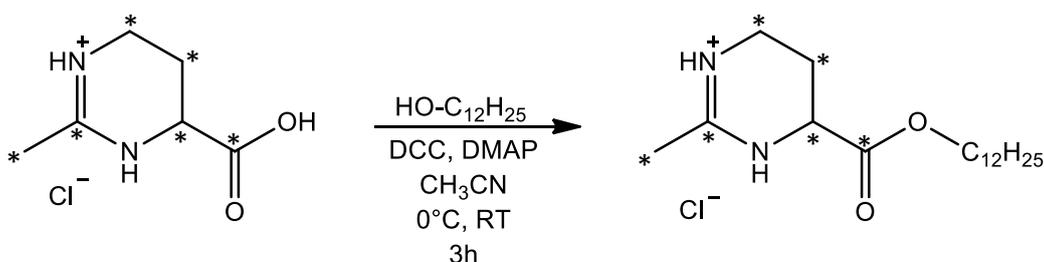
MS (ESI (+), 4 eV), m/z (%): 327.1 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$.

4.2.4 2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäurehydrochlorid (Ectoinhydrochlorid)



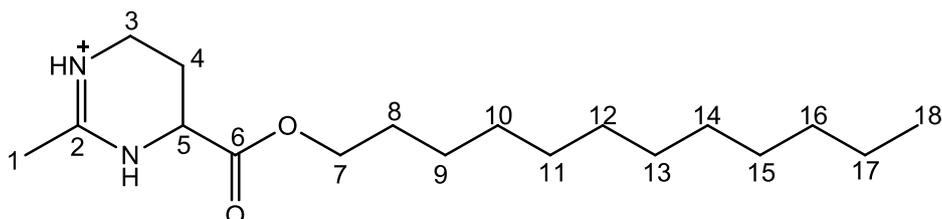
In einem 50 ml Rundkolben wurden (0.17 mmol) ^{13}C -Ectoin in 1 ml Methanol vorgelegt. Mittels einer Pipette wurden 135 μl einer 1.25 M HCl-Lösung in Methanol unter Rühren hinzugegeben. Nach kurzem Rühren wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Vakuum getrocknet. Das Hydrochlorid (31 mg, 0.17 mmol, quant.) wurde als farbloses Pulver erhalten.

4.2.5 2-Methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-carbonsäuredodecylester (^{13}C -Laurylectoin)



In einem 50 ml Rundkolben wurden 25 mg (0.17 mmol) ^{13}C -Ectoin in 25 ml Acetonitril vorgelegt und mittels Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der Zugabe von 73 mg (0.35 mmol) DCC

und katalytischen Mengen DMAP wurde die Lösung für 15 min bei 0°C gerührt. Über eine Pipette wurden 42 μ l (34.6 mg, 0.19 mmol, 0.83 g \cdot cm⁻³) 1-Dodecanol tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 3 d bei dieser gerührt. Anschließend wurde die farblose Suspension filtriert und der farblose Rückstand mit wenig Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingengt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung (SiO₂, CHCl₃:MeOH = 3:2, v/v, R_f = 0.67) wurde das Produkt (270 mg, 0.87 mmol, 15.5%) als farbloser Feststoff erhalten.



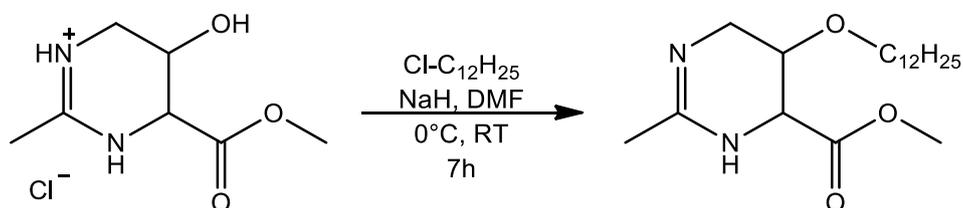
¹H-NMR: (CD₃OD, 499.1 MHz, 298 K, ppm):

0.90 (t, 3H, H-18), 1.29 (m, 20H, H-8 bis H-17), 1.72 (m, 2H, H-3), 1.85 (m, 2H, ³J(H,H) = 5.0 Hz, H-4), 2.16 (s, 3H, H-1), 3.54 (t, 1H, ³J(H,H) = 5.0 Hz, H-5), 4.22 (t, 2H, ³J(H,H) = 5.0 Hz, H-7).

¹³C{¹H}-NMR: (CD₃OD, 125.5 MHz, 298 K, ppm):

14.4 (s, 1C, C-18), 21.8 (s, 1C, C-1), 23.7 (s, 1C, C-17), 30.3 bis 30.7 (m, 8C, C-8 bis C-15), 33.1 (s, 1C, C-16), 34.7 (s, 1C, C-4), 52.2 (s, 1C, C-3), 63.0 (s, 1C, C-5), 67.4 (s, 1C, C-7), 159.9 (s, 1C, C-2), 170.9 (s, 1C, C-6).

4.2.6 Laurylether mit Schutzgruppe

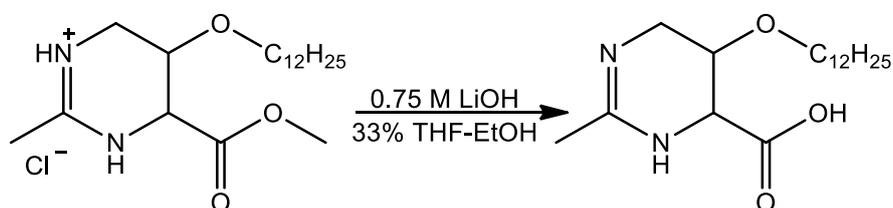


In einem 250 ml Rundkolben wurden 2.4 g (11.5 mmol) Methylhydroxyectoinhydrochlorid in 50 ml DMF vorgelegt und mittels Eisbad auf 0°C gekühlt. Eine Suspension aus 600 mg (25.3 mmol) Natriumhydrid in 20 ml DMF wurden bei 0°C hinzuge tropft. Die farblose Suspension wurde für zwei Stunden bei RT gerührt. Über eine Spritze wurden 3 ml (2.6 g,

12.7 mmol, $0.86 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) 1-Chlordodecan tropfenweise hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 5 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der beige Rückstand am Vakuum getrocknet. Dieser wurde in 50 ml dest. Wasser aufgenommen und zweimal mit je 25 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mittels 2 M HCl auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt und fünfmal mit je 20 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Die Suspension wurde filtriert, der Rückstand mit 10 ml Essigsäureethylester gewaschen und die vereinigten Filtrate bis zur Trockne eingengt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung (SiO_2 , $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 3:2$, v/v, $R_f = 0.16$) wurde das Produkt (117 mg, 0.14 mmol, 3%) als farbloser Feststoff erhalten.

MS (EI, 4 eV), m/z (%): 341.1 (100) $[\text{M}]^+$.

4.2.7 Schutzgruppe abspalten



In einem 10 ml Rundkolben wurden 117 mg (0.14 mmol) Laurylether in 5 ml 33% THF-Ethanol gelöst. Bei RT wurden 2.5 ml (1.88 mmol, 45 mg) einer 0.75 M LiOH-Lösung hinzugegeben. Nach 23 h wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der farblose Rückstand in 2.5 ml Wasser und 3.5 ml Diethylether gelöst. Die wässrige Phase wurde mit Hilfe von 2 M HCl auf einen pH-Wert von 1 - 2 eingestellt und zweimal mit je 2 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die GCMS-Analyse des farblosen Rückstandes ergab eine unselektive Reaktion.

4.3 Zelllinien

4.3.1 Makrophagen

Makrophagen sind Leukozyten und zählen somit zu den Zellen des Immunsystems. Sie dienen der Beseitigung von Mikroorganismen durch Phagozytose und können den Organismus durch Ausschüttung von Botenstoffen, beispielsweise Zytokine, warnen und so systemische Wirkung, wie Fieber, auslösen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mausmakrophagen-ähnliche Zelllinien, RAW 264.7 und J-774, verwendet.

Die Zelllinie RAW 264.7 wurde aus einer Makrophagen-Präparation einer BAB/14 Maus etabliert, die sich aufgrund von Infektionen mit dem Abelson-Maus-Leukämievirus (Ab-MLV) und einem ecotropen MLV Tumor entwickelt hatte (Raschke et al. 1978).

Die Zelllinie J-774 stammt aus einem Tumor der BALB/c-Maus. Sie ist semi-adhärenent und produziert ständig Interleukin-1. Dextransulfat, p-Phenylendiamin und LPS inhibieren das Wachstum der Zellen (Ralph et al. 1975).

4.3.2 Murine embryonale Fibroblasten (MEFs)

MEFs sind primäre Zellen, die aus Mausembryonen isoliert wurden. Ihnen fehlt im Gegensatz zu Zelllinien die Immortalisierung, weshalb sie den Zellen in einem Organismus ähnlicher sind. In dieser Arbeit wurden allerdings zwei verschiedene MEFs verwendet, die durch Fusionierung mit Tumorzellen Zellteilungsfähigkeiten aufweisen. Die eine Zelllinie stammt aus einer *wildtype* Black-6-Maus und die andere aus einer *knock-out* Black-6-Maus. Bei Letzterer wurde die S1P-Lyase ausgeschaltet (Lim und Dobson 2012).

4.3.3 Körnerzellen und Gewebe des Kleinhirns

Das anteriore und posteriore Gewebe des Kleinhirns sowie die Körnerzellen wurden aus Dicer flox/flox Mäusen (Murchison et al. 2005) und jeweiligen Kontrolltieren entnommen. Die Präparation erfolgte am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Bonn.

4.4 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen Medien behandelt. Das Wachstumsmedium besteht aus DMEM mit einem Zusatz von 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin und das Inkubationsmedium aus MEM mit einem Zusatz von 0.3% FKS und 1%

Penicillin/Streptomycin. Zum Einfrieren der Zellen wurde ein Einfriermedium verwendet bestehend aus Wachstumsmedium und DMSO im Verhältnis von 4.5:1.

4.4.1 Auftauen der Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 2 ml FKS gegeben und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine mit 1 ml FKS und 5 mL Wachstumsmedium gefüllte 25 cm² Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

4.4.2 Umsetzung der Zellen

Bei einer Konfluenz von mind. 80% wurden die Zellen in größere (75 oder 175 cm²) Kulturflaschen umgesetzt.

Hierzu wurde bei adhärennten Zellen das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben und die Zellkulturflasche für 3 min bei 40°C inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Zur Neutralisation wurde Wachstumsmedium zu der entstandenen Zellsuspension gegeben und diese mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Bei semi-adhärennten Zellen wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt

Nach 7 min bei 1200 rpm in der Zentrifuge, wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine mit FKS und Wachstumsmedium vorbereitete Zellkulturflasche gegeben und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

4.4.3 Einfrieren der Zellen

Sobald der Zellkulturflaschenboden konfluent war, konnten die Zellen eingefroren werden.

Bei adhärennten Zellen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS (37°C) gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung wurde die Zellkulturflasche für 3 min bei 40°C inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Durch Zugabe des

Wachstumsmediums wurde die Trypsinierung unterbrochen und die entstandene Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Die semi-adhären Zellen wurden mittels Zellschaber im Medium vom Boden gelöst und die Suspension mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Das Röhrchen wurde 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in FKS resuspendiert. Nach langsamer Zugabe des Einfriermediums wurden jeweils 1.8 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

4.4.4 Aussäen der Zellen

Bei einer Konfluenz von mindestens 90% wurden die Zellen für die Versuche in Petrischalen ausgesät.

Hierzu wurde bei den adhären Zellen das Medium angesaugt und der Zellrasen mit PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und für 3 min bei 40°C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Flasche zu lösen. Zur Neutralisation wurde Wachstumsmedium hinzugegeben und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Die semi-adhären Zellen wurden im Medium mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Das Röhrchen wurde 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert und in 21 cm^2 Petrischalen gegeben, welche mit 0.5 ml FKS und 1 ml Wachstumsmedium beschichtet waren. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert, so dass eine Konfluenz von 60-70% erreicht wurde.

4.4.5 Vorinkubation mit Ectoinderivaten bzw. CTAB

Für die Versuche wurde das Wachstumsmedium entfernt und der Zellrasen zweimal mit je 1 ml Inkubationsmedium gewaschen. Anschließend wurden die 5 mM Stammlösungen der Ectoinderivate mit Inkubationsmedium auf eine Konzentration von $25\text{ }\mu\text{M}$ für Ectoin und Hydroxyectoin bzw. $5\text{ }\mu\text{M}$ und $25\text{ }\mu\text{M}$ für Laurylectoin, Laurylhydroxyectoin und CTAB verdünnt. Die Zellen wurden in diesen Medien für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank vorinkubiert.

4.4.6 Behandlung der Zellen mit LPS

Nach der Vorinkubation wurde zu den Zellen eine LPS Lösung gegeben, so dass eine Endkonzentration von 100 ng/ml erreicht wurde. Die Zellen wurden für weitere 2 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

4.4.7 Inkubation der Zellen mit ¹³C-Laurylectoin

Für den Versuch wurden die Zellen wie in 4.4.2 beschrieben in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Anschließend wurde das Wachstumsmedium entfernt und der Zellrasen zweimal mit je 10 ml Inkubationsmedium gewaschen. Die 5 mM Stammlösung des ¹³C-Laurylectoins wurde mit Inkubationsmedium auf eine Konzentration von 25 µM verdünnt und die Zellen in diesem Medium für 3 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Inkubationsmedium wurde abgenommen, die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS (37°C) gewaschen und die Zellen geerntet. Die drei gesammelten Fraktionen (Inkubationsmedium, PBS-Waschlösung und Zellpellet) wurden mittels HPLC auf ¹³C-Ectoin und dessen mögliche Abbauprodukte untersucht.

4.5 Untersuchung der Genexpression auf RNA-Ebene

4.5.1 RNA-Isolation

Für die Isolation und Aufreinigung der RNA wurde das RNeasy Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Ernten und Homogenisieren

Das Medium wurde entfernt und der Zellrasen zweimal mit je 1 ml PBS (37°C) gewaschen. Auf den Zellrasen wurden 1.5 ml RLT-Puffer (enthält 10 µl Mercaptoethanol pro ml RLT) gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden gelöst und in zwei 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach Zugabe einer Stahlkugel wurde das Zelllysate zweimal für je 2 min bei 20 Hz im Mixer Mill aufgeschlossen. In jedes Eppendorfgefäß wurden 750 µl 70%iges Ethanol gegeben und durch sofortiges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Säulenauftrag

Jeweils 600 µl der Probe wurden auf eine RNeasy Mini Spin Column gegeben und für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und der Vorgang solange wiederholt bis das Lysat vollständig aufgetragen war.

DNase Verdau und Aufreinigung

Die an die Säulenmembran gebundene RNA wurde mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde, wie auch in den folgenden Schritten, nach der Zentrifugation bei 10000 rpm für 30 s verworfen. Zum Abbau der DNA wurden 80 µl DNase-Reagenz (7:1 RDD-Puffer/DNase) direkt auf die Membran gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden abermals 350 µl RW1-Puffer hinzugegeben und für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß gestellt und die RNA mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt, nur diesmal für 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule wieder in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß gestellt und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde die Säule in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß gestellt.

Eluierung der RNA

Um die RNA zu eluieren wurde auf die Membran der Säule zweimal je 30 µl RNase-freies Wasser gegeben und zweimal für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend ist eine Lagerung bei -80°C möglich.

4.5.2 RNA-Quantifizierung mittels Photometer

Zur Quantifizierung der isolierten RNA wurde diese mit RNase-freiem Wasser verdünnt (1:35) und im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren für UV-Licht. Um die Reinheit zu bestimmen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Endkonzentration der RNA, sowie der Reinheitsgrad lassen sich über folgende Formeln bestimmen:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \alpha_{260 \text{ nm}} \cdot v \cdot u \cdot 1000^{-1}$$

$$\text{Reinheit} = \frac{\alpha_{260\text{nm}}}{\alpha_{280\text{nm}}}$$

mit:

$\alpha_{260\text{nm}}$ = Absorption bei 260 nm

$\alpha_{280\text{nm}}$ = Absorption bei 280 nm

v = Verdünnungsfaktor (35)

u = Umrechnungsfaktor (40 µg/ml)

Bei einem Reinheitsgrad zwischen 1.6 und 1.8 wurde die RNA als frei von Verunreinigung mit Proteinen betrachtet.

4.5.3 RNA Qualifizierung mittels Agarosegelelektrophorese

Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurde sie mittels Agarosegelelektrophorese qualifiziert. Hierzu wurde ein 1,5%iges Agarosegel in TAE-Puffer (1x) mit 10 µl Ethidiumbromid, welches der Detektierung unter UV-Licht dient, verwendet. Die RNA wurde auf eine einheitliche Konzentration von 1 µg mit RNase-freiem Wasser verdünnt und mit 2 µl RNA-Ladepuffer (10x) versetzt. Die Proben wurden aufgetragen und durch ein elektrisches Feld die negativ geladenen Nucleinsäuren durch die Gelmatrix nach ihrer Größe getrennt. Anschließend wurde eine Aufnahme des Gels mit der AlphaDigiDoc angefertigt. Bei intakter RNA sind die 28S- und 18S-Bande ribosomaler RNA in einem Intensitätsverhältnis von 2:1 zu erkennen. Nur RNA, welche ein Laufverhalten wie in Abbildung 20 zeigte, wurde weiterverwendet.



Abbildung 20: rRNA-Banden nach Gelelektrophorese.

4.5.4 Reverse Transkription

Zur Untersuchung der Expression bestimmter Gene auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR (4.5.5) muss die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe der reversen Transkription. Hierzu wurde die RNA auf eine einheitliche Konzentration zwischen 250 und 500 ng/µl verdünnt. 8 µl der verdünnten RNA wurden mit 1 µl dNTP-Mix (je 10 µM der Desoxynucleosidtriphosphate) und 1 µl random hexamer Primer (Mix aus sechs Oligonucleotiden mit zufälligen Sequenzen, so dass diese an jeder Position der RNA binden können) versetzt und zur Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA für 5 min auf 65°C erwärmt und anschließend für 2 min auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl RT-Puffer (10x), 4 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl DTT (0.1 M), 1 µl RNase Out (40 U/µl) und 1 µl

SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/ μ l) wurden bei 25°C für 10 min die random hexamere an die RNA angelagert und die cDNA bei 50°C für 50 min synthetisiert. Die Reaktion wurde durch Erwärmen auf 85°C für 5 min beendet und dann für 2 min auf 0°C gekühlt. Anschließend war eine Lagerung bei -80°C möglich.

4.5.5 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR (quantitative real time polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Vervielfältigung der DNA in-vitro. Der Verlauf der PCR und die Quantifizierung der Expression bestimmter Gene werden mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen überprüft. Hierbei ist anfangs die Template-Menge begrenzt, wodurch die Fluoreszenz langsam ansteigt. Wenn die DNA künstlich in mehreren Zyklen durch eine thermostabile Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) vervielfältigt wird, steigt die Fluoreszenz exponentiell an. Wenn das Substrat verbraucht ist, kommt die Fluoreszenz zum Erliegen. Um eine quantitative Aussage über die Genexpression treffen zu können, wird der sog. Ct-Wert (Cycle Threshold) zur Auswertung herangezogen. An diesem Punkt steigt die Fluoreszenz erstmals signifikant an (Holzapfel und Wickert 2007).

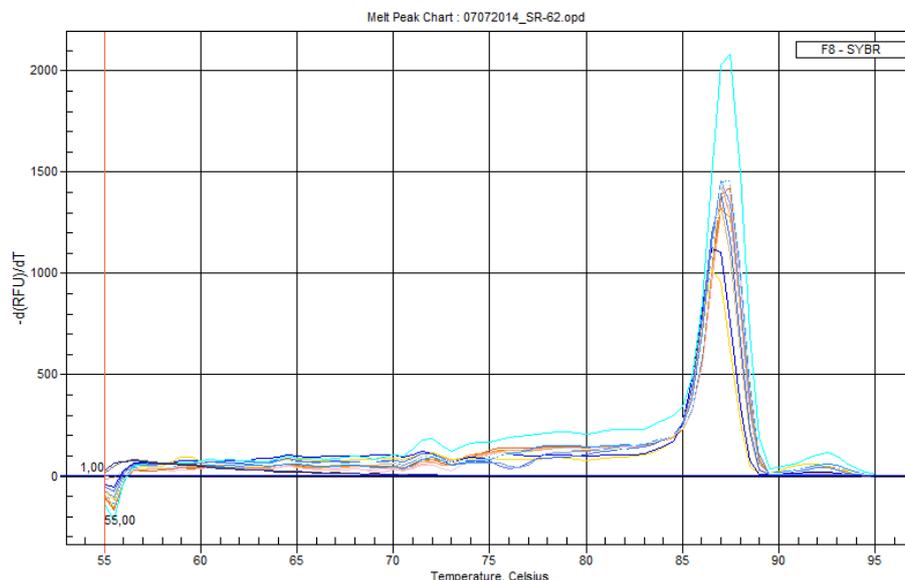


Abbildung 21: Beispiel einer intakten Schmelzkurve.

Die Fluoreszenz kann je nach System auf unterschiedliche Weise an die cDNA binden und somit detektiert werden. In dieser Arbeit wurde der fluoreszierende Farbstoff SensiFAST™ SYBR Hi-ROX der Firma Bioline verwendet, der sich in die kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA einlagert. Allerdings kann der Farbstoff auch unter ungünstigen

Bedingungen mit Primer-Dimeren oder PCR-Beiprodukten reagieren. Dies kann durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR überprüft werden (Abbildung 21). Wenn die Schmelzkurvenanalyse nur ein Signal zeigt, war die qRT-PCR erfolgreich.

Zur praktischen Durchführung der qRT-PCR wurde für jede Probe 1 µl cDNA zusammen mit 7.4 µl RNase-freiem Wasser und je 0.8 µl forward und reverse Primer (jeweils 20 µM), sowie 10 µl SensiFAST™ SYBR Hi ROX (2x) in eine randlose PCR-Platte gegeben. Der SensiFAST™ SYBR Hi-ROX Mastermix enthält SYBR® Green I dye, dNTPs, Stabilisatoren und eine DNA-Sequenz, die das Ablesen eines Gens verstärkt. Anschließend wurde die Platte kurz zentrifugiert und in das qRT-PCR Gerät von Bio-Rad eingesetzt. Zunächst wurde für 2 min die Temperatur auf 95°C erhöht und so das Hot Start Enzym aktiviert. Anschließend wurde ein 2-Stufen-Zyklus, bestehend aus dem Denaturierungsschritt (5 s bei 95°C) und dem Annealingschritt (30 s bei 60°C), 40-mal wiederholt und nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Zum Abschluss wurde die Temperatur auf 40°C gesenkt.

Die Primer des Referenzgens 18S und der Zielsequenzen wurden mit Hilfe des Programms von NCBI (National Center für Biotechnology Information) designt (Tabelle 2).

Gen	Primer
18S	5'-aatcagttatggttccttggtc-3'(forward)
	5'-gctctagaattaccacagttatccaa-3'(reverse)
COX-2	5'-tcatgaaatatgtgctgacatcc-3'(forward)
	5'-tgtagtaggagaggttgagaagg-3'(reverse)
IL-1	5'-aatctcgcagcagcacatca-3'(forward)
	5'-acgggaaagacacaggtagc-3'(reverse)
IL-6	5'-gtggctaaggaccaagacca-3'(forward)
	5'-ataacgcactaggtttgccga-3'(reverse)
IL-10	5'-gcatggcccagaaatcaagg-3'(forward)
	5'-aatcgatgacagcgcctcag-3'(reverse)
TNF-α	5'-accgtcagccgatttgctat-3'(forward)
	5'-ccgactccgcaaagtctaa-3'(reverse)

Tabelle 2: verwendetet Primersequenzen (Mus musculus).

4.5.6 Auswertung der qRT-PCR

Zur relativen Quantifizierung der Ausgangsmenge der DNA werden zwei verschiedene Methoden herangezogen. Bei Beiden wird der Ct-Wert verwendet, welcher den Zyklus bezeichnet, an dem die Fluoreszenz erstmals einen definierten Schwellenwert signifikant

überschreitet. An diesem Punkt befindet sich in jeder Probe die gleiche Menge synthetisierter DNA. Die Anzahl der Zyklen (Ct-Wert), die benötigt werden um die Menge zu erreichen, gibt einen Aufschluss über die relative Ausgangsmenge der DNA.

Standardkurven Methode

Bei dieser Methode wird für jedes Gen anhand der Ct-Werte der Standards mit bekannter Konzentration eine Standardkurve erstellt und die relative Menge der Targetgene berechnet. Diese werden dann nach der Mittelwertbestimmung auf das Referenzgen normalisiert und abschließend auf eine Probe des entsprechenden Gens (LPS) normiert.

$\Delta\Delta$ Ct-Methode

Hier wird zunächst der Mittelwert der Ct-Werte gebildet und von diesem der entsprechende Ct-Wert des Referenzgens abgezogen (Δ Ct-Wert). Nach Subtraktion der Ct-Werte der Normierungsprobe (LPS) ($\Delta\Delta$ Ct-Wert) wird mit Hilfe der unten aufgeführten Formel die relative Transkriptmenge der jeweiligen Gene bestimmt.

$$rT = -2^{\Delta\Delta Ct}$$

4.6 Untersuchung auf Lipidebene

4.6.1 Zellernte für Lipide

Die gesamte Zellernte wurde auf Eis durchgeführt. Bei adhärenen Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurde 1 ml des eiskalten PBS auf den Zellenrasen gegeben und dieser mit Hilfe eines Zellschabers von der Petrischale abgelöst. Dies wurde wiederholt, um möglichst viele Zellen aus der Petrischale zu lösen. Die Zellsuspension wurde in ein Schraubkappenglas (SKG) überführt und für 10 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 400 μ l ddH₂O aufgenommen.

4.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um eine Vergleichsgröße für die Zellmengen zu haben, wurde eine Proteinbestimmung nach dem von Bradford 1976 entwickelten Assay durchgeführt (Lottspeich 1998). Dabei bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blue G-250 in saurer Lösung mit den

Seitenketten von Proteinen Komplexe. Die ungebundene, rote Form des Farbstoffs hat ein Absorptionsmaximum von 470 nm. Durch die Komplexbildung ändert der Farbstoff seine Farbe zu blau und wird stabilisiert. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei auf 595 nm. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes viel höher ist als der des freien Farbstoffs, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden und ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Da das Maß der Farbreaktion vom Protein abhängig ist, ist zur Konzentrationsbestimmung eine Kalibrierung notwendig. Zur Kalibrierung wird das Standardprotein BSA (Rinderserumalbumin) verwendet.

Praktisch wurden 200 µl einer Coomassie-Brillant-Blue G-250-Lösung zusammen mit 5 µl der Proteinprobe und 15 µl ddH₂O in eine Mikrotiterplatte gegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm vermessen. Die Standardkurve wurde aus einer BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 250 µg/ml hergestellt. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

4.6.3 Aufarbeitung der Lipide (van Echten-Deckert 2000)

Extraktion der Lipide

Zu den 390 µl Zell- oder Gewebssuspension wurden 5.85 ml eines 2:1 Chloroform/Methanol-Gemisches gegeben und kurz gevortext. Die Schraubkappengläser wurden mit Parafilm abgedichtet und für 24 h bei 48°C im Schüttelbad extrahiert.

Filtration der Lipide

Für die Filtration wurden lange Pasteurpipetten ca. 1 cm hoch mit Watte gestopft (=Filter) und mit 500 µl Extraktionsmittel (ExMi: Chloroform/Methanol/ddH₂O = 20:10:2) gespült. Unter die Filter wurden Schraubkappengläser gestellt und die Proben auf die Filter gegeben. Die Probengläser wurden dreimal mit je 500 µl ExMi gespült und ebenfalls auf die Filter gegeben. Nachdem der Filter abermals mit 500 µl ExMi gespült wurde, wurden die vereinigten Filtrate unter Wärmezufuhr und N₂-Strom eingedampft.

Alkalische Hydrolyse

Um auf der Dünnschichtchromatographieplatte die Glycosphingolipide besser identifizieren zu können, werden die Phosphorlipide durch eine alkalische Hydrolyse entfernt. Dazu wurden die nach der Filtration eingedampften Proben in 2.5 ml Methanol aufgenommen und 10 min

im Ultraschallbad sonifiziert. Nach Zugabe von 62.5 µl 4M NaOH-Lösung wurden die Proben gevortext, die Deckel mit Parafilm verschlossen und für 2 h bei 37°C im Wasserschüttelbad hydrolysiert. Zur Neutralisation wurden 10 µl Eisessig hinzugegeben und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden die Proben unter Wärmezufuhr und N₂-Strom eingedampft.

Entsalzen

Nach der alkalischen Hydrolyse müssen die Lipide von den Salzen und anderen polaren Verunreinigungen durch eine *reverse phase* Chromatographie (RP-18) befreit werden. Hierzu wurden lange Pasteurpipetten mit Glaswolle gestopft und 750 µl einer RP-18-Suspension hinzugegeben, sodass ein ca. 2 cm hohes Säulchen generiert wurde. Dieses wurde zweimal mit je 1 ml theoretischer Oberphase (Chloroform/Methanol/ 0.1 M KCl = 6:96:94) gespült. Die Proben wurden in 1 ml Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad sonifiziert. Nach Zugabe von 1 ml 300 mM NH₄OAc-Lösung in H₂O wurden die Proben auf die Säulchen aufgetragen. Die Probengefäße wurden zweimal mit je 500 µl 200 mM NH₄OAc-Lösung in MeOH/H₂O = 1:1 nachgespült und aufgetragen. Anschließend wurden die Säulchen sechsmal mit je 1 ml ddH₂O gespült. Neue Schraubkappengläser wurden untergestellt und die Lipide schrittweise mit 1 ml Methanol und achtmal mit je 1 ml Chloroform/Methanol = 1:1 eluiert. Das Eluat wurde unter Wärmezufuhr und N₂-Strom eingedampft.

Trennung in neutrale und anionische Lipide

Zur Trennung der Lipide mittels *anion-exchange-chromatography* wurden lange Pasteurpipetten mit Glaswolle gestopft und 1 ml einer DEAE-Sephadex-A25 Suspension hinzugegeben, sodass ein ca. 2 cm hohes Säulchen generiert wurde. Dieses wurde mit 1 ml Methanol und dreimal mit je 1 ml CHCl₃/MeOH/ddH₂O = 3:7:1 gespült. Nachdem Schraubkappengläser untergestellt wurden, wurden die Proben in 1 ml CHCl₃/MeOH/H₂O = 3:7:1 gelöst und 5 min im Ultraschallbad sonifiziert. Die Proben wurden aufgetragen und die neutralen Lipide sechsmal mit je 1 ml CHCl₃/MeOH/H₂O = 3:7:1 eluiert. Anschließend wurden neue Schraubkappengläser untergestellt und die anionischen Lipide sechsmal mit je 1 ml CHCl₃/MeOH/NH₄OAc (0,8 M) = 3:7:1 eluiert. Die beiden Fraktionen wurden unter Wärmezufuhr und N₂-Strom eingedampft.

4.6.4 Dünnschichtchromatographie

Zur Auftrennung der Lipide wurden diese in 400 µl ExMi aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter Wärmezufuhr und N₂-Strom wurden die Lipide in 25 µl ExMi gelöst und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Platte), welche zuvor 1 h bei 100°C getrocknet wurde, aufgetragen. Die Standards wurden in einer Konzentration von 5-10 nmol aufgetragen. Die DC-Platte wurde über Nacht im Exsikkator getrocknet und der DC-Tank mit dem entsprechenden Laufmittel über Nacht equilibriert. Für Ceramide, Cholesterol und Fettsäuren wurde ein Laufmittelgemisch aus Chloroform/Methanol/Eisessig = 190:9:1 verwendet und für anionische und neutrale Lipide ein Laufmittelgemisch aus Chloroform/Methanol/0.22% CaCl₂ = 60:35:8. Je nach Laufmittel dauerte die Chromatographie 1.5 bis 2 h. Die DC-Platte wurde danach für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und dann visualisiert.

Zur Visualisierung der Lipide gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, durch Ioddämpfe oder Verkohlung. Für die erste Methode wurde Iod in eine Kammer gegeben und die Platte so auf die Kammer gelegt, dass sie diese verschließt und die aufsteigenden Ioddämpfe die Banden färben. Bei der zweiten Methode wurde die Platte in eine Lösung aus 8%iger Phosphorsäure und 10%igem Kupfersulfat getaucht. Bei 180°C wurde die DC-Platte für mind. 10 min erhitzt, wodurch die Lipide verkohlen.

5 Literaturverzeichnis

- Abdel-Aziz, Heba; Wadie, Walaa; Scherner, Olaf; Efferth, Thomas; Khayyal, Mohamed T. (2015): Bacteria-Derived Compatible Solutes Ectoine and 5alpha-Hydroxyectoine Act as Intestinal Barrier Stabilizers to Ameliorate Experimental Inflammatory Bowel Disease. In: *Journal of natural products* 78 (6), S. 1309–1315. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00115.
- Ackermann, Hermann (2008): Cerebellar contributions to speech production and speech perception: psycholinguistic and neurobiological perspectives. In: *Trends in neurosciences* 31 (6), S. 265–272. DOI: 10.1016/j.tins.2008.02.011.
- Adams, Rachel L.; Kogut, Margot; Russell, Nicholas J. (1990): The effect of salinity on growth and lipid composition of a moderately halophilic Gram-negative bacterium HX. In: *Biochem. Cell Biol.* 68 (1), S. 249–254. DOI: 10.1139/o90-034.
- Adams, Rachel L.; Russell, Nicholas J. (1992): Interactive effects of salt concentration and temperature on growth and lipid composition in the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola*. In: *Can. J. Microbiol.* 38 (8), S. 823–827. DOI: 10.1139/m92-134.
- Aloni, Y.; Inbar, L.; Lapidot, A.; Ben-Asher, E. (1993): Purified tetrahydropyrimidine derivatives and pharmaceutical compositions comprising them. In: *Eu. Appl. EP 0553884A1*.
- Andersson, M. M.; Breccia, J. D.; Hatti-Kaul, R. (2000): Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. In: *Biotechnology and applied biochemistry* 32 (Pt 3), S. 145–153.
- Arakawa, T.; Timasheff, S. N. (1983): Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 224 (1), S. 169–177.
- Arakawa, T.; Timasheff, S. N. (1985): The stabilization of proteins by osmolytes. In: *Biophysical journal* 47 (3), S. 411–414. DOI: 10.1016/S0006-3495(85)83932-1.
- Armant, Myriam A.; Fenton, Matthew J. (2002): Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. In: *Genome biology* 3 (8), REVIEWS3011.
- Arora, Anubhav; Ha, Chanki; Park, Chan Beum (2004): Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. In: *FEBS letters* 564 (1-2), S. 121–125. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00326-6.
- Avron, M. (1986): The osmotic components of halotolerant algae. In: *Trends in Biochemical Sciences* 11 (1), S. 5–6. DOI: 10.1016/0968-0004(86)90218-5.

Bartel, David P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell* 116 (2), S. 281–297.

Bartens, Werner (2001): Forever Young. Bakterien aus einem Wüstensee sollen die menschliche Haut vor Sonne und Wassermangel schützen. In: *Die Zeit* 2001, 04.10.2001 (41), S. 1–2.

Barth, S.; Huhn, M.; Matthey, B.; Klimka, A.; Galinski, E. A.; Engert, A. (2000): Compatible-Solute-Supported Periplasmic Expression of Functional Recombinant Proteins under Stress Conditions. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4), S. 1572–1579. DOI: 10.1128/AEM.66.4.1572-1579.2000.

Baskaran, N.; Kandpal, R. P.; Bhargava, A. K.; Glynn, M. W.; Bale, A.; Weissman, S. M. (1996): Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. In: *Genome research* 6 (7), S. 633–638.

Ben-Amotz, A.; Avron, M. (1973): The Role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the Halophilic Alga *Dunaliella parva*. In: *Plant physiology* 51 (5), S. 875–878.

Biggin, P. C.; Sansom, M. S. (2001): Channel gating: twist to open. In: *Current biology : CB* 11 (9), S. 364–366.

bitop AG (04.07.2007): Intensive Forschung & enge Kooperationen zahlen sich aus: bitop AG erweitert Produktportfolio um innovatives. Witten. bitop AG, Stockumer Straße 28; D-58453 Witten.

Bleeker, Fonnet E.; Lamba, Simona; Zanon, Carlo; Molenaar, Remco J.; Hulsebos, Theo J. M.; Troost, Dirk et al. (2014): Mutational profiling of kinases in glioblastoma. In: *BMC cancer* 14, S. 718. DOI: 10.1186/1471-2407-14-718.

Bleeker, Fonnet E.; Molenaar, Remco J.; Leenstra, Sieger (2012): Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. In: *Journal of neuro-oncology* 108 (1), S. 11–27. DOI: 10.1007/s11060-011-0793-0.

Blount, P.; Moe, P. C. (1999): Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. In: *Trends in microbiology* 7 (10), S. 420–424.

Borges, Nuno; Ramos, Ana; Raven, Neil D. H.; Sharp, Richard J.; Santos, Helena (2002): Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. In: *Extremophiles : life under extreme conditions* 6 (3), S. 209–216. DOI: 10.1007/s007920100236.

- Bownik, Adam; Stepniewska, Zofia (2016): Ectoine as a promising protective agent in humans and animals. In: *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 67 (4), S. 260–265. DOI: 10.1515/aiht-2016-67-2837.
- Brown, A. D. (1976): Microbial water stress. In: *Bacteriological reviews* 40 (4), S. 803–846.
- Buenger, J.; Driller, H. (2004): Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. In: *Skin pharmacology and physiology* 17 (5), S. 232–237. DOI: 10.1159/000080216.
- Bünger, J. (1998): Neue Wirkstoffklasse schützt und pflegt die Haut. In: *Parfüm. Kosm.* 79, S. 32–35.
- Bünger, J. (1999): Ectoine added protection and care for the skin. In: *Eurocosm* 7, S. 22–24.
- Bünger, J. (2000): Neue Rohstoffe - Mehr Schutz für die Haut mit einem neuen Wirkstoff für die Kosmetikindustrie. In: *SÖFW-Journal* 126, S. 90.
- Burg, Maurice B.; Ferraris, Joan D. (2008): Intracellular organic osmolytes: function and regulation. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (12), S. 7309–7313. DOI: 10.1074/jbc.R700042200.
- Chen, Chang-Zheng; Li, Ling; Lodish, Harvey F.; Bartel, David P. (2004): MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5654), S. 83–86. DOI: 10.1126/science.1091903.
- Chen, F.; Castranova, V.; Shi, X.; Demers, L. M. (1999): New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. In: *Clinical chemistry* 45 (1), S. 7–17.
- Clegg, J. S.; Seitz, P.; Seitz, W.; Hazlewood, C. F. (1982): Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. In: *Cryobiology* 19 (3), S. 306–316.
- Colby, David W.; Prusiner, Stanley B. (2011): Prions. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (1), a006833. DOI: 10.1101/cshperspect.a006833.
- Constantin, Lena (2016): The Role of MicroRNAs in Cerebellar Development and Autism Spectrum Disorder During Embryogenesis. In: *Molecular neurobiology*. DOI: 10.1007/s12035-016-0220-9.
- Crowe, J. H.; Hoekstra, F. A.; Crowe, L. M. (1992): Anhydrobiosis. In: *Annual review of physiology* 54, S. 579–599. DOI: 10.1146/annurev.ph.54.030192.003051.

- Crowe, John H.; Carpenter, John F.; Crowe, Lois M.; Anchordoguy, Thomas J. (1990): Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. In: *Cryobiology* 27 (3), S. 219–231. DOI: 10.1016/0011-2240(90)90023-W.
- da Costa, M. S.; Santos, H.; Galinski, E. A. (1998): An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 61, S. 117–153.
- Dahmane, N.; Ruiz-i-Altaba, A. (1999): Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. In: *Development* 126 (14), S. 3089.
- Dinarelli, C. A. (2000): Proinflammatory cytokines. In: *Chest* 118 (2), S. 503–508.
- Dwivedi, Mridula; Brinkkotter, Marc; Harishchandra, Rakesh Kumar; Galla, Hans-Joachim (2014): Biophysical investigations of the structure and function of the tear fluid lipid layers and the effect of ectoine. Part B: artificial lipid films. In: *Biochimica et biophysica acta* 1838 (10), S. 2716–2727. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.05.007.
- Eichel, Andrea; Bilstein, Andreas; Werkhauser, Nina; Mosges, Ralph (2014): Meta-analysis of the efficacy of ectoine nasal spray in patients with allergic rhinoconjunctivitis. In: *Journal of allergy* 2014, S. 292545. DOI: 10.1155/2014/292545.
- Eisenman, L. M. (2000): Antero-posterior boundaries and compartments in the cerebellum: evidence from selected neurological mutants. In: *Progress in brain research* 124, S. 23–30. DOI: 10.1016/S0079-6123(00)24005-3.
- Feghali, C. A.; Wright, T. M. (1997): Cytokines in acute and chronic inflammation. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2, d12-26.
- Galinski, E. A. (1995): Osmoadaptation in bacteria. In: *Advances in microbial physiology* 37, S. 272–328.
- Galinski, Erwin A.; Trüper, Hans G. (1994): Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. In: *FEMS Microbiology Reviews* 15 (2-3), S. 95–108. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00128.x.
- Galla, Hans-Joachim (2017): Einfluss von Laurylectoin auf die Membranfluidität. Münster, 08.11.2017. Email an Gerhild van Echten-Deckert und Sabrina Häbel. Festplatte.

- Gaur, Upasna; Aggarwal, Bharat B. (2003): Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. In: *Biochemical pharmacology* 66 (8), S. 1403–1408.
- Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. In: *Annual review of immunology* 16, S. 225–260. DOI: 10.1146/annurev.immunol.16.1.225.
- Gilmore, T. D. (2006): Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. In: *Oncogene* 25 (51), S. 6680–6684. DOI: 10.1038/sj.onc.1209954.
- Göller, Karin; A. Galinski, Erwin (1999): Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7 (1–4), S. 37–45. DOI: 10.1016/S1381-1177(99)00043-0.
- Graf, Ruediger; Anzali, Soheila; Buenger, Joachim; Pfluecker, Frank; Driller, Hansjuergen (2008): The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. In: *Clinics in dermatology* 26 (4), S. 326–333. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.01.002.
- Hagen-Euteneuer, Nadine (2013): Entzündungsvorbeugende Wirkung von Ectoin, Hydroxyectoin und Laurylectoin. Universität Bonn, 2013. mündlich an Sabrina Häbel.
- Hannun, Y. A.; Luberto, C. (2000): Ceramide in the eukaryotic stress response. In: *Trends in cell biology* 10 (2), S. 73–80.
- Hannun, Yusuf A.; Obeid, Lina M. (2002): The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (29), S. 25847–25850. DOI: 10.1074/jbc.R200008200.
- Harishchandra, Rakesh Kumar; Wulff, Stephanie; Lentzen, Georg; Neuhaus, Thorsten; Galla, Hans-Joachim (2010): The effect of compatible solute ectoines on the structural organization of lipid monolayer and bilayer membranes. In: *Biophysical chemistry* 150 (1-3), S. 37–46. DOI: 10.1016/j.bpc.2010.02.007.
- Henke, W.; Herdel, K.; Jung, K.; Schnorr, D.; Loening, S. A. (1997): Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. In: *Nucleic acids research* 25 (19), S. 3957–3958.
- Herrup, K.; Kuemerle, B. (1997): The compartmentalization of the cerebellum. In: *Annual review of neuroscience* 20, S. 61–90. DOI: 10.1146/annurev.neuro.20.1.61.

Hesse, Manfred; Meier, Herbert; Zeeh, Bernd (2005): Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 7., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Hoekstra, Folkert A.; Wolkers, Willem F.; Buitink, Julia; Golovina, Elena A.; Crowe, John H.; Crowe, Lois M. (1997): Membrane Stabilization in the Dry State. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 117 (3), S. 335–341. DOI: 10.1016/S0300-9629(96)00272-1.

Holzappel, Bianca; Wickert, Lucia (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. In: *Biol. Unserer Zeit* 37 (2), S. 120–126. DOI: 10.1002/biuz.200610332.

Horn, Florian (2009): Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.

Ishihara, Katsuhiko; Hirano, Toshio (2002): IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13 (4-5), S. 357–368.

Janeway, Charles (2009): Immunologie. Unter Mitarbeit von Kenneth Murphy, Paul Travers und Mark Walport. 7. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl. (Spektrum-Lehrbuch).

Kamimura, D.; Ishihara, K.; Hirano, T. (2003): IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 149, S. 1–38. DOI: 10.1007/s10254-003-0012-2.

Kanapathipillai, Mathumai; Ku, Sook Hee; Girigoswami, Koyeli; Park, Chan Beum (2008): Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. In: *Biochemical and biophysical research communications* 365 (4), S. 808–813. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.11.074.

Karin, M.; Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. In: *Annual review of immunology* 18, S. 621–663. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621.

Karp, Gerald (2005): Molekulare Zellbiologie. Mit 36 Tabellen. 1., dt. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer (Springer-Lehrbuch).

Khraiwesh, Basel; Arif, M. Asif; Seumel, Gotelinde I.; Ossowski, Stephan; Weigel, Detlef; Reski, Ralf; Frank, Wolfgang (2010): Transcriptional control of gene expression by microRNAs. In: *Cell* 140 (1), S. 111–122. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.023.

- Kim, Kye-Seong; Kim, Jong S.; Lee, Man R.; Jeong, Hoe S.; Kim, Jaesang (2009): A study of microRNAs in silico and in vivo: emerging regulators of embryonic stem cells. In: *The FEBS journal* 276 (8), S. 2140–2149. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06932.x.
- King, David; Yeomanson, Daniel; Bryant, Helen E. (2015): PI3King the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. In: *Journal of pediatric hematology/oncology* 37 (4), S. 245–251. DOI: 10.1097/MPH.0000000000000329.
- Knapp, S.; Ladenstein, R.; Galinski, E. A. (1999): Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. In: *Extremophiles : life under extreme conditions* 3 (3), S. 191–198.
- Kolls, Jay K.; Linden, Anders (2004): Interleukin-17 family members and inflammation. In: *Immunity* 21 (4), S. 467–476. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.08.018.
- Kroker, Matthias; Sydlik, Ulrich; Autengruber, Andrea; Cavelius, Christian; Weighardt, Heike; Kraegeloh, Annette; Unfried, Klaus (2015): Preventing carbon nanoparticle-induced lung inflammation reduces antigen-specific sensitization and subsequent allergic reactions in a mouse model. In: *Particle and fibre toxicology* 12, S. 20. DOI: 10.1186/s12989-015-0093-5.
- Kumar, Himanshu; Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2011): Pathogen Recognition by the Innate Immune System. In: *International Review of Immunology* 30 (1), S. 16–34.
- Kunte, Hans Jörg; Lentzen, G.; Galinski, E. (2016): Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products. Berlin: Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM).
- Kurz, Matthias (2008): Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. In: *Saline Systems* 4, S. 6. DOI: 10.1186/1746-1448-4-6.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lambert, Dominic; Draper, David E. (2007): Effects of osmolytes on RNA secondary and tertiary structure stabilities and RNA-Mg²⁺ interactions. In: *Journal of molecular biology* 370 (5), S. 993–1005. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.03.080.
- Lapidot, A.; Iakobashvili, R.; Malin, G. (1999): Methods for DNA amplification and sequencing. In: *In. Appl. WO 9941410A1*.

Lappas, Martha; Permezel, Michael; Georgiou, Harry M.; Rice, Gregory E. (2002): Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. In: *Biology of reproduction* 67 (2), S. 668–673.

Lauw, F. N.; Pajkrt, D.; Hack, C. E.; Kurimoto, M.; van Deventer, S. J.; van der Poll, T. (2000): Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (5), S. 2783–2789.

Lenz, Andreas; Franklin, Glen A.; Cheadle, William G. (2007): Systemic inflammation after trauma. In: *Injury* 38 (12), S. 1336–1345. DOI: 10.1016/j.injury.2007.10.003.

Lewis, Benjamin P.; Burge, Christopher B.; Bartel, David P. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. In: *Cell* 120 (1), S. 15–20. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035.

Lim, Jenson; Dobson, Jon (2012): Improved transfection of HUVEC and MEF cells using DNA complexes with magnetic nanoparticles in an oscillating field. In: *Journal of genetics* 91 (2), S. 223–227.

Lippert, Karin; Galinski, Erwin A. (1992): Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, S. 61–65.

Liu, Qian; Jiang, Mei; Kuang, Yi; Shu, Xiaoqiong; Li, Jun; Li, Matthew W.; Li, Hedong (2017): Dicer1 Ablation Impairs Responsiveness of Cerebellar Granule Neuron Precursors to Sonic Hedgehog and Disrupts Expression of Distinct Cell Cycle Regulator Genes. In: *Cerebellum (London, England)* 16 (2), S. 450–461. DOI: 10.1007/s12311-016-0821-x.

Liu, Y.; Bolen, D. W. (1995): The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. In: *Biochemistry* 34 (39), S. 12884–12891.

Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J. (2001): The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. In: *Cell* 104 (4), S. 487–501.

Lodish, Harvey F. (2013): *Molecular cell biology*. 7. ed., 2. print., Internat. ed. New York, NY, Basingstoke: Freeman; Macmillan Higher Education. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy1212/2012932495-d.html>.

Löffler, Georg (Hg.) (2002): *Biochemie und Pathobiochemie*. Mit 218 Tabellen. Deutsche Ärzte-Versicherung. 7., völlig neu bearb. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer (Springer-Lehrbuch).

- Lottspeich, Friedrich (Hg.) (1998): Bioanalytik. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl. (Spektrum-Lehrbuch).
- Louis, P.; Trüper, H. G.; Galinski, E. A. (1994): Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (6), S. 684–688. DOI: 10.1007/s002530050199.
- Lu, Jun; Getz, Gad; Miska, Eric A.; Alvarez-Saavedra, Ezequiel; Lamb, Justin; Peck, David et al. (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. In: *Nature* 435 (7043), S. 834–838. DOI: 10.1038/nature03702.
- Luberto, Chiara; Kravetska, Jacqueline M.; Hannun, Yusuf A. (2002): Ceramide regulation of apoptosis versus differentiation: a walk on a fine line. Lessons from neurobiology. In: *Neurochemical research* 27 (7-8), S. 609–617.
- MacKichan, M. L.; DeFranco, A. L. (1999): Role of ceramide in lipopolysaccharide (LPS)-induced signaling. LPS increases ceramide rather than acting as a structural homolog. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (3), S. 1767–1775.
- Makeyev, Eugene V.; Zhang, Jiangwen; Carrasco, Monica A.; Maniatis, Tom (2007): The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. In: *Molecular cell* 27 (3), S. 435–448. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.07.015.
- Manivel, J. C.; Priest, J. R.; Watterson, J.; Steiner, M.; Woods, W. G.; Wick, M. R.; Dehner, L. P. (1988): Pleuropulmonary blastoma. The so-called pulmonary blastoma of childhood. In: *Cancer* 62 (8), S. 1516–1526.
- Merck KGaA (12.09.2000): More protection for the skin: Merck KGaA presents a revolutionary active ingredient for the cosmetic industry. Darmstadt.
- Merck KGaA (24.04.2001): Innovation für die Haut: Merck startet die Markteinführung von Emblica - einem pflanzlichen Wirkstoff für die Kosmetikindustrie. Düsseldorf und Darmstadt. Vennen, Hartmut.
- Muller, Dorte; Lindemann, Torben; Shah-Hosseini, Kija; Scherner, Olaf; Knop, Markus; Bilstein, Andreas; Mosges, Ralph (2016): Efficacy and tolerability of an ectoine mouth and throat spray compared with those of saline lozenges in the treatment of acute pharyngitis and/or laryngitis: a prospective, controlled, observational clinical trial. In: *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-*

Laryngology - Head and Neck Surgery 273 (9), S. 2591–2597. DOI: 10.1007/s00405-016-4060-z.

Murchison, Elizabeth P.; Partridge, Janet F.; Tam, Oliver H.; Cheloufi, Sihem; Hannon, Gregory J. (2005): Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (34), S. 12135–12140. DOI: 10.1073/pnas.0505479102.

Mutschler, Ernst; Schaible, Hans-Georg; Vaupel, Peter (2007): *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 140 Tabellen. 6., völlig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.

Nakagawa, Yuichi; Sota, Masahiro; Koumoto, Kazuya (2015): Cryoprotective ability of betaine-type metabolite analogs during freezing denaturation of enzymes. In: *Biotechnology letters* 37 (8), S. 1607–1613. DOI: 10.1007/s10529-015-1841-1.

Newton, R.; Kuitert, L. M.; Bergmann, M.; Adcock, I. M.; Barnes, P. J. (1997): Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. In: *Biochemical and biophysical research communications* 237 (1), S. 28–32. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7064.

Norrby, E. (2011): Prions and protein-folding diseases. In: *Journal of internal medicine* 270 (1), S. 1–14. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2011.02387.x.

O'Neill, G. P.; Ford-Hutchinson, A. W. (1993): Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. In: *FEBS letters* 330 (2), S. 156–160.

Oren, A. (1999): Bioenergetic aspects of halophilism. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63 (2), S. 334–348.

Oren, Aharon (1986): Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*. In: *Can. J. Microbiol.* 32 (1), S. 4–9. DOI: 10.1139/m86-002.

Oren, Aharon (2002): Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28 (1), S. 56–63.

Palsson-McDermott, Eva M.; O'Neill, Luke A. J. (2004): Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. In: *Immunology* 113 (2), S. 153–162. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x.

- Pastor, Jose M.; Salvador, Manuel; Argandona, Montserrat; Bernal, Vicente; Reina-Bueno, Mercedes; Csonka, Laszlo N. et al. (2010): Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. In: *Biotechnology advances* 28 (6), S. 782–801. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.06.005.
- Pech, Thomas; Ohsawa, Ichiro; Praktijnjo, Michael; Overhaus, Marcus; Wehner, Sven; Websky, Martin von et al. (2013): A natural tetrahydropyrimidine, ectoine, ameliorates ischemia reperfusion injury after intestinal transplantation in rats. In: *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 80 (2), S. 102–110. DOI: 10.1159/000342792.
- Peltier, Joseph; O’Neill, Analeah; Schaffer, David V. (2007): PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. In: *Developmental Neurobiology* 67 (10), S. 1348–1361. DOI: 10.1002/dneu.20506.
- Pfluecker, F.; Bungler, J.; Hitzel, S.; Witte, G.; Beck, J.; Lergenmuller, M.; Driller, H. (2005): Complete photo protection - going beyond visible endpoints. In: *SÖFW-Journal* 131 (7), S. 20–30.
- Qu, Y.; Bolen, C. L.; Bolen, D. W. (1998): Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (16), S. 9268–9273.
- Ralph, Peter; Prichard, John; Cohn, Melvin (1975): Reticulum Cell Sarcoma: An Effector Cell in Antibody-Dependent Cell-Mediated Immunity. In: *The Journal of Immunology* 114 (2 Part 2), S. 898–905. Online verfügbar unter http://www.jimmunol.org/content/114/2_Part_2/898.
- Rao, Prakash K.; Kumar, Roshan M.; Farkhondeh, Mina; Baskerville, Scott; Lodish, Harvey F. (2006): Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (23), S. 8721–8726. DOI: 10.1073/pnas.0602831103.
- Raschke, W. C.; Baird, S.; Ralph, P.; Nakoinz, I. (1978): Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. In: *Cell* 15 (1), S. 261–267.
- Reed, Robert H. (1984): Use and abuse of osmo-terminology. In: *Plant Cell Environ* 7 (3), S. 165–170. DOI: 10.1111/1365-3040.ep11614591.

Rees, William A.; Yager, Thomas D.; Korte, John; Hippel, Peter H. von (1993): Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. In: *Biochemistry* 32 (1), S. 137–144. DOI: 10.1021/bi00052a019.

Roessler, Markus; Muller, Volker (2001): Osmoadaptation in bacteria and archaea. Common principles and differences. In: *Environ Microbiol* 3 (12), S. 743–754. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2001.00252.x.

Ruvolo, Peter P. (2003): Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. In: *Pharmacological research* 47 (5), S. 383–392.

Salmannejad, Faranak; Nafissi-Varcheh, Nastaran (2017): Ectoine and hydroxyectoine inhibit thermal-induced aggregation and increase thermostability of recombinant human interferon Alfa2b. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 97, S. 200–207. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.11.014.

Sauer, T.; Galinski, E. A. (1998): Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. In: *Biotechnology and bioengineering* 57 (3), S. 306–313.

Schnoor, Michael; Voss, Peter; Cullen, Paul; Boking, Thomas; Galla, Hans-Joachim; Galinski, Erwin A.; Lorkowski, Stefan (2004): Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. In: *Biochemical and biophysical research communications* 322 (3), S. 867–872. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.200.

Scholz, Holger (2003): Prostaglandins. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 285 (3), R512-4. DOI: 10.1152/ajpregu.00298.2003.

Schünke, Michael (2006): Prometheus Lernatlas der Anatomie. Kopf und Neuroanatomie. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag.

Schwibbert, Karin; Marin-Sanguino, Alberto; Bagyan, Irina; Heidrich, Gabriele; Lentzen, Georg; Seitz, Harald et al. (2011): A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581 T. In: *Environmental microbiology* 13 (8), S. 1973–1994. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02336.x.

Severin, Jorg; Wohlfarth, Axel; Galinski, Erwin A. (1992): The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. In: *Journal of General Microbiology* 138, S. 1629–1638.

Shirai, T.; Yamaguchi, H.; Ito, H.; Todd, C. W.; Wallace, R. B. (1985): Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. In: *Nature* 313 (6005), S. 803–806.

Simmons, Daniel L.; Botting, Regina M.; Hla, Timothy (2004): Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. In: *Pharmacological reviews* 56 (3), S. 387–437. DOI: 10.1124/pr.56.3.3.

Smirnoff, Nicholas; Cumbes, Quinton J. (1989): Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. In: *Phytochemistry* 28 (4), S. 1057–1060. DOI: 10.1016/0031-9422(89)80182-7.

Sonnemann, Uwe; Scherner, Olaf; Werkhauser, Nina (2014): Treatment of rhinitis sicca anterior with ectoine containing nasal spray. In: *Journal of allergy* 2014, S. 273219. DOI: 10.1155/2014/273219.

Sukharev, S. I.; Blount, P.; Martinac, B.; Kung, C. (1997): Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. In: *Annual review of physiology* 59, S. 633–657. DOI: 10.1146/annurev.physiol.59.1.633.

Suzuki, Hiroshi I.; Yamagata, Kaoru; Sugimoto, Koichi; Iwamoto, Takashi; Kato, Shigeaki; Miyazono, Kohei (2009): Modulation of microRNA processing by p53. In: *Nature* 460 (7254), S. 529–533. DOI: 10.1038/nature08199.

Sydlik, Ulrich; Gallitz, Inka; Albrecht, Catrin; Abel, Josef; Krutmann, Jean; Unfried, Klaus (2009): The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 180 (1), S. 29–35. DOI: 10.1164/rccm.200812-1911OC.

Sydlik, Ulrich; Peuschel, Henrike; Paunel-Gorgulu, Adnana; Keymel, Stefanie; Kramer, Ursula; Weissenberg, Alexander et al. (2013): Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation. In: *The European respiratory journal* 41 (2), S. 433–442. DOI: 10.1183/09031936.00132211.

Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2005): Toll-like receptors in innate immunity. In: *International immunology* 17 (1), S. 1–14. DOI: 10.1093/intimm/dxh186.

Thompson, R. F.; Steinmetz, J. E. (2009): The role of the cerebellum in classical conditioning of discrete behavioral responses. In: *Neuroscience* 162 (3), S. 732–755. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.041.

- Timasheff, Serge N. (2002): Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. In: *Biochemistry* 41 (46), S. 13473–13482.
- Torchilin, V. P. (2000): Drug targeting. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 11 Suppl 2, S81-91.
- Tress, Oliver; Häbel, Sabrina; Bönisch, Carina; Sistig, Thorsten; van Echten-Deckert, Gerhild; Schilling, Karl; Eiberger, Britta (unveröffentlicht): Cerebellar development and miRNAs: How granule cells pull the strings/take the driver's seat. Proper cerebellar development depends on granule cell specific miRNAs. Dicer deficiency in granule cells causes cerebellar abnormalities. Institute of Anatomy and Cell Biology, University of Bonn, Nussallee 10, D-53115 Bonn.
- Trüper, H. G.; Galinski, E. A. (1986): Concentrated brines as habitats for microorganisms. In: *Experientia* 42 (11-12), S. 1182–1187. DOI: 10.1007/BF01946388.
- Ullah, A. H. (1988): Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. In: *Preparative biochemistry* 18 (4), S. 443–458. DOI: 10.1080/00327488808062543.
- Unfried, Klaus; Kramer, Ursula; Sydlik, Ulrich; Autengruber, Andrea; Bilstein, Andreas; Stolz, Sabine et al. (2016): Reduction of neutrophilic lung inflammation by inhalation of the compatible solute ectoine: a randomized trial with elderly individuals. In: *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 11, S. 2573–2583. DOI: 10.2147/COPD.S115061.
- van Echten-Deckert, G. (2000): Sphingolipid extraction and analysis by thin-layer chromatography. In: *Methods in enzymology* 312, S. 64–79.
- Ventosa, A.; Nieto, J. J.; Oren, A. (1998): Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 62 (2), S. 504–544.
- Vreeland, R. H.; Anderson, R.; Murray, R. G. E. (1984): Cell Wall and Phospholipid Composition and Their Contribution to the Salt Tolerance of *Halomonas elongata*. In: *Journal of Bacteriology* 160, S. 879–883.
- Wallach, Donald Francis Hoelzl; Knüfermann, Hubertus G. (1973): Plasmamembranen. Chemie, Biologie und Pathologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Heidelberger Taschenbücher).

Wang, A.; Bolen, D. W. (1997): A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. In: *Biochemistry* 36 (30), S. 9101–9108. DOI: 10.1021/bi970247h.

Wechsler-Reya, R. J.; Scott, M. P. (1999): Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. In: *Neuron* 22 (1), S. 103–114.

Wedeking, A.; Hagen-Euteneuer, N.; Gurgui, M.; Broere, R.; Lentzen, G.; Tolba, R. H. et al. (2014): A lipid anchor improves the protective effect of ectoine in inflammation. In: *Current medicinal chemistry* 21 (22), S. 2565–2572.

Wedeking, Annika (2005): Synthese von Ectoinderivaten und Untersuchungen zu deren Wirkung auf Säugerzellen. Diplomarbeit. Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn. Mikrobiologie.

Wedeking, Annika (2012): Antiinflammatorische Wirkung von Ectoin und Lauryl-Ectoin. Dissertation. Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn. LIMES Institut.

Wei, Lai; Wedeking, Annika; Buttner, Reinhard; Kalff, Jorg C.; Tolba, René H.; van Echten-Deckert, Gerhild (2009): A natural tetrahydropyrimidine protects small bowel from cold ischemia and subsequent warm in vitro reperfusion injury. In: *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 76 (4), S. 212–220. DOI: 10.1159/000218338.

Welsch, Ulrich (2005): Sobotta Lehrbuch Histologie. 2. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.

Werkhauser, Nina; Bilstein, Andreas; Sonnemann, Uwe (2014): Treatment of allergic rhinitis with ectoine containing nasal spray and eye drops in comparison with azelastine containing nasal spray and eye drops or with cromoglycic Acid containing nasal spray. In: *Journal of allergy* 2014, S. 176597. DOI: 10.1155/2014/176597.

Wood, J. M. (1999): Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63 (1), S. 230–262.

Yancey, Paul H. (2005): Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. In: *The Journal of experimental biology* 208 (Pt 15), S. 2819–2830. DOI: 10.1242/jeb.01730.

Yeom, Kyu-Hyeon; Lee, Yoontae; Han, Jinju; Suh, Mi Ra; Kim, V. Narry (2006): Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. In: *Nucleic acids research* 34 (16), S. 4622–4629. DOI: 10.1093/nar/gkl458.

Zhao, Yong; Samal, Eva; Srivastava, Deepak (2005): Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. In: *Nature* 436 (7048), S. 214–220. DOI: 10.1038/nature03817.

6 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

18S	ribosomale RNA 18S
28S	ribosomale RNA 28S
Abb.	Abbildung
Äq.	Äquivalente
AS	Arachidonsäure
BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
cDNA	complementary DNA
Cer	Ceramide
cm	Zentimeter
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ct-Wert	Cycle Threshold
d	Dublett
DAG	1,2-Diacylglycerol
dd	Dublett von Dubletts
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
d.h.	das heißt
DMAP	<i>p</i> -Dimethylaminopyridin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure, <i>engl. deoxyribonucleic acid</i>
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP Mix	Desoxynucleotid Mix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronstoß, <i>engl. electron impac</i>
ESI	Elektronenspray-Ionisation

et al.	und andere
etc.	et cetera
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GalCer	Galaktosylceramide
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCMS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
GlcCer	Glucosylceramide
h	Stunde
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Quantum Coherence
Hz	Hertz
IL	Interleukin
K	Kontrolle
l	Liter
LacCer	Lactosylceramide
LE	Laurylectoin
LOH	Laurylhydroxyectoin
LPS	Lipopolysaccarid
m	Multipllett / mittel
M	Molare Masse/Molarität
mbar	Millibar
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NMR	Magnetische Kernresonanzspektroskopie,
NTC	no template control
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>engl. polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PIP	L- α -Phosphatidylinositol-4-monophosphat
PIP ₂	L- α -Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
ppm	parts per million
q	Quartett
qRT-PCR	quantitative real time PCR
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonucleinsäure, <i>engl. ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RP	reverse Phase
RT-PCR	real time PCR
rpm	rounds per minute
s	Singulett oder Sekunde
sept	Septett
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA Puffer
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TFA	Trifluoressigsäure, <i>engl. trifluoroacetic acid</i>
THF	Tetrahydrofuran
TNF	Tumor Nekrose Factor
UV	ultraviolet
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
V	Volt

Geräte

Geräte	Hersteller/Vertreiber
Alpha DigiDoc	Alpha Innotech
Analysenwaage	BP 210 D, Sartorius
Autoklav	H+P Labortechnik
Brutschrank	Heraeus
Exsikkator	Duran
Fluoreszenz Foto Analyser	Labor AK Thiele
Gelapparatur	BioRad
Magnetrührer	IKA
Mikrotiterplattenreader	FLUOstar Omega, BMG
Mikrowelle	Privileg
Mixer Mill	MM300, Retsch
PCR-Maschine	Biozym
Pipetten	Eppendorf
rt-PCR Maschine	BioRad
Reinstwasseranlage Easypure UV/UF	Barnsted/Werner
Reinstwasseranlage MembraPure	Merck Millipore
Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Labortechnik
Spannungsquelle	PowerPac 3000, BioRad
Spülmaschine	Mielabor G7783, Miele
Sterilbank	Heraeus
Stickstoffgasanlage	Pierce Reacti-Therm III
Tiefkühlschrank (4°C und -20°C)	Robert Bosch GmbH
Tiefkühlschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf
Trockenschrank	Heraeus
Ultraschallbad	Branson Sonic Power Company
Vortexer/Minishaker	IKA
Waage	Sartorius
Zentrifuge	Megafuge 2.0R, Heraeus

Kommerziell erworbene Chemikalien und Lösungen

Chemikalien	Hersteller/Vertreiber
Acetylchlorid	Fluka
Agarose	AppliChem
Ammoniumacetat	Merck
Calciumchlorid	Merck
1-Chlordodecan	Merck
Chloroform	VWR
<i>d</i> ₃ -Chloroform	euriso-top
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
Cyclohexan	Hoesch
DCC	Fluka
DMAP	Fluka
DMEM	Sigma Aldrich
DMF	VWR
1-Dodecanol	Alfa Aesar
Ectoin	Merck
EDTA	Merck
Essigsäure	Riedel de Haen
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylacetat	Hoesch
Fetales Kälberserum	PAN Biotech
Hydroxyectoin	AppliChem
1-Ioddodecan	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumpermanganat	Alfa Aesar
Kieselgel 60 (0.063 – 0.200 mm)	AppliChem
Kupfersulfat	AppliChem
MEM	PAN Biotech
Mercaptoethanol	VWR
Methanol	Sigma Aldrich
<i>d</i> ₄ -Methanol	Deutero
Natriumchlorid	Merck

Natriumhydroxid	Merck
Natriumsulfat	Roth
Oxalylchlorid	Alfa Aesar
Penicillin/Streptomycin	Biomol GmbH
Phosphorsäure	VWR
RP-18 (40-63 µm)	Merck
RNA Ladepuffer	Sigma Aldrich
Salzsäure, 37%	Merck
TAE Puffer	AppliChem
Tridecansäure	Acros Organics
<i>d</i> ₂ -Wasser	Deutero

Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller/Vertreiber
Baumwolle	Rewe
DC-Platten	Merck
Filterpapier	Schleicher&Schull; Whatman
Glaswolle	Hecht
Latexhandschuhe	VWR
Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One
Parafilm	Bemis
Petrischalen	Falcon; Sarstedt
Pipettenspitzen	Eppendorf; Greiner Bio-One; VWR
Reaktionsgefäße (1,5/2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml)	Falcon
Reaktionsgefäße (50 ml)	Sarstedt; VWR
Schraubkappengläser (SKG)	VWR
Spitzenvorsatz	Merck Millipore; VWR
Zellschaber	Costar; Sarstedt

Kits

Kit	Hersteller/Vertreiber
InvisorbSpin RNA Mini Kit	Invitek
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel

Pure Link RNA Mini Kit

Quick-RNA MiniPrep

RNeasy Kit

Superscript III

Invitrogen

Zymo Research

Qiagen

Invitrogen