

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger

Der immunsuppressive Effekt von hydrophoben  
Gallensäuren in humanen Makrophagen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Laura Johanna Elisabeth Kleinebrecht

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Graf  
Korreferent: Prof. Dr. Germing

Für Lisa, Susanne und Heiner

Die in dieser Dissertationsschrift dargestellten Daten gelangten teilweise in folgenden Dokumenten zur Darstellung:

1. Posterpräsentation:

Katrin Haselow, Laura Kleinebrecht, Verena Keitel, Johannes G. Bode, Dirk Graf, Dieter Häussinger (2011): *Inhibition of Toll-like receptor signaling in human macrophages by bile acids*. EASL, 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Berlin

2. Publikation:

Katrin Haselow, Johannes G. Bode, Marianne Wammers, Christian Ehltling, Verena Keitel, Laura Kleinebrecht, Anna-Kathrin Schupp, Dieter Häussinger, Dirk Graf (2013): *Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages*. Journal of Leukocyte Biology; 94(6):1253-64

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit hydrophobe Gallensäuren eine suppressive Wirkung auf die humane Immunfunktion ausüben. Aus klinischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Erhöhung von Gallensäuren im Blut i.R. einer Cholestase zu verschiedenen immunsuppressiven Effekten führen kann. Als Vertreterin der hydrophoben Gallensäuren wurde Tauroolithocholsäure gewählt. Auf der Basis der Beobachtungen an Kupferzellen wurden die Versuche mit humanen Makrophagen durchgeführt, die mittels Zellkultur aus Monozyten gewonnen wurden. Mittels Nachweisverfahren auf Protein- und RNA/DNA-Ebene (*Western-Blot*, *Immuno-Assay*, *Real-Time-PCR*) wurde untersucht, ob Tauroolithocholsäure in humanen Makrophagen immunsuppressive Effekte zeigt und auf welchen Wirkmechanismus dies zurückzuführen ist.

Zusammenfassend konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass hydrophobe Gallensäuren (hier Tauroolithocholsäure) immunsuppressiv auf humane Makrophagen wirken, indem sie die LPS-vermittelte TNF- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -mRNA-Expression über einen cAMP/PKA-abhängigen Signalweg hemmen. Möglicherweise ursächlich hierfür sein könnte auch die Inhibition der LPS-vermittelten nukleären Translokation von NF- $\kappa$ B durch Gallensäuren.

Der hier zugrunde liegende Mechanismus ist nicht geklärt, jedoch konnte aus vorliegenden Daten anderer Gruppen postuliert werden, dass über eine PKA-Aktivierung die c-Fos-Expression gesteigert wird, sodass eine Inhibition der p65-abhängigen Zytokinexpression stattfindet. Andere potentielle Mechanismen sind die Konkurrenz von CREB mit CBP, wodurch eine verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung bewirkt wird oder eine Inhibition der LPS-induzierten nukleären Translokation von NF- $\kappa$ B durch cAMP bzw. Gallensäuren.

Neuere Arbeiten zeigen außerdem, dass der immunsuppressive Effekt der Gallensäuren nicht nur in einer Inhibition der LPS-induzierten Zytokinexpression resultiert, sondern in einer Umprogrammierung der Zellen zu regulatorischen Makrophagen zu suchen ist. Die Klärung des genauen molekularen Mechanismus ist Gegenstand aktueller Arbeiten im Forschungslabor.

## Abkürzungen

3'ARE	3'AU-reiches-Element
AP-1	<i>activator protein 1</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
(8Br)-cAMP	8-Bromo Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Bindeprotein
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CpG-DNA	Cytosin-phosphatidyl-Guanin DNS
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	CRE-bindendes Protein
CXCL	Chemokin- (C-X-C Motiv) Ligand
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
DISC	<i>death-inducing signal complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	Doppelstrang-RNS
eIF-2	<i>eukaryotic-initiation factor 2</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Elf-1	<i>E74-like factor 1</i>
Elk-1	<i>E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1</i>
Epac	<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>
Erk	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosine-5'-Triphosphat
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen-stimulierender Faktor
GP-BAR1	<i>bile acid-activated GPCR 1(TGR5)</i>
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
IFN	Interferon
IgM	Immunglobulin M
IκB	Inhibitor von κB
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin

IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimulierte Gene
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
M-CSF	Makrophagen-stimulierender Faktor
MD-2	<i>Myeloid differentiation factor-2</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MPS	Mononukleäres Phagozytose System
Mx-Protein (MxA)	<i>myxovirus resistance-protein</i>
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NFTAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
p38/56	Protein 38/56
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PKA	Proteinkinase A
PKR	Proteinkinase R
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SOCS	<i>suppressors of cytokine signalling</i>
SSI	<i>STAT-induced STAT-Inhibitors (syn. SOCS)</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNS
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>

TAK1	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TBK1	TANK-bindende Kinase 1
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TGR5	<i>G protein-coupled bile acid receptor 5</i>
T <sub>H</sub> -Zellen 1 & 2	T-Helfer-Zellen 1 & 2
TIR	Toll-/ Interleukin 1 Rezeptor
TLC	Taurolithocholsäure
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tpl2	<i>tumor progression locus 2</i>
TRAF-6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seiten</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1-18</b>
1.1 Effektormechanismen der angeborenen Immunität	
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2 Die Familie der Toll-like Rezeptoren	2-3
1.1.3 Toll-like Rezeptor 4 und seine Signalkaskade	3-6
1.1.4 Die Rolle der Makrophagen bei der Immunabwehr	6-10
1.1.5 Zytokinexpression der Makrophagen	10-13
1.2 Physiologie und Pathophysiologie von Gallensäuren	
1.2.1 Gallensäuremetabolismus und Cholestase	13-16
1.2.2 Gallensäuren als zelluläre Signalmoleküle	16-17
1.2.3 Immunmodulatorische Effekte von Gallensäuren	17-18
<b>2. Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>3. Materialien</b>	<b>20-30</b>
3.1 Geräte	20-22
3.2 Reagenzien und Inhibitoren für die Zellkultur	23
3.3 Antikörper	23-24
3.4 Lösungen und Puffer	24-26
3.5 Kits	26
3.6. Oligonukleotide	27
3.7 Medien und Zusätze für die Zellkultur	27-28
3.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	28-30
<b>4. Methoden</b>	<b>31-38</b>
4.1 Isolation und Zellkultur von humanen Makrophagen	
4.1.1 Aufreinigung der Buffy-Coats	31-32
4.1.2 Zellseparation mittels MACS	32-33
4.1.3 Ausplattierung und Zellkultur	33

4.2	Proteinbestimmung	33-34
4.3	Elektrophorese und Westernblot	34-36
4.4	Proteinnachweisverfahren	36
4.5	Reverse Transkription und Real-Time PCR	36-37
4.6	cAMP-Assay	37-38
4.7	Statistik	38
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39-46</b>
5.1	Inhibition der Expression von MxA und der PKR durch Taurolithocholsäure	39-40
5.2	Inhibition der LPS-induzierten Zytokinexpression durch Taurolithocholsäure in humanen Makrophagen	40-41
5.3	Induktion von cAMP in humanen Makrophagen durch Gallensäuren	41-42
5.4	Inhibition von ISG-Produkten durch Forskolin und 8Br-cAMP	42-43
5.5	Inhibition der Zytokinexpression durch TLC ist Proteinkinase A-abhängig	43-44
5.6	Interaktion zwischen Taurolithocholsäure-vermittelter und TLR-4-abhängiger Signaltransduktion	44-45
5.7	Einfluss von MAP-Kinasen auf den suppressiven Effekt von TLC	45-46
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47-52</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>53-60</b>

## **Anhang**

# 1. Einleitung

## 1.1 Effektormechanismen der angeborenen Immunität

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Ein Organismus ist täglich mit vielen potenziellen Krankheitserregern konfrontiert, ohne dass diese zu einer Krankheit führen.

Das Abwehrsystem setzt sich dabei aus mehreren Komponenten mit jeweils zellulären und azellulären Effektormechanismen zusammen<sup>1</sup>.

Im Rahmen der angeborenen Immunantwort sorgen (neben verschiedenen Epithelien) zunächst Phagozyten (neutrophile Granulozyten und Gewebemakrophagen) für die Elimination der Erreger. Die Fähigkeit dieser Zellen, anhand von einfachen Oberflächenproteinen wie LPS körpereigene von körperfremden Strukturen zu differenzieren, ist die erste Voraussetzung für eine effektive Immunabwehr. Ein weiterer zellulärer Bestandteil der angeborenen Immunabwehr sind NK-Zellen, welche virusinfizierte Zellen erkennen und vernichten können. Zytokine bzw. Chemokine sind Proteine, die von Phagozyten freigesetzt werden und die Entzündungsreaktion fördern.<sup>1, 2</sup>

Die genannten Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind auch an der adaptiven Immunantwort beteiligt. Die eigentliche zelluläre Komponente der adaptiven Immunabwehr sind jedoch die Lymphozyten, deren wichtigste Untergruppen B-Zellen sowie CD4+- und CD8+-T-Zellen sind. Durch die Produktion hochspezifischer Antikörper können Pathogene nicht nur sehr effektiv beseitigt werden, die erworbene Immunabwehr bildet zudem Gedächtniszellen aus, so dass bei Zweitkontakt die Immunreaktion schneller und potenter ausfällt.<sup>3</sup>

Beide Systeme greifen ineinander, die erworbene Immunität wird durch die angeborenen Mechanismen nicht nur gebahnt sondern auch moduliert.<sup>1, 3</sup>

Das angeborene Immunsystem dient also zunächst einer raschen Beseitigung pathogener Organismen und verhindert so vor allem die Etablierung eines Infektionsherdes. Allerdings ist sein Repertoire begrenzt und es fehlt im Vergleich zur adaptiven Immunität der Lerneffekt, sodass die Antwort auf den gleichen Erreger zu einem späteren Zeitpunkt nicht wirkungsvoller ausfällt als bei Erstkontakt.<sup>1-4</sup>

### 1.1.2 Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die initiale Abwehrreaktion von Krankheitserregern setzt eine schnelle Identifizierung durch das angeborene Immunsystem voraus. Daher verfügen viele Zellarten über eine Reihe sogenannter Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors, PRR*).<sup>1</sup> Diese Rezeptoren erkennen pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP) – einfache Moleküle, die Bestandteile von Mikroorganismen aber nicht von körpereigenen Zellen sind.<sup>5</sup> Beispiele für diesen Rezeptortyp sind der Mannoserezeptor oder die RIG-I-ähnlichen Proteine, deren Ligand doppelsträngige RNS (dsRNS) ist.<sup>5</sup>

Eine wichtige Gruppe der *pattern recognition receptors* ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR).<sup>6</sup>

Toll-like Rezeptoren stellen eine evolutionär sehr alte und gut konservierte Gruppe von signalgebenden, transmembranösen Rezeptoren dar. Sie sind bei der Abwehr von Infektionen sowohl bei Vertebraten als auch bei Pflanzen und Insekten von großer Bedeutung. Der Rezeptortyp der TLR wurde ursprünglich bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo man ihn als Toll bezeichnete. Die bei Säugern gefundenen Rezeptoren nannte man dementsprechend Toll-like Rezeptoren.<sup>6, 7</sup>

Bisher wurden beim Menschen zehn verschiedene Toll-like Rezeptoren identifiziert, auch ihre Genloci sind inzwischen bekannt. Aufgrund der Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen kann man die TLR in fünf verschiedene Subfamilien einteilen, wobei TLR-3 und TLR-4 alleine jeweils eigene Subfamilien darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten Gewebe zumindest einen Toll-like Rezeptor exprimieren, dabei verfügen Makrophagen über alle bekannten TLR. Die Regulation der Expression kann über verschiedene Stimuli erfolgen wie mikrobielle Substanzen und Zytokine. So bewirkt z.B. IFN- $\gamma$  eine Erhöhung der Expression von TLR-4 in der Plasmamembran von Monozyten und Makrophagen.<sup>6</sup>

Nachfolgend findet sich eine Auflistung der verschiedenen Toll-like Rezeptoren und eine Auswahl ihrer Liganden.

Toll-like Rezeptor	Ligand
TLR-1:TLR-2-Heterodimer	Proteoglykan Lipoproteine
TLR-2:TLR-6-Heterodimer	Glykosylphosphatidylinositol ( <i>T. cruzi</i> ) Zymosan ( <i>Hefen</i> )
TLR-3	doppelsträngige RNS
TLR-4 (mit MD-2 und CD14)	Lipopolysaccharid ( <i>gramnegative B.</i> ) Lipoteichonsäure ( <i>grampositive B.</i> )
TLR-5	Flagellin
TLR-7	einzelsträngige RNS
TLR-8	Oligonukleotide mit hohem Gehalt an Guanin
TLR-9	nichtmethylierte CpG-DNA
TLR-10	nicht bekannt

**Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden<sup>4</sup>**

Die meisten Toll-like Rezeptoren sind in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert, die Toll-like Rezeptoren 3, 7 und 9 befinden sich hingegen in der Membran von Endosomen.<sup>4</sup> Die Rezeptoren sind wahrscheinlich als Dimere aktiv, wobei einige Heterodimere bilden und andere - wie z.B. TLR-4 - nur als Homodimere vorkommen.<sup>8</sup>

Aufgrund der relativ geringen Anzahl verschiedener Rezeptoren ist das System der Toll-like Rezeptoren limitiert, aber die meisten Mikroorganismen können auf diesem Weg erkannt werden.<sup>6</sup>

### 1.1.3 Toll-like Rezeptor 4 und seine Signalkaskade

Zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen ist der Toll-like Rezeptor 4 von großer Bedeutung.

Er findet sich auf Makrophagen (sowie auf dendritischen und neutrophilen Zellen) und ist mit zwei weiteren Proteinen - MD-2 und CD14 – assoziiert.<sup>9, 10</sup> Der

bekannteste Ligand dieses Komplexes ist bakterielles Lipopolysaccharid (LPS).<sup>9, 10</sup> Dieses ist in der Zellwand von gramnegativen Bakterien zu finden und besteht aus einem membranständigen Lipid, das über eine Kernregion mit einem Polysaccharid unterschiedlicher Länge verbunden ist.<sup>11</sup>

Die Signalkaskade des TLR-4 ist nachfolgend schematisch dargestellt.

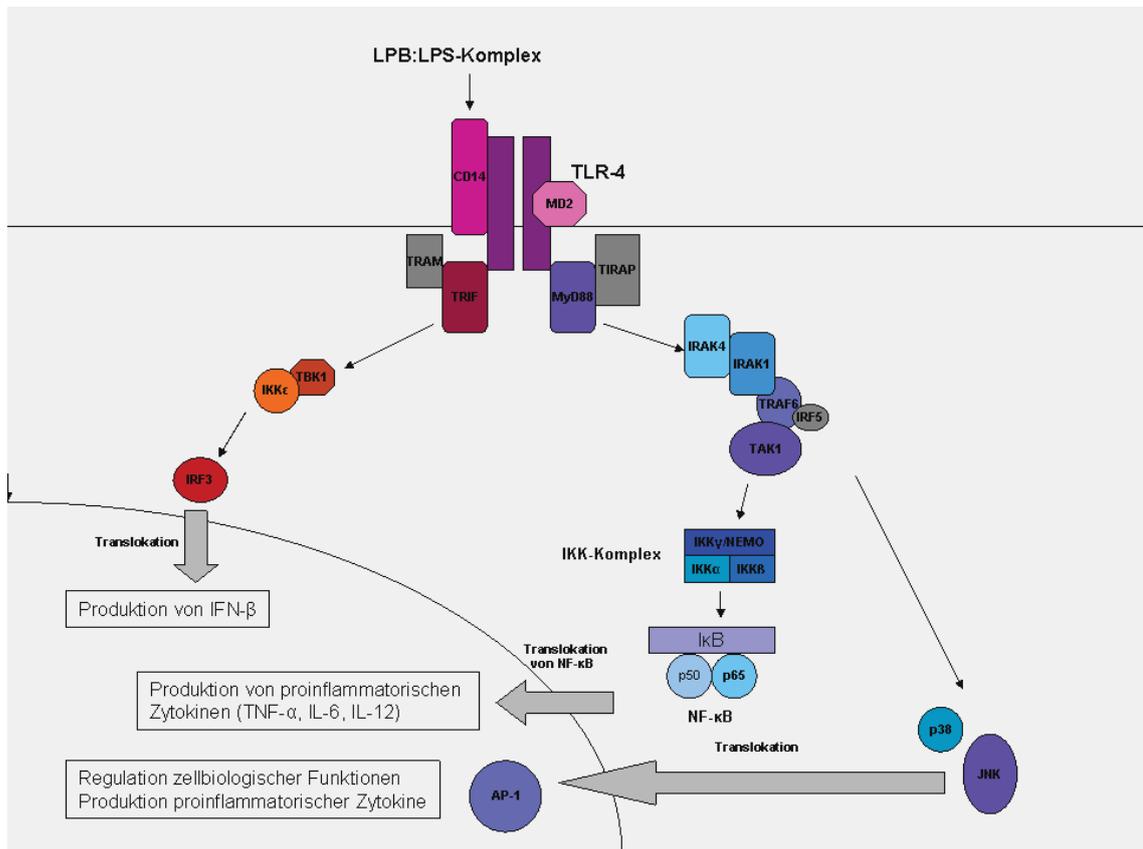


Abbildung 1: Schematische Darstellung der TLR-4-Signalkaskade, adaptiert nach<sup>12,13</sup>

In Körperflüssigkeiten wie Blut wird LPS zuerst an das LPS-bindende Protein (*LBP*), ein Akut-Phase-Protein, gebunden. LPS bindet an das CD14-Protein, welches über einen Glykosylphosphatidylinositolanker in die Zellmembran integriert ist. Der CD14:LPS-Komplex interagiert in der Folge mit TLR-4, welcher von MD-2 im Zytosol der Zelle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert worden ist. Die daraufhin ausgelöste Signalkaskade wird auch allgemein als Toll-Signalweg bezeichnet.<sup>12, 13</sup>

Die Familie der Toll-like Rezeptoren ist charakterisiert durch sogenannte leucinreiche Regionen (LRR) an der extrazellulären Seite, sowie durch eine TIR (Toll-/ Interleukin 1 Rezeptor)-Domäne im Bereich des intrazellulären Anteils

des Rezeptors. Die Bindung eines Liganden (wie LPS) an die LRR bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, sodass an die TIR-Domäne ein Adaptorprotein binden kann, das ebenfalls über eine solche TIR-Domäne verfügt. Das am besten charakterisierte Adaptorprotein ist der myeloide Differenzierungsfaktor 88 (MyD88). In der Signalkaskade von TLR-4 lässt sich ein MyD88-abhängiger von einem MyD88-unabhängigen Signalweg unterscheiden (Abb. 1).<sup>13</sup>

Beim MyD88-abhängigen Weg wird MyD88 nach Aktivierung an den zytoplasmatischen Teil des TLR-4 transloziert. In der Folge aktiviert die Todesdomäne von MyD88 nun sequentiell die IL-1-Rezeptorassoziierte-Kinasen (IRAK) 4 und 1, welche mit dem Adaptorprotein TRAF-6 assoziieren und in diesem Komplex die TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*) aktivieren. TAK1 phosphoryliert den IKK (I $\kappa$ B-Kinase)-Komplex, wodurch der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert wird. Im Zytosol wird NF- $\kappa$ B durch das inhibitorische Protein I $\kappa$ B im inaktivierten Zustand gehalten. Nach der Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch IKK wird es ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Dadurch wird NF- $\kappa$ B freigesetzt und transloziert in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen induziert. Dies hat die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF- $\alpha$  oder IL-6, zur Folge.<sup>12, 13</sup>

Außerdem kann TAK1 weitere MAP-Kinasen, wie die p38-MAPK und c-Jun N-terminale Kinasen (JNK), phosphorylieren. Diese können verschiedene weitere Transkriptionsfaktoren aktivieren. Hier sind insbesondere die Proteine der AP-1-Familie zu nennen - Heterodimere, die aus je einem Monomer von entweder c-Fos-, ATF- und Jun-Transkriptionsfaktoren bestehen. Nach Phosphorylierung von c-Jun durch die Jun-Kinase transloziert c-Jun in den Zellkern und dimerisiert dort mit c-Fos zu AP-1. Die Expression von c-Fos wird wiederum durch den Transkriptionsfaktor Elk-1 reguliert, dessen Aktivität u.a. durch die Erk (*extracellular-signal-regulated kinases*) vermittelt wird. Die Aktivierung der Erk ist ebenfalls Folge der Stimulation des TLR-4 (nicht in der Abbildung dargestellt).<sup>13, 14</sup>

Neben der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren haben diese Kinasen auf der posttranskriptionalen Ebene regulierende Effekte z.B. auf die TNF- $\alpha$ -Funktion (eingeschlossen der TNF- $\alpha$ -mRNA-Kerntransport, die mRNA-Stabilität und die Translation).<sup>15</sup> So konnte gezeigt werden, dass die Tpl2-abhängige Aktivierung der Erk-1 und Erk-2 die inhibitorische Domäne (3'ARE = 3'AU-rich-element) der TNF- $\alpha$ -mRNA phosphoryliert und so den Zytokinspiegel erhöht.<sup>15-17</sup>

Bei Weiterleitung des LPS-Signals über den MyD88-unabhängigen Signalweg transloziert TRIF mit seiner TIR-Domäne zum Rezeptor. TRIF stimuliert nun die Kinasen I $\kappa$ K $\epsilon$  und TBK1. Diese aktivieren den Interferon-regulierenden Faktor (IRF) 3, über den unter anderem die Expression von Interferon- $\beta$  kontrolliert wird. In der Folge induziert IFN- $\beta$  die Expression von Produkten IFN-induzierbarer Gene wie MxA und PKR.<sup>13, 14, 14, 18, 19</sup>

#### 1.1.4 Die Rolle der Makrophagen bei der Immunabwehr

Bereits im Jahr 1905 beschrieb Elie Metchnikoff Makrophagen (M $\Phi$ s) als phagozytierende Zellen, die in einer Reihe von Organismen für die Eliminierung von Pathogenen verantwortlich sind.<sup>20</sup>

Makrophagen leiten sich von myeloiden Vorläuferzellen ab, aus denen unter anderem die Zellen des Mononukleären Phagozytose Systems (MPS) hervorgehen. Makrophagen entwickeln sich aus im Blut zirkulierenden Monozyten, die sich im Gewebe zu ortsständigen Makrophagen differenzieren – ein Vorgang der kontinuierlich, aber v. a. bei Vorliegen einer Entzündung stattfindet.<sup>21</sup>

Man hat Makrophagen in Abhängigkeit von dem Gewebe, in dem sie vorkommen, spezielle Bezeichnungen gegeben, z.B. bezeichnet man Makrophagen in der Leber als Kupffer-Zellen. Besonders zahlreich ist ihr Vorkommen in der Submucosa des Verdauungstraktes, in der Lunge, in der Leber und im Bindegewebe sowie in allen Abschnitten der Milz.<sup>4, 22, 23</sup>

Ursprünglich wurden Makrophagen in zwei Subpopulationen eingeteilt: die klassisch und die alternativ aktivierten Makrophagen.<sup>24</sup>

Die klassisch aktivierten M1-Makrophagen werden traditionell als die Zielzellen von T<sub>H</sub>1-Zellen verstanden. Letztere sezernieren IFN- $\gamma$ , welches zusammen mit TNF- $\alpha$  die Ausbildung dieser *host-defence-type*-Makrophagen bewirkt. Auch z.B. NK-Zellen können durch das Freisetzen von IFN- $\gamma$  eine transienten Aktivie-

rung dieser Makrophagen bewirken. Ferner können Liganden wie LPS über den TLR-Rezeptorweg TNF- $\alpha$  und INF- $\beta$  (statt IFN- $\gamma$ ) induzieren, welche (autokrin) ohne die Anwesenheit von T-Zellen und NK-Zellen die Aktivierung von klassisch aktivierten Makrophagen bewirkt. Diese Zellpopulation dient der Infektabwehr durch vermehrte Produktion von Zytokinen und antimikrobiellen Molekülen sowie durch eine verbesserte Eliminierung phagozytierter Erreger.<sup>24, 25</sup>

Unter dem älteren Begriff der alternativ aktivierten Makrophagen (M2) werden mittlerweile zwei weitere Spezies von Makrophagen zusammengefasst. Unter dem Einfluss von IL-4, das vor allem aus basophilen Granulozyten stammt, bilden sich zum Einen sogenannte *wound healing macrophages*. Da IL-4 zum Zytokinprofil der T<sub>H</sub>2-Helfer-Zellen gehört, sind diese Makrophagen auch Effektorzellen der adaptiven Immunantwort. *Wound healing macrophages* sind in der Lage, extrazelluläre Matrix zu produzieren und dienen so unter Verlust vieler antimikrobieller Effektormechanismen der Gewebemöostase.<sup>24, 25</sup>

Die zweite Gruppe sogenannter alternativ aktivierter Makrophagen sind die *regulatory macrophages*. Diese Zellen können keine extrazelluläre Matrix synthetisieren und sind antigenpräsentierende Zellen, sie unterscheiden sich funktionell demnach deutlich von Wundheilungsmakrophagen. Auch ihre Aktivierung folgt einem anderen Weg und ist im Detail Gegenstand der aktuellen Forschung (s.u.). Jedoch scheinen (alle Arten von) regulatorischen Makrophagen zwei verschiedene Stimuli zur Aktivierung zu benötigen. Kontakt mit dem ersten Agens wie z.B. Immunkomplexen hat erst einen Effekt, wenn eine Kombination mit z.B. einem TLR-Liganden stattfindet. Daraufhin verändert sich das Zytokinprofil, es wird vermehrt IL-10 produziert. Gleichzeitig vermindert sich die Menge an IL-12, sodass das Verhältnis der beiden Zytokine als Charakteristikum dieser Makrophagenpopulation betrachtet werden darf.<sup>24, 25</sup>

Auf Grund ihrer Lokalisation sind Makrophagen eine der ersten Gruppen von Zellen, die mit eindringenden Pathogenen konfrontiert werden. Sie verfügen über eine Reihe von *pattern recognition receptors*, mit Hilfe derer sie Pathogene erkennen können. Es sei an dieser Stelle hinzugefügt, dass Makrophagen nicht nur körperfremde Moleküle erkennen, sondern dass sie auch zwischen kranken und gesunden Körperzellen unterscheiden.<sup>26</sup>

In diesem Zusammenhang wurde der Begriff der *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) geprägt und damit eine Gruppe von endogenen Gefahrensignalen definiert.<sup>27</sup> Als Beispiel seien hier Hyaluronfragmente genannt, die bei Gewebsschaden entstehen, und die via Toll-like Rezeptor 2 und 4 eine Entzündungsreaktion hervorrufen können.<sup>28</sup>

Die Phagozytose stellt die erste Möglichkeit zur Infektbekämpfung dar. Neben den neutrophilen Granulozyten und den dendritischen Zellen stellen Monozyten bzw. Makrophagen die dritte Population von phagozytierenden Zellen dar.<sup>29</sup> Die Bindung der Liganden an Rezeptoren wie den TLR-4 stimuliert die Phagozytose der Krankheitserreger, welche im nächsten Schritt in intrazellulären Vesikeln durch lysosomale Degradierung zerstört werden.<sup>30, 31</sup>

Makrophagen und neutrophile Zellen erzeugen ferner im Zuge des *respiratory burst* (so benannt, da der Sauerstoffbedarf zunimmt) mehrere toxische Sauerstoffderivate wie zum Beispiel Stickoxid, welche ebenfalls bakterizid wirken. Diese Abwehrmoleküle können auch sezerniert werden, sodass sie extrazellulär ihre antimikrobielle Wirkung entfalten.<sup>31-33</sup>

Neben der frühzeitigen Elimination von Krankheitserregern durch Phagozytose sind die Makrophagen weiterhin für die Organisation einer lokalen Entzündungsreaktion zuständig. Diese wichtige Funktion erfüllen die Makrophagen mit der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen im Zuge ihrer Wechselwirkung mit dem jeweiligen Krankheitserreger. Makrophagen setzen nach Erkennen eines Pathogens eine Reihe von Molekülen frei. Durch enzymatische Spaltung von Membranlipiden entstehen sehr rasch Lipidmediatoren – der plättchenaktivierende Faktor (*platelet activating factor, PAF*), Prostaglandine und Leukotriene. Danach setzen Makrophagen Zytokine (wie z.B. den Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und Chemokine (chemotaktisch wirksame Zytokine) frei.<sup>34, 35</sup>

Die Reaktion der Makrophagen auf die Krankheitserreger löst am Infektionsort eine Entzündungsreaktion aus, die wichtige physiologische Konsequenzen hat. Zum einen wird durch Mikrothrombosierung eine lokale Blutstase herbeigeführt, die eine systemische Keimverschleppung verhindern soll.<sup>36</sup> Außerdem fördert die lokale Inflammation den Transport von weiteren Abwehrzellen und Effektormolekülen zum Infektionsort.<sup>4</sup> Die Leukozyten, die das Gefäßsystem verlassen und an den Entzündungsherd wandern, sind zunächst neutrophile Granulozyten.<sup>26</sup> Dann folgen Monozyten, die sich unter Einfluss von M-CSF zu

weiteren Makrophagen entwickeln, sich aber auch in Gegenwart von GM-CSF und Interleukin 4 (IL-4) zu myeloiden, dendritischen Zellen differenzieren können.<sup>4, 26, 37</sup>

Schließlich wirken Makrophagen auch antiinflammatorisch: So phagozytieren sie neutrophile Granulozyten und sezernieren antiinflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10, was einen exzessiven Gewebeschaden verhindert und die Wundheilung fördert.<sup>22, 26, 38</sup>

Die Phagozytose und die Organisation der lokalen Entzündungsreaktion machen Makrophagen zu unverzichtbaren Effektorzellen des Immunsystems.

Makrophagen können wie (fast) alle kernhaltigen Körperzellen Proteine, die zum Beispiel im Zuge einer Virusinfektion in ihrem Zytosol synthetisiert werden, über MHC-I-Moleküle an ihrer Zelloberfläche präsentieren, was das Abtöten der infizierten Zelle durch CD8+-T-Effektorzellen zur Folge hat.<sup>39</sup> Neben den dendritischen Zellen und den B-Lymphozyten gehören Makrophagen aber zusätzlich zu der Gruppe der professionell antigenpräsentierenden Zellen der Immunabwehr, d.h. sie können phagozytiertes Material, das sie selbst nicht eliminieren können, über MHC-II-Moleküle CD4+-T-Zellen präsentieren.<sup>39</sup> Dabei verfügen Makrophagen im Ruhezustand nur über wenige MHC-II-Moleküle und gar keine kostimulierenden B7-Moleküle.<sup>1</sup> Letztere sind jedoch essentiell für eine erfolgreiche Immunantwort, da ein Fremdantigen alleine keine Immunreaktion auslöst.<sup>1</sup> Erst nach Identifizierung von mikrobiellen Strukturen durch die zahlreichen *pattern recognition receptors* wie z.B. TLR-4 wird die Synthese von ausreichend MHC-II-Molekülen und B7-Molekülen induziert.<sup>7, 40</sup>

Die Antigenpräsentation von intrazellulär degradiertem Material über MHC-II-Moleküle durch Makrophagen ist allerdings nicht Teil der afferenten bzw. der Induktionsphase der T-Zell-Antwort, an deren Ende antigenspezifische T- und B-Lymphozyten stehen. Vielmehr treffen im Zuge der efferenten Phase antigenspezifische CD4+-T<sub>H</sub>1-Zellen auf ihre Zielzellen - die Makrophagen. Die Makrophagen präsentieren an ihrer Oberfläche Peptide von intrazellulären Keimen, die sie alleine nicht vernichten können. Daraufhin schütten Lymphozyten gezielt IFN- $\gamma$  aus und induzieren den CD40-Liganden auf der Oberfläche der Makrophagen. Diese Interaktion der Zellen hat die Aktivierung der Makrophagen zur Folge.<sup>41</sup>

Makrophagen sind demnach ein zentraler Bestandteil des Immunsystems, da sie nicht nur die erste Verteidigungslinie gegen potenzielle Krankheitserreger bilden, sondern auch die adaptive Immunreaktion unterstützen und zudem eine *restitutio ad integrum* im Anschluss an eine Abwehrreaktion fördern.

#### 1.1.5 Zytokinexpression der Makrophagen

Zytokine sind kleine Proteine, die von Zellen der Immunabwehr produziert und sezerniert werden, und die nach Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren verschiedene Reaktionen auslösen können. Sie können autokrin wirken - also auf die produzierende Zelle selbst oder parakrin auf Nachbarzellen. Man unterscheidet strukturell zwei große Familien von Zytokinen: Zur Hämatoopoetin-Familie gehören sowohl Wachstumshormone als auch Interleukine mit Funktionen der Immunabwehr. Die zweite Gruppe ist die TNF-Familie, deren Mitglieder Effektormechanismen der Immunabwehr darstellen und die auch membrangebunden vorkommen. Zu den Zytokinen, die Makrophagen sezernieren, gehören z.B. IL-6, TNF- $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  und IL-10.<sup>4</sup>

Die Erkennung eines spezifischen bakteriellen Moleküles über PRR führt zur Freisetzung eines für den Stimulus spezifischen Zytokinmusters, zum Beispiel die Expression von TNF- $\alpha$  nach Stimulation des TLR-4 durch LPS.<sup>37, 42</sup>

Protein	Zielzellen/ Wirkort	Wirkung
IL-1	Lymphozyten Leber	Stimulation der T-Lymphozyten Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen Fieber Endothelaktivierung
IL-6	Lymphozyten Leber	Stimulation der T-Lymphozyten/ B-Lymphozyten (Antikörperproduktion) Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen Fieber
CXCL-8 (IL-8)	Phagozyten	Chemotaxie/ Degranulation neutrophiler Granulozyten
IL-12	NK-Zellen	Weiterleitung der Immunantwort an T <sub>H</sub> 1-Zellen
TNF- $\alpha$	Gefäßendothel	Expression von Zelladhäsionsmolekülen (E-und P-Selektine); lokale Erhöhung der Gefäßper- meabilität lokale Blutgerinnung Mobilisierung von dendritischen Zellen

**Tabelle 2: Zyto- bzw. Chemokine von Makrophagen nach<sup>4</sup>**

TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen, da es lokal effektiv zur Eindämmung der Erreger am Infektionsort beiträgt. So unterbindet TNF- $\alpha$  z.B. durch Bildung kleiner Gefäßthromben die Ausbreitung der Pathogene vom Eintrittsort aus in den Blutkreislauf. Der Abfluss mit den in dendritischen Zellen eingeschlossenen Erregern erfolgt dann mit der Lymphe in die Lymphknoten, wo eine adaptive Immunreaktion initiiert werden kann. Die lokalen Effekte von TNF- $\alpha$  sind also klar von Vorteil, wenn große Mengen von TNF- $\alpha$  in den Blutkreislauf gelangen, kann dies jedoch verheerende Konsequenzen haben.<sup>4, 43, 44</sup>

Bei einer systemischen Infektion mit Krankheitserregern - v.a. mit gramnegativen Bakterien - wird TNF- $\alpha$  in großen Mengen von Makrophagen in Leber, Milz und aus anderen Körperregionen freigesetzt. Die systemische Wirkung des Zytokins besteht zum einen in einer allgemeinen Gefäßerweiterung, die zu ei-

nem starken Blutdruckabfall führen kann. Durch die Permeabilitätssteigerung kommt es zum Austritt von Flüssigkeit in das Gewebe und das Blutvolumen sinkt zusätzlich, sodass es zur Ausbildung eines septischen Schocks kommt. TNF- $\alpha$  führt außerdem zu Gerinnungsstörungen, die multiple Thrombosen der kleinen Gefäße und eine Verbrauchskoagulopathie mit anschließender Blutungsneigung (DIC) zur Folge hat. In diesem Zustand kommt es schnell zu einem Multiorganversagen. Da TNF- $\alpha$  ein im Verlauf der Evolution gut konserviertes Zytokin ist, kann geschlussfolgert werden, dass die Vorteile einer lokalen Eindämmung durch TNF- $\alpha$  gegenüber den lebensbedrohlichen Nachteilen einer systemischen Freisetzung überwiegen.<sup>43-45</sup>

Typ I-Interferone stellen eine weitere Gruppe von Effektormolekülen dar, die durch Makrophagen exprimiert werden.<sup>4</sup>

Interferone sind antiviral wirkende Moleküle, die mit der Virusvermehrung *in vitro* und *in vivo* interferieren. Man unterscheidet Typ I-Interferone (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) von dem Typ II-Interferon IFN- $\gamma$ , welches nicht als unmittelbare Reaktion auf eine Virusinfektion gebildet wird, sondern mit einer Latenz der Beseitigung intrazellulärer Pathogene dient. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  werden bei einer Infektion durch verschiedene Viren von vielen Zelltypen synthetisiert. Dies geschieht hauptsächlich als Reaktion auf das Vorliegen von doppelsträngiger RNS, welche durch den endosomal lokalisierten Toll-like Rezeptor 3 erkannt wird. Aber wie oben bereits erläutert, kann auch LPS über den TLR-4 die Expression von IFN- $\beta$  induzieren.<sup>8, 46</sup>

IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  binden nach ihrer Sekretion an den Interferonrezeptor - einen Zytokinrezeptor, der an eine Tyrosinkinase der Janus-Familie gekoppelt ist. In dieser Eigenschaft phosphorylieren die Kinasen Transkriptionsfaktoren (*signal transducers and activators of transcription*, STAT) direkt, wodurch eine Dissoziation vom Rezeptor erzielt wird und die STAT-Proteine als Homo - oder Heterodimere in den Zellkern transportiert werden. Dort initiieren sie die Transkription von Genen, die für antiviral wirksame Proteine kodieren.<sup>47</sup>

Eines dieser durch IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  induzierten Proteine ist die Proteinkinase R, welche den Initiationsfaktor eIF-2 der eukaryotischen Proteinbiosynthese phosphoryliert, wodurch die Translation gehemmt und somit die Virusreplikation behindert wird.<sup>47</sup> Ein weiteres Interferon-induzierbares Protein ist das MxA-

Protein - eine Large-GTPase, welche das *Trafficking* des viralen Nukleokapsids hemmt.<sup>48, 49</sup>

Auch aktivieren Typ I-Interferone und weitere von Makrophagen produzierte Zytokine (v.a. IL-12) die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die daraufhin virusinfizierte Zellen abtöten. Ferner induzieren sie bei allen kernhaltigen Körperzellen eine vermehrte Expression von MHC-I-Molekülen, wodurch eine effektive Präsentation von Virusantigenen und eine Abtötung der betroffenen Zellen durch CD8+T-Zellen erreicht werden. Die Interferone bewirken zudem die Expression von costimulierenden Molekülen auf Makrophagen und dendritischen Zellen, sodass eine Interaktion der beiden Zellpopulationen untereinander ermöglicht wird.<sup>50-53</sup>

Einige Viren, wie z.B. das Hepatitis-C-Virus, können allerdings die antivirale Wirkung der Interferone auf verschiedenen Ebenen antagonisieren und erreichen somit eine hohe Persistenz.<sup>54</sup>

## 1.2 Physiologie und Pathophysiologie von Gallensäuren

### 1.2.1 Gallensäuremetabolismus und Cholestase

Die Galle besteht zu über 80% aus Wasser, die festen Bestandteile sind hauptsächlich Gallensäuren (67%), daneben u.a. Phosphatidylcholin (22%), Cholesterin (4%) und Bilirubin (0,3%).<sup>55</sup>

Gallensäuren bestehen aus einem Steroidkern mit einer bis drei Hydroxylgruppen und einer aliphatischen Seitenkette unterschiedlicher Länge. In den Hepatozyten können die Gallensäuren über zwei unterschiedliche Synthesewege aus Cholesterin synthetisiert werden. Der „klassische“ Syntheseweg steht physiologisch im Vordergrund, die Endprodukte der Biosynthese sind die primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure. Bei Patienten mit Lebererkrankungen kann auch der „alternative“ („saure“) Syntheseweg bedeutend werden, bei dem das vorherrschende Endprodukt die Chenodeoxycholsäure ist.<sup>55</sup>

Wenn die primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure ins Kolon gelangen, werden sie durch bakteriell vermittelte Prozesse zu den sekundären Metaboliten Deoxycholsäure, Lithocholsäure oder alternativ 7-Ketolithocholsäure metabolisiert. Aus Letzterer kann in der Leber und im Darm die tertiäre Gallensäure Ursodeoxycholsäure synthetisiert werden.<sup>55</sup>

Damit die Gallensäuren vor ihrer Sekretion in die Gallenwege polarer und damit hydrophiler werden, werden sie mehrheitlich im Verhältnis 3:1 mit Glycin oder Taurin konjugiert (auch sulfatiert, glukuronidiert, glukosyliert oder mit N-Acetyl-Glucosamin verknüpft). Da diese Moleküle bei physiologischem pH-Wert in ihrer anionischen Form vorliegen, werden sie Gallensalze genannt.<sup>55</sup>

Die Gallensäuren werden nach ihrer Sekretion zu über 90% im terminalen Ileum mit Hilfe eines aktiven Transportsystems resorbiert. Sie werden dann in das Portalvenenblut abgegeben und überwiegend an Albumin gebunden zurück zur Leber transportiert, über Transportsysteme in die Hepatozyten aufgenommen und dann wieder in die Gallenkanalikuli sezerniert, sodass der enterohepatische Kreislauf erneut beginnt.<sup>55</sup>

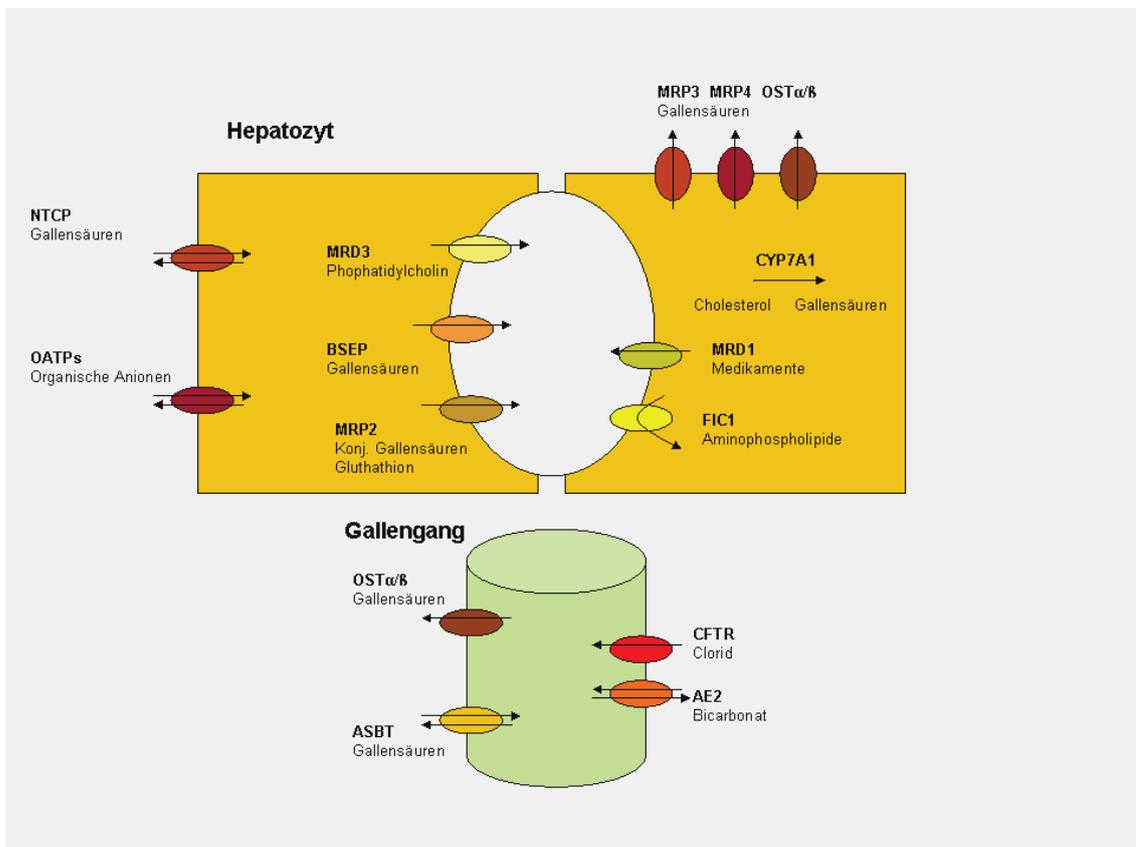


Abbildung 2: Darstellung hepatoobiliärer Transportsysteme nach<sup>56</sup>

Etwa 10% der Gallensäuren gelangen ins Kolon, wo die dort entstandenen Metabolite teilweise aufgenommen werden. Der Rest wird über die Faeces ausgeschieden, was nebenbei die einzige Möglichkeit zur Ausscheidung von Cholesterin ist. Der tägliche Verlust an Gallensäuren mit dem Stuhl von 0,3 - 0,6 g wird durch die Gallensäuresynthese in der Leber ausgeglichen, sodass der Gallensäure-Pool konstant bleibt. Die Galle wird interprandial in der Gallenblase gespeichert und konzentriert, nach Nahrungsaufnahme erfolgt die Abgabe in das Duodenum.<sup>55, 57</sup>

Ein Ungleichgewicht des Gallensäuremetabolismus findet sich zum Beispiel im Zustand der Cholestase, auf deren Pathologie kurz eingegangen wird.

Unter dem Begriff Cholestase versteht man die verminderte Sekretion von Gallebestandteilen in den Darm, entweder durch verminderte Ausscheidung aus dem Hepatozyten oder durch den Aufstau der Galle durch ein Abflusshindernis in den Gallenwegen. Dabei kann die Abflussbehinderung auf dem gesamten Weg von der Galleproduktion in den Leberzellen bis zur Einmündung des Ductus choledochus in das Duodenum lokalisiert sein. Man kann dabei eine intrahepatische Cholestase definieren, was z.B. die hepatozelluläre Schädigung durch Virushepatitiden oder auch Veränderungen der intrahepatischen Gallengänge durch z.B. sklerosierende Cholangitiden umfasst. Davon zu unterscheiden ist die extrahepatische Form der Cholestase, zu der mechanische Hindernisse wie Gallensteine oder Tumoren des Gallengangs führen können. Die Auswirkungen auf das Gewebe ergeben sich aus der Retention der toxischen Anteile der Galle, wie Bilirubin und Gallensäuren, welche im Blut akkumulieren.<sup>58</sup>

Erhöhte Konzentrationen hydrophober Gallensäuren wirken über eine CD95L-unabhängige Aktivierung des Fas-Rezeptors (syn. CD95) in Hepatozyten apoptotisch, indem die Gallensäuren den EGF-Rezeptor phosphorylieren, was die Aktivierung von CD95 und in der Folge die Induktion des *death-inducing signal complex* (DISC) bewirkt.<sup>59, 60</sup>

Sie hemmen aber auch den Signalweg des hepatoprotektiven IL-6 auf mehreren Ebenen.<sup>61</sup> Die Schädigung von Zellorganellen (Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum) führt ebenfalls zur Aktivierung der Apoptose.<sup>62</sup> Diese Effekte sind zumindest teilweise Ergebnis der Bildung radikaler Sauerstoffspe-

zies.<sup>62-64</sup> Oxidativer Stress und reaktive Aldehyde sind außerdem an der Ausbildung und der Progression einer Leberfibrose beteiligt.<sup>65</sup>

Die Symptome der Cholestase sind der Ikterus, helle (acholische Stühle), bierbrauner Urin und Pruritus.<sup>58</sup> Es kommt zum Übertritt aller gallepflichtigen Stoffe ins Blut.<sup>58</sup> Dabei akkumulieren Gallensäuren stark, die totale Gallensäurekonzentration im Serum kann bis auf das hundertfache des Normwertes (normal: 3,1±0,7 µmol/l) ansteigen.<sup>66</sup>

### 1.2.2 Gallensäuren als zelluläre Signalmoleküle

Neben ihrer Eigenschaft als Detergenzien sind Gallensäuren als Signalmoleküle von großer Bedeutung. Sie aktivieren im Wesentlichen zwei Rezeptorsysteme: Zum einen sind Gallensäuren Liganden von nukleären Rezeptoren wie zum Beispiel dem sogenannten Farnesoid-X-Rezeptor (FXR). Diese Rezeptoren bilden mit dem Retinoid-X-Rezeptor Heterodimere und binden an regulatorischen DNS-Abschnitten. So können sie Einfluss auf den Gallensäuremetabolismus nehmen, wie die eigene Synthese oder die intestinalen Resorptionsraten.<sup>55, 57, 67</sup> Zum anderen vermitteln Gallensäuren verschiedene Effekte über den kürzlich beschriebenen G-Protein-gekoppelten Rezeptor TGR5 (syn. GP-BAR1). Insbesondere Tauroolithocholat (TLC) ist ein potenter Ligand dieses membrangebundenen (gallensäurespezifischen) Rezeptors, der nach Bindung des Agonisten internalisiert wird.<sup>68</sup> Eine hohe Expressionsrate dieses Rezeptors findet sich zum Beispiel in der menschlichen Milz und im Intestinaltrakt - aber auch in CD14+-Monozyten, Alveolarmakrophagen und Kupffer-Zellen<sup>68</sup>. Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Aktivierung der Adenylatcyclase und darüber zu einem Anstieg von intrazellulärem cAMP (Abbildung 3), über das die verschiedenen Effekte, wie zum Beispiel Vorgänge im Energiemetabolismus, mediiert werden.<sup>69,70</sup> Gallensäuren können ferner eine Vielzahl von intrazellulären Kinasen wie Mitglieder der sogenannten Mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die Proteinkinase C und andere aktivieren. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung dieser Signalelemente in Vorgängen wie der Gallensäuren-vermittelten Cholereze/ Cholestase, Proteolyseinhibition und der Apoptose involviert ist.<sup>67, 71, 72</sup>

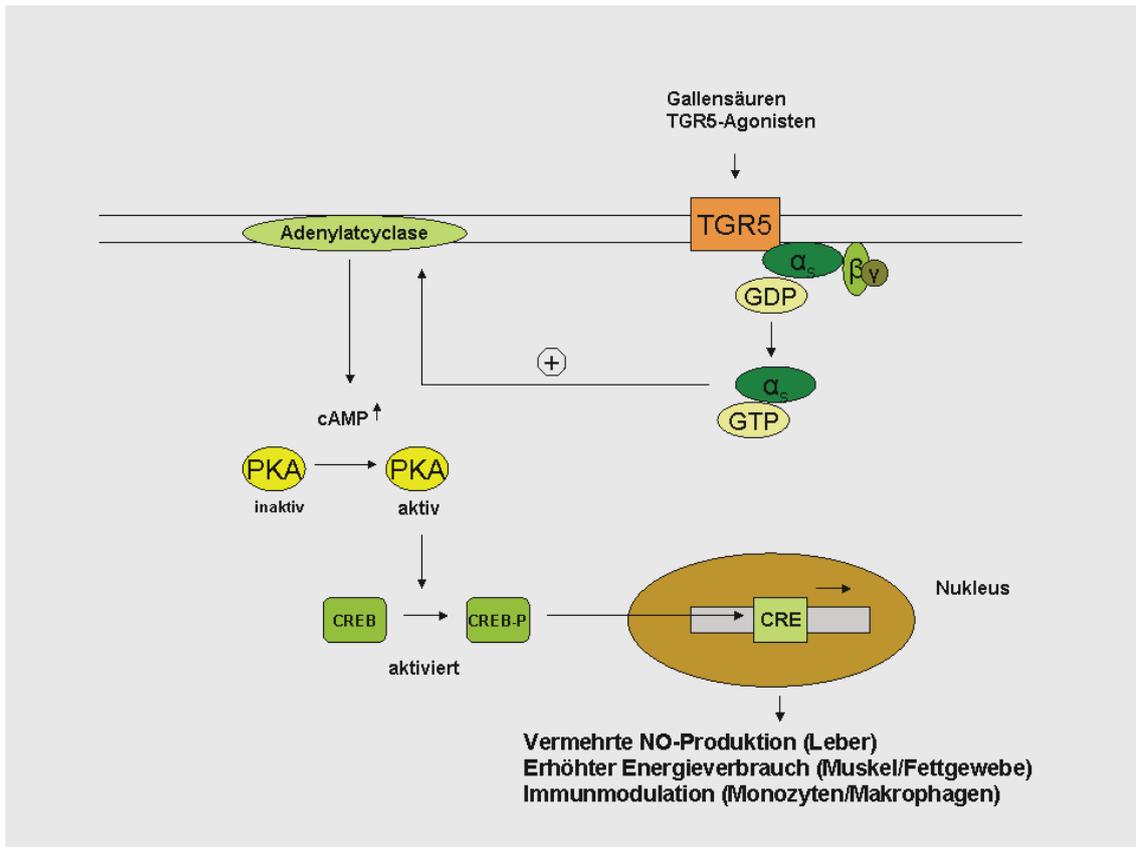


Abbildung 3: Schematische Darstellung der TGR5-Signalkaskade nach<sup>73</sup>

### 1.2.3 Immunmodulatorische Effekte von Gallensäuren

Es ist bereits seit Anfang der 1970er Jahre bekannt, dass mehrere Krankheitsbilder wie z.B. die fortgeschrittene Leberzirrhose zu einer Erhöhung der Gallensäurekonzentration im Blut führen.<sup>66</sup> Ebenso wurde nachgewiesen, dass es im Zuge cholestatischer Krankheitsbilder zu einer negativen Beeinflussung der Effektivität des Immunsystems kommen kann einhergehend mit einer verminderten Zell-medierten Immunität.<sup>74-76</sup>

So zeigen auch Studien neueren Datums, dass das Ansprechen auf die Monotherapie einer chronischen Hepatitis C mit (pegyliertem) Interferon- $\alpha$  bei Vorliegen einer Zirrhose abnimmt<sup>77</sup> und dass hohe Gallensäurespiegel mit einer größeren Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens einhergehen<sup>78, 79</sup>.

Verschiedene Quellen belegen, dass hydrophobe Gallensäuren die Interferon- $\alpha$ -vermittelte Expression von ISG-Produkten (ISG, *interferon stimulated genes*) wie dem MxA-Protein oder der 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase in hepatozy-

tären Zellen, humanen Lymphozyten, PBMCs und NK-Zellen herunterregulieren.<sup>80, 81,82, 83</sup>

Ferner konnte gezeigt werden, dass die humorale Immunantwort durch hydrophobe Gallensäuren (hier v. a. Chenodeoxycholsäure und ihre konjugierten Derivate) inhibiert wird und zwar insbesondere durch eine verminderte IgM-Produktion aus B-Lymphozyten. Der suppressive Effekt war dieser Studie zufolge Konsequenz einer verminderten Zellteilung und einer verminderten Exozytose der Immunglobuline.<sup>84</sup>

Der inhibitorische Effekt von unkonjugierter Chenodeoxycholsäure auf humane Monozyten wurde 1992 erstmalig beschrieben.<sup>85</sup> Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass die LPS-induzierte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen in Alveolarmakrophagen, PBMCs und leberständigen Makrophagen (den sogenannten Kupffer-Zellen) durch hydrophobe Gallensäuren wie Tauroolithocholsäure über den Gallensalzrezeptor TGR5 mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration inhibiert wird.<sup>68, 70</sup>

Der suppressive Effekt eines erhöhten cAMP-Spiegels auf die LPS-induzierte Zytokinexpression wurde bereits in früheren Untersuchungen bei peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) beschrieben.<sup>86</sup> cAMP hat zudem inhibitorische Effekte auf die Bildung reaktiver Sauerstoffespezies und auf die Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen.<sup>87-89</sup> Die Suppression der Phagozytose wird dabei durch das Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) vermittelt, einem weiteren Effektor von cAMP neben der PKA.<sup>89</sup> Daneben scheint jedoch die PKA mehr als Epac die Suppression der Zytokinexpression zu bewirken.<sup>89</sup> Weiterhin ist bekannt, dass cAMP zu einer vermehrten Expression von Interleukin 10 führt.<sup>89</sup> IL-10 wirkt über eine STAT3-vermittelte Suppression der Zytokinproduktion antiinflammatorisch<sup>90</sup>, ein wichtiger Mechanismus der cAMP-vermittelten Immunsuppression. Allerdings konnte für dendritische Zellen auch eine IL-10-unabhängige Suppression der TNF- $\alpha$ -und IL-12-Expression durch cAMP gezeigt werden.<sup>89</sup> Demnach gibt es mehrere Wege, auf denen hydrophobe Gallensäuren via cAMP-Erhöhung einen suppressiven Effekt auf die Immunfunktion von Makrophagen ausüben können.

## 2. Fragestellung

Wie oben ausgeführt haben klinische Beobachtungen gezeigt, dass es im Zuge erhöhter Gallensäurekonzentrationen bei cholestatischen Krankheitsbildern zu einer negativen Beeinflussung der Effektivität des Immunsystems kommen kann.<sup>74, 78</sup> Insbesondere konnte eine reduzierte Immunfunktion monozytärer Zellen nachgewiesen werden.<sup>76</sup>

Diese Dissertationsschrift behandelt zum einen die Fragestellung, ob sich die bisher gezeigten immunsuppressiven Effekte hydrophober Gallensäuren (hier repräsentativ Tauroolithocholsäure) auf humane, von Monozyten abgeleitete Makrophagen übertragen lassen. Des Weiteren sollen die erarbeiteten Ergebnisse zur Klärung der Frage beitragen, auf welcher Stufe des Signalweges von LPS der immunsuppressive Effekt von hydrophoben Gallensäuren auf die Immunfunktion der humanen Makrophagen stattfindet.

### 3. Materialien

#### 3.1 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller/Ort</u>
Autoklav	Steritec KSG112	Steritec, Kleve, Deutschland
Blottingkammern	semi-dry-transfer- Horizontalapparat Multipor II	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammern	Z37, 507-1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Entwicklermaschine	Curix60 AGFA®	AGFA, Köln, Deutschland
Glassspritze	Hamilton Microliter™ Syringes	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Inkubationsschrank	3111 Forma Scientific, CO <sub>2</sub> Water Jacketed Incubator	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
MACS-Gerät	QuadroMACS®	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Mikroskop	ID03	Zeiss, Jena, Deutschland
pH-Meter	inoLab® pH-Level 1	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Power Supplys	Elektrophoresis Power Supply (EPS600/EPS601/EPS 3500)	Pharmacia Biotech, Karlsruhe, Deutschland
Real-Time PCR-Gerät	7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Schüttler	Rollschüttler Assistant RM5	Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
	Laborshake	Gerhardt, Königswinter, Deutschland
	GFL 3032	Welabo, Düsseldorf Deutschland

Thermobad	GFL 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer Compact 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank	Antares	Anthos MS, Krefeld, Deutschland
Waagen	BABC200	Sartorius, Göttingen, Deutschland
	Feinwaage EP210S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Cryofuge 6000	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
	Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3.2 Reagenzien und Inhibitoren für die Zellkultur

<u>Reagenz/Inhibitor</u>	<u>Hersteller/Ort</u>
8-bromo-adenosine-3'-5'-cyclic-monophosphate	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
Erk-Inhibitor (PD098059)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
JNK 1/2/3-Inhibitor (SP600125)	SA Biosciences, Frederick, USA
p38-MAPK-Inhibitor (SB203580)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Proteinkinase-A-Inhibitor (PKI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TLC ( <i>Sodium tauroolithocholate</i> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ultra Pure <i>E.coli</i> K12 LPS	InvivoGen, San Diego, USA

### 3.3 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller/Ort</u>
Anti-Active®p38	Promega, Madison, USA

GAPDH	Biodesign International, Saco, USA
NF-κB-p65	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
MxA (M143)	Universität Freiburg, Virologie Prof. Dr. Otto Haller, Freiburg, Deutschland
Phospho-IRF3 (Ser <sup>396</sup> )	Cell Signaling Technology, Denver, USA
Phospho-NF-κB-p65 (Ser <sup>536</sup> )	Cell Signaling Technology, Denver, USA
Phospho-STAT1 (Tyr <sup>701</sup> )	Cell Signaling Technology, Denver, USA
Phospho-STAT3 (Tyr <sup>705</sup> )	Cell Signaling Technology, Denver, USA
PKR	Cell Signaling Technology, Denver, USA
STAT1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
STAT3	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Polyclonal rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako, Hamburg, Deutschland

### 3.4 Lösungen und Puffer

TRIS-Puffer	3,5 mM	SDS
	25 mM	TRIS
	250 mM	Glycin
APS	10 %	

Blockierungspuffer	1 %/5 % BSA in TBS-T	
Blotting-Puffer	40 mM	SDS
	10 mM	TRIS
	10 mM	Glycin
	25 %	Methanol
Elektrophorese-Puffer	4 mM	SDS
	25 mM	TRIS
	250 mM	Glycin
MACS-Puffer	0,5 %	BSA
	2 mM	EDTA
	in PBS pH 7,2	
RL-Lysepuffer	20 mM	TRIS pH 7,4
	140 mM	NaCl
	10 mM	NaF
	10 mM	Natriumpyrophosphat x 10 H <sub>2</sub> O
	1 %	Triton X-100
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1 mM	Natriumorthovanadat
	20 mM	β-Glycerophosphat
RLT- Lysepuffer	1 % β-Mercaptoethanol in RLT-Puffer [Qiagen, Hilden, Deutschland]	
2 x SDS-Loadingpuffer	220 mM	TRIS/HCL pH 6,8
	9 %	SDS
	40 %	Glycerin
	0,125 %	Bromphenolblau
	1 M	DTT

Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 %	
Stripping-Puffer	0,2 M	Glycin pH 2,5
	0,05 %	Tween 20
TBS-T	20 mM	TRIS pH 7,4
	150 mM	NaCl
	0,1 %	Tween 20
TE-Puffer	10 mM	TRIS pH 7,4
	1 mM	EDTA

### 3.5 Kits

<u>Kit</u>	<u>Hersteller/Ort</u>
cAMP-Screen® System	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
SYBR® Green Universal PCR MasterMIX	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit/Qia Shredder	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 3.6 Oligonukleotide

Primer	Sequenz
hu-HPRT1 (forward)	5'-GCT TTC CTT GGT CAG GCA GT-3'
hu-HPRT1 (reverse)	5'-GCT TGC GAC CTT GAC CAT CT-3'
hu-IFN $\beta$ (forward)	5'-TCT CCT GTT GTG CTT CTC CA-3'
hu-IFN $\beta$ (reverse)	5'-TTC AAT TGC CAC AGG AGC TT-3'
hu-IL1 $\beta$ (forward)	5'-GTG CAA GAT GCA CCT GTA CG-3'
hu-IL1 $\beta$ (reverse)	5'-TGG ACC AGA CAT CAC CAA GC-3'
hu-IL 6 (forward)	5'-GCC ACT CAC CTC TTC AGA ACG-3'
hu-IL 6 (reverse)	5'-CCG TCG AGG ATG TAC CGA ATT-3'
hu-IL 10 (forward)	5'-TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA-3'
hu-IL 10 (reverse)	5'-CTC AGA CAA GGC TTG GCA AC-3'
hu-TNF $\alpha$ (forward)	5'-GAT CAA TCG GCC CGA CTA TC-3'
hu-TNF $\alpha$ (reverse)	5'-TCC TCA CAG GGC AAT GAT CC-3'

Alle oben aufgeführten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

### 3.7 Medien und Zusätze für die Zellkultur

#### Medium/Zusatz

#### Hersteller/Ort

CD14-Microbeads (human)

Miltenyi Biotech,  
Bergisch Gladbach,  
Deutschland

Complete Protease-Inhibitor-Cocktail (Tabletten)

Roche Diagnostics,  
Mannheim, Deutschland

Fetales Kälberserum

Gibco Life Technologies,  
Karlsruhe, Deutschland

Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, München, Deutschland
Hanks' Salzlösung (HBSS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Humaner M-CSF	PeproTech, Rocky Hill, USA
PBS	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
3.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	
<u>Chemikalien/Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller/Ort</u>
Acrylamid 4K-Lösung (30%) Mix 29:1	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Bio Rad Protein Assay	BIO RAD, München, Deutschland
Bromphenol Blau	BIO RAD, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

ECL Western Blotting Detektionssystem	Perkin Elmer Lifesciences, Boston, USA
Einmalküvetten (Polystyrol/Polysterene)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritzen Omnifix® 20 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Entwicklerlösungen (Tetenal Roenteroll/Superfix)	TETENAL, Norderstedt, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Filtereinheit (FP 30/0,2 Ca-S)	Whatman, Dassel, Deutschland
Gewebekulturschale	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Hyperfilm	Amersham, Freiburg, Deutschland
MACS® Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS® Separation Columns (LS)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

PageRuler™ (Plus Prestained Protein Ladder)	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Ponceau S	Serva, Heidelberg, Deutschland
Protran© Nitrocellulose Transfermembran	Whatman, Dassel, Deutschland
TRIS Ultra Pure Grade	MP Biomedicals, Solon, USA
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheit von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

## 4. Methoden

### 4.1 Isolation und Zellkultur von humanen Makrophagen

#### 4.1.1 Aufreinigung der Buffy-Coats

Die Präparation der humanen Makrophagen erfolgte aus Buffy-Coats von Blutspendern, die mit freundlicher Genehmigung vom hiesigen Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin unter der Leitung von Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Rüdiger E. Scharf bezogen wurden. Es wurden tagesfrische Buffy-Coats von männlichen Blutspendern verwendet.

Bei einem Buffy-Coat handelt es sich um ein Blutprodukt, welches durch Sedimentation beziehungsweise Zentrifugation von mit Gerinnungshemmern versetztem Vollblut entsteht. Die Schicht, die sich zwischen Erythrozyten und Blutplasma bildet, stellt die Zellen des Buffy-Coat dar und besteht im Wesentlichen aus Leukozyten sowie Thrombozyten.

Vor der Präparation wurden sämtliche verwendeten Medien auf 37 °C erwärmt. In Vorbereitung zur Dichtegradientenzentrifugation wurde der Inhalt des Buffy-Coat zu etwa gleichen Teilen auf drei Falcons verteilt und diese bis zu einem Volumen von 40 ml mit Hanks' Salzlösung (HBSS) aufgefüllt. Vier weitere Falcons wurden mit je 20 ml Ficoll bestückt – einem synthetischen Polymer der Saccharose, welches als Trennlösung fungierte. Anschließend wurde die Buffy-Coat/HBSS-Suspension zu je vier mal 30 ml auf die mit Ficoll bestückten Falcons verteilt, wobei ein Vermischen der beiden Flüssigkeiten vermieden wurde. Daran anschließend erfolgte eine 35-minütige Zentrifugation ohne Bremse bei Raumtemperatur mit einer Geschwindigkeit von 547 x g. Hierbei bildeten sich mehrere Schichten aus - die etwa 1,5 cm dicke, weißliche Schicht stellte dabei den Leukozytenfilm dar. Diese wurde vorsichtig abpipettiert und in einem neuen Falcon bis zu einem Volumen von 50 ml mit HBSS aufgefüllt. Diese Suspension wurde nun dreimal für jeweils 10 min bei 4 °C mit Bremse zentrifugiert, wobei nach jeder Zentrifugation der Überstand verworfen und das Falcon erneut mit Puffer auf 50 ml aufgefüllt wurde. Die erste und die letzte Zentrifugation erfolgten dabei mit einer Geschwindigkeit von 293 x g, die zweite

mit einer Geschwindigkeit von 165 x g. Das schließlich entstandene Zellpellet wurde in 5 ml Hanks' Pufferlösung aufgenommen und fortan auf Eis gehalten.

#### 4.1.2 Zellseparation mittels MACS

Um zu erreichen, dass möglichst nur Monozyten in Zellkultur gebracht und zu Makrophagen ausdifferenziert wurden, wurde eine *Magnet Cell Separation* (MACS) durchgeführt. Diese dient der Abtrennung der gesuchten Zellen aus dem Zellgemisch und geschieht mittels circa 50 nm großer Eisenoxidpartikel, die mit einem Antikörper verbunden sind. Dieser Antikörper richtet sich spezifisch gegen Oberflächenantigene der gesuchten Zellen. Im Falle der Monozytenpräparation richtet sich der Antikörper gegen den CD14-Rezeptor (*CD* = Cluster of differentiation), welcher besonders auf myelomonozytischen Zellen von Säugetieren zu finden ist und der neben MD-2 sowie TLR-4 den Rezeptor für LPS bildet<sup>12</sup>. Die markierten Zellen laufen im Separator durch ein elektrisches Magnetfeld und werden so von der unmarkierten Zellfraktion getrennt.

Zu Beginn des Verfahrens stand die Bestimmung der Zellzahl. Zur Zählung wurden 10 µl der Probe mit Trypanblau in einer Verdünnung von 1:20 eingefärbt und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dann wurde die Probe 10 min lang mit 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 80µl MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert und der Suspension dann 20 µl CD14-Microbeads pro 10<sup>7</sup> Zellen zugefügt. Nach Vermischen wurde die Probe für 15 min im Kühlschrank bei 2-4 °C gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen gewaschen und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension von bis zu 10<sup>8</sup> Zellen pro 500 µl Puffer.

Im weiteren Verlauf der Separation der Monozyten wurden die MACS-Säulen an den MACS-Separator angebracht und dann mit MACS-Puffer bestückt. Danach wurde die Zellsuspension hinzupipettiert, wobei diese zur Aufreinigung durch eine Filtereinheit in die Säule lief. Nach Durchlaufen der Zellsuspension durch den Separator enthielt das Effluat die unmarkierte, CD14-negative Zellfraktion. Die Säulen wurden dreimal mit MACS-Puffer gewaschen, bevor sie

aus dem Separator entfernt und auf einen passenden Sammelbehälter aufgesetzt wurden. Die markierten Zellen wurden gelöst, indem Puffer hinzupipettiert und sofort ein Kolben kräftig in die Säulen geschoben wurde. Nach einer erneuten Zählung im oben beschriebenen Verfahren erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 300 x g und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden dann in RPMI-Medium aufgenommen und anschließend ausgesäht.

#### 4.1.3 Ausplattierung und Zellkultur

Nach der positiven Selektion der CD14<sup>+</sup>-Zellen wurden diese in einer Zahl von  $2 \times 10^6$  auf mit Medium (RPMI 1640-Medium, zusätzlich fetales Kälberserum und Penicillin/Streptomycin) vorbestückten 10 cm-Schalen ausgesäht. Um eine Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zu erreichen, wurde dem Medium vor Bestückung der Schalen humaner M-CSF in einer Konzentration von 10 ng/ml zugefügt. M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) ist ein Protein, welches u.a. von Zellen des Immunsystems von Säugetieren gebildet wird und in Kultur die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen bewirkt. Die Zellen wurden fortan bei 37 °C im Brutschrank gehalten.

Am vierten Tag nach der Präparation erfolgte ein Mediumwechsel mit M-CSF-haltigem Medium. Am siebten Tag wurde das Medium um 30 % seines Volumens durch mit Wachstumsfaktor versetztes Medium ergänzt. Am neunten Tag nach Zellpräparation wurde ein Mediumwechsel ohne M-CSF und einen Tag darauf die Zellversuche durchgeführt. Verwendet wurden nur solche Schalen, die lichtmikroskopisch im Bezug auf Zellzahl, Adhärenz und Zellmorphologie geeignet erschienen. Bei Versuchsbeginn erfolgte ein abermaliger Mediumwechsel ohne Wachstumsfaktor, wobei die verwendeten Substanzen zuvor in diesem Medium angesetzt worden waren und so mit dem Medium auf die Zellen gebracht wurden. Wenn mehrere Substanzen zum Einsatz kamen, wurden diese in der Folge ohne weiteren Mediumwechsel hinzupipettiert.

#### 4.2 Proteinbestimmung

Mit der Proteinbestimmung nach Bradford werden Proteinkonzentrationen mittels Photometrie quantitativ bestimmt. Dabei bildet der Triphenylmethanfarbstoff

Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) in saurer Lösung mit unpolaren und kationischen Seitenketten von Proteinen Komplexe und stabilisiert sie dadurch in ihrer anionischen Sulfatform. Damit verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von  $\lambda = 465 \text{ nm}$  (rot, kationische Form) auf  $\lambda = 595 \text{ nm}$  (blau, anionische Form). Die Reaktionszeit von Protein und Farbstoff beträgt 2 min, der Farbstoff-proteinkomplex bleibt für 1 h erhalten. Die Zunahme der Absorption kann im Photometer bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  gegen eine Leerprobe gemessen werden und bestimmt somit die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe.

Konkret wurden die Zelllysatsproben bei maximaler Umdrehung und einer Temperatur von  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet verworfen. In einer 1-ml-Einwegküvette wurden jeweils  $5 \text{ }\mu\text{l}$  der unverdünnten Probe zu  $795 \text{ }\mu\text{l}$  destilliertem Wasser und  $200 \text{ }\mu\text{l}$  Bradfordreagenz hinzugegeben. Nach Mischung der Probe wurde die Extinktion bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  im Photometer gemessen, welches mit einem Standardprotein - dem bovinen Serumalbumins (BSA) - kalibriert worden war.

#### 4.3 Elektrophorese und Western-Blot

Zur Proteinanalyse mittels Western-Blot wurden je  $40 \text{ }\mu\text{g}$  Gesamtprotein des Zelllysats mit 2-x-SDS-Ladungspuffer aliquottiert. Anschließend wurde dieses Gemisch für 5 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  zur Proteindenaturierung erhitzt. Die Proteinauftrennung erfolgte mittels Gelelektrophorese, der Prozentanteil an Polyacrylamid der Gele variierte je nach Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine.

##### Polyacrylamidsammelgel (5%)

4,6 ml	Aqua bidest.
1,2 ml	30%Acrylamid/Bisacrylamid 29/1
0,9 ml	1 M Tris/HCL pH 6,8
66,5 $\mu\text{l}$	10 % SDS
66,5 $\mu\text{l}$	10 % APS
6,65 $\mu\text{l}$	TEMED

#### Polyacrylamidtrenngel (10 %)

13,3 ml	Aqua bidest.
11,1 ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid
8,4 ml	1,5 M Tris/HCL pH 8,8
333 µl	10 % SDS
333 µl	10 % APS
13,35 µl	TEMED

#### Polyacrylamidtrenngel (12 %)

9,9 ml	Aqua bidest.
12 ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid
7,5 ml	1,5 M Tris/HCL pH 8,8
300 µl	10 % SDS
300 µl	10 % APS
12 µl	TEMED

An das Gel wurde eine vertikale Spannung von 260 mV für 3-4 Stunden angelegt.

Das Gel mit den elektrophoretisch in Banden aufgetrennten Proteinen wurde im nächsten Schritt zum Western-Blot benutzt. Dabei wird ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes, elektrisches Feld angelegt, wodurch ein Übertritt der zuvor aufgetrennten Proteine auf eine darunter liegende Membran herbeigeführt wird. In diesem Fall wurden die Proteine nach der semi-dry-Methode auf eine Nitrocellulosemembran transferiert: Auf die Anodenplatte wurden vier mit 1-x-Blottingpuffer durchtränkte Filterpapiere aufgelegt, welche der Größe der Nitrocellulosemembran entsprachen. Die zuvor in bidestilliertem Wasser angefeuchtete und dann ebenfalls mit 1-x-Blottingpuffer benetzte Membran wurde nun auf die Filterpapiere aufgelegt und mit weiteren vier getränkten Filterpapieren bedeckt. Die Kathodenplatte wurde zusätzlich mit Gewichten beschwert, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern. Für eine Dauer von 90 bis 120 min wurde Strom der Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> der Membran an den Stromkreis gelegt. Zur Kontrolle des luftblasenfreien Transfers wurde anschließend an das Blottingverfahren eine Ponceaufärbung durchgeführt. Um eine Blockierung von

unspezifischen Proteinen zu erzielen, wurde die Membran weiterhin mit 1 % – 5 % BSA (bovines Serumalbumin) in TBS-T für 1 h inkubiert.

#### 4.4 Proteinnachweisverfahren

Um einzelne Proteine darstellen zu können, wurden die Membranen im weiteren Verlauf über Nacht und bei 4 °C mit epitopspezifischen Primärantikörpern inkubiert. Diese waren in Konzentrationen von 1:1000 bis 1:2000 in Waschpuffer (TBS-T) verdünnt. Auf zwei je zehnminütige Waschvorgänge mit TBS-T, die der Ablösung unspezifisch gebundener Antikörper diente, folgte eine einstündige Inkubation mit dem ebenfalls in Waschpuffer gelöstem, sekundärem Markierungsantikörper, der sich gegen die Fc-Region des Erstantikörpers richtete. Als endogene Beladungskontrolle diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glycolyse.

Die Sichtbarmachung des peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpers erfolgte mittels Chemilumineszens. Zu diesem Zweck wurde die Membran 5 min mit einem 1:1-Gemisch des entsprechenden ECL-Reagenzes behandelt und anschließend durch Auflegen eines ECL-Hyperfilms abgebildet.

#### 4.5 Reverse Transkription und Real-Time PCR

Die Isolierung der RNA aus den Zelllysaten wurde unter Zuhilfenahme des RNeasy Mini Kit® (Qia Shredder) durchgeführt, daran anschließend erfolgte die Bestimmung des RNA-Gehaltes der Proben mittels Photometrie.

Vor Durchführen der Real-Time-PCR wurde die RNA im Zuge der reversen Transkription in cDNA (engl. *complementary DNA*) umgeschrieben, dies geschah mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit®.

Die quantitative Real-Time-PCR ist ein Verfahren, bei dem neben der Amplifikation einer spezifischen Basensequenz gleichzeitig die Möglichkeit besteht, eine Aussage über die Menge der Amplifikate zu treffen. Verwendet wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (SYBR® Green Universal PCR MasterMix), der mit doppelsträngiger DNA interkaliert und über dessen Zunahme an Fluoreszenz rechnerisch auf die Amplifikatmenge geschlossen werden konnte. Als PCR-Gerät wurde das 7500 Real-Time PCR System und als Reaktionsge-

fäße 96-Well-Platten mit haftender Abdeckung benutzt. Semiquantitative Ergebnisse wurden über die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode erworben.

Die mRNA der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT 1) [Produkt eines konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gens] diente als endogene mRNA-Kontrolle. Die Ergebnisse der PCR wurden mittels Negativkontrollen in Form von Ansätzen ohne Zusatz von reverser Transkriptase sowie Wasserkontrollen überprüft. Die Kontrolle der Spezifität der PCR erfolgte über eine Schmelzkurvenanalyse.

#### 4.6 cAMP-Assay

Für den cAMP-Assay wurde das cAMP-Screen® System, ein kompetitiver Immunoassay, von Applied Biosystems benutzt.

Bei diesem Verfahren wird zuerst der Antikörper, der für das zu untersuchende Protein spezifisch ist, an einer festen Phase fixiert. Anschließend wird der Analyt zugefügt. In diesem Fall wurden die Makrophagen zunächst wie oben beschrieben auf 24-Well-Mikroplatten kultiviert, mit Gallensäuren stimuliert und lysiert. Die Lyse erfolgte bei 37°C für 5 bis 30 Minuten unter lichtmikroskopischer Kontrolle.

Das Lysat wurde dann auf mit cAMP-Antikörper beschichtete 96-Well-Mikroplatten pipettiert. Gemäß Protokoll eines Immunoassay wird dann eine Lösung hinzugefügt, welche das gesuchte Protein in bekannter Konzentration enthält (in diesem Fall cAMP-Antigen-Konjugat). Das in den Zelllysaten in unbekannter Konzentration vorliegende Antigen und das Antigen in der Konjugat-Lösung konkurrieren um die an die Well-Platten gebundenen Antikörper. Je größer der Anteil des untersuchten Proteins in der Probe ist, desto weniger Konjugat-Antigen wird gebunden. Aus der Messung dieses ungebundenen Konjugat-Antigens ergibt sich demzufolge im Umkehrschluss die Menge des von den Makrophagen gebildeten cAMP.

Als Nachweisverfahren diente die Chemielumineszenz: Nach Inkubation mit einem markierten cAMP-Antikörper und nach Zugabe des chemilumineszenten Substrats konnten die entsprechenden Signale mittels Luminometer gemessen werden. Die gemessenen Werte wurden mit denen einer cAMP-Standardreihe

verglichen, um die cAMP-Konzentrationen der Proben zu bestimmen. Forskolin diente als Positivkontrolle.

#### 4.7 Statistik

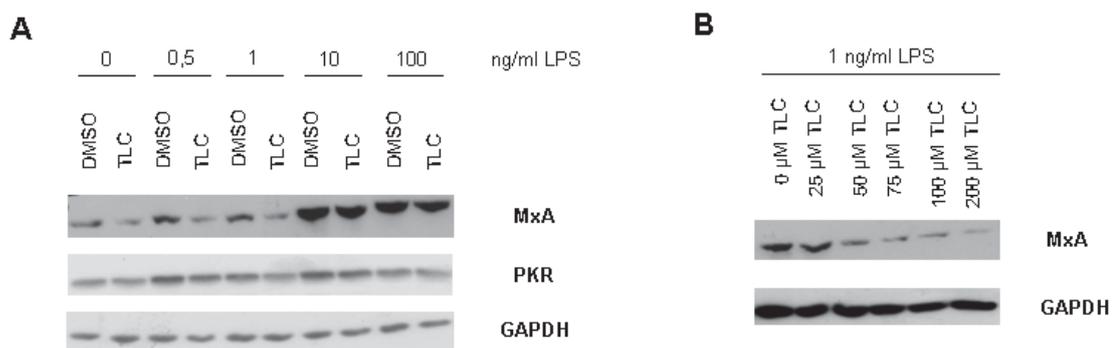
Die gezeigten Westernblots und PCR sind repräsentativ für mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Tabellarische oder im Balkendiagramm dargestellte Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt. Die Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels des Student-*t*-Tests. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Konfidenzintervall von 95% ( $p < 0.05$ ) als gegeben angesehen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Inhibition der Expression des MxA-Protein und der PKR durch Taurolithocholsäure

Der suppressive Effekt von hydrophoben Gallensäuren auf die IFN- $\alpha$ -vermittelte Expression von ISG-Produkten wurde in einer Reihe von Immunzellen und in hepatozellulären Zellen bereits gezeigt (s.o.).

Die Abbildung 4 zeigt die Regulation der LPS-induzierten Expression des MxA-Proteins und der PKR nach Präinkubation von TLC in humanen (*monocyte-derived*) Makrophagen.



**Abbildung 4: Regulation von MxA und PKR durch TLC-Präinkubation nach Stimulation mit LPS in verschiedenen Konzentrationen**

**(A)** Nach Vorbehandlung der humanen Makrophagen mit TLC [50  $\mu$ M] bzw. DMSO für einen Zeitraum von 45 Minuten, wurde den Zellen LPS in den angegebenen Konzentrationen für 18 Stunden zugefügt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und 40  $\mu$ g des Gesamtproteins im Western-Blot aufgetragen. Das MxA-Protein und die PKR wurden mit jeweils spezifischen Antikörpern detektiert, als Beladungskontrolle diente GAPDH.

**(B)** Die humanen Makrophagen wurden mit TLC in den dargestellten Konzentrationen bzw. in der Kontrolle mit der entsprechenden Menge an DMSO für einen Zeitraum von 45 Minuten vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit LPS [1 ng/ml] über 18 Stunden. Die Auswertung des Versuches erfolgte analog zu **(A)**.

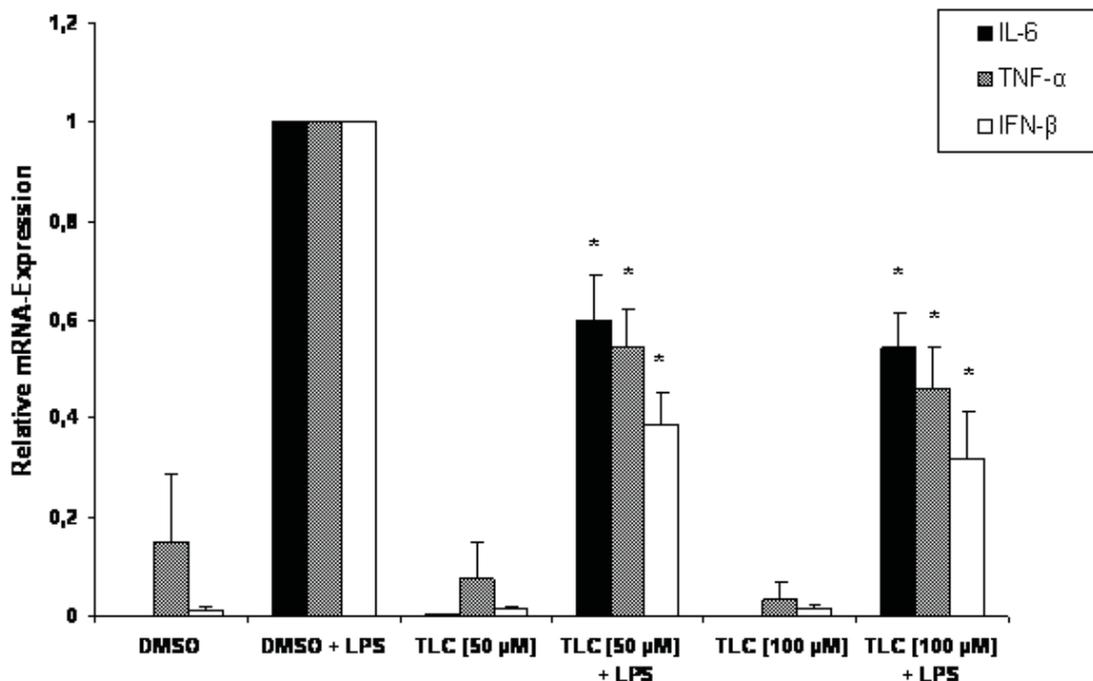
Wie aus der Abbildung 4 A ersichtlich wird, inhibiert TLC die LPS-induzierte MxA- und PKR-Expression. Der Effekt ist bei allen dargestellten Konzentrationen vorhanden, am deutlichsten bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml LPS.

Abbildung 4 B zeigt diesen suppressiven Effekt auf die MxA-Expression in Abhängigkeit von der TLC-Konzentration. Wie aus der Abbildung zu erkennen ist tritt diese Inhibition zuerst bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  TLC auf, weshalb diese in der Folge verwendet wurde.

## 5.2 Inhibition der LPS-induzierten Zytokinexpression durch Taurolithocholsäure in humanen Makrophagen

Da eine verminderte Expression von ISG-Produkten Folge einer verminderten Interferonausschüttung sein kann, wurde der Effekt von TLC auf die Expression von Interferon- $\beta$ -mRNA untersucht.

In Kupffer-Zellen wurde gezeigt, dass Gallensäuren über einen TGR5-cAMP-vermittelten Weg die LPS-induzierte Produktion verschiedener Zytokine (darunter IL-6, und TNF- $\alpha$ ) inhibieren (s.o.). Daher wurden auch diese beiden Zytokine unter dem Einfluss von TLC untersucht.



**Abbildung 5: Inhibition der LPS-induzierten Zytokinexpression durch TLC**

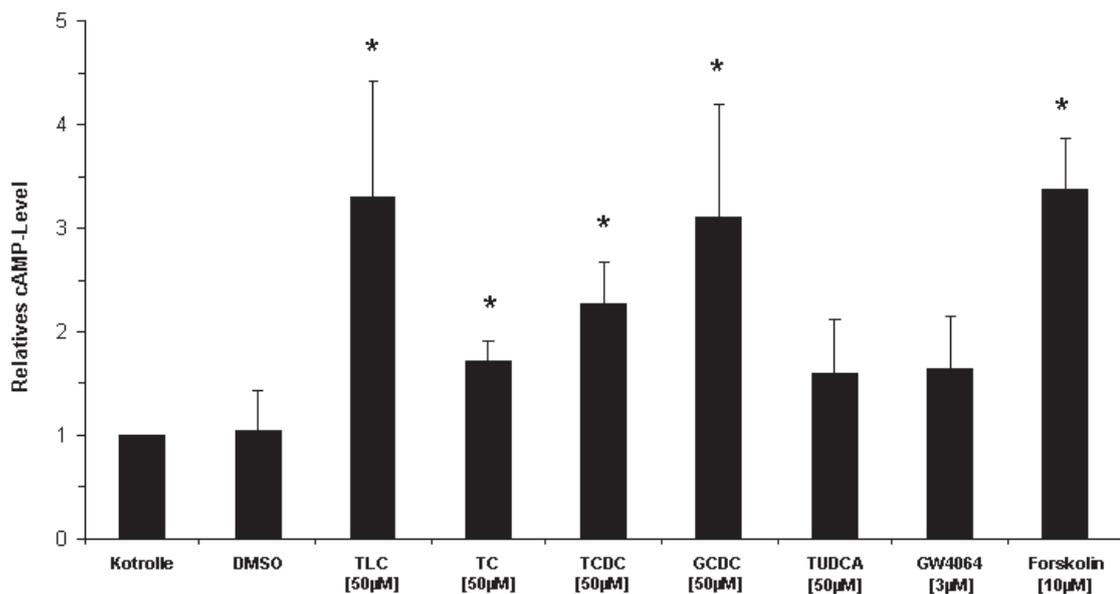
Die Makrophagen wurden 45 Minuten lang mit TLC in den Konzentrationen 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  (bzw. äquivalenten Volumen an DMSO) vorbehandelt. Anschließend wurde LPS [1 ng/ml] hinzugefügt und die Proben nach 3 Stunden lysiert. Die mRNA-Level wurden durch Real-Time-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Expressionsraten der jeweiligen Zytokine im Verhältnis zur

nicht mit TLC vorbehandelten Kontrolle, welche gleich 1 gesetzt wurde. Mittelwerte  $\pm$  SEM.  
\* $p < 0,05$

Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, reduziert TLC die LPS-induzierte mRNA-Expression der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\beta$  signifikant auch in humanen Makrophagen.

### 5.3 Induktion von cAMP in humanen Makrophagen durch Gallensäuren

Für Kupffer-Zellen konnte gezeigt werden, dass TLC über einen TGR-5-vermittelten Weg die cAMP-Spiegel in der stimulierten Zelle erhöht (s.o.). Im Folgenden wurden humane Makrophagen mit verschiedenen Gallensäuren sowie mit Forskolin (einem unspezifischen Aktivator fast aller Adenylatcyclasen<sup>91</sup>) stimuliert und anschließend die intrazelluläre Menge an cAMP gemessen (Abb. 6).



**Abbildung 6: cAMP-Level nach Stimulation mit Gallensäuren und Forskolin**

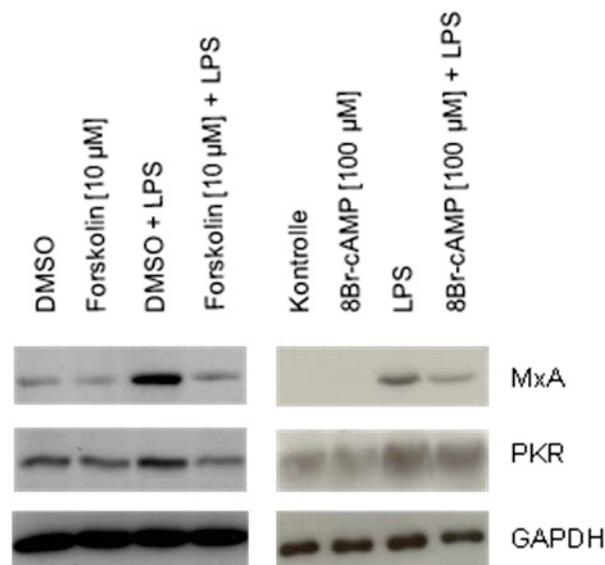
Die Makrophagen wurden mit den jeweiligen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen 4 Minuten lang inkubiert. DMSO diente als Kontrolle. Die Auswertung erfolgte mittels cAMP-Assay.

Die gemessenen cAMP-Level wurden auf die unstimulierte Kontrolle bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$

Es zeigt sich, dass der intrazelluläre cAMP-Spiegel in den humanen Zellen nach Stimulation mit TLC, TC, TCDC, GCDC und Forskolin im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ist. Auf der anderen Seite wird durch die hydrophile Gallensäure TUDC und den synthetischen Liganden GW4064, der den nukleären Gallensäuren-Rezeptor FXR stimuliert, keine cAMP-Synthese induziert.

#### 5.4 Inhibition von ISG-Produkten durch Forskolin und 8Br-cAMP

Analog zu den zuvor dargestellten Versuchen, wurde der inhibitorische Effekt von 8Br-cAMP und Forskolin auf die LPS-vermittelte Expression der PKR und des MxA-Proteins nachgewiesen (Abb. 7).



**Abbildung 7: LPS-induzierte MxA- und PKR-Expression nach Forskolin- und 8Br-cAMP-Behandlung**

Die Makrophagen wurden 45 Minuten lang mit Forskolin [10 µM] bzw. 8-Br-cAMP [100 µM] präinkubiert. Daran anschließend folgte eine Stimulation mit LPS [1 ng/ml] für 18 Stunden und die Zellen wurden daraufhin lysiert.

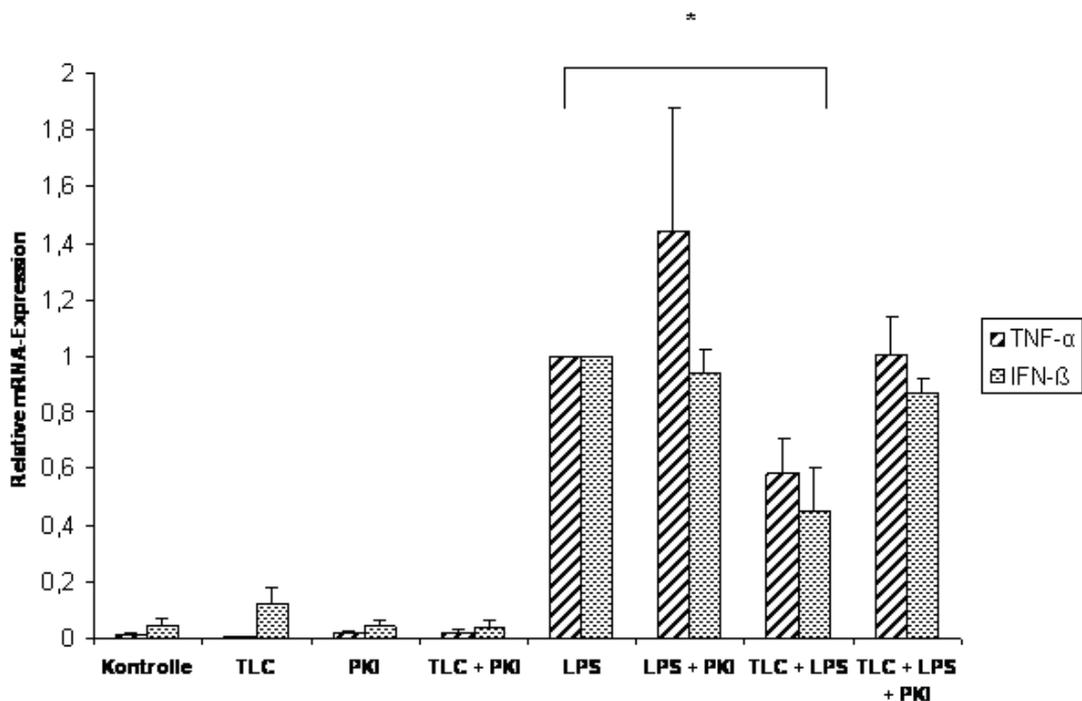
40 µg des Lysats wurden im Westernblot-Verfahren benutzt. MxA-Protein und PKR wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert, als Beladungskontrolle diente GAPDH.

Die Behandlung der mit LPS stimulierten Makrophagen mit cAMP bzw. die Stimulation der cAMP-Produktion durch Forskolin erzeugt eine Abnahme der MxA- sowie der PKR-Expression. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die

TLC-Effekte auf diesen Teil der Immunfunktion von humanen Makrophagen durch eine Erhöhung von cAMP mediiert werden könnten.

### 5.5 Inhibition der Zytokinexpression durch TLC ist Proteinkinase A-abhängig

cAMP überführt die Proteinkinase A in ihre aktive Form und dadurch wird eine Vielzahl von Zellfunktionen reguliert (s.o.), wie z.B. der Aktivitätsgrad des Transkriptionsfaktors CREB<sup>73</sup>. Es wurde untersucht, ob die Suppression der Zytokinexpression durch TLC unter Beteiligung der PKA verläuft. Hierzu wurde ein selektiver Inhibitor dieser Kinase eingesetzt, der sogenannte PKI (Abb. 7).



**Abbildung 8: Effekt von TLC auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -Expression ist PKA-abhängig**

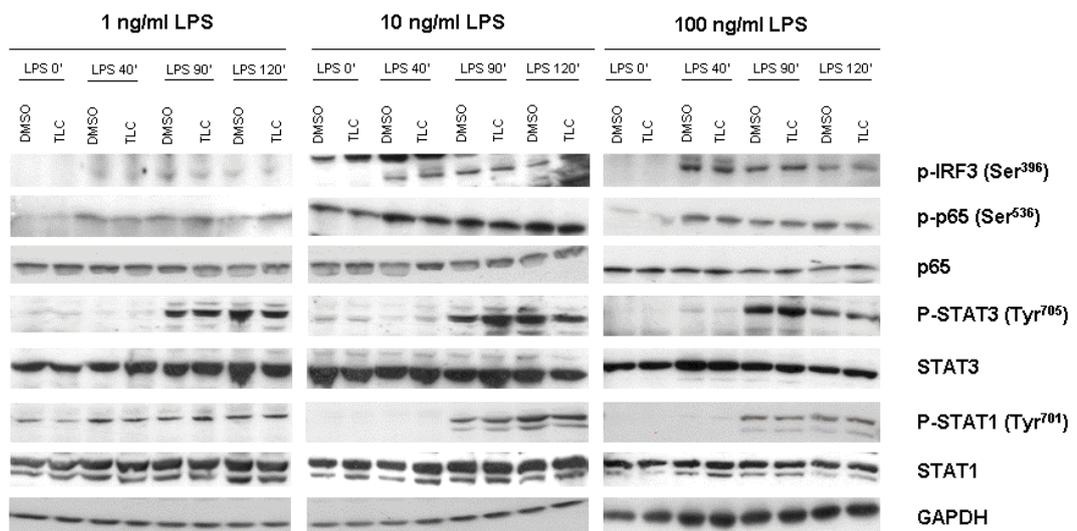
Die Makrophagen wurden 30 Minuten lang mit dem PKI [2,3 nM] vorinkubiert, danach wurden die Zellen mit TLC [50  $\mu$ M] stimuliert. Nach 45 Minuten wurde LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml der Zellkultur zugegeben und die Proben nach 3 Stunden lysiert. Die relative mRNA-Expression der Zytokine TNF- $\alpha$  und INF- $\beta$  wurde mittels spezifischer Primer nach der Real-Time-PCR-Methode analysiert.

In der Abbildung sind die Mittelwerte der Proben und der entsprechende Standardfehler als Fehlerindikator dargestellt. Die LPS-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. \* $p < 0,05$  (für TNF- $\alpha$   $n=5$ ; für IFN- $\beta$   $n=3$ )

Es konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation der Makrophagen mit dem Inhibitor der Proteinkinase A den suppressiven Effekt von TLC aufhebt. In Anwesenheit des PKA-Inhibitors konnte durch TLC keine Suppression der LPS-vermittelten TNF- $\alpha$ - und Interferon- $\beta$ -mRNA-Expression dokumentiert werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die suppressiven Effekte von Tauroolithocholat auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und das antivirale IFN- $\beta$  über einen PKA-abhängigen Weg erfolgt.

### 5.6 Interaktion zwischen Tauroolithocholsäure-vermittelter und TLR-4-abhängiger Signaltransduktion

LPS bewirkt nach Bindung an den TLR-4 die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Über den MyD88-unabhängigen Weg wird IRF-3 phosphoryliert, über den MyD88-abhängigen wird unter anderem NF- $\kappa$ B aktiviert. Durch die Ausschüttung von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  werden STAT-Proteine phosphoryliert und bewirken ihrerseits die Expression des MxA-Protein und der PKR (s.o.). Vor diesem Hintergrund wurde der Effekt von TLC auf die Phosphorylierung von IRF-3, p65 sowie STAT1 und STAT3 durch LPS in humanen Makrophagen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Effekte von TLC auf die LPS-induzierte Phosphorylierung von IRF3, p65, STAT1 und STAT3**

Die Makrophagen wurden 45 Minuten lang mit TLC in einer Konzentration von 50  $\mu$ M präinkubiert, analog wurden die Kontrollproben mit DMSO vorbehandelt. LPS wurde in den

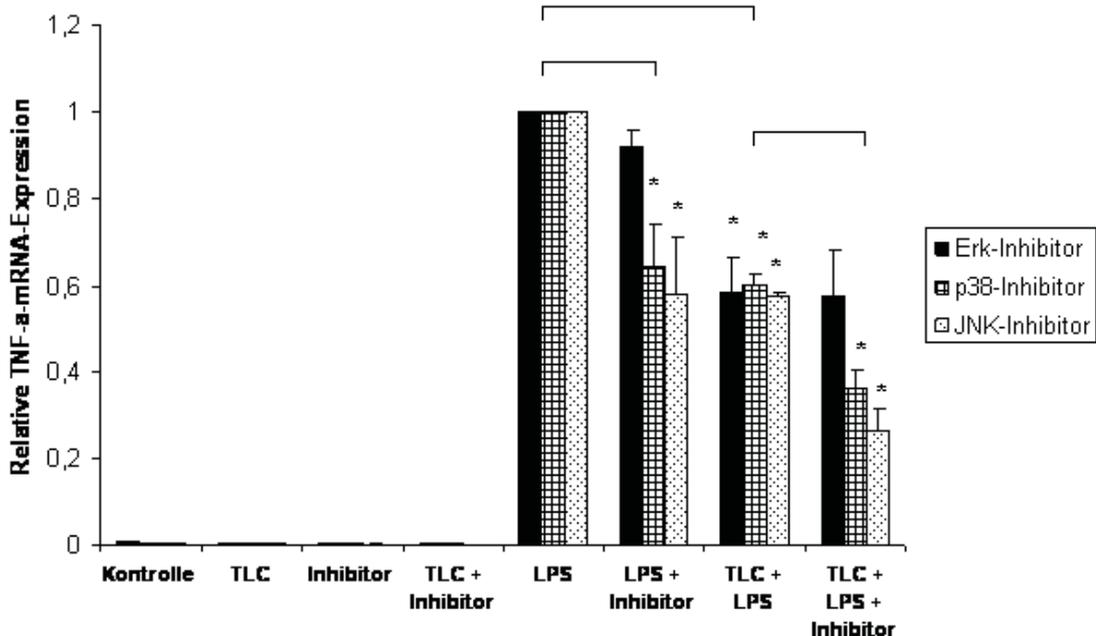
Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml sowie 100 ng/ml dazu gegeben und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert.

40 µg des Gesamtproteins wurden im SDS-Page aufgetrennt. Nach dem Western Blot erfolgte die Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern. Als Beladungskontrolle wurde GAPDH benutzt, als Kontrollen für die Proteine p-STAT1 und 3 sowie p-p65 wurden zusätzlich deren Gesamtproteine bestimmt.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, kann die LPS-induzierte Phosphorylierung von IRF3, p65, STAT1 und STAT3 durch TLC nicht gehemmt werden.

### 5.7 Einfluss von MAP-Kinasen auf den suppressiven Effekt von TLC

Eine Reihe von MAP-Kinasen sind Bestandteile der TLR-4-Signalkaskade. Über die Aktivität der p38-Kinasen, der c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und auch der Erk-Kinasen wird der Phosphorylierungsgrad verschiedener Transkriptionsfaktoren (wie zum Beispiel NF-κB oder Elk-1) und damit eine Reihe von Zellfunktionen wie auch die Expression proinflammatorischer Zytokine reguliert.<sup>92</sup>



**Abbildung 10: TLC-Effekt nach Inhibitor-Präinkubation**

Der jeweilige Kinaseinhibitor (Erk-, p38- und JNK-Inhibitor) wurde in einer Konzentration von 10 µM für 30 Minuten auf die Makrophagen gegeben, anschließend wurden TLC [50 µM] bzw.

DMSO für 45 Minuten hinzugefügt. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen mit LPS [1 ng/ml] über einen Zeitraum von 3 Stunden.

Die TNF- $\alpha$ -Expressionsrate wurde mittels eines spezifischen Primers nach der Real-Time-PCR-Methode analysiert. In der Abbildung handelt es sich um die Mittelwerte der Proben, der Fehlerindikator entspricht dem Standardfehler. Dargestellt ist das Verhältnis der Proben zur LPS-Kontrolle, welche gleich 1 gesetzt wurde. \* $p < 0,05$  (jeweils  $n=3$ )

Die Vorinkubation mit dem Erk-Inhibitor veränderte die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Expression nicht signifikant, weder mit noch ohne Vorinkubation mit TLC. Daraus lässt sich schließen, dass diese Kinase nicht an der Vermittlung der TLC-induzierten Zytokinsuppression beteiligt ist.

Wurden die Zellen mit dem p38-Inhibitor oder mit dem JNK-Inhibitor behandelt, führte dies jeweils schon alleine zu einer signifikanten Reduktion der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Expressionsrate. Bei kombinierter Behandlung der Zellen mit TLC und diesen Inhibitoren zeigte sich eine weitere Inhibition des TNF- $\alpha$ -Signals. Dieser inhibitorische Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Expression durch die Kombination der Reagenzien war signifikant größer als nach alleiniger Inkubation der Zellen mit TLC. Daraus lässt sich folgern, dass sich die suppressiven Effekte von TLC und den jeweiligen Kinaseinhibitoren (p38-Inhibitor und JNK-Inhibitor) additiv verhalten. Demnach scheint die TLC-vermittelte TNF- $\alpha$ -Suppression ein Vorgang zu sein, der vom Signalweg dieser MAP-Kinasen unabhängig ist.

## 6. Diskussion

Ziel der vorgelegten Arbeit war die weitere Analyse der suppressiven Effekte hydrophober Gallensäuren auf die Immunfunktion von humanen Makrophagen. Unter cholestatischen Bedingungen sind die Gallensäurespiegel deutlich erhöht und erreichen Werte von bis zu 300  $\mu\text{mol/l}$ .<sup>66</sup> Gallensäuren führen unter diesen Bedingungen zur Verschlechterung der Leberfunktion, in dem sie unter anderem eine hepatozelluläre Apoptose induzieren<sup>59, 60</sup>.

Aus klinischen Untersuchungen ist außerdem bekannt, dass Gallensäuren unter cholestatischen Bedingungen immunsuppressive Effekte vermitteln. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass Gallensäuren durch eine Hemmung der Transformation der Lymphoblasten die Immunfunktion von Lymphozyten unterdrücken.<sup>75</sup> Auch die Phagozytosefähigkeit von Kupffer-Zellen wird unter cholestatischen Bedingungen supprimiert.<sup>74</sup>

Im weiteren Verlauf haben wir uns mit dem Mechanismus befasst, wie Gallensäuren einen immunsuppressiven Effekt auf Makrophagen vermitteln. Exemplarisch wurde dabei TLC untersucht, welcher der Ligand mit der höchsten Affinität zum Gallensalzrezeptor TGR5 ist.<sup>93</sup>

Auf Grund der aktuellen Studienlage wurde ein Zusammenhang zwischen der TLC-induzierten bzw. der TGR5-vermittelten cAMP-Produktion und der LPS-induzierten Zytokinexpression angenommen.<sup>68</sup> Schon 1974 wurde beschrieben, dass cAMP diverse inhibitorische Effekte auf die Immunfunktion hat und dabei die Hypothese aufgestellt, dass cAMP (neben vasoaktiven Hormonen und Entzündungsmediatoren) zur Feinregulation der Immunantwort beiträgt.<sup>94</sup> Die intrazelluläre Konzentration von cAMP wird durch die hydrophobe Gallensäure TLC erhöht, wie zum Beispiel für Cholangiozyten<sup>95</sup> und hier für humane Makrophagen gezeigt wurde<sup>96</sup>. Andere Arbeiten zeigten, dass die Aktivierung des Gallensalzrezeptors TGR5 durch Tauroolithocholat den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration vermittelt,<sup>68, 70, 70, 97, 97, 98</sup> insbesondere konnte dies für die leberspezifischen Makrophagen (Kupffer-Zellen) nachgewiesen werden.<sup>68</sup> Auch wurde die Hypothese aufgestellt, dass die LPS-induzierte Zytokinexpression in Alveolarmakrophagen durch Stimulation des TGR5 und konsekutiver cAMP-Spiegel-Erhöhung gemindert wird.<sup>70</sup>

In der hier vorgelegten Arbeit wurde auf dieser Grundlage der Effekt von cAMP und Gallensäuren auf die Immunfunktion der humanen Makrophagen untersucht. Auch in unserem Fall zeigte sich, dass TLC (wahrscheinlich über den TGR5 vermittelt) zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP führt. Daraufhin wurde die Rolle der PKA bei der Vermittlung dieses Effektes untersucht.

Cyclisches Adenosinmonophosphat kann in der Zelle verschiedene Proteine z.B. diverse Ionenkanäle aktivieren.<sup>99, 100</sup> Das wichtigste Rezeptorprotein für intrazelluläres cAMP ist bei Säugetieren jedoch die Proteinkinase A (auch cAMP-abhängige Kinase<sup>101</sup>) - eine Serin/Threonin-Kinase, die die Immunfunktionen der Zelle vielfach regulieren kann.<sup>89</sup>

Um zu beweisen, dass es sich bei der TLC-vermittelten Suppression der LPS-Antwort in den humanen Makrophagen um Effekte der Proteinkinase A handelt, wurde ein Kinaseinhibitor eingesetzt. Wie Abbildung 7 zeigt, hebt die selektive Inhibition der Proteinkinase A die suppressiven Effekte von TLC auf die mRNA-Expression der Zytokine TNF- $\alpha$  und Interferon- $\beta$  auf. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die inhibierende Wirkung von TLC auf die Immunfunktion humaner Makrophagen in Abhängigkeit der PKA vermittelt wird. Eine Modulation des proinflammatorischen Zytokinprofils durch Erhöhung der PKA-Aktivität ist bereits für murine Makrophagen (RAW 264,7 = *Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*) beschrieben.<sup>102</sup> Die Erhöhung von intrazellulärem cAMP nach Prostaglandin E<sub>2</sub> - Gabe bzw. die Inkubation der Makrophagen mit 8-Br-cAMP bewirkte in dieser Studie eine Suppression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ .<sup>102</sup> Die Hypothese, dass die PKA die Suppression des LPS-induzierten Zytokinprofils mediiert, wurde durch Knock-out der katalytischen Einheit der PKA gestützt.<sup>102</sup> Versuche mit dem Kinaseinhibitor H89 erbrachten an den murinen Makrophagen uneinheitliche Ergebnisse<sup>102</sup>, jedoch ist H89 kein selektiver Inhibitor der PKA. Auch für die TLC-induzierte Zytokinsuppression in Kupffer-Zellen wurde ein TGR5-PKA-abhängiger Signalweg postuliert.<sup>68</sup>

Von weiterführendem Interesse ist nun die Erörterung der Frage, welche Zellvorgänge die aktivierte Proteinkinase A moduliert. Die PKA kann auf verschiedene Arten in Zellvorgänge eingreifen. Wie für T-Lymphozyten gezeigt wurde, moduliert die PKA die Transkriptionsfaktoren CREB (*cAMP response element binding protein*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und NF- $\kappa$ B.<sup>101, 103</sup>

Außerdem wurde eine Interaktion der PKA mit verschiedenen MAP-Kinasen (z.B. p38-Kinase und Erk) nachgewiesen.<sup>101</sup> Im Falle des Transkriptionsfaktors CREB reicht die alleinige Phosphorylierung des Serins 133 durch die PKA aus, um die Assoziation des Coaktivators CBP und die Bindung an CRE-(*cAMP-response-element*)-Regionen des Genoms zu bewirken.<sup>101</sup> Der Transkriptionsfaktor CREB ist an einer Vielzahl von zellphysiologischen Prozessen beteiligt.<sup>104</sup> Von besonderem Interesse ist hier, dass CREB die proinflammatorische Zytokinantwort nach Aktivierung von PRR wie TLR-4 in monozytären Zellen reguliert.<sup>104</sup> Der Ansatzpunkt ist dabei anscheinend die Modulation der Aktivität von NF- $\kappa$ B.<sup>104</sup> Für einige Zielgene benötigt das aktivierte Heterodimer dieses Transkriptionsfaktors (meist RelA/p65-p50<sup>105</sup>) die Interaktion des CBP/p300 mit Serin 276 der p65-Untereinheit, um optimal wirken zu können.<sup>104</sup> Es wurde daher postuliert, dass die immunmodulierende Eigenschaft von aktiviertem CREB in einer Konkurrenz mit dem NF- $\kappa$ B-Komplex um den gemeinsamen Coaktivator CBP/p300 besteht, und CREB so die Expression von Zytokinen reguliert.<sup>104</sup> Eine Erklärung für den immunsuppressiven Effekt von cAMP wäre damit die Reduktion der NF- $\kappa$ B-vermittelten Transkription von Zielgenen, indem das PKA-abhängig aktivierte CREB mit p65 um die physiologischerweise begrenzte Menge an CBP konkurriert.<sup>106</sup>

Ein weiteres Erklärungsmodell liegt in der vermehrten Expression von c-Fos, einer Komponente von AP-1, nach cAMP-Erhöhung.<sup>89</sup> Das c-Fos-Protein tritt in direkte Interaktion mit p65 und verhindert die Bindung des p65:p65-Homodimers an die TNF-Promoter-Region, was den suppressiven Effekt auf die LPS-induzierte Zytokinexpression erklären kann.<sup>89</sup> Eine alternative Möglichkeit, die c-Fos-Konzentration zu erhöhen, besteht in der Phosphorylierung des sehr instabilen Proteins unter anderem über den LPS-IKK $\beta$ -Signalweg.<sup>89</sup>

Zum dritten konnten Wall et al. zeigen, dass 8-Br-cAMP in murinen Makrophagen die LPS-induzierte, nukleäre Translokation des p50-p65-NF- $\kappa$ B-Heterodimers (des quantitativ bedeutendsten Dimers des NF- $\kappa$ B-Komplexes<sup>105</sup>) hemmt.<sup>102</sup> Diese Inhibition der Translokation des aktivierten Komplexes erklärt nach Meinung der Autoren die Unterdrückung von „*early response genes*“ wie TNF- $\alpha$ .<sup>102</sup> Auch in der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Translokation durch Gallensäuren

in humanen Makrophagen gehemmt werden kann.<sup>96</sup> Da p65 ein postuliertes Substrat der PKA ist<sup>107</sup>, wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit auch der Effekt von TLC auf die Phosphorylierung von p65 nach LPS-Inkubation untersucht. In Gegenwart von TLC wird die LPS-vermittelte Phosphorylierung nicht modifiziert (Abb.8). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Befund aus einer anderen Arbeit, in der ebenfalls keine Änderung der Phosphorylierung von p65 bei intrazellulärer Erhöhung von cAMP gefunden wurde.<sup>102</sup>

Weitere Arbeiten deuten daraufhin, dass durch die Behandlung mit Gallensäuren wie auch mit cAMP eine Umprogrammierung von klassisch aktivierten Makrophagen zu regulatorischen Makrophagen stattfindet. Diese sind gekennzeichnet durch eine vermehrte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 bzw. ein erhöhtes Verhältnis von IL-10 zu IL-12.<sup>24, 25</sup> Als Grundlage dieser Effekte kommen dabei die drei oben beschriebenen PKA-abhängigen Prozesse in Betracht.<sup>96</sup>

Es wurden im Rahmen der vorgelegten Arbeit weitere Bestandteile des MyD88-abhängigen Signalweges der TLR-4-Rezeptorkaskade unter TLC-Einfluss untersucht. Die Map-Kinasen p38, c-JNK und Erk wurden als mögliche Signalelemente identifiziert, die zu einem Crosstalk des TLR-4-Signalwegs mit dem cAMP-Weg führen. Wall et al. konnten hohe Phosphorylierungsgrade dieser Kinasen nach LPS-Stimulation nachweisen, jedoch zeigte sich keine Veränderung bei Erhöhung von cAMP durch PGE<sub>2</sub>.<sup>102</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden Inhibitoren der entsprechenden Kinasen eingesetzt und der Effekt auf die Expression von TNF- $\alpha$  in Anwesenheit von TLC untersucht. In unserem Modell konnte die TLC-vermittelte Suppression der TNF- $\alpha$ -mRNA nicht durch die Inhibitoren aufgehoben werden.

Der Inhibitor der Erk hatte keinen signifikanten Effekt auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression, weder mit noch ohne Vorinkubation durch TLC. Daraus lässt sich zum einen schließen, dass die TLC-vermittelte Immunsuppression nicht über diese Kinase mediiert wird. Zum anderen lässt sich sagen, dass die Erk-Kinase an der Kontrolle der TNF- $\alpha$ -Expression in humanen Makrophagen nicht beteiligt zu sein scheint. Man hätte dies zum Beispiel wegen der Interaktion der Erk mit der JNK annehmen dürfen, allerdings scheint die Hauptaufgabe der Erk eher in Zellprozessen wie Differenzierung und Proliferation zu liegen<sup>108</sup>.

Der Einsatz der Inhibitoren der p38-MAP-Kinase und der JNK führte jeweils zu einer signifikanten Verminderung der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionsrate, und zwar sowohl mit als auch ohne TLC-Vorinkubation. Würde die TNF- $\alpha$ -Suppression durch TLC über eine dieser beiden Kinasen signalisiert, hätte der Kinaseinhibitor die Verminderung der Zytokinexpressionsrate durch die Gallensäure verhindern müssen. Die dargestellten Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass mehrere additiv wirksame Faktoren die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression hemmen. Diese Beobachtung ist vereinbar mit dem Wissen, dass sowohl die p38-MAP-Kinase (u.a. über Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und mRNA-Stabilisierung) als auch die JNK (über Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1) die Produktion von TNF- $\alpha$  induzieren.<sup>109</sup>

Da sowohl ein inhibierender Einfluss von TLC auf die LPS-induzierte Expression von Interferon- $\beta$ -mRNA als auch eine verminderte Expression der Proteine PKR und MxA gezeigt werden konnten, wurde zunächst der Phosphorylierungsgrad von IRF3 als Element des MyD88-unabhängigen Signalweges untersucht. Es zeigte sich jedoch keine Beeinflussung der LPS-induzierten Phosphorylierung durch TLC-Vorinkubation.

Als nächstes wurde der Einfluss von TLC auf die Phosphorylierung der STAT-Proteine 1 und 3 untersucht. Die Typ-I-Interferone sind Aktivatoren der STAT-Proteine, wobei die Rekrutierung von STAT 3 am geringsten ausgeprägt bzw. nur transient vorhanden ist.<sup>110</sup> Dabei wird die Aktivierung der STAT-Proteine 1 und 3 häufig durch dieselben Liganden ausgelöst, jedoch wirkt STAT 1 direkt sowie indirekt proinflammatorisch während STAT 3 auch antiinflammatorische Effekte hat.<sup>110</sup> Es konnte keine Inhibition der LPS-vermittelten Phosphorylierung der STAT-Proteine durch TLC-Vorinkubation beobachtet werden. Die Beobachtung, dass TLC sowohl die LPS-induzierte Expression von IFN- $\beta$  als auch MxA und PKR supprimiert, lässt auf einen Zusammenhang schließen. Die ISG-Produkte MxA und PKR unterliegen der Regulation durch die STAT-Proteine<sup>50</sup>, sodass hier eine Regulation dieser Proteine durch Phosphorylierung postuliert wurde. Es gibt allerdings mehrere Möglichkeiten der Regulation im IFN-STAT-Signalweg.

Als Feedbackregulatoren des Jak-STAT-Signalweges dienen zum einem die SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signaling*) - synonym SSI (*STAT-induced STAT-Inhibitors*). Die SOCS-Proteine binden an die Jak-Kinasen, was

die Phosphorylierung und damit die nukleäre Translokation der STAT-Proteine verhindert.<sup>50</sup>

Weiterhin können zwei Mitglieder der PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*)-Familie, PIAS 1 und 3, den STAT-Signalweg regulieren.<sup>50</sup> IFN- oder IL-6-induziert assoziieren diese direkt mit STAT 1 und 3 und verhindern die Translokation.<sup>50</sup>

Eine weitere Möglichkeit zur Unterbrechung des Signalweges besteht in der Dephosphorylierung der Janus-Kinasen durch die Tyrosinphosphatase SHP-1.<sup>50</sup>

In der Summe bestehen demnach mehrere mögliche Ansätze zur Erklärung eines reduzierten MxA/ PKR-Expression (bei gleichbleibendem Phosphorylierungsgrad der Transkriptionsfaktoren).

Die Beobachtung, dass die LPS-induzierte STAT-3-Phosphorylierung nicht durch Gallensäuren gehemmt wurde, unterstützt hingegen die Überlegung, dass die immunsuppressive Funktion von Gallensäuren hauptsächlich in der Umprogrammierung zu regulatorischen Makrophagen bestehen könnte. Die LPS-abhängige Produktion von IL-10 wird über IFN- $\beta$  vermittelt und bewirkt die Aktivierung von STAT-3.<sup>111</sup> Inkubation mit hydrophoben Gallensäuren supprimiert zwar IFN- $\beta$ , nicht aber die IL-10-Produktion.<sup>96</sup> Daraufhin wurde der Schluss gezogen, dass Gallensäuren eine Interferon- $\beta$ -unabhängige Induktion von IL-10 bewirkt und zwar am ehesten über eine direkte Aktivierung von CREB (mit seinem Zielgen IL-10) durch die Gallensäuren.<sup>96</sup>

Der suppressive Effekt von immunologischen Prozessen durch hydrophobe Gallensäuren ist wie oben gezeigt komplex und bedarf der weiteren Erforschung. Vor dem klinischen Hintergrund von z.B. der Interferon-Therapie bei Hepatitiden ist dies sicherlich von hoher Relevanz.

## Literaturverzeichnis

1. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
2. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 1998; 10(5):349-350.
3. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258):50-53.
4. Murphy K, Travers P, Walport M. Die angeborene Immunität. *Janeway Immunologie*. 7 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009 p. 53-139.
5. Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(5):985-992.
6. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:335-376.
7. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640):394-397.
8. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 2007; 76:141-165.
9. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1):20-26.
10. Beutler B. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3(1):23-28.
11. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 2006; 75:39-68.
12. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008; 48(1):322-335.
13. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(2):240-73, Table.
14. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; 300(5625):1524-1525.
15. Deleault KM, Skinner SJ, Brooks SA. Tristetraprolin regulates TNF TNF- $\alpha$  mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Mol Immunol* 2008; 45(1):13-24.

16. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C et al. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000; 103(7):1071-1083.
17. Fan J, Heller NM, Gorospe M, Atasoy U, Stellato C. The role of post-transcriptional regulation in chemokine gene expression in inflammation and allergy. *Eur Respir J* 2005; 26(5):933-947.
18. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7):499-511.
19. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13(2):85-94.
20. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:451-483.
21. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010; 327(5966):656-661.
22. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol* 2008; 15:118-146.
23. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(12):953-964.
24. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(12):958-969.
25. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006; 80(6):1298-1307.
26. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* 2008; 214(2):161-178.
27. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81(1):1-5.
28. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23:435-461.
29. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 2007; 219:143-156.
30. Heine H, Lien E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130(3):180-192.
31. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623.

32. Bogdan C, Rollingshoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1):64-76.
33. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232(1-2):3-14.
34. Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:655-677.
35. Laskin DL, Laskin JD. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. *Toxicology* 2001; 160(1-3):111-118.
36. Levi M, van der PT. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 2010; 38(2 Suppl):S26-S34.
37. Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2(1):99-105.
38. Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104(1):27-38.
39. Kaufmann SH, Schaible UE. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(1):79-87.
40. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343(5):338-344.
41. Ma J, Chen T, Mandelin J et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(11):2334-2346.
42. Makela SM, Strengell M, Pietila TE, Osterlund P, Julkunen I. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2009; 85(4):664-672.
43. Cairns CB, Panacek EA, Harken AH, Banerjee A. Bench to bedside: tumor necrosis factor-alpha: from inflammation to resuscitation. *Acad Emerg Med* 2000; 7(8):930-941.
44. Dellinger RP. Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis* 2003; 36(10):1259-1265.
45. Okajima K. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol Rev* 2001; 184:258-274.
46. Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(4):419-424.

47. Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* 2005; 15(6):407-422.
48. Haller O, Gao S, von der MA, Daumke O, Kochs G. Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J Biol Chem* 2010; 285(37):28419-28424.
49. Jatiani SS, Mittal R. Expression of the antiviral protein MxA in cells transiently perturbs endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323(2):541-546.
50. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4):778-809, table.
51. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006; 7(2):131-137.
52. Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* 2006; 22(5):561-569.
53. Pietras EM, Saha SK, Cheng G. The interferon response to bacterial and viral infections. *J Endotoxin Res* 2006; 12(4):246-250.
54. Bode JG, Brenndorfer ED, Haussinger D. Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol Chem* 2008; 389(10):1283-1298.
55. Jüngst C, Lammert F. Physiologie und Pathophysiologie des Gallensäurestoffwechsels und der Gallesekretion. In: Riemann JF, Fischbach W, Galle PR, Mössner J, editors. *Gastroenterologie: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Band 2*. 1 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2008.
56. Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol* 2009; 51(3):565-580.
57. Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 2006; 25(7):1419-1425.
58. Hofmann AF. Cholestatic liver disease: pathophysiology and therapeutic options. *Liver* 2002; 22 Suppl 2:14-19.
59. Reinehr R, Graf D, Haussinger D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 2003; 125(3):839-853.
60. Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Haussinger D. Tauroolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 2002; 122(5):1411-1427.

61. Graf D, Kohlmann C, Haselow K, Gehrman T, Bode JG, Haussinger D. Bile acids inhibit interleukin-6 signaling via gp130 receptor-dependent and -independent pathways in rat liver. *Hepatology* 2006; 44(5):1206-1217.
62. Maillette de Buy WL, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis* 2010; 42(6):409-418.
63. Gumprich E, Devereaux MW, Dahl R et al. Resistance of young rat hepatic mitochondria to bile acid-induced permeability transition: potential role of alpha-tocopherol. *Pediatr Res* 2008; 64(5):498-504.
64. Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM, Jr. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 1995; 109(4):1249-1256.
65. Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36(4):231-242.
66. Neale G, Lewis B, Weaver V, Panveliwalla D. Serum bile acids in liver disease. *Gut* 1971; 12(2):145-152.
67. Keitel V, Kubitz R, Haussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* 2008; 14(37):5620-5629.
68. Keitel V, Donner M, Winandy S, Kubitz R, Haussinger D. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(1):78-84.
69. Watanabe M, Houten SM, Matakai C et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006; 439(7075):484-489.
70. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9435-9440.
71. Sommerfeld A, Reinehr R, Haussinger D. Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis. *J Biol Chem* 2009; 284(33):22173-22183.
72. Stross C, Helmer A, Weissenberger K et al. Protein kinase C induces endocytosis of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299(2):G320-G328.
73. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(8):678-693.
74. Drivas G, James O, Wardle N. Study of reticuloendothelial phagocytic capacity in patients with cholestasis. *Br Med J* 1976; 1(6025):1568-1569.

75. Keane RM, Gadacz TR, Munster AM, Birmingham W, Winchurch RA. Impairment of human lymphocyte function by bile salts. *Surgery* 1984; 95(4):439-443.
76. Greve JW, Gouma DJ, Buurman WA. Bile acids inhibit endotoxin-induced release of tumor necrosis factor by monocytes: an in vitro study. *Hepatology* 1989; 10(4):454-458.
77. Zeuzem S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* 2004; 140(5):370-381.
78. Jorquera F, Monte MJ, Guerra J et al. Usefulness of combined measurement of serum bile acids and ferritin as additional prognostic markers to predict failure to reach sustained response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20(4):547-554.
79. Serfaty L, Giral P, Loria A, Andreani T, Legendre C, Poupon R. Factors predictive of the response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 21(1):12-17.
80. Graf D, Haselow K, Munks I, Bode JG, Haussinger D. Inhibition of interferon-alpha-induced signaling by hyperosmolarity and hydrophobic bile acids. *Biol Chem* 2010; 391(10):1175-1187.
81. Podevin P, Blanc MC, Vaubourdolle M, Veyrunes C, Bonnefis MT, Poupon R. Bile acid inhibition of interferon activity in human lymphocytes: no evidence of oxidative stress. *Eur J Clin Invest* 1997; 27(6):491-496.
82. Podevin P, Calmus Y, Bonnefis MT, Veyrunes C, Chereau C, Poupon R. Effect of cholestasis and bile acids on interferon-induced 2',5'-adenylate synthetase and NK cell activities. *Gastroenterology* 1995; 108(4):1192-1198.
83. Podevin P, Rosmorduc O, Conti F, Calmus Y, Meier PJ, Poupon R. Bile acids modulate the interferon signalling pathway. *Hepatology* 1999; 29(6):1840-1847.
84. Correia L, Podevin P, Borderie D et al. Effects of bile acids on the humoral immune response: a mechanistic approach. *Life Sci* 2001; 69(20):2337-2348.
85. Calmus Y, Podevin P, Robert A, Poupon R. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on expression of procoagulant activity by human monocytes. *J Hepatol* 1994; 20(4):466-472.
86. Yoshimura T, Kurita C, Nagao T et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1-beta production by beta-adrenoceptor agonists from lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacology* 1997; 54(3):144-152.

87. Dent G, Giembycz MA, Rabe KF, Wolf B, Barnes PJ, Magnussen H. Theophylline suppresses human alveolar macrophage respiratory burst through phosphodiesterase inhibition. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10(5):565-572.
88. Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 2004; 173(1):559-565.
89. Koga K, Takaesu G, Yoshida R et al. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity* 2009; 30(3):372-383.
90. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999; 10(1):39-49.
91. Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:145-174.
92. Zhang T, Feng Q. Nitric oxide and calcium signaling regulate myocardial tumor necrosis factor- $\alpha$  expression and cardiac function in sepsis. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88(2):92-104.
93. Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, Cipriani S. Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30(11):570-580.
94. Bourne HR, Lichtenstein LM, Melmon KL, Henney CS, Weinstein Y, Shearer GM. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science* 1974; 184(132):19-28.
95. Alpini G, Glaser S, Robertson W et al. Bile acids stimulate proliferative and secretory events in large but not small cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997; 273(2 Pt 1):G518-G529.
96. Haselow K, Bode JG, Wammers M et al. Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages. *J Leukoc Biol* 2013.
97. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298(5):714-719.
98. Keitel V, Reinehr R, Gatsios P et al. The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 2007; 45(3):695-704.
99. Nakamura T, Gold GH. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 1987; 325(6103):442-444.

100. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 1991; 351(6322):145-147.
101. Torgersen KM, Vang T, Abrahamsen H, Yaqub S, Tasken K. Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cell Signal* 2002; 14(1):1-9.
102. Wall EA, Zavzavadjian JR, Chang MS et al. Suppression of LPS-induced TNF-alpha production in macrophages by cAMP is mediated by PKA-AKAP95-p105. *Sci Signal* 2009; 2(75):ra28.
103. Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP, Yamada H, Boumpas DT. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R alpha gene expression at multiple levels. *J Immunol* 1992; 148(9):2845-2852.
104. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* 2010; 185(11):6413-6419.
105. Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an I kappa B alpha/NF-kappa B complex. *Cell* 1998; 95(6):749-758.
106. Parry GC, Mackman N. Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappa B-mediated transcription. *J Immunol* 1997; 159(11):5450-5456.
107. Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF-kappa B is regulated by the I kappa B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 1997; 89(3):413-424.
108. Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(12):2707-2719.
109. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1754(1-2):253-262.
110. Regis G, Pensa S, Boselli D, Novelli F, Poli V. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(4):351-359.
111. Chang EY, Guo B, Doyle SE, Cheng G. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol* 2007; 178(11):6705-6709.

## **Anhang**

### **Danksagung**

Als erstes bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger für die großzügige Überlassung des sehr interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, unter den hervorragenden Bedingungen in seinem Institut arbeiten zu dürfen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Privatdozent Dr. Dirk Graf für seine intensive Betreuung, die anregenden Diskussionen und die freundliche Unterstützung während der Dissertation.

Frau Dr. rer. nat. Katrin Haselow danke ich dafür, dass sie mir bei allen Belangen fachlicher und organisatorischer Art kompetent zur Seite stand.

Für ihre Unterstützung und die freundliche Atmosphäre im Labor möchte ich ferner Frau Annette Tries und Frau Diplom-Biologin Anna-Katrin Schupp meinen Dank aussprechen.

Die gute Stimmung im Labor und diverse Kuchenpausen haben mich oft Rückschläge besser verkraften lassen. Dafür danke ich jedem Mitarbeiter dieser und anderer Arbeitsgruppen.

Dann möchte ich noch meiner Familie danken, vor allem denen, die großen Anteil an all meinen Leistungen haben, sie aber nicht mehr erleben können. Besonders danke ich dabei meiner geduldigen Schwester Lisa. Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

19.05.2014, Laura Johanna Elisabeth Kleinebrecht