Einfluss mikrobieller und pflanzlicher Bestandteile auf das angeborene Immunsystem im Kontext inflammatorischer Prozesse

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Humanbiologe Patrick Schopohl

Berlin, 2015

Die folgende Dissertation wurde am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias F. Melzig angefertigt. Die theoretischen und praktischen Arbeiten erfolgten im Zeitraum von Januar 2012 bis März 2015.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig
2. Gutachter: PD Dr. Gerhard Bader

Disputation am: 19.06.2015

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre ohne die Unterstützung, Geduld und den Beistand einer Vielzahl von Personen nicht möglich gewesen. Im Folgenden möchte ich mich bei diesen Menschen von ganzem Herzen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig, der mir die Möglichkeit gegeben hat an einem derart interessanten Thema zu forschen und meine Dissertation selbstständig und selbstorganisiert in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Seine Zuversicht in meine Fähigkeit hat mich auch in schwierigen Zeiten stets unterstützt und seine fachlichen Anregungen sowie stete Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Günther Weindl danke ich vor allem für die Anleitung und Möglichkeit zur Durchführung der RT-qPCR Experimente in seiner Arbeitsgruppe.

Ich danke auch Herrn Paul Grüneberg für die Anfertigung der dünnschichtchromatographischen Arbeiten sowie bei der tatkräftigen Unterstützung der pflanzlichen Naturstoffexperimente.

Auch Frau Diana Blauert danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Bewältigung der schier endlos erscheinenden Menge an ELISAs.

Der gesamten Arbeitsgruppe Melzig danke ich für die vielen schönen Momente. Neben dem wissenschaftlichen und häufig auch nicht-wissenschaftlichen Austausch werde ich auch die vielen Momente und Aktivitäten außerhalb des Laboralltags in liebevoller Erinnerung behalten.

Auch der Arbeitsgruppe Weindl danke ich für die vielen schönen Momente und herzlichen Gespräche, die vor allem auf persönlicher Ebene einen bleibenden Eindruck hinterlassen haben.

In besonderem Maße danke ich Emi, deren Glaube an mich stets unerschütterlich war und die mich in Zeiten der Verzweiflung voller Liebe und Vertrauen motiviert hat weiter zu machen

Vor allem danke ich meinen Eltern, die mich bereits mein gesamtes Leben unterstützen und in den vielen Momenten der emotionalen Krisen stets zu mir gehalten haben. Euer liebevolles Grundvertrauen, der intellektuelle Austausch und die vielen schönen Momente haben mein Leben extrem bereichert.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung ..... **I**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Das angeborene Immunsystem **1**

1.1.1 Grundlagen zum angeborenen Immunsystem 1

1.1.2 Rezeptoren, Transduktoren und Effektoren 3

1.1.2.1 Tumor Nekrose Faktor Alpha 3

1.1.2.2 Interferon γ 4

1.1.2.3 Toll-like Rezeptoren 5

1.1.2.4 Nuclear Factor κ B 6

1.1.2.5 Proteinkinase C 6

1.1.2.6 Lysozym 7

1.1.3 Monozyten und Makrophagen: Eradikatoren und Modulatoren 8

1.1.4 Rollen, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten 11

1.2 Modulatoren des angeborenen Immunsystems **13**

1.2.1 Immunmodulatoren mikrobieller Herkunft 13

1.2.2 Immunmodulatoren pflanzlicher Herkunft 15

1.2.2.1 Iridoide und ihr Einfluss auf das Immunsystem 15

1.2.2.2 Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid 17

2 Zielsetzung **19**

3 Material & Methoden **20**

3.1 Material **20**

3.1.1 Allgemeine Geräte 20

3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien 21

3.1.3 Dünnschichtchromatographie 22

3.1.3.1 Substanzen 22

3.1.3.2 Puffer und Lösungen 22

3.1.4 Zellkultur und -analytik 23

3.1.4.1 Chemikalien, Proteine und Substanzen 23

3.1.4.2 Puffer und Lösungen 24

3.1.4.3 Stimulanzien: Synthetische TLR-Agonisten 25
3.1.4.4 Stimulanzien: Mikrobielle Präparationen 25
3.1.4.5 Stimulanzien: Pflanzliche Naturstoffe 28
3.1.4.6 Verwendete Primer 28
3.2 Methoden 30
3.2.1 Dünnschichtchromatographie 30
3.2.2 Zellkultur 31
3.2.2.1 Auftauen und Einfrieren von THP-1 Zellen 31
3.2.2.2 Kultivierung und Passagieren von THP-1 Zellen 31
3.2.2.3 Stimulationsprotokolle 31
3.2.2.4 Ernte 33
3.2.3 ELISA und Lysozymaktivitätsmessung 33
3.2.4 RT-qPCR 33
3.2.4.1 Quantifizierung der Zielgene 34
3.2.4.2 RNA-Extraktion 34
3.2.4.3 cDNA-Synthese 35
3.2.4.4 qPCR 35
3.2.5 XTT-Zellviabilitätstest 35
3.2.6 Statistische Verfahren 36

4 Ergebnisse 37
4.1 Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Proteine in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen 37
4.1.1 Einfluss von PMA, IFNγ und LPS auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität 37
4.1.2 Einfluss synthetischer TLR-Agonisten auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität 40
4.1.3 Einfluss mikrobieller Präparationen auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität 43
4.1.4 Einfluss mikrobieller Präparationen auf die Expression von IL-1α, IL-6 und IL-10 .. 47
4.1.5 Einfluss von LPS auf die Aktivierbarkeit von THP-1 Zellen durch Pilzpräparationen 49
4.2 Beeinflussung der TNFα-Sekretion durch verschiedene Naturstoffe pflanzlichen Ursprungs 51
4.2.1 Spaltung der Iridoidglykoside in ihre Aglyka 51
4.2.2 Beeinflussung der Zellviabilität durch Iridoidglykoside und ihre Aglyka 54
4.2.3 Beeinflussung der TNFα-Sekretion durch Iridoidglycoside und ihre Aglyka 57

4.2.4 Beeinflussung der TNFα-Sekretion durch Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid 61

4.3 Änderungen in der mRNA-Expression von Zelladhäsionsmolekülen im Kontext einer gesetzten Entzündung 63

4.3.1 Änderung der mRNA-Expression von Zelladhäsionsmolekülen nach Stimulation mit IFNγ und synthetischen TLR-Agonisten 63

4.3.2 Änderung der mRNA-Expression von Zelladhäsionsmolekülen nach Stimulation mit IFNγ und mikrobiellen Präparationen 68

4.3.3 Zeitlicher Verlauf der mRNA-Expression durch Stimulation mit IFNγ und synthetischen TLR-Agonisten 73

4.4 Einfluss pflanzlicher Naturstoffe auf die IFNγ und LPS induzierte mRNA-Expression in THP-1 Zellen 75

4.4.1 Einfluss von Aconitin auf die IFNγ und LPS induzierte mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen 75

4.4.2 Einfluss von Harpagosid auf die IFNγ und LPS induzierte mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen 76

4.4.3 Einfluss von Harpagid auf die IFNγ und LPS induzierte mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen 77

5 Diskussion 84

5.1 Regulation der Entzündungsreaktion in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 durch IFNγ und synthetische TLR-Agonisten 84

5.1.1 Etablierung eines reproduzierbaren Protokoll für die stabile Differenzierung humaner THP-1 Zellen in makrophagenähnliche Zellen 84

5.1.2 Einfluss von IFNγ und synthetischer TLR-Agonisten auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität 85

5.1.3 Einfluss von IFNγ und synthetischer TLR-Agonisten auf die mRNA-Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle 89

5.1.4 Schlussfolgerung zum Einfluss von IFNγ und synthetischer TLR-Agonisten auf die TNFα-Sekretion und mRNA-Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle in humanen THP-1 Zellen 91

5.2 Einfluss pflanzlicher Naturstoffe im Kontext bakterieller Entzündungen 92

5.2.1 Einfluss von pH und β-Glukosidase auf die pflanzlichen Iridoidglykoside Aucubin, Catalpol, Harpagosid und Harpagid 92

5.2.2 Immunmodulatorische Effekte der pflanzlichen Iridoidglykoside Aucubin, Catalpol, Harpagosid und Harpagid in humanen THP-1 Zellen 94

5.2.3 Immunmodulatorische Effekte von Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid 97
5.2.4 Schlussfolgerung zum Einfluss pflanzlicher Naturstoffe im Kontext bakterieller Entzündungen 98
5.3 Pilz- und Bakterienpräparationen im Kontext des angeborenen Immunsystems 100
5.3.1 Zytokinsekretion durch Stimulation mit IFNγ und Pilz- und Bakterienpräparationen 100
5.3.2 Makrophagenpolarisation durch die Stimulation mit Bakterienpräparationen 103
5.3.3 Schlussfolgerung zum Einfluss von IFNγ und verschiedener Pilz- und Bakterienpräparationen auf die Makrophagenpolarisation in humanen THP-1 Zellen 104

6 Zusammenfassung 106
Abstract 107

7 Ausblick 108

Literaturverzeichnis VIII
Abbildungsverzeichnis XV
Tabellenverzeichnis XVI
Publikationsverzeichnis XVII
Anhang XVIII
Lebenslauf XXVIII
Eidestattliche Erklärung XXX

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	activator protein 1
APC	antigen-presenting cell
BMDCs	bone marrow-derived myeloid dendritic cells
CD	cluster of differentiation
cDC	classical denditric cells
C/EBPα, β und ε	CCAAT enhancer binding proteins alpha, beta and epsilon
COX-1/-2	Cyclooxygenase-1/-2
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESL-1	E-selectin ligand 1
evc.	e vouluminae cellulae
evemc.	extractum e voluminae ex muris cellulae
extr.	extractum
FADD	fas-associated protein with death domain
FBS	fetal bovine serum
GEMM-CFU	granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-macrophage colony forming unit
GFI1	growth-factor independent 1
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H_2O_{bid}	aqua bidestilata
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFNγ	Interferon gamma
IκB	inhibitor of κB
IKK	IκB-Kinasekomplex
IL	Interleukin
IRF8	INFγ regulatory factor 8
k.A.	keine Abbildung
LFA4	leukocyte function associated antigen 4

LPS	Lipopolysaccharid
MAC-1	macrophage receptor 1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
NF-κB	nuclear factor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
iNOS	inducible NO-synthase
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-13-myristat-12-acetat
PRR	pattern recognition receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PU.1	PU-box binding protein 1
RIP	receptor interacting protein
RNA	ribonucleic acid
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	reverse transcriptase
SCL	stem cell leukemia factor
SOCS	suppressor of cytokine activation
STAT	signal transducer and activator of transcription
TACE	tumor necrosis factor-alpha converting enzyme
TGFβ	tumor growth factor beta
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
VCAM-1	vascular adhesion molecule 1
VLA	very late antigen
w/	mit
w/o	ohne

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

1.1.1 Grundlagen zum angeborenen Immunsystem

Im Kontext des Kosmos erscheinen Zeit, Raum und die dadurch erdenkliche Vielfalt unendlich zu sein, dennoch empfinden wir das Leben auf unserem Planeten als einzigartig in seiner Diversität und Komplexität. Aufgrund der Artenvielfalt, des breiten ökologischen Spektrums und der räumlichen Begrenzung, haben die unterschiedlichen Lebensformen des Planeten Erde eine Vielzahl von Strategien entwickelt, die das Überleben des Individuums und ihrer Art gewährleisten soll. Die in diesem Rahmen entstandenen ökologischen Beziehungen sind dabei geprägt von Symbiose, Konkurrenz und Parasitismus. Und auch der Mensch, der wie kein anderes Lebewesen gelernt hat die Welt in seinem Sinne zu gestalten, ist mit einer großen Anzahl an Organismen und Pathogenen konfrontiert, welche die Existenz des Individuums gefährden. Eine der Strategien, sich krankmachender Pathogene zu erwehren, war die phylogenetisch bereits früh einsetzende Entwicklung eines Immunsystems.

Unter dem menschlichen Immunsystem verstehen wir die funktionelle Einheit körpereigener Strukturen, die das Eindringen pathogener Fremdpartikel und ihre Ausbreitung innerhalb des Organismus erschweren und bei der Wiederherstellung der Homöostase vorrangig beteiligt sind. Historisch betrachtet wird das Immunsystem in einen angeborenen Anteil und einen erworbenen Anteil gegliedert. Und obwohl die stetig wachsenden Erkenntnisse der Wissenschaft die ursprünglich gezogenen Grenzen zunehmend mehr in Frage stellen, sind sie weiterhin ein hilfreiches Mittel zur Orientierung in der schier grenzenlosen Komplexität des Organismus.

Zum angeborenen Immunsystem gehören vor allem jene Körperstrukturen, die unmittelbar und ohne vorherige genomische Neuorganisierung wirksam Pathogenen entgegenwirken können. Darunter fallen die physikalischen Barrieren, wie die über feste Verbindungen verknüpften Epithelien der äußeren und inneren Organe, aber auch die chemischen Barrieren, wie beispielsweise die pH-Extrema des Verdauungstrakts und spezifischer intrazellulärer Kompartimente. Des Weiteren zählen verschiedene lösliche Bestandteile zum angeborenen Immunsystem, wie beispielsweise das Komplementsystem, dessen Bindung an körperfremde Strukturen als Opsonisierung, also „Schmackhaftmachen“, bezeichnet wird und somit die Phagozytose durch Makrophagen oder Granulozyten stimuliert (Sarma and Ward 2011), aber auch die Vielzahl von Zytokinen, die neben Wachstum und Differenzierung auch für die Aktivierung und Inaktivierung verschiedenster Funktionen der zellulären Immunantwort essentiell sind (Banyer et al. 2000; Chaplin 2010).

Zirkulierende und ortständige immunkompetente Zellen spielen sowohl bei der Organisation der Immunantwort als auch bei der direkten Beseitigung pathogener Strukturen eine entscheidende Rolle. Gemeinsame Vorläuferzelle aller zellulären Blutbestandteile ist die pluripotente hämatopoetische Stammzelle, die sich sowohl in Vorläuferzellen vom lymphoiden Typ als auch vom myeloiden Typ differenzieren kann (Chaplin 2010). Lymphoide Vorläuferzellen können dann, entsprechend des sie umgebenden Milieus, in Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie B- und T-Lymphozyten differenzieren, wobei Letztere zum erworbenen Immunsystem zu zählen sind. Die myeloide Vorläuferzelle hingegen ermöglicht die Differenzierung in eine Vielzahl von verschiedenen Zellpopulationen. So führt die Gegenwart von IL-1, IL-3 und/oder IL-6 zur Differenzierung myeloider Vorläuferzellen in Granulozyten-Erythrozyten-Megakaryozyten-Makrophagen kolonieformende Einheiten (GEMM-CFU), die sich wiederum in Gegenwart von IL-3 und GM-CSF *(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor),* sowie M-CSF *(macrophage colony-stimulating factor)* zu Monozyten und Makrophagen differenzieren können (Valledor et al. 1998), auf denen auch der Fokus der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit lag.

Neben den Epithelien, den schleimproduzierenden Zellen des Gastrointestinaltrakts, den säureproduzierenden Zellen des Magens und den zellulären Blutbestandteilen, spielen jedoch auch die an der Thermoregulation beteiligten Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems, durch direkte und indirekte Inaktivierung pathogener Strukturen, eine wesentliche Rolle bei der Eradikation pathogener Strukturen und der Aufrechterhaltung der Homöostase (Nakamura 2011; Xiao et al. 2011). Und obwohl die Bedeutung der Psyche im Kontext der Psychoneuroimmunologie zunehmend mehr als wesentliche regulatorische Komponente unseres Immunsystems erkannt wird, ist sie doch eher dem erworbenen Immunsystem zuzuordnen. Beide Prinzipien werden bei der Betrachtung des Immunsystems häufig vernachlässigt, daher sollen sie zwar Erwähnung finden, jedoch nicht expliziter Bestandteil dieser Arbeit sein.

1.1.2 Rezeptoren, Transduktoren und Effektoren

Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in reife, immunkompetente Zellen, sowie ihre spätere Aktivierung und Regulation hängen von einer Vielzahl verschiedener Proteine, wie Transkriptionsfaktoren, Membranrezeptoren, Zytokinen und Wachstumsfaktoren ab, deren Expression und Sekretion in einem komplex organisierten, intra- und interzellulären Zusammenspiel erfolgt (Valledor et al. 1998; Martinez et al. 2006). Im Folgenden werden die für die Dissertation relevanten Proteine genauer betrachtet.

1.1.2.1 *Tumor Nekrose Faktor Alpha*

Tumor Nekrose Faktor alpha (TNFα) wurde im Jahr 1975 als Endotoxin-induziertes Glykoprotein identifiziert, welches zur Nekrose verschiedener Tumerzelllinien, sowie in Mäuse transplantierter Tumore führte (Carswell et al. 1975). TNFα wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen synthetisiert, aber auch eine Reihe weiterer Zellen ist zur Bildung von TNFα fähig; zu ihnen zählen B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen, Neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Mastzellen, Muskelzellen, Fibroblasten und Osteoklasten (Bradley 2008). TNFα scheint somit einer der zentralen Mediatoren der Immunantwort zu sein.

Posttranslationär liegt TNFα als membranständiges, jedoch bereits aktives Pro-Peptid vor und ist somit bezüglich seines Wirkungsradius auf benachbarte Zellen beschränkt. Erst die extrazelluläre Spaltung durch Matrix Metalloproteasen, wie beispielsweise TACE *(tumor necrosis factor-alpha converting enzyme)*, überführt TNFα in seine lösliche Form, wodurch eine systemische Verfügbarkeit gewährleistet wird und auch weiter entfernte Zellpopulationen stimuliert werden können (Mohan et al. 2002). Die Bindung von aktiven TNFα-Trimeren an einen der zwei membranständigen TNFα-Rezeptoren (TNFR) führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden die eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Apoptose, Differenzierung und die Regulierung entzündlicher Prozesse beeinflussen (Black et al. 1997). So führt die Rekrutierung der TNFR-assoziierten Moleküle TRADD *(tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein),* RIP *(receptor interacting protein)* und FADD *(Fas-associated protein with death domain)* zum einen zur Aktivierung der pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF-κB *(nuclear factor kappa B)* und AP-1 *(activator protein 1)*, zum anderen jedoch auch zur Aktivierung apoptoseinduzierende Caspasen, wie beispielsweise Caspase-8 (Li and Lin 2008). Die Entscheidung hinsichtlich Überleben oder Apoptose der Zelle ist somit stark Abhängig von weiteren regulatorischen Mechanismen.

TNFα wird klassisch als pro-inflammatorisches Zytokin betrachtet, dessen physiologische Aufgabe unter anderem darin besteht die Immunantwort bei bakteriellen Infektionen zu ver-

stärken. Fehlregulierte oder exzessive TNFα-Aktivität kann jedoch schädlich sein und ist bei der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener entzündlicher Erkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis, Spondylitis Ankylosa und der Psoriasis Arthritis involviert (Voulgari 2010). Aber auch bei entzündlichen Erkrankungen des Verdauungs- und Respirationstrakts, sowie kardiovaskulären und renalen Erkrankungen spielt TNFα eine wesentliche Rolle, wie erhöhte TNFα-Gewebs- und Serumkonzentrationen und eine relativ gute Ansprechbarkeit der Erkrankungen auf TNFα-Inhibitoren zeigen (Bradley 2008). Die Wirkung von TNFα ist dabei vielfältig. So fördert TNFα die Induktion der Cyclooxigenase-2 in Endothelzellen, wodurch die Bildung von vasodilatorischem PGE_2 stimuliert wird und die für Entzündungen typische Erwärmung, Rötung und Schwellung entstehen (Mark et al. 2001). Darüber hinaus stimuliert es die Rekrutierung weiterer Leukozyten zum Ort der Entzündung, indem es die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie E-Selektin, Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) auf Endothelzellen induziert (Zhang et al. 2002; Bernot et al. 2005).

Der Einfluss von TNFα auf die Entstehung und den Verlauf lokaler und systemischer Entzündungen ist immens und die Identifikation spezifischer, gut verträglicher Inhibitoren von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TNFα-Expression und –Sekretion als Indikator verwendet, mit dessen Hilfe die Aktivität von IFNγ in Kombination mit synthetischen TLR-Agonisten beziehungsweise mikrobiellen Präparationen im Zellmodell untersucht werden sollte. Des Weiteren diente sie unter anderem als Maßstab für den Einfluss verschiedener pflanzlicher Substanzen auf die Aktivierbarkeit und den Verlauf einer IFNγ- und TLR-Agonist-induzierten Entzündung im Kontext des angeborenen Immunsystems.

1.1.2.2 ***Interferon γ***

Interferone, ursprünglich *macrophage activating factor* – MAF genannt, werden entsprechend ihrer Rezeptorspezifität und Sequenzhomologie in zwei Klassen unterteilt: Typ I – Interferone, zu denen die Subtypen Interferon (IFN) α, β, ω und τ gehören und Typ II – Interferone, die als einzigen Vertreter IFNγ haben. Im Gegensatz zu Typ I – Interferonen, die zumindest in niedrigen Konzentrationen von nahezu allen Zellen sekretiert werden, wird IFNγ hauptsächlich von immunkompetenten Zellen produziert. So bilden Makrophagen, NK-Zellen und im späteren Verlauf auch in T-Lymphozyten vor allem nach Stimulation mit den Interleukinen (IL)-12 und -18, zwei Zytokinen, die speziell im Kontext bakterieller Infektionen vorrangig von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) gebildet werden, das Typ II – Interferon IFNγ (Kolb-Mäurer et al. 2003; Schroder et al. 2004).

Die Stimulation des IFNγ-Rezeptors führt zur Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade und in der Folge zu einer gesteigerten Transkription vieler pro-inflammatorischer Proteine (Schroder et al. 2004). Vor allem niedrige IFNγ-Konzentrationen führen darüber hinaus zur Aktivierung eines signalverstärkenden Regelkreises *(positive feedback)*, der durch die Phosphorylierung des *singal transducer and activator of transcription-1* (STAT-1) und der Aktivierung von *interferon regulatory factor* (IRF)-1 aufrecht gehalten wird und die pro-inflammatorische Wirkung von IFNγ unterstützt. Interessanterweise führen jedoch höhere IFNγ-Konzentration zur verstärkten Aktivierung sogenannter *suppressor of cytokine signalling* (SOCS)-Proteinen, wie SOCS-1 und -3, die zum einen über Interaktion mit den rezeptorassoziierten Januskinasen (JNK) die Signaltransduktion unterbinden zum anderen aber auch die Stabilität von kernlokalisiertem NF-κB (p65) herabsetzen und somit dem signalverstärkenden Regelkreis, einen signalhemmenden Regelkreis *(negative feedback)* entgegen setzen (Schroder et al. 2004; Hu et al. 2008; Strebovsky et al. 2011). IFNγ übt somit die Funktion eines Regulatorproteins aus, dass, je nach Konzentration, pro- oder anti-inflammatorische Wirkung ausüben kann.

1.1.2.3 ***Toll-like Rezeptoren***

Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören, wie auch Nod-like Rezeptoren (NLRs), RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) und Dectine zu den *pattern recognition receptors* (PRRs), die sowohl pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMPs) aber auch nichtinfektiöse endogene Muster, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), erkennen können und für die effektive Beseitigung entzündlicher Prozesse eine große Rolle spielen (Brown 2006; Kawai and Akira 2010). TLRs sind evolutionär hoch konserviert und finden sich sowohl in Insekten als auch in Wirbeltieren. Bisher wurden 10 Mitglieder der TLR-Familie identifiziert, die sich anhand ihrer zellulären Lokalisation und ihrer entsprechenden Agonisten in zwei Subgruppen unterteilen lassen.

Zur ersten Gruppe zählen TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11; Zelloberflächenrezeptoren, die hauptsächlich durch Lipopolysaccharide (LPS), Lipoproteine und Flagellin aktiviert werden. Die zweite Gruppe besteht aus TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 und ist in intrazellulären Kompartimenten, wie dem endoplasmatischen Retikulum, den Endosomen oder Lysosomen lokalisiert. Diese intrazellulären TLRs werden durch Nukleinsäuren, wie ssRNA, dsRNA beziehungsweise bakterielle und virale DNA (auch als CpG-DNA bezeichnet) aktiviert. Obwohl die Aktivierung und Modulation der TLR-Signalkaskaden hochgradig komplex ist, resultiert die Stimulation jedes einzelnen TLR unter anderem in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Aber auch Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 oder verschiedene IRF-

Proteine werden aktiviert und somit die Expression pro-inflammatorischer Proteine stimuliert (Kawai and Akira 2010; Gay et al. 2014).

1.1.2.4 *Nuclear Factor κ B*

Einer der sogenannten Meisterregulatoren eukaryotischer Genexpression ist Nuclear Factor kappa B (NF-κB). Die NF-κB Familie besteht aus fünf Mitgliedern (p50, p52, p65/RelA, RelB und c-Rel), die als Homo- oder Heterodimere in verschiedener Kombination als Transkriptionsfaktoren für eine Vielzahl von Genen dienen. Unter normalen Bedingungen verweilen NF-κB Dimere, gebunden an inhibitorische Proteine der *Inhibitor of* κB (IκB)-Familie, im Zytoplasma. Die Aktivierung der NF-κB Signalkaskade führt dann zur Phosphorylierung der IκB-Proteine durch den IκB-Kinasekomplex (IKK), wodurch diese ihre Bindungsaffinität für die NF-κB-Dimere verlieren und abdissoziieren können. Freies NF-κB kann daraufhin in den Zellkern translozieren und dort die Transkription verschiedenster Gene regulieren *(Sun and Andersson 2002)*.

In der Hämatopoese spielt NF-κB eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien und unterstützt beispielsweise die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen *(Ammon et al. 2000; Bottero et al. 2006).* Die Expression bestimmter NF-κB Familienmitglieder ist darüber hinaus wichtig für das Überleben und den Schutz vor Apoptose reifer Makrophagen *(Pagliari et al. 2000; Pennington et al. 2001)*, sowie bei der Regulation von TNF-alpha und Lysozym im Kontext bakterieller Entzündungen *(Phi van 1996; Takashiba et al. 1999)*. Zu den Aktivatoren von NF-κB gehören, wie bereits oben beschrieben, unter anderem Interferone und TLRs.

1.1.2.5 *Proteinkinase C*

Die erstmals 1977 von Yasutomi Nishizuka beschriebene Proteinkinase C (PKC)-Familie der Serin/Threonin-Kinasen besteht aus 10 Mitgliedern und spielt eine wesentliche Rolle bei der zellulären Signaltransduktion (Inoue et al. 1977). Die Aktivität der PKC ist Ca^{2+}- und Phospholipid-abhängig, doch erst die Gegenwart vor allem ungesättigter Fettsäure Diacylglycerole (DAG) reduziert die Ca^{2+}-Anforderungen des Enzyms auf physiologische Mengen und ermöglicht seine volle Aktivität (Kishimoto et al. 1980; Kikkawa and Nishizuka 1986). Zusätzlich zu DAG kann die Aktivität der PKC aber auch durch Phorbolester gesteigert werden, die ihren stimulierenden Effekt jedoch über eine alternative Bindungsstelle ausüben und daher nicht mit DAG in Konkurrenz stehen (Slater et al. 1994). PKC-Familienmitglieder sind bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt und sie regulieren Überleben und Aktivität immun-

kompetenter Zellen (Isakov and Altman 2013). So führt die Hemmung der PKC in RBL-2H3 Mastzellen zu einem deutlichen Abfall der TNFα-Sekretion ohne dabei die Expression zu beeinflussen, wodurch seine Funktion als regulatorisches, jedoch pro-inflammatorisches wirkendes Protein verdeutlicht wird (Abdel-Raheem et al. 2005).

Aber auch für die Proliferation und Differenzierung immunkompetenter Zellen spielt die PKC eine wichtige Rolle. So kann beispielsweise die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Monozytenzelllinie THP-1, neben All-trans-Retinol (Vit. A1) und 1,25-dihydroxyvitamin D3 auch über den Phorbolester PMA, und folglich über die Aktivierung der PKC, in makrophagenähnliche Zellen differenziert werden (Tsuchiya et al. 1982; Schwende et al. 1996; Chen and Ross 2004).

1.1.2.6 ***Lysozym***

Das bakteriolytische Potential von Speichel und die darauf folgende Entdeckung von Lysozym in menschlichen Körperflüssigkeiten wurde erstmals vom Bakteriologen und Mitentdecker des Penicillins Alexander Fleming (1881 – 1955) untersucht (Fleming 1922). Lysozym ist eine kationische Glykosidase, welche die Hydrolyse zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin, einer glykosidischen Bindung, die sich in den Zellwänden grampositiver Bakterien befindet, katalysiert (Kirby 2001). Es findet sich in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Organen mit der höchsten Konzentration in der Tränenflüssigkeit und stellt somit eine erste Hürde für eindringende Bakterien dar (Klockars and Reitamo 1975).

Auch Makrophagen sind zur Sekretion von aktivem Lysozym befähigt (Gordon et al. 1974). Da die Sekretion von Lysozym im Laufe der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zunimmt, verwundert es nicht, dass Transkriptionfaktoren, wie beispielsweise *PU-box binding protein 1* (PU.1), CCAAT *enhancer binding proteins* (C/EBP) und NF-κB, die für Generierung reifer Makrophagen relevant sind, auch bei der Regulation der Lysozymexpression eine entscheidende Rolle spielen (Scott et al. 1992; Phi van 1996; Faust et al. 1999; DeKoter and Singh 2000). Ob und inwiefern die Lysozym und TNFα, die ebenfalls durch gleiche Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, hinsichtlich ihrer Sekretion miteinander korrelieren, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.1.3 Monozyten und Makrophagen: Eradikatoren und Modulatoren

Die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu Monozyten und Makrophagen erfordert eine fein regulierte Expression und Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle. Zu den sogenannten Master Transkriptionsfaktoren, also diejenigen Transkriptionsfaktoren, die für die Expression myeloidspezifischer Gene verantwortlich sind und somit das Schicksal der Subpopulationen maßgeblich beeinflussen, zählen beispielsweise PU.1, C/EBPα, β und ε, *growth-factor independent* 1 (GFI1), *stem cell leukemia factor* (SCL) und der INFγ-aktivierte Transkriptionsfaktoren IRF8 (Rosenbauer and Tenen 2007). Traditionell galten Monozyten als die quantitativ maßgeblichen Vorläufer gewebsständiger Makrophagen, doch neuere Forschungsergebnisse relativieren diese Betrachtung deutlich. Zwar können zirkulierende Monozyten nach ihrer Extravasation zu gewebsständigen Makrophagen und Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) differenzieren, jedoch zeigen Ergebnisse von Yona *et al.*, dass sowohl die klassischen dendritischen Zellen (cDC) aber auch der Großteil der gewebsständigen Makrophagen, wie beispielsweise Kupffer Zellen, Langerhans Zellen, sowie Alveolar- und Peritonealmakrophagen, bereits im Embryonalstadium gebildet werden und nicht monozytären Ursprungs sind (Yona et al. 2013).

Die Einordnung der Monozyten als eigenständiges, dynamisches Zellsystem gewinnt daher zunehmend mehr an Bedeutung. Entsprechend ihrer Klassifizierung anhand spezifischer Oberflächenmarker können verschiedene Subpopulationen unterschieden werden. So haben beispielsweise zirkulierende murine $LY6C^{low}$ Monozyten (entsprechend humanen $CD14^{low}CD16^{+}$ Monozyten) die Fähigkeit an der luminalen Seite von Epithelien zu wandern, wo sie die endotheliale Integrität aufrechterhalten, sowie Neutrophile Granulozyten rekrutieren und bei der Beseitigung von Zellschrott mitwirken. Im Gegensatz dazu deutet die schnelle Rekrutierung von $LY6C^{hi}$ Monozyten ($CD14^{+}$ beim Menschen) an den Ort einer Entzündung oder Verletzung auf ihre Schlüsselfunktion bei der Beseitigung pathogener Zustände hin. Diese $LY6C^{hi}$ Monozyten haben die Fähigkeit aus dem Lumen in das Gewebe zu migrieren und sich dort in mononukleäre Phagozyten zu differenzieren und somit den Pool gewebsständiger Makrophagen erweitern.

Auch wenn distinkte Unterschiede zwischen Makrophagen monozytären Ursprungs und den klassischen gewebsständigen Makrophagen beziehungsweise cDCs bestehen, ähneln sie sich doch stark hinsichtlich ihrer Funktion und Genexpression (Ginhoux and Jung 2014). Aktivierte Monozyten und Makrophagen besitzen eine starke Fähigkeit zur Phagozytose und bilden zusammen mit Neutrophilen Granulozyten die Speerspitze bei der Beseitigung pathogener Zelltrümmer (Chaplin 2010). Als Teil des angeborenen Immunsystems produzieren vor allem Makrophagen dazu große Mengen an bakteriolytischem Lysozym (Gordon et al. 1974; Klockars and Reitamo 1975).

Obwohl aktivierte Monozyten und Makrophagen pro-inflammatorische Aktivität besitzen, wird ihre Rolle als Immunmodulatoren mit sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Eigenschaften zunehmend deutlicher (Mosser 2003). Neben ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) (Forman and Torres 2001), wirken sie also ebenfalls als Immunmodulatoren, die anhand ihres Rezeptorexpressions- und Zytokinsekretionsmusters unterschieden werden können (Gordon 2003; Martinez et al. 2006). Solcherlei polarisierte Makrophagen lassen sich in zwei Hauptgruppen aufteilen: primär pro-inflammatorische M1 Makrophagen und eher anti-inflammatorische wirkende M2 Makrophagen, obwohl letztere Gruppe sich in drei Untergruppen (M2a, M2b und M2c) mit unterschiedlichen Eigenschaften aufteilen lässt. Trotz fließender Übergänge zeigen sich doch gruppenspezifische Charakteristika. Die klassische Aktivierung von Makrophagen durch IFNγ und TNFα, sowie durch mikrobielle Bestandteile führt beispielsweise zur Reifung von pro-inflammatorischen M1 Makrophagen, die unter anderem geprägt sind durch die Expression des Oberflächenmarkers CD86, der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNFα und IL-1, sowie durch die Bildung von ROS und NOS. Die alternative Aktivierung von Makrophagen durch die Stimulation mit den Interleukinen IL-4, IL-13 und IL-10 führt zur Bildung der Subpopulationen M2a und M2c. Diese kaum antimikrobiellen Makrophagen hingegen zeigen keine CD86-Expression und TNFα-Sekretion, produzieren dafür aber verstärkt TGFβ und IL-10. M2b Makrophagen haben eine Sonderstellung, da sie sowohl zur Bildung von CD86 und TNFα befähigt sind, ihnen aber beispielsweise die Fähigkeit zur Generierung von ROS und RNS fehlt (Abb. 1). Aufgrund ihres breiten Aktivitätsspektrums, ihrer hohen Plastizität und vollständigen Reversibilität bilden Makrophagen daher eine Zellpopulation, die nicht nur bei der primären Unterstützung der Entzündung beteiligt sind, sondern auch bei ihrer Beseitigung (Mosser 2003; Benoit et al. 2008).

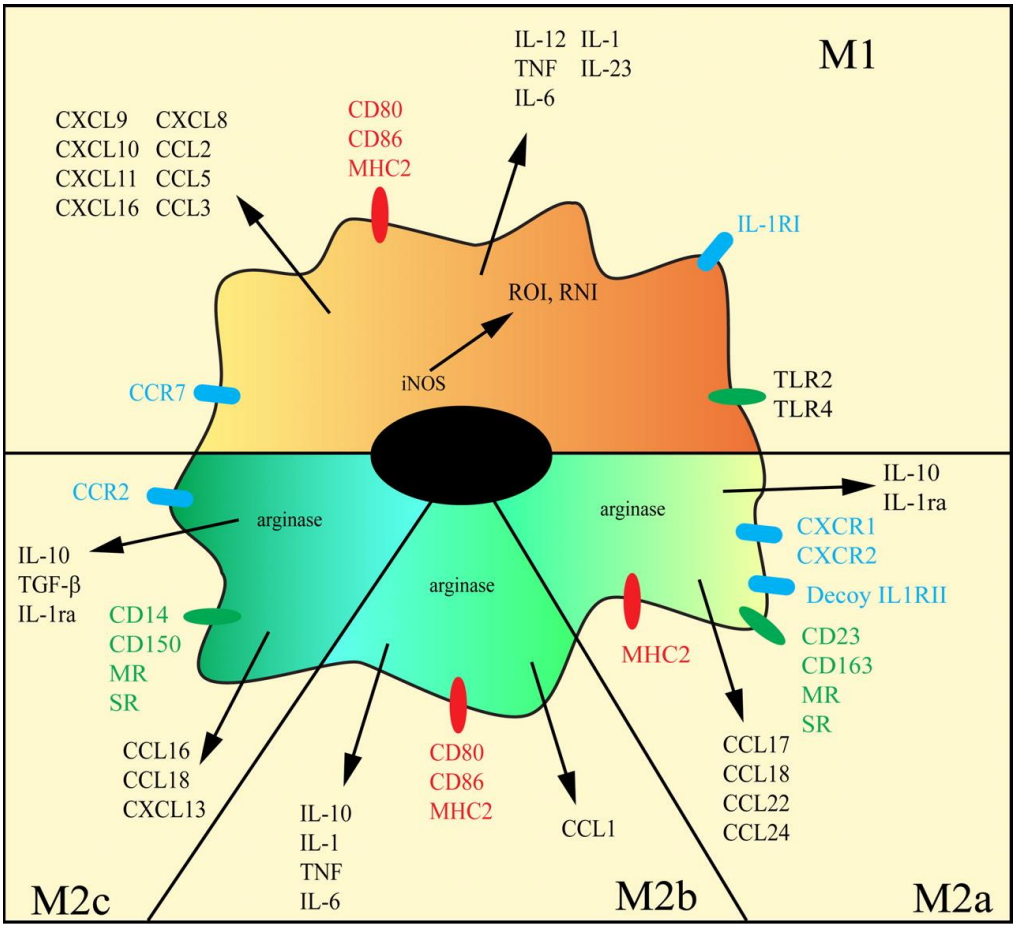


Abb. 1: Makrophagenpolarisation nach Benoit *et al.* 2008

1.1.4 Rollen, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten

Eine wichtige Voraussetzung für die effektive Bekämpfung pathogener Strukturen ist die Fähigkeit immunkompetenter Zellen an den Ort des Geschehens zu gelangen. Damit Monozyten bei der Wiederherstellung der gewebsspezifischen Homöostase mitwirken können, benötigen sie also die Fähigkeit das Gefäßsystem zu verlassen und in das entsprechende Gewebe einzuwandern. Das Rollen von Leukozyten auf endothelialen Oberflächen, ihre Adhäsion und anschließende Transmigration in das dahinter liegende Gewebe wurde bereits vor Längerem beschrieben, doch erst in jüngerer Zeit gelang es Wissenschaftlern die zugrunde liegenden Mechanismen genauer aufzuschlüsseln. Diese koordinierte Kaskade des Selektin-vermittelten Rollens, der Chemokin-gesteuerten Aktivierung, der Integrin-abhängigen Arretierung und der anschließenden transendothelialen Migration ist nicht nur von großer Bedeutung für die Auffrischung gewebsständiger Makrophagen und dendritischer Zellen, sondern auch für die Fähigkeit von Monozyten gezielt an Orte der Infektion zu gelangen um dort bei der Beseitigung pathogener Strukturen mitzuwirken (Ley et al. 2007).

Für den korrekten Ablauf der Extravasation ist die Expression einer Vielzahl von Oberflächenproteinen von großer Bedeutung. Der initiale Schritt der Extravasation ist das Rollen von Leukozyten auf endothelialen Oberflächen. Für diesen Vorgang sind vorrangig die Glykoproteine L-Selektin, P-Selektin und E-Selektin (die von Endothelzellen und teilweise von Leukozyten produziert werden), die allesamt mit dem P-Selektin Glykoprotein Liganden-1 (PSGL-1) oder anderen glykosylierten Oberflächenproteinen interagieren können (Kansas 1996; McEver and Cummings 1997). PSGL-1 findet sich sowohl auf Leukozyten, aber auch auf Endothelzellen. Seine Interaktion mit leukozytärem L-Selektin führt somit einerseits zum Anhaften zirkulierender Leukozyten an das Endothel aber auch zur Rekrutierung weiterer Leukozyten zum Ort der Entzündung (Eriksson et al. 2001; da Costa Martins et al. 2007). Diese *sher stress*-abhängige Bindungen sind hoch dynamisch und führen zu kontaktverstärkenden Konformationsänderungen und zur Aktivierung intrazellulärer Singalkaskaden in Endothelzellen und Leukozyten (Ley et al. 2007). Auch das Interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) ist für das Rollen von großer Bedeutung. So führt die verstärkte Expression von ICAM-1 mit E-Selektin bzw. L-Selektin zu einer gesteigerten Rekrutierung und einer Verlangsamung von rollenden Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten vermutlich durch eine Selektin-vermittelte Konformationsänderung des Lymphozytenfunktion-Assoziierten Antigens-1 (LFA1), wodurch seine Bindungsaffinität mit endothelialem ICAM-1 gesteigert wird (Kadono et al. 2002; Salas et al. 2004; Chesnutt et al. 2006). Aber auch der Makrophagen Rezeptor-1 (MAC-1) ist für die Bindungsstärke rollender Leukozyten von Bedeutung, wie *in vivo* Versuche mit Mäusen zeigten (Dunne et al. 2002). Verschiedene Chemokine stimulieren die Bindung der Leukozyten Integrine an ICAM-1 auf Endothelzellen und sorgen für die feste Arre-

tierung der Zellen an der Gefäßwand. Diese Leukozytenaktivierung, ihr Arrest und das anschließende Wandern durch die Gefäßwand ist ein komplexer Prozess, der eine Vielzahl aufeinander abgestimmter Signalkaskaden bedarf. Dies ist jedoch auch eine große Chance bei der Identifikation möglicher Substanzen, die regulatorisch eingreifen und die Extravasation modulieren können.

1.2 Modulatoren des angeborenen Immunsystems

1.2.1 Immunmodulatoren mikrobieller Herkunft

Mikroorganismen, wie Pilze und Bakterien, gehören zu den ersten Lebensformen, die sich auf der Erde etablierenden konnten. Die Fähigkeit ihren Stoffwechsel mit einfachen molekularen Verbindungen aufrecht zu erhalten, sowie ihre hohe Anpassungsfähigkeit kombiniert mit einer kurzen Replikationszeit sicherten ihr Fortbestehen seit jeher und garantieren ihnen auch in Zukunft einen festen Platz im Stammbaum des Lebens. Aber auch für die Entwicklung des Menschen spielten sie eine wichtige Rolle. Im Kontext der Verdauung unterstützen beispielsweise über 400 verschiedene Bakterienstämme die Prozessierung von Nahrungsbestandteilen und helfen somit bei der Aufnahme von Nährstoffen mit. Unser Mikrobiom, also die Komposition unserer Darmflora, trägt somit entscheidend zum Ernährungs- und Gesundheitszustand des einzelnen Individuums bei (Sun and Chang 2014). Doch die Symbiose zwischen Menschen und Bakterien ist entsprechend der Endosymbiontentheorie noch viel älter und fundamentaler, da die funktionelle Vereinigung eukaryotischer und prokaryotischer Zellen die Entwicklung eines so komplexen Organismus, wie den Menschen, überhaupt erst ermöglicht hat (Schimper, 1893; Margulis, 1970). Auch Pilze sind eng mit dem Leben der Menschen verbunden. Sie unterstützen nicht nur den organischen Abbau menschlicher Verbrauchs- und Ausscheidungsstoffe sondern sind auch stark an der kulturellen Entwicklung des Menschen beteiligt, da sie unter anderem die Herstellung kulturell bedeutsamer Güter, wie Brot, Bier und Käse erst möglich gemacht haben.

Unter der Summe von Bakterien, Pilzen und Viren existiert jedoch auch eine Vielzahl von Organismen, die nicht in Symbiose mit dem Menschen lebt, sondern eine ernst zu nehmende Gefahr für die Gesundheit und das Überleben darstellt. Noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts waren die drei häufigsten Todesursachen des Menschen auf den Einfluss pathogener Mikroorganismen zurückzuführen und erst die Entdeckung der Antibiotika hat zu einer deutlichen Abnahme der Letalität infektiöser Erkrankungen geführt (Jones et al. 2012). Trotz des großen Potentials klassischer und moderner Antibiotika, Fungizide und Virustatika bei der Behandlung von Infektionen, ist die Grundvoraussetzung bei der Beseitigung schadhafter Mikroorganismen ein intaktes Immunsystem.

Im Laufe der Evolution haben sich, wie bereits unter 1.1.2.3 erwähnt, spezifische PRRs entwickelt, deren Stimulation zur Aktivierung immunkompetenter Zellen führt, wodurch diese endringende Pathogene erkennen und beseitigen können. Die Fähigkeit immunkompetenter Zellen derartige PAMPs zu erkennen und dadurch die Gen- und Proteinexpression zu aktivieren birgt ein großes therapeutisches Potential. Die Verwendung mikrobieller Präparationen zur Therapie verschiedener Erkrankungen hat gerade in der Alternativmedizin eine lan-

ge Tradition. Im 19. Jahrhundert begründete der Leipziger Tierarzt Johann Joseph Wilhelm Lux die alternativmedizinische Behandlungsmethode der Isopathie, die im späteren Verlauf dann hauptsächlich mit Prof. Dr. Günther Enderlein in Verbindung gebracht wird (Lux, 1833). Ähnlich der Homöopathie, die auf dem „Ähnlichkeitsprinzip“ (*„similia similibus curantur“* – ähnliches wird ähnliches heilen“) basiert, setzt die Isopathie das „Gleichheitsprinzip“ (*„aequalia aequalibus curantur“* – „gleiches wird gleiches heilen“) bei der Behandlung von Erkrankungen zugrunde. Obwohl die von Lux und Enderlein postulierten Wirkprinzipien vom heutigen Standpunkt wissenschaftlich fragwürdig erscheinen und von der modernen Mikrobiologie teilweise nicht nachvollzogen werden können, schwören eine Vielzahl von Ärzten, Heilpraktikern und Patienten auf ihre Wirksamkeit.

Durch die Entdeckung von PRRs und ihrer Fähigkeit bakterielle, mykotische oder virale Bestandteile zu erkennen scheint nun auch eine pharmakologische Wirkung entsprechender mikrobieller Präparationen plausibel. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb sowohl synthetische TLR-Agonisten als auch verschiedene mikrobielle Präparationen hinsichtlich ihres Einflusses auf das Immunsystems untersucht (s. Tabelle 1 und 2).

1.2.2 Immunmodulatoren pflanzlicher Herkunft

Die Anfänge der Verwendung medizinischer und schamanischer Heilpflanzen verschwimmen im Nebel der Vergangenheit, doch zählt die Kenntnis ihrer Wirksamkeit zu den ältesten kulturellen Überlieferungen der Menschheit. Ob im asiatischen Raum, bei den Naturvölkern Amerikas oder den europäischen Schamanen, weltweit wurden und werden Pflanzen alleine oder als Bestandteil medizinischer Zubereitungen zur Therapie körperlicher und geistiger Leiden, aber auch als Vehikel zur spirituellen Verbindung mit der Gottes- und Geisterwelt, eingesetzt (Rätsch, 2007). Eine Grundregel, die auf den Philosoph und Mystiker Paracelsus zurückzuführen ist, hat sich dabei stets bewährt: *„Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis machts, daß ein Ding kein Gift sei."* (Paracelsus, 1538).

Ein wesentliches Leiden beschäftigte Mediziner damals wie heute gleichermaßen: Entzündungen. Entzündungen führen nicht nur zu Schmerzen und Einschränkung der Bewegungsfreiheit im betroffenen Gewebe, sondern sind ebenso bei der Entstehung und dem Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen (Libby 2006), Typ II Diabetes (Donath and Shoelson 2011) und Krebs (Beyaert et al. 2013) maßgeblich beteiligt – drei der häufigsten Todesursachen der heutigen Zeit (Jones et al. 2012). Die effektive Unterbindung vor allem chronischer Entzündungen bildet somit eine der fundamentalen Säulen bei der Prävention und Behandlung verschiedenster Erkrankungen in der heutigen Zeit. Neben der entzündungshemmenden Eigenschaft der Weidenrinde *(Salicis cortex)* zeigen viele weitere Medizinalpflanzen eine antiinflammatorische Wirksamkeit und zunehmend mehr werden die verantwortlichen Bestandteile und ihre zugrunde liegenden molekularen Wirkmechanismen entschlüsselt. So zeigen beispielsweise Flavonoide eine starke Fähigkeit bei der Inhibition entzündlicher Prozesse aber auch die anti-entzündlichen und tumorhemmenden Eigenschaften von grünem Tee wurden vielfach beschrieben (de Mejia et al. 2009; Serafini et al. 2010).

Das Potential pflanzlicher Inhaltstoffe mit Wirkung auf zelluläre Prozesse erscheint in Anbetracht der Diversität der Pflanzenwelt und der Komplexität des menschlichen Organismus grenzenlos. Im Rahmen dieser Dissertation habe ich mich deshalb auf die Untersuchung der Iridoidglykoside Aucubin, Catalpol und Harpagosid, sowie auf das Diterpen Aconitin und das Alkylamid Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid im Kontext der TNFα-Sekretion und der Expression verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorzelllinie THP-1 beschränkt (s. Abb. 2).

1.2.2.1 *Iridoide und ihr Einfluss auf das Immunsystem*

Die Substanz Iridodial, der strukturell einfachste Vertreter der Iridoide, wurde erstmals im Abwehrsekret der Ameisengattung *Iridomyrmex* gefunden, woher sich auch der Name der

Stoffgruppe ableitet. Iridoide gehören zur Gruppe der Monoterpene mit einem Grundgerüst von 10 Kohlenstoffatomen. In der Regel kommen sie als sekundäre Pflanzenstoffe vor, die im Terpenstoffwechsel produziert werden und in drei Hauptgruppen unterteilt werden können: Iridoidglycoside, Secoiridoide und die nichtglykosidischen Iridoide (El-Naggar and Beal 1980).

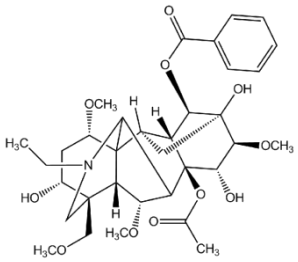
Das Iridoidglykosid Aucubin findet sich nicht nur in Flohsamen (*Plantago psyllium* L., Plantaginaceae), sondern zusammen mit Catalpol auch im Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L., Plantaginaceae) und den Wollblumen (*Verbascum densiflorum* Bertol., Scrophulariaceae). Präparate dieser Pflanzen werden aufgrund ihrer antibakteriellen, entzündungshemmenden und reizmildernden Wirkung vorwiegend als Expektorantien und bei entzündlichen Veränderungen der Mund- und Rachenschleimhaut verwendet (Hänsel und Sticher, 2010). Aucubin und Catalpol besitzen beide nur neun Kohlenstoffatome im Grundgerüst und unterscheiden sich lediglich im Vorhandensein eines Epoxidrings, der beim Catalpol anstelle einer Doppelbindung vorliegt (Abb. 2). Als gebundener Zucker findet sich bei beiden β-D-Glucose. Beide Iridoidglykoside zeigen ihre anti-inflammatorische Wirkung über eine Reduktion der TNFα-Produktion sowie einer Herabsetzung der NF-κB Aktivität in LPS-aktivierten RAW264.7 Zellen (An et al. 2002; Park and Chang 2004). Darüber hinaus zeigen sie eine inhibitorische Wirkung auf Cyclooxygenase (COX)-1/-2 Enzyme und die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) (Park et al. 2010). Dabei scheint jedoch vor allem das Aglykon die wirksame Form zu sein, da die eigentlichen Glykoside keinen Effekt aufwiesen.

Pflanzliche Zubereitung der Teufelskralle *(Harpagophytum procumbens,* Pedaliaceae*)*, wie Dekokte, Tinkturen Puder oder Extrakte, werden seit Jahrhunderten vor allem im südafrikanischen Raum zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen verwendet. Mitte des 20. Jahrhunderts gelangte die Teufelskralle durch den Soldaten G.H. Mehnert nach Europa nachdem dieser durch das Studium der traditionellen Medizin Südafrikas auf das therapeutische Potential von *H. procumbens* aufmerksam wurde (Wegener, 2000). Ein Großteil der pflanzlichen Inhaltsstoffe wurde bereits isoliert; zu ihnen zählen Iridoidglykoside, Flavonoide, Phytosterole, Aminosäuren und Kohlenhydrate. Das erste isolierte Iridoidglykosid war Harpagosid, das zusammen mit Harpagid als weitgehend hauptaktive Komponente angesehen wird (Mncwangi et al. 2012). Strukturell unterscheiden sie sich beide Iridoidglykoside durch den zusätzlichen Zimtsäurerest, den Harpagosid trägt. Diese zusätzliche Esterstruktur ist vermutlich auch dafür verantwortlich, dass Harpagosid vom Organismus auch ohne Spaltung, sondern direkt als genuines Glykosid resorbiert werden kann (Büechi und Wegener, 2002). Präparationen aus Teufelskralle wirken antiphlogistisch, analgetisch und appetitanregend, wobei letzteres vermutlich auf die Bitterwirkung der Iridoide zurückzuführen ist. Zu den wichtigsten Einsatzbereichen zählen demnach Appetitlosigkeit, dyspeptische oder rheumatische

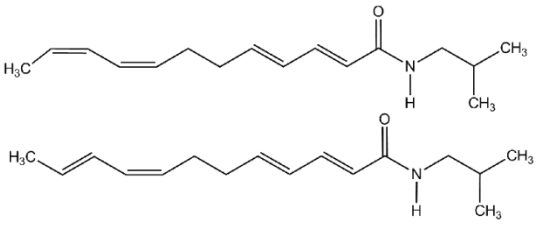
Beschwerden sowie bei Arthrose (Mncwangi et al. 2012; Georgiev et al. 2013). Die analgetische und antiphlogistische Wirkung von Harpagosid lässt sich unter anderem auf die Reduktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und COX-2 mRNA-Expression und Proteinsekretion zurückführen, wie Experimente in murinen RAW 264.7 Zellen zeigten (Kaszkin et al. 2004; Huang et al. 2006). Aber auch in primären humanen Monozyten konnten durch Extrakte von *H. procumbens* die TNFα-Expression und –Sekretion herabgesetzt werden (Fiebich et al. 2012), wodurch die anti-inflammatorische Wirkung der Teufelskralle noch weiter verdeutlicht wird. Harpagid wird als Begleitsubstanz meist nicht explizit untersucht, es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Wirksamkeit des Gesamtextraktes pflanzlicher Präparationen größer ist als die einzelner Bestandteile.

1.2.2.2 ***Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid***

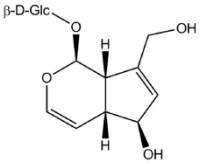
Aconitum napellus, oder der Blaue Eisenhut, ist eine Pflanze aus der Gattung der Hahnenfußgewächse, die bevorzugt an Bachufern und feuchten Wiesen des mitteleuropäischen Mittelgebirges vorkommt und eine lange Tradition als Heil- und Giftpflanze hat (Wikipedia, 2015). Die toxische Wirkung von Aconitin wird hauptsächlich auf seine Bindung an offene, spannungsabhängige Natriumkanäle in erregbaren Geweben, wie Herz und Nerven, zurückgeführt, wodurch diese im offenen Zustand gehalten werden und deren Refraktärzeit erhöht wird (Chan 2009). Aber auch ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration durch gesteigerte Expression des Na^{+}/Ca^{2+}-Austauschers NCX und der Hemmung des aktiven Ca^{2+}-Transporters SERCA2a (Zytosol -> SR) ist für seine toxischen Effekte verantwortlich (Zhou et al. 2013). In der Folge treten bereits in niedrigen Dosen lebensbedrohliche Symptome auf. Die Monographie der Kommission E (Phytotherapie) hebt hervor: „*Aconitum napellus* Risiken: Wegen der geringen therapeutischen Breite können Intoxikationserscheinungen bereits im therapeutischen Dosisbereich auftreten. Dies sind: Parästhesien, Erbrechen, Schwindel, Muskelkrämpfe, Hypothermie, Bradykardie, Herzrhythmusstörungen und zentrale Atemlähmung.“ Aus diesem Grund finden Präparate der Gattung *Aconitum* primär bei entzündlichen Erkrankungen und schmerzhaften Nervenleiden Anwendung und werden vor allem in homöopathischer Dosierung verabreicht. In entsprechenden Verdünnungen finden sich Extrakte von Aconitum beispielsweise in den Medikamenten Influex, Meditonsin oder Rheumodoron. Dennoch, Untersuchungen hinsichtlich des molekularen Wirkmechanismus im Kontext immunologischer Prozesse sind spärlich, weshalb sie im Rahmen dieser Dissertation genauer betrachtet wurden.



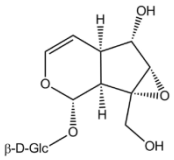
Aconitin



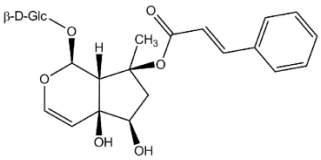
Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid



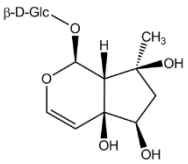
Aucubin



Catalpol



Harpagosid



Harpagid

Abb. 2: Strukturformeln der untersuchten pflanzlichen Naturstoffe

2 Zielsetzung

Die Stimulation von TLRs führt zur Aktivierung komplexer Signalkaskaden und in der Folge zur Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, wodurch die Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine angeregt wird. Ziel der Arbeit war es ein Zellsystem zu etablieren, mit dessen Hilfe der Einfluss von IFNγ, sowie verschiedener synthetischer aber auch komplexer TLR-Agonisten aus mikrobiellen Zellpräparationen auf die TNFα-Sekretion und die Aktivität von Lysozym untersucht werden konnte. Im Kontext dieser *in vitro* induzierten Entzündung sollte der Einfluss der Differenzierung mitberücksichtigt werden, weshalb sowohl PMA-unstimulierte als auch PMA-stimulierte THP-1 Zellen untersucht wurden. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich die Stimulation mit IFNγ und spezifischen TLR-Agonisten auch regulatorisch auf die interzelluläre Adhäsion auswirkt, was ein Indikator für eine gesteigerte Transmigration immunkompetenter Zellen in entzündetes Gewebe wäre. Neben der mikroskopischen Einschätzung der interzellulären Adhäsion sollte deshalb ferner überprüft werden, ob eine derart gesetzte Entzündung auch die Expression spezifischer Zelladhäsionsmoleküle, die bei der Transmigration immunkompetenter Zellen in entzündliches Gewebe vorrangig beteiligt sind, maßgeblich beeinflusst.

Das Interesse an der Identifikation potenter pflanzlicher Wirkstoffe mit anti-inflammatorischen Eigenschaften steigt zunehmend, doch sind die Erkenntnisse hinsichtlich zugrunde liegender Wirkmechanismen noch immer gering. Es stellte sich daher die Frage ob und inwiefern selektierte pflanzliche Inhaltsstoffe, denen eine gute Wirksamkeit bei der Behandlung entzündlicher und/oder infektiöser Erkrankungen zugesprochen wird, auch *in vitro* eine Wirkung haben. Dazu sollte ihr Potential untersucht werden, die oben beschriebene IFNγ und TLR-Agonist induzierte TNFα-Sekretion, welche einen starken pro-inflammatorischen Stimulus darstellt, in humanen THP-1 Zellen zu beeinflussen. Da auch die Transmigration immunkompetenter Zellen sowohl bei akuten als auch bei chronischen Entzündungen eine wesentliche Rolle für den Entzündungsverlauf spielt, sollte ferner überprüft werden ob die untersuchten pflanzlichen Wirkstoffe die mRNA-Expression spezifischer Zelladhäsionsmoleküle in Gegenwart und in Abwesenheit von Entzündungsmediatoren beeinflussen können. Die derart gewonnen Ergebnisse könnten unser Verständnis entzündlicher Prozesse erweitern und als Grundlage für die Entwicklung neuer Substanzkombinationen bei der Behandlung akuter und chronischer Entzündungen dienen.

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage BP 211 D	Sartorius AG (Göttingen)
Biologische Sicherheitswerkbank Klasse II, HERAsafe®	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)-
CO_2-Inkubator Mini Galaxy	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden)
DC-Entwicklungskammern mit Deckel (10 x 10 cm)	Desaga GmbH (Wiesloch)
Einkanalpipetten (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg)
Elektronische Pipettierhilfe Maxipette	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Hämacytometer (Neubauer-improved, Tiefe 0,1 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda Königshofen)
Heizblock SHT 2D	Stuart Scientific Co. Ltd. (Großbritannien)
Heizplatte H22 electronic	C. Gerhardt GmbH & Co. KG (Königswinter)
Mehrkanalpipette 10-100 µl	Eppendorf AG (Hamburg)
Mehrkanalpipette 30-300 µl	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Mikroliterzentrifuge Z 233 M-2	HERMLE Labortechnik GmbH (Wehingen)
Mikroplattenleser Infinite® 200	Tecan Austria GmbH (Österreich)
Kreisschüttler SLT Shaker	Elmech GmbH (Celle)
Kreisschüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. (USA)
Real-Time PCR Systems LightCycler® 480	Firma Roche (Schweiz)
Thermoschüttler PHMT	Grant Instruments Ltd. (Großbritannien)
Ultraschallbad Sonorex RK 100	BANDELIN electronic (Berlin)
Wasserbad	VWR International GmbH (Darmstadt)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Electron Corporation (USA)

3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
DC-Alufolien (20 x 20 cm, Kieselgel 60 F_{254})	Merck KGaA (Darmstadt)
Einfrierröhrchen Cryo.s ™	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Einmal-Injektions-Kanülen Sterican® (0,2 x 40 mm, Dünnwand)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Einmalspritzen Injekt® (5 mL)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Hämacytometer-Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda Königshofen)
Mikrotiterplatten (96 Well, F, Immunoplatte MaxiSorp ™)	Thermo Fisher Scientific (USA)
Multiwellplatten (LightCycler, 96, clear)	Roche AG (Schweiz)
Parafilm	Pechiney Packaging (USA)
PCR Strip Tubes and Caps	Roche AG (Schweiz)
Pipettenspitzen (2-200 µl, gelb)	VWR International GmbH (Darmstadt) & Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen)
Pipettenspitzen (5-300 µl, farblos)	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Pipettenspitzen (50-1000 µl, blau)	Eppendorf AG (Hamburg)
PP-Rundboden Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße (2 mL)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL; steril)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Spritzenvorsatzfilter (Celluloseacetat, 0,2 µm, steril)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb GmbH (Heidelberg)
Suspensionskulturflaschen (25 cm^2, 50 mL, mit Filter, steril)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Suspensionskulturflaschen (75 cm^2, 250 mL, mit Filter, steril)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturplatten mit Deckel (24 Well, steril)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturplatten mit Deckel (96 Well, F, steril)	VWR International GmbH (Darmstadt)

3.1.3 **Dünnschichtchromatographie**

3.1.3.1 ***Substanzen***

Ameisensäure (zur Synthese)	Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn)
Ammoniaklösung 25% (zur Analyse)	Merck KGaA (Darmstadt)
Ammoniumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
β-Glukosidase aus Mandeln (lyophilisiertes Pulver, ≥6 units/mg)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Essigsäure (Eisessig)	Fisher Scientific UK Limited (Großbritannien)
Ethanol absolut	VWR International GmbH (Darmstadt)
Ethylacetat	VWR International GmbH (Darmstadt)
Methanol	Fisher Scientific UK (Großbritannien)
Natriumhydroxid	Merck KGaA (Darmstadt)
Pflanzliche Naturstoffe	PhytoLab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth)
Salzsäure 37%	Merck KGaA (Darmstadt)
Schwefelsäure 95-98%	Merck KGaA (Darmstadt)
Vanillin	Merck KGaA (Darmstadt)

3.1.3.2 ***Puffer und Lösungen***

Ammoniumpuffer pH 9	Ammoniak 25%	0,68 g
	Ammoniumchlorid	0,95 g
	H_2O_{bid}	ad 100 mL
Fließmittel 1	Ameisensäure	11 mL
	Essigsäure	11 mL
	H_2O_{bid}	27 mL
	Ethylacetat	100 mL
Fließmittel 2	H_2O_{bid}	10 mL
	Methanol	13 mL
	Ethylacetat	77 mL
1M Natriumhydroxid (NaOH)	NaOH	4 g
	H_2O_{bid}	ad 100 g
1M Salzsäure	Salzsäure 37%	9,87 g
	H_2O_{bid}	ad 100 g

Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz	Vanillin	1 g
	Schwefelsäure (95-98%)	2 mL
	Ethanol absolut	100 mL

3.1.4 Zellkultur und -analytik

3.1.4.1 *Chemikalien, Proteine und Substanzen*

L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin)
Albumin Fraktion V (≥98%, pulverisiert, bovin)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA (Darmstadt)
DNAse I	Ambion – Life Technologies Corporation (USA)
DNAse I (10x) Puffer	Ambion – Life Technologies Corporation (USA)
dNTP Set, PCR-Grade (100mM)	Qiagen N.V. (Niederlande)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
EnzCheck Lysozyme Assay Kit	Invitrogen – Life Technologies (USA)
FBS Superior	Biochrom AG (Berlin)
HOECHST 33258	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Human TLR1-9 Agonist Kit	InvivoGen (Frankreich)
Humaner IL-1α ELISA-Kit	PeproTech (USA)
Humaner IL-6 ELISA-Kit	PeproTech (USA)
Humaner IL-10 ELISA-Kit	PeproTech (USA)
Humanes IFNγ	Cell Signaling Technology, Inc. (USA)
Humanes TNFα	Cell Signaling Technology, Inc. (USA)
Humaner TNF-α ELISA-Kit	eBioscience, Inc. (USA)
M-MLV Reverse Transcriptase (200u/µL)	Promega (USA)
Oligo dT Primer (0,4µg/µL)	Qiagen N.V. (Niederlande)
PBS Dulbecco	Biochrom AG (Berlin)
Pflanzliche Naturstoffe	PhytoLab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth)

Phorbol-13-myristat-12-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Phosphorsäure 85%	Merck KGaA (Darmstadt)
Primer für die qPCR	Life Technologies Corporation (USA)
RNA-Extraktions-Kit	SeqLab (Göttingen)
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG (Berlin)
Saccharose	Pfeifer & Langen GmbH & Co. KG (Köln)
THP-1 Zellen	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig)
TMB ELISA Substrate Solution	eBioscience, Inc. (USA)
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Wasser clease-Free, not DEPC-Treated)	Ambion – Life Technologies Corporation (Nu- (USA)
Wasser für Injektionszwecke (WFI)	Gibco – Life Technologies Corp. (USA)
XTT Zellproliferations-Testkit	AppliChem GmbH (Darmstadt)

3.1.4.2 *Puffer und Lösungen*

β-Glukosidase-Lösung	β-Glukosidase	1 U/mL
HOECHST-Stocklösung	HOECHST 33258	1 mg/mL
Medium 1 (Zellkultur)	L-Alanyl-L-Glutamin	5 mL
	FBS	50 mL
	RPMI 1640	ad 500 mL
Medium 2 (Zellkultur)	L-Alanyl-L-Glutamin	5 mL
	FBS	5 mL
	RPMI 1640	ad 500 mL
Medium (Einfriermedium)	L-Alanyl-L-Glutamin	5 mL
	DMSO	50 mL
	FBS	100
	RPMI 1640	ad 500 mL
Medium (Auftaumedium)	L-Alanyl-L-Glutamin	5 mL
	FBS	100 mL
	RPMI	ad 500 mL
1M Phosphorsäure	Phosphorsäure 85%	11,53 g
	H_2O_{bid}	ad 100 g

3.1.4.3 *Stimulanzien: Synthetische TLR-Agonisten*

Alle Substanzen wurden in Wasser für Injektionszwecke (WFI) auf eine Konzentration von 5 µg/mL eingestellt (Stocklösung). Für die Stimulation im 24-well Format wurden 10 µL Stocklösung in 490 µL Medium gelöst, sodass eine Endkonzentration von 100 ng/mL erreicht wurde.

Agonist	*Kurzbeschreibung*	*Toll-Like Rezeptor*
Pam3CSK4	Synthetisches tripalmityliertes Lipopeptid	TLR 1/2
HKLM	Gefriergetrocknete, hitzeinaktivierte Präparation von *Lysteria monocytogenes*	TLR 2
Poly(I:C)	Synthetisches, doppelsträngiges RNS-Analog	TLR 3
Poly(I:C) LMW	Synthetisches, doppelsträngiges RNS-Analog, niedriges Molekulargewicht	TLR 3
LPS-EK	Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli*	TLR 4
ST-FLA	Flagellin aus *Salmonella typhinurium*	TLR 5
FSL-1	Synthetisches Lipoprotein aus *Mycoplasma salivarium*	TLR 6/2
Imiquimod	Imidazoquinolin Aminanalog zu Guanosin	TLR 7
ssRNA40	GU-reiche, einzelsträngige RNS	TLR 8
ODN2006	Synthetische DNS mit unmethylierten CpG Dinukleotiden	TLR9

Tabelle 1: **Verwendete synthetische Toll-Like Rezeptoren**

3.1.4.4 *Stimulanzien: Mikrobielle Präparationen*

Die im Rahmen der Forschungsarbeiten verwendeten mikrobiellen Präparationen wurden durch die Firma SANUM-Kehlbeck GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Präparationen erfolgte, wie bereits beschrieben (Helal et al. 2012). Die lyophilisierten Präparationen wurden in Wasser für Injektionszwecke gelöst und auf eine Konzentration von 50 µg/mL (Stocklösung) eingestellt. Für die Stimulation im 24-well Format wurden 10 µL Stocklösung in 490 µL Medium gelöst, sodass eine Endkonzentration von 100 ng/mL erreicht wurde.

Eine Auflistung der untersuchten Präparationen findet sich in nachstehender Tabelle. Zur genaueren Spezifizierung wurden im Text folgende Abkürzungen verwendet:

extractum e volumine ex muris cellulae → evemc., e volumine cellulae → evc., extractum → extr., serum oryctolagi → sero, culturae filtratum → cf.

Ausgangsstoff	**Nummer**	**Aufarbeitung**
1. Pilze		
Candida albicans	1	e volumine cellulae
Candida albicans Sero A	2	extractum
Candida albicans Sero B	3	extractum
Candida parapsilosis	4	e volumine cellulae
Mucor racemosus	5 6	e volumine cellulae serum oryctolagi
Mucor mucedo (+)	7	e volumine cellulae
Mucor mucedo (-)	8	e volumine cellulae
Penicillium chryogenum (syn. P. notatum)	9	e volumine cellulae
Penicillium glabrum (syn. P. frequentans)	10	e volumine cellulae
Penicillium roquefortii	11	e volumine cellulae
Penicillium brevicompactum (syn. P. stolon-iferum)	12	e volumine cellulae
Aspergillus niger	13 14	e volumine cellulae serum oryctolagi
Aspergillus ruber	15	e volumine cellulae
Aspergillus oryzae	16	e volumine cellulae
Fomitopsis pinicola (syn. Fomes pinicola , syn. Polyporus pinicola, syn. Boletus pinico-la)	17 18	e volumine cellulae extractum e volumine ex muris cellulae
Laricifomes officinalis	19	e volumine cellulae
Ustilago zeae	20	e volumine cellulae
Trichophyton verrucosum	21 22	e volumine cellulae extractum

2. *Grampositive Bakterien*

Bacillus subtilis	23	e volumine cellulae
	24	culturae filtratum
	25	e volumine ex muris cellulae
Bacillus cereus	26	e volumine cellulae
	27	e volumine ex muris cellulae
Bacillus firmus	28	e volumine cellulae
	29	e volumine ex muris cellulae
Mycobacterium phlei	30	e volumine cellulae
	31	e volumine ex muris cellulae
Mycobacterium bovis	32	e volumine cellulae
	33	e volumine ex muris cellulae
	34	extractum
Propionibacterium acnes	35	culturae filtratum
	36	extractum
Propionibacterium avidum	37	e volumine ex muris cellulae
Corynebacterium stationis	38	culturae filtratum
Streptococcus pyogenes	39	extractum
Staphylococcus aureus	40	extractum

3. *Gramnegative Bakterien*

Brucella melitensis	41	extractum
Escherichia coli	42	extractum
Klebsiella pneumonia	43	extractum
Proteus vulgaris	44	extractum
Pseudomonas aeruginosa	45	extractum
Salmonella enteritidis	46	extractum
Serratia marcescens	47	extractum

Tabelle 2: **Verwendete mikrobielle Präparationen**

3.1.4.5 *Stimulanzien: Pflanzliche Naturstoffe*

Die lyophilisierten pflanzlichen Naturstoffe wurden in Wasser für Injektionszwecke, Ethanol oder Methanol gelöst und auf eine Konzentration von 25 mM (Stocklösung) eingestellt. Für die Stimulation im 24-well Format wurden 10 µL Stocklösung in 490 µL Medium gelöst, sodass eine Endkonzentration von maximal 500 µM erreicht wurde.

*Name **	*Stoffgruppe*	*Lösungsmittel*
Aconitin	Diterpenalkaloide	Ethanol
Aucubin	Iridoidglycoside	H_2O
Catalpol	Iridoidglycoside	H_2O
Harpagid	Iridoidglycoside	H_2O
Harpagosid	Iridoidglycoside	H_2O
Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid	Amide	Methanol

* Für Strukturformeln siehe Abb. 2!

Tabelle 3: **Verwendete pflanzliche Naturstoffe**

3.1.4.6 *Verwendete Primer*

Für die Amplifikation spezifischer cDNAs wurden folgende Primerpaare verwendet. Die Generierung der Primer erfolgte mit Hilfe von *Primer*-BLAST, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Über den *Homo Sapiens (human) Nucleotide*-BLAST, NCBI, wurde auf unspezifische Amplifikate überprüft und entsprechende Primer aus sortiert. Die Amplifikate haben eine Länge von 106 – 165 Nukleotiden und einen GC-Gehalt von 50% – 60%. Jedes Amplifikat war Exon-Exon-Junction überspannend.

Gene Name	*Orientierung*	*Oligo Sequenz (5' nach 3')*	*Accession Number*
GAPDH	Sense	AGCCTCCCGCTTCGCTCTCT	NM_002046.4
GAPDH	Antisense	GCGCCCAATACGACCAAATCCGT	
TNF alpha	Sense	TCTGGCCCAGGCAGTCAGATCAT	NM_000594.2

TNF alpha	Antisense	CGGCGGTTCAGCCACTGGAG	
CD86	Sense	ACAGACACACGGATGAGTGGGGT	NM_175862.4
CD86	Antisense	TCAGAGGAGCAGCACCAGAGAGC	
ICAM-1	Sense	GGGAACAACCGGAAGGTGTA	NM_000201.2
ICAM-1	Antisense	GGAGTCCAGTACACGGTGAG	
PECAM-1	Sense	ACCAAGCAGAAGGCTAGCAA	NM_000442.4 *
PECAM-1	Antisense	GGGGCAAGAATGACTCTGACT	
MAC-1	Sense	GGCCAATGTGACCAGTGAGAA	NM_001145808.1
MAC-1	Antisense	CTGAGGCCGTGAAGTTGAGAT	
L-Selektin	Sense	CTCTGTTGTGATTTCCTGGCAC	NM_000655.4
L-Selektin	Antisense	CCGCCTTGTTTTGTATGGCAA	
ESL-1	Sense	AGGATGTGAGGGAGCCTGAA	NM_012201.5 **
ESL-1	Antisense	TTCCAACCGGTTCATCAGCA	
PSGL-1	Sense	ATGCCCATGGAGTTCGTGGT	NM_001206609.1
PSGL-1	Antisense	GCATGGCACCAGCCATCTTAT	

* Transkriptvarianten (XM_005276883.1, XM_005276882.1, XM_005276881.1, XM_005276880.1, XM_006721944.1, XM_006721945.1)

** Transkriptvarianten (NM_000632.3, NM_001145808.1)

Tabelle 4: **Primer für die quantitative PCR**

3.2 Methoden

3.2.1 Dünnschichtchromatographie

Ob und in welchem Umfang die untersuchten Iridoidglykoside unter verschiedenen Bedingungen in Aglykon und Zuckerrest gepalten werden können, wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft. Die DC zählt zu den planarchromatographischen Verfahren und dient zur Trennung sowie zur qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzen. Als stationäre Phase dienten mit Kieselgel beschichtete DC-Alufolien. Die mobile Phase unterschied sich entsprechend der verwendeten Iridoidglykoside; für Aucubin und Catalpol wurde Fließmittel 1, für die Versuche mit Harpagid und Harpagosid Fließmittel 2 verwendet. Auf entsprechende Kammersättigung wurde geachtet. Als Detektionsmittel diente Vanillin-Schwefelsäure. Als Maß für die Trennung diente der R_F-Wert, der sich entsprechend der Laufstrecke der Substanz (a) und der Laufstrecke (b) des Lösungsmittels anhand folgender Formel ermittelte:

$$R_F = \frac{a}{b}$$

Für die Untersuchungslösung wurden 15 µl Probe mit 15 µl Spaltungsreagenz in ein Reaktionsgefäß gegeben und intensiv gemischt. Kontrollproben wurden mit reinem Lösungsmittel ohne Spaltungsreagenz versetzt. Diese Mischungen wurden für 20 min bei 37°C mit einer Geschwindigkeit von 500 rpm geschüttelt und anschließend auf Eis gekühlt. Versuchslösungen mit β-Glukosidase wurden zur Enzyminaktivierung im Anschluss an das Schütteln für 3 Minuten bei 80 °C erhitzt und danach für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. 10 µl der klaren Versuchslösungen wurden dann bandenförmig innerhalb eines Abstandes von 1,5 cm auf die vorbereitete DC-Platte aufgetragen und trocknen gelassen.

Untersucht wurden wässrige Aucubin-, Catalpol-, Harpagid- und Harpagosid-Lösungen in einer Konzentration von 5 mmol/l. Als Spaltungsreagenzien dienten in verschiedenen Konzentrationen Salzsäure, Natronlauge und β-Glukosidase-Lösung.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 *Auftauen und Einfrieren von THP-1 Zellen*

Die im Rahmen der praktischen Arbeiten verwendeten THP-1 Zellen entstammen der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig). Unmittelbar nach Erhalt erfolgte die Expansion erst auf 25 cm^2, dann auf 75 cm^2 Suspensionskulturflaschen in Auftaumedium (RPMI 1640 Medium + 20 % FBS + 1 % L-Glutamin). Das Auftauen der Zellen erfolgte so schnell wie möglich. Dazu wurde ein 1 mL Aliquot aus dem Flüssigstickstoff genommen, im Wasserbad auf 37 °C erhitzt und in 9 mL Auftaumedium resuspendiert. Um die Zellen vom DMSO zu befreien wurden sie erneut für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und erneut in 10 mL Auftaumedium resuspendiert. Nach der Kultivierung für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 in einer 25 cm^2 großen Suspensionskulturflasche erfolgte ein Mediumwechsel mit Auftaumedium, die Überführung in eine 75 cm^2 großen Flasche und die erneute Kultivierung für drei Tage. Die weiteren Passagen erfolgten in regulärem Zellkulturmedium.

Vor dem Einfrieren wurden die THP-1 Zellen für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und in Einfriermedium (RPMI 1640 Medium + 20 % FBS + 1 % L-Glutamin + 10 % DMSO) bei einer Konzentration von 5,5 x 10^6 Zellen/mL resuspendiert. Mehrere, je 1 mL große Aliquots wurden dann langsam auf -80 °C herunter gekühlt und anschließend für die längere Aufbewahrung bei -120 °C in Flüssigstickstoff gelagert.

3.2.2.2 *Kultivierung und Passagieren von THP-1 Zellen*

Die Kultivierung der THP-1 Zellen erfolgte in Zellkulturmedium (RPMI 1640 Medium + 10 % FBS + 1 % L-Glutamin) bei 37 °C und 5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Die Zellen wurden alle vier Tage im Verhältnis von 1:4 beziehungsweise alle drei Tage im Verhältnis von 1:3 passagiert. Aufgrund ihres differenzierungsfördernden Potentials wurde auf die Verwendung jeglicher Antibiotika verzichtet (Mathieson et al. 2011).

3.2.2.3 *Stimulationsprotokolle*

Vor der Aussaat der THP-1 Zellen wurde stets ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten Zellen betrug in der 24-well Platte zwischen 500.000 und 600.000 Zellen/mL, was bei 500 µL eingesetztem Volumen eine absolute Zellzahl von 250.000 bis 300.000 Zellen/well ergibt. Jede Versuchsbedingung wurde als biologisches Triplikat (n = 3) ausgesät. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Stimmulationsprotokolle verwendet (Abb. 3). Aufgrund seines großen Aufwands und seiner Störanfäl-

ligkeit wurde das Stimulationsprotokoll A, welches für die Experimente in Abb. 4 – 7 verwendet wurde, durch Stimulationsprotokoll B ersetzt. Dieses zeigte bei weniger Zellsterblichkeit, größerer Reproduzierbarkeit und weniger Arbeitsaufwand äquivalente Ergebnisse. Für die mRNA-Expressionskinetik wurde das Protokoll B entsprechend Modifiziert; die Ernte erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 und 48 h nach Stimulation mit IFNγ und LPS. Die Experimente bezügliche des Einflusses von LPS auf die Induzierbarkeit von THP-1 Zellen durch Pilzpräparationen wurde Stimulationsprotokoll C verwendet. Der Einfluss verschiedener pflanzlicher Naturstoffe auf die mRNA-Expression und TNFα-Sekretion wurde mit Hilfe des Stimulationsprotokolls D untersucht.

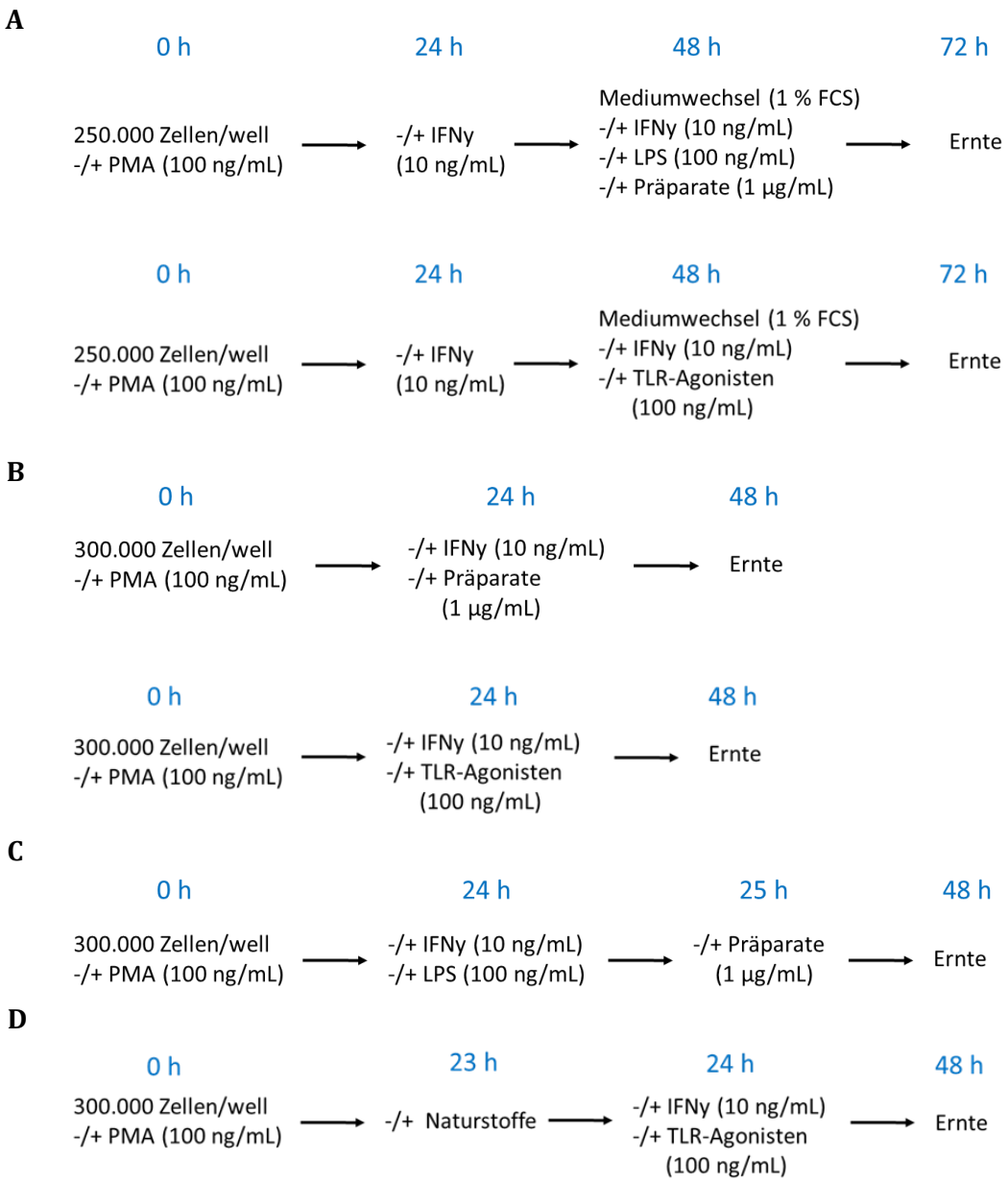


Abb. 3: Für die zellbiologischen Arbeiten verwendeten Stimulationsprotokolle

3.2.2.4 *Ernte*

Die Ernte der Überstände für die *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) und die Lysozymaktivitätsmessungen erfolgte nach Zentrifugation der undifferenzierten THP-1 Zellen und direkt aus der Platte bei den differenzierten THP-1 Zellen. Da das Einfrieren und Auftauen keinen Einfluss auf die Nachweisbarkeit und Aktivität hatte (k.A.), wurden die Proben bei -20 °C gelagert und erst am nächsten Tag quantifiziert.

Für die Quantifizierung der mRNA wurden die undifferenzierten Zellen geerntet, für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und die Überstände dekantiert. Bei den PMA-differenzierten Zellen wurden die Überstände mit einer Pipette abgenommen. Im Anschluss wurden die biologischen Triplikate jeder Versuchsbedingung vereint und die Extraktion gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.2.3 **ELISA und Lysozymaktivitätsmessung**

Die Bestimmung der Menge an sekretiertem TNFα, IL-1α, IL-6, und IL-10 wurde ein Sandwich-ELISA verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll mit folgenden Besonderheiten. Aufgrund der hohen Konzentration an sekretiertem TNFα wurden die PMA-positiven Proben in der Verdünnung 1:20 bis 1:50 angesetzt. Die Absorptionsmessung für TNFα erfolgte am Mikroplattenleser Infinite® 200 der Firma Tecan bei einer Wellenlänge von 495 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Die Messung der Absorption bei den Interleukin-ELISA wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm durchgeführt.

Zur Bestimmung der Lysozymaktivität wurde der EnzCheck Lysozyme Assay Kit der Firma Life Technologies verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Die Verstärkung des Lichtsignals betrug 60 %.

3.2.4 **RT-qPCR**

Die RT-qPCR ist eine Kombination aus reverser Transkription von zellulärer mRNA in cDNA und der anschließenden Quantifizierung der synthetisierten DNA. Sie ist eine effiziente Methode, um Unterschiede in den Expressionsniveaus von Zielgenen unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen zu bestimmen. Die Eigenschaft des Fluoreszensfarbstoffs Sybr Green in doppelsträngige DNA zu interkalieren und nach Anregung mit einer Wellenlänge von 494 nm Licht zu emittieren wird dabei zur Quantifizierung genutzt. Das Lichtemissionsmaximum liegt bei 522 nm. Die im Idealfall nach jedem PCR-Zyklus verdoppelte Menge DNA kann entsprechend doppelt so viele Moleküle Sybr Green binden, was wiederum zu einer Verdopplung der

möglichen Lichtemission führt. Durch graphische Darstellung der Lichtintensität gegen die Zyklenanzahl ergibt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf, der für die Berechnung des Schwellenwerts, also ab wann ein Signal als oberhalb der Hintergrundstrahlung definiert wird, herangezogen werden kann.

3.2.4.1 *Quantifizierung der Zielgene*

Zur absoluten Quantifizierung der Zielgene diente im Rahmen meiner Promotion der Mittelwert aus den Maxima der 2. Ableitung der Amplifikationskurven der Probentriplikate *(2nd Deriviate Max)*; im Folgenden als ct-Wert bezeichnet. Zur Normalisierung der Zielgene wurde der Δct-Wert (Probe) herangezogen, der sich aus der Differenz des ct-Werts des jeweiligen Zielgens einer Probe und dem ct-Wert des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der gleichen Probe herleitet.

Zur Bestimmung der relativen Expressionsänderung ε_{rel} einer Probe im Vergleich zur Kontrolle (ctrl), wurden die entsprechenden Δct-Werte gemäß folgender Formel in Bezug gesetzt:

$$\varepsilon_{rel} = 2^{-(\Delta ct\ (Probe)\ -\ \Delta ct\ (ctrl))}$$

Die Berechnung des absoluten Fehlers der relativen Expressionsänderung σ (ε_{rel}) erfolgte mit Hilfe der Formel:

$$\sigma_{\varepsilon_{rel}} = \sqrt{((\varepsilon_{rel\ (Probe)} \cdot \ln 2)^2 \cdot (\sigma_{\Delta ct\ (Probe)})^2)}$$

3.2.4.2 *RNA-Extraktion*

Für die Wahl der Extraktionsmethode wurden zwei kommerzielle Kits miteinander verglichen. Das SEQLAB Mini-RNA-Kit der Firma SeqLab zeigte im Vergleich zum High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche bei gleicher Reinheit einen deutlichen Vorteil hinsichtlich Handhabung und Preis pro Probe. Die relevanten RNA-Extraktionen erfolgten demnach mit dem SEQLAP Mini-RNA-Kit gemäß Herstellerprotokoll. Im Anschluss an die RNA-Extraktion wurden die in RNase freiem H_2O gelösten Proben für 24 h bei -20 °C gelagert und anschließend am Nanodrop quantifiziert und für die cDNA-Synthese aliquottiert.

3.2.4.3 *cDNA-Synthese*

Für die cDNA Synthese wurden entsprechend des Extraktionserfolgs 1,5 - 2 µg RNA in einem PCR-Reaktionsgefäß mit nukleasefreiem H_2O auf 10 µL aufgefüllt. Anschließend wurden 5 µL Master Mix 1 (1 µL dNTP-Mix (10mM) + 1 µL Oligo-dT (0,5 µg/µL) + 4 µL H_2O_{bid}) hinzupipettiert. Nach der Primeranlagerung (5 min bei 65°C → 2 min bei 4°C) wurden 10 µL Master Mix 2 (0,7 µL MMLV Reverse Transkriptase + 0,5 µL Ribolock RNase Inhibitor + 2 µL DTT (0,1M) + 2 µL H_2O_{bid} + 5 µL 5x First Strand Puffer) dazugegeben und die eigentliche cDNA-Synthese gestartet (2 h bei 37°C → 15 min bei 75°C → 4°C). Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.4.4 *qPCR*

Pro Well einer 96-Well-Platte wurden 5 µL cDNA-Mix (Probe) vorgelegt und anschließend 15 µL PCR Mix hinzupipettiert. Die 96-Well Platte wurde mit Folie versiegelt und die Reaktion gestartet. Die Durchführung der qPCR erfolgte am LightCycler® 480 Real-Time PCR System. Es wurden stets Triplikate der jeweiligen Proben gemessen sowie für jedes Primerpaar Wasserkontrollen verwendet.

3.2.5 **XTT-Zellviabilitätstest**

Das Prinzip des XTT-Tests beruht auf der Annahme, dass in den Mitochondrien lokalisierte Dehydrogenasen vor allem in vitalen Zellen Tetrazoliumverbindungen wie z.B. Natrium-3´-(1-phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzensulphonsäure (XTT) reduziert werden und als Reaktionsprodukt ein farbiges Formazan entsteht, welche photometrisch bestimmt werden kann. Für die Aktivierung der Reaktion wird neben den mitochondrialen Dehydrogenasen noch N-Methyldibenzopyrazinmethylsulfat (PMS) benötigt.

Undifferenzierte THP-1 Zellen wurden in einer finalen Konzentration von 20.000 Zellen/well, differenzierte THP-1 Zellen in einer finalen Konzentration von 50.000 Zellen/well einer 96 well Platte angesetzt, mit PMA bzw. H_2O versetzt und für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden den angegebenen Substanzen in verschiedener Konzentration hinzugegeben und für 48 h inkubiert. Die Durchführung des XTT-Assays erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

3.2.6 Statistische Verfahren

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden prinzipiell zwei Verfahren genutzt. Bei Stichproben n > 4 wurde die statistische Signifikanz mithilfe des U-Tests nach Wilcoxon-Mann-Whitney bestimmt. Aufgrund der kleineren Stichproben (n = 3) bei einer Vielzahl von Zellkulturexperimenten, wurde aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als biologisches Triplikat angesetzt und vermessen wurden, ein repräsentatives Experiment ausgewählt und dargestellt. Einzelheiten zu jedem Experiment finden sich in den Abbildungslegenden. Einzelheiten zur Quantifizierung der Zielgen-mRNA-Expression finden sich in Abschnitt 3.2.4.1.

4 Ergebnisse

4.1 Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Proteine in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen

4.1.1 Einfluss von PMA, IFNγ und LPS auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität

Die *in vitro* Differenzierung von humanen THP-1 Zellen kann durch Stimulation mit verschiedenen Substanzen erreicht werden (Schwende et al. 1996). Aufgrund der Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit primär pro-inflammatorische Prozesse untersucht werden sollten, wurde für die Differenzierung der THP-1 Zellen der Phorbolester PMA verwendet. Abbildung 4 zeigt, dass eine stabile Differenzierung für mindestens 72 h durch die Stimulation mit 100 ng/mL PMA erreicht werden konnte. Dies zeigte sich sowohl pänotypisch durch eine gesteigerte Adhäsion der Zellen am Zellkulturplattenboden als auch in einer deutlichen Zunahme der TNFα-Sekretion (Abb. 4).

IFNγ ist ein Glykoprotein, das vor allem in niedrigen Konzentration zu einer starken Aktivierung von Makrophagen führt (Hu et al. 2008). Um den Einfluss von IFNγ und PMA auf die Ansprechbarkeit auf den TLR4-Agonisten LPS zu untersuchen wurden THP-1 Zellen vor der Stimulation entweder unbehandelt gelassen oder mit PMA und IFNγ vorbehandelt. In undifferenzierten THP-1 Zellen konnte die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität durch IFNγ nur geringfügig gesteigert werden, wohingegen LPS nahezu keinen Einfluss hatte (Abb. 5). Im Gegensatz dazu waren PMA-differenzierte THP-1 Zellen wesentlich sensitiver gegenüber einer Stimulation mit IFNγ als auch LPS. Die Stimulation mit IFNγ resultierte in einer Zunahme der TNFα-Sekretion auf das 3-Fache. Dieser stimulierende Effekt wurde durch zusätzliche Zugabe von LPS synergistisch verstärkt. Denn auch IFNγ-unbehandelte Zellen reagierten mit einem Anstieg in sekretiertem TNFα, jedoch in weitaus geringerem Maße. Im Kontext von Lysozym führte eine Vorbehandlung mit IFNγ zu einem fast 4-fachen Anstieg der messbaren Aktivität. Interessanterweise führte die zusätzliche Gabe von LPS in das Medium zu einer Abnahme der Lysozymaktivität. Dieser inhibitorische Effekt von LPS war sowohl messbar für IFNγ-behandelte als auch IFNγ-unbehandelte THP-1 Zellen (Abb. 5).

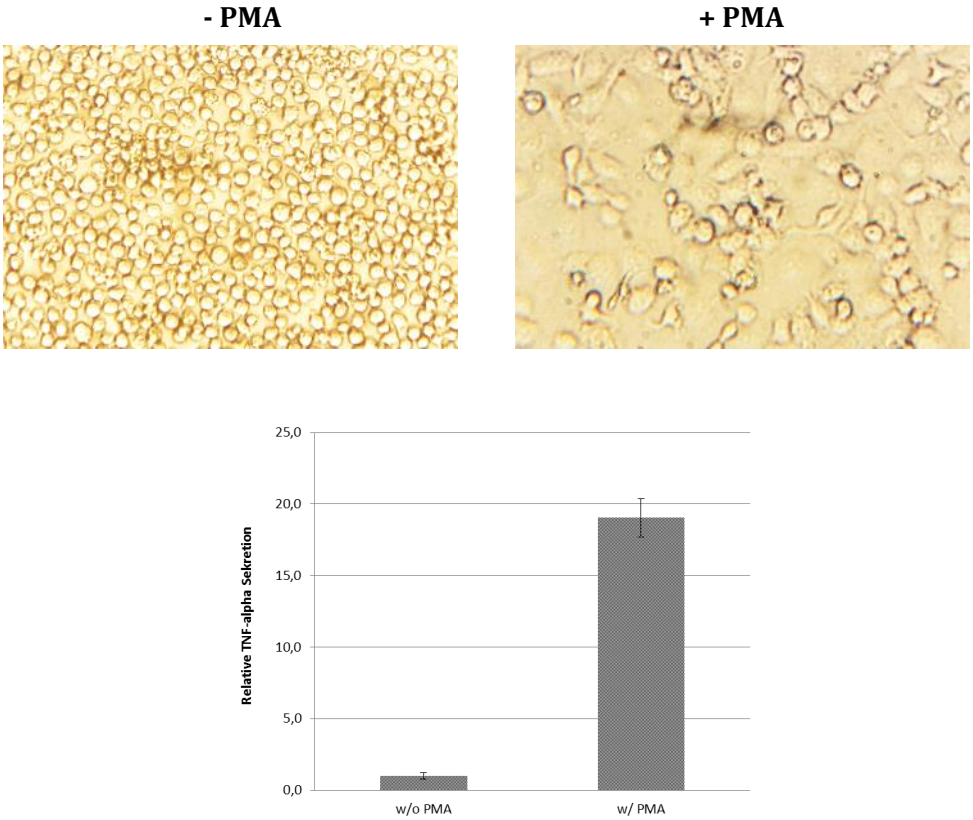


Abb. 4: Änderungen im Phänotyp und der TNFα-Sekretion nach Stimulation mit PMA. THP-1 Zellen wurden für 72 h mit 100 ng/mL PMA stimuliert, was zu einer starken Zunahme der Adhäsion führte. Die Bilder wurden 72 h nach Stimulation bei 100 x Vergrößerung aufgenommen. Die Quantifizierung der TNFα-Konzentration in den Überständen der PMA-unbehandelten und -behandelten THP-1 Zellen erfolgte über einen ELISA 48 h nach Stimulationsbeginn.

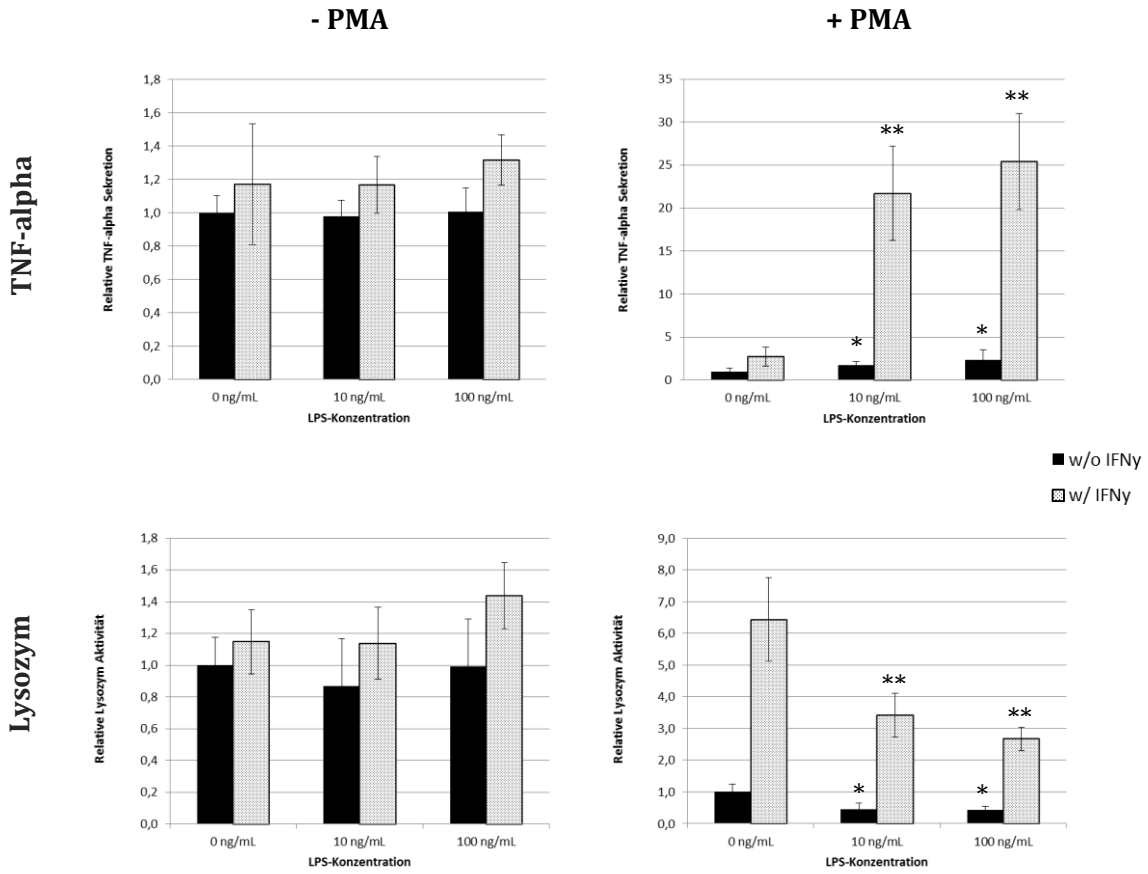


Abb. 5: Einfluss von PMA, IFNγ und LPS auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden in einer 24-well Platte (250.000 Zellen pro well) ausgesät und für 48 h mit PMA (100 ng/mL) differenziert oder zur Kontrolle mit DMSO (1:10000) behandelt. Im Anschluss an die Differenzierung erfolgte ein Mediumwechsel mit reduzierter Konzentration an FBS (RPMI + 1% FBS + 1% L-Glutamin). Unmittelbar nach dem Mediumwechsel wurden die undifferenzierten (-PMA) und differenzierten (+PMA) THP-1 Zellen für 24 h mit LPS in den Konzentrationen 0, 10 und 100 ng/mL in Gegenwart und Abwesenheit von IFNγ (10 ng/mL) stimuliert. TNFα-Sekretion wurde über einen ELISA quantifiziert, die Lysozymaktivität wurde enzymatisch bestimmt. Balken zeigen normalisierte Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei individuellen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. * Signifikanter Unterschied zur Kontrolle (w/o IFNγ), ** Signifikanter Unterschied zur Kontrolle (w/ IFNγ), $\alpha < 0.05$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, einseitiger U-Test).

4.1.2 Einfluss synthetischer TLR-Agonisten auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität

Um den Einfluss von IFNγ und verschiedener bakterieller Zellbestandteile, wie Lipopeptide und Oligonukleotide auf die TNFα-Sekretion und die Lysozymaktivität zu untersuchen, wurden undifferenzierte und differenzierte THP-1 Zellen mit verschiedenen TLR-Agonisten für 24 Stunden behandelt und die Überstände untereinander verglichen. Die Stimulation von undifferenzierten THP-1 Zellen mit IFNγ hatte keinen eindeutigen Effekt auf die Menge von sekretiertem TNFα (Abb. 6a). Die Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam3CSK4, HKLM und Poly(I:C) resultierte jedoch in einem 1,5-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Nur die Stimulation mit dem TLR-Agonisten FSL-1 führte zu einem 2- bis 3-fachen Anstieg der TNFα Sekretion sowohl in IFNγ-vorbehandelten als auch IFNγ-unbehandelten THP-1 Zellen (Abb. 6a). Im Gegensatz dazu zeigten mit PMA differenzierte THP-1 Zellen ein klares Ansprechen auf die Stimulation mit IFNγ und bestimmten TLR-Agonisten (Abb. 6b). Vorbehandlung von differenzierten THP-1 Zellen mit IFNγ resultierte in einer fast 10-fachen Steigerung von detektierbarem TNFα im Medium. Die Antwort auf die Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten ähnelte sich in IFNγ-vorbehandelten und IFNγ-unbehandelten THP-1 Zellen, jedoch nur TLR-Agonisten, die an Zelloberflächen TLRs binden, also Pam3CSK4, HKLM, ST-FLA, FSL-1 und LPS (für LPS siehe Abb. 5), waren effektiv (Abb. 6b). Wie in den undifferenzierten Zellen hatte die Stimulation mit dem TLR-Agonisten FSL-1 bei den differenzierten THP-1 Zellen den stärksten Einfluss, sowohl in den IFN-unbehandelten als auch in den IFNγ-vorbehandelten Proben (Abb. 6a, b). Obwohl die TNFα-Sekretion in der Gegenwart von IFNγ allgemein erhöht war, zeigte sich der relative Einfluss der verschiedenen TLR-Agonisten im Vergleich von differenzierten, IFNγ-vorbehandelten Zellen mit differenzierten, IFNγ-unbehandelten Zellen nicht so deutlich (Abb. 6b).

Da Lysozym die glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin spaltet, was zur Degradation grampositiver Bakterienzellwände führt, stellte sich die Frage, ob die Stimulation von Monozyten und/oder Makrophagen mit verschiedenen TLR-Agonisten die Sekretion von aktivem Lysozym beeinflussen würde. Auch hier sollte ein möglicher *priming*-Effekt von IFNγ untersucht werden, weshalb sowohl undifferenzierte als auch differenzierte THP-1 Zellen mit IFNγ vorbehandelt wurden (Abb. 6c, d). Undifferenzierte THP-1 Zellen zeigten im Kontext der Lysozymaktivität nur ein schwaches Ansprechen auf die IFNγ Vorbehandlung und auch die Stimulation mit den verschiedenen TLR-Agonisten hatte keinen signifikanten Effekt (Abb. 6c). Im Gegensatz dazu reagierten differenzierte THP-1 Zellen mit einem 2,5-fachen Anstieg der Lysozymaktivität nach Stimulation mit IFNγ. Darüber hinaus führte, obwohl auch nur geringfügig, der TLR-Agonist Pam3CSK4 zu einem leich-

ten Abfall der Lysozymaktivität, wohingegen vor allem intrazelluläre TLR-Agonisten gar keinen Einfluss zeigten (Abb. 6d).

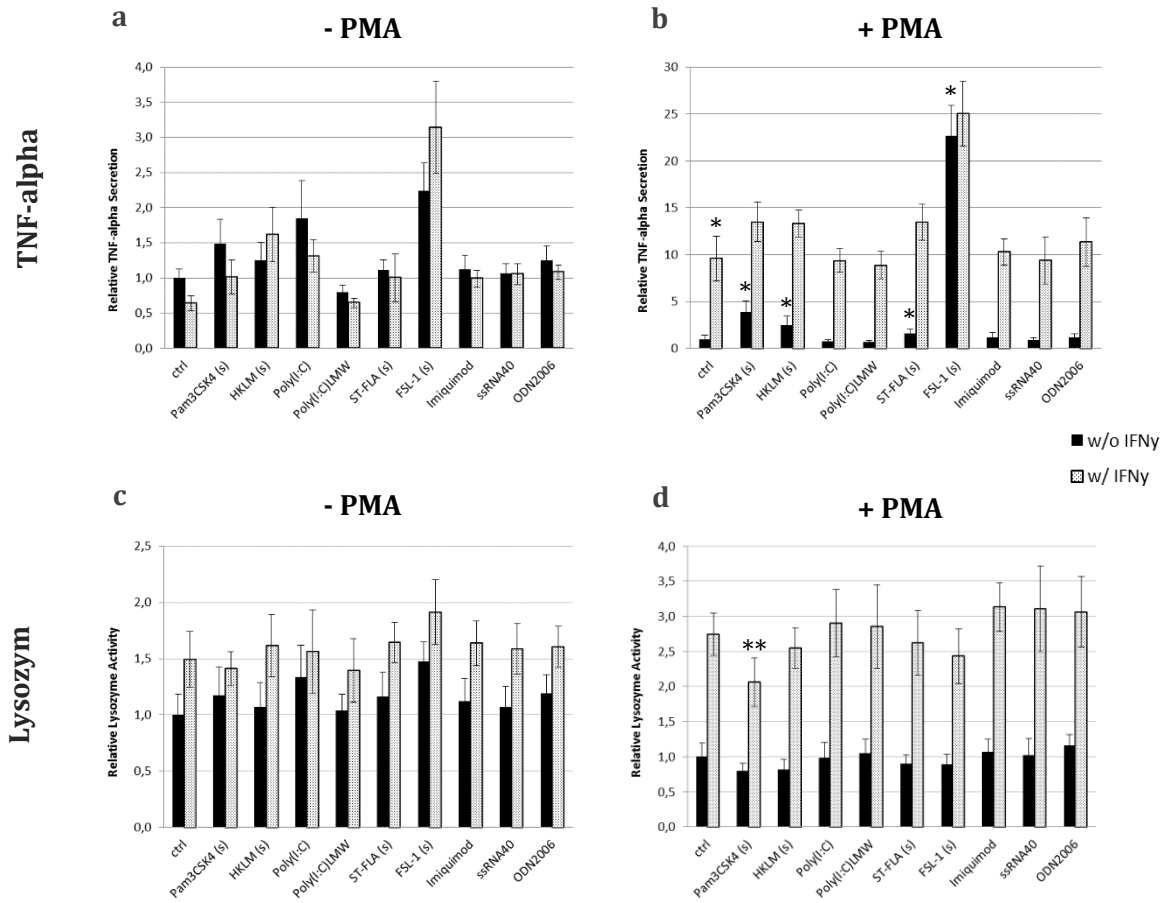


Abb. 6: Einfluss von IFNγ und synthetischer TLR-Agonisten auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden für 48 h mit PMA (100 ng/mL) differenziert. Undifferenzierte Zellen wurden zur Kontrolle mit DMSO (1:10000) behandelt. Das Priming der undifferenzierten und differenzierten Zellen erfolgte mit IFNγ (10 ng/mL) oder PBS 24 h nach der Aussaat. Die Stimulation mit den synthetischen TLR-Agonisten (100 ng/mL), sowie das zweite Priming erfolgte im Anschluss an einen Mediumwechsel mit serumreduzierten Medium (RPMI + 1% FBS + 1% L-Glutamin) 48 h nach Aussaat. **a** und **b:** TNFα-Sekretion wurde über einen ELISA quantifiziert. **c** und **d:** Aktives Lysozym wurde enzymatisch quantifiziert. Balken repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichung von vier individuellen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. (s) deutet auf TLR-Agonisten, die Zelloberflächenrezeptoren aktivieren. * Signifikanter Unterschied zur Kontrolle (w/o IFNγ), ** Signifikanter Unterschied zur Kontrolle (w/ IFNγ), $\alpha < 0.05$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, einseitiger U-Test).

4.1.3 Einfluss mikrobieller Präparationen auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität

Um der Frage nachzugehen, ob die zur Therapie eingesetzten mikrobiellen Präparationen der Firma SANUM-Kehlbeck GmbH & Co. KG im Kontext eines *in vitro* Zellsystems eine molekularbiologisch nachweisbarere Wirkung haben, wurden 47 mikrobielle Präparationen, hinsichtlich ihrer Fähigkeit die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in humanen THP-1 Zellen zu beeinflussen, untersucht. Das international tätige Pharmaunternehmen SANUM-Kehlbeck GmbH und Co. KG, welches Alleinhersteller spezieller Isopathika und Immunmodulatoren in Deutschland ist, stellte die im Rahmen dieser Promotion verwendeten Pilz- und Bakterienpräparationen freundlicherweise zur Verfügung. Eine ausführliche Zusammenstellung der Ergebnisse aller untersuchten Präparationen findet sich im Anhang (s. Anhang). Aus Gründen der Übersicht wird jedoch im Folgenden lediglich eine Auswahl besonders wirksamer und unwirksamer Präparationen dargestellt.

In allen durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Stimulation sowohl der undifferenzierten als auch der differenzierten THP-1 Zellen mit allen untersuchten Pilzpräparationen in diesem Zellmodell zu keiner Steigerung der TNFα-Sekretion führte. Zwar bewirkte die Vorstimulation mit IFNγ in den PMA-differenzierten Zellen eine Erhöhung der TNFα-Konzentration im Medium, änderte aber nichts an der Ansprechbarkeit hinsichtlich der verwendeten Pilzpräparationen. Die mitgeführte LPS-Positivkontrolle zeigte, den Erwartungen entsprechend, eine Zunahme der TNFα-Sekretion in differenzierten THP-1 Zellen sowohl mit als auch ohne IFNγ-Vorbehandlung (Abb. 7). Auch die Aktivität von sekretiertem Lysozym änderte sich nicht wesentlich. Lediglich die Gabe von LPS führte in Gegenwart von PMA und IFNγ zu einem deutlichen Abfall der Lysozymaktivität, was der bereits zuvor gemachten Beobachtung entsprach (vgl. Abb. 5).

Im Gegensatz zu den Pilzpräparationen führte die Mehrheit der verwendeten Bakterienpräparationen zu einer deutlichen Aktivierung der TNFα-Sekretion. Zwar waren sie, ähnlich den Pilzpräparationen, nicht in der Lage die undifferenzierten THP-1 Zellen zu stimulieren, im Gegensatz dazu bewirkten sie jedoch in PMA-differenzierten THP-1 Zellen einen deutlichen Anstieg der TNFα-Sekretion sowohl in den IFNγ-vorbehandelten und -unbehandelten Zellen (Abb. 8). Im besonderen Maße wirkten sich bei den grampositiven Bakterien die Präparate *Bacillus subtilis (evc.)* und *Bacillus subtilis (evemc.)*, *Bacillus firmus (evc.)* und *Bacillus firmus (evemc.)*, *Mycobacterium phlei (evemc.)*, sowie *Propionibacterium avidum (evemc.)* und bei den gramnegativen die Präparate *Escherichia coli (extr.)*, *Klebsiella pneumonia (extr.)* und *Serratia marcescens (extr.)* positiv auf die TNFα-Sekretion aus (Abb. 7, Anhang). Die Präparationen *Trichophyton verrucosum (evc.)* und *Trichophyton verrucosum (extr.)*, *Mycobacterium*

bovis (evc.) und *Mycobacterium bovis (evemc.)* und *Mycobacterium bovis (extr.)*, sowie *Brucella melitensis (extr.)* hatten dagegen keinen Einfluss auf die TNFα-Sekretion, weder in den IFNγ-vorbehandelten noch in den IFNγ-unbehandelten Proben (Tabelle 5).

Die Lysozymaktivität war auch mit den Bakterienpräparaten in den undifferenzierten THP-1 Zellen nicht zu beeinflussen. Auch IFNγ hatte hier keinen nennenswerten Einfluss. In den differenzierten THP-1 Zellen hingegen zeigten vor allem die Präparationen, die zu einem starken Anstieg der TNFα-Sekretion führten, einen hemmenden Einfluss auf die Lysozymaktivität, obwohl der Effekt durch den stimulierenden Einfluss von IFNγ teilweise überdeckt wurde (vgl. Abb. 8, Abb. 5, Anhang).

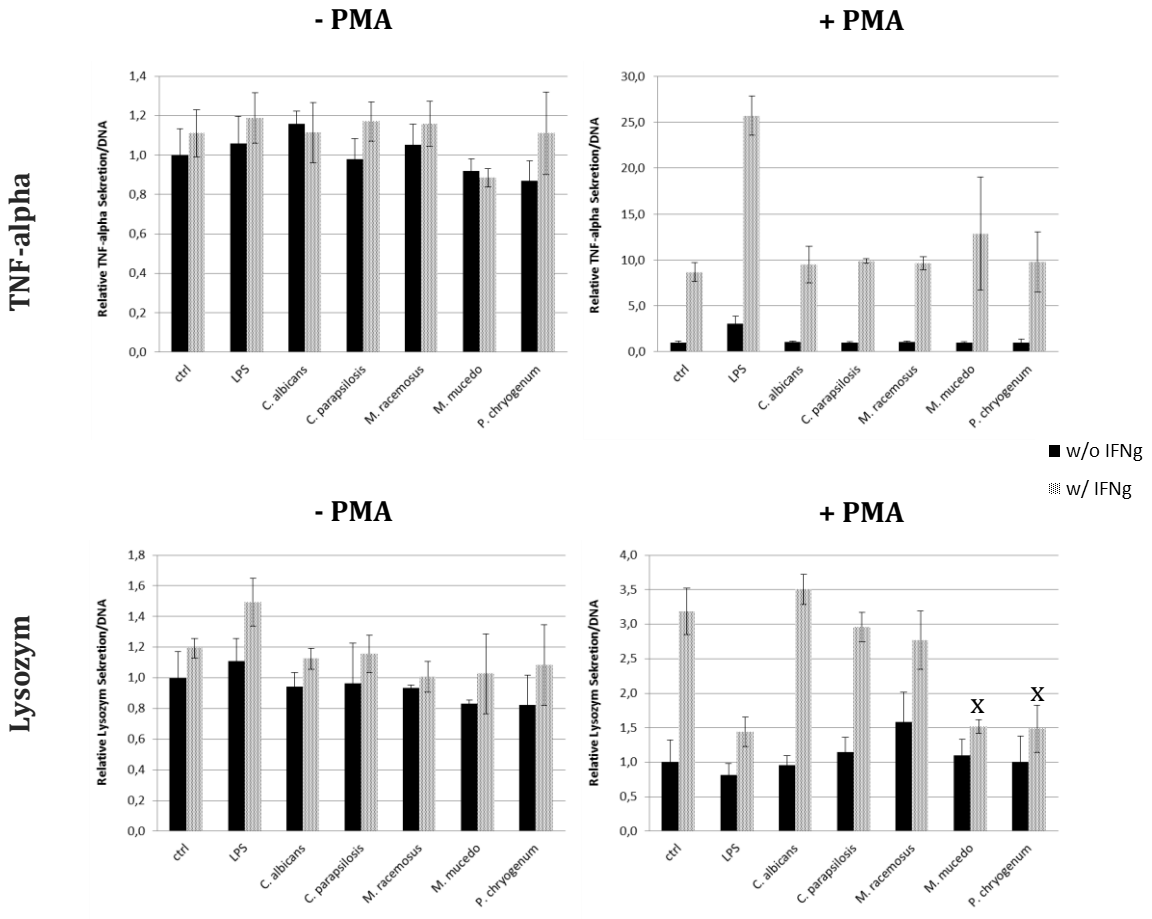


Abb. 7: Einfluss verschiedener Pilzpräparationen auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden mit einer Konzentration von 500.000 Zellen/mL (250.000 Zellen/well) in RPMI Medium (+10 % FBS + 1 % L-Glutamin) kultiviert und mit PMA (100 ng/mL) für 48 Stunden differenziert. DMSO in einer Verdünnung von 1:10000 diente als Kontrolle. 24 Stunden nach Differenzierungsbeginn wurden die Zellen mit IFNγ (10 ng/mL) oder PBS (als Kontrolle) stimuliert. 48 Stunden nach Differenzierungsbeginn erfolgte ein Mediumwechsel (RPMI + 1 % FBS + 1 % L-Glutamin). Unmittelbar nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen erneut mit IFNγ (10 ng/mL) und PBS stimuliert. Dazu erfolgte die Stimulation mit den mikrobiellen Präparationen (1 µg/mL) und LPS (100 ng/mL). H_2O diente als Kontrolle. 24 h später wurden die Zellen geerntet und die Überstände analysiert. Balken zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung eines von zwei individuell durchgeführten Experimenten (Zusammenfassung mehrerer Teilexperimente). Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. X die Präparate *M. mucedo* und *P. chryogenum* zeigten keinen hemmenden Einfluss auf die Lysozymsekretion im Vergleich zur experimentspezifischen Kontrolle (vgl. Anhang).

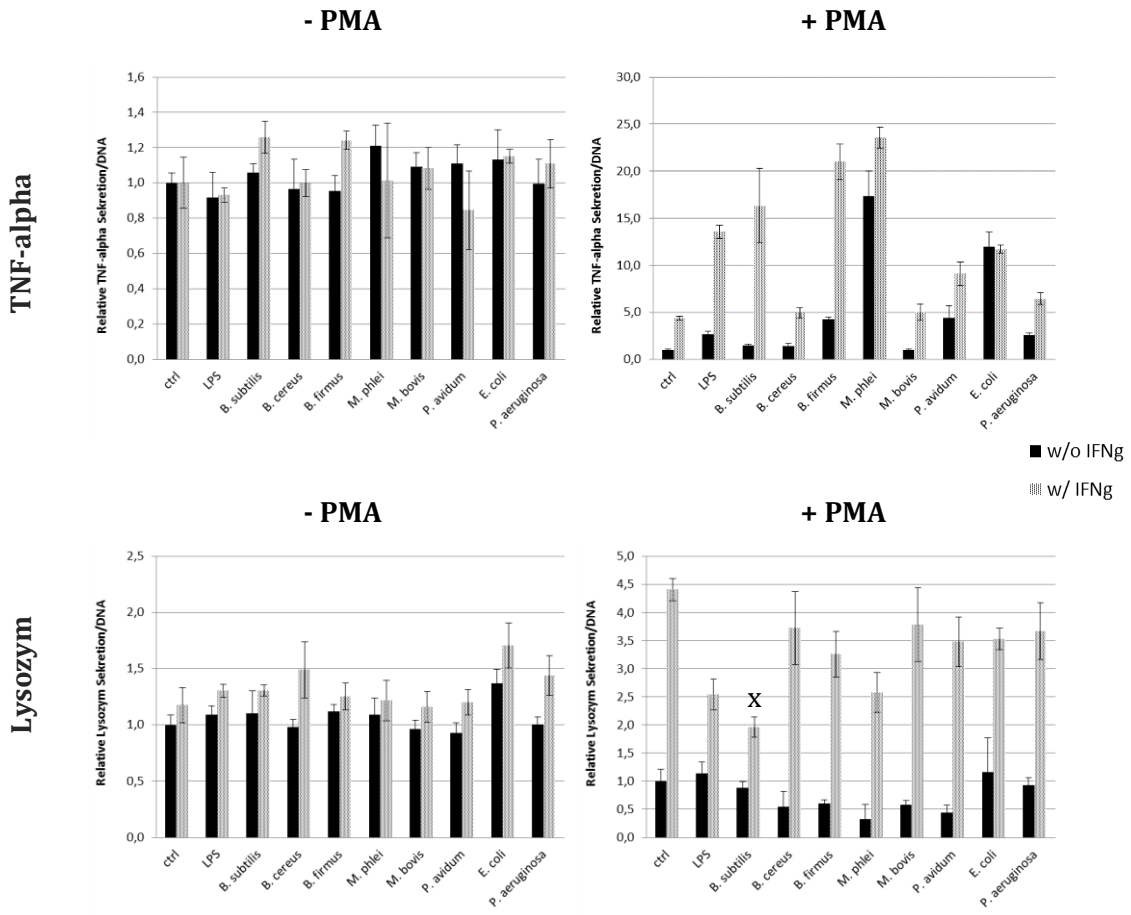


Abb. 8: Einfluss verschiedener Bakterienpräparationen auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden mit einer Konzentration von 500.000 Zellen/mL (250.000 Zellen/well) in RPMI Medium (+10 % FBS + 1 % L-Glutamin) kultiviert und mit PMA (100 ng/mL) für 48 Stunden differenziert. DMSO in einer Verdünnung von 1:10000 diente als Kontrolle. 24 Stunden nach Differenzierungsbeginn wurden die Zellen mit IFNγ (10 ng/mL) oder PBS (als Kontrolle) stimuliert. 48 Stunden nach Differenzierungsbeginn erfolgte ein Mediumwechsel (RPMI + 1 % FBS + 1 % L-Glutamin). Unmittelbar nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen erneut mit IFNγ (10 ng/mL) und PBS stimuliert. Dazu erfolgte die Stimulation mit den mikrobiellen Präparationen (1 µg/mL) und LPS (100 ng/mL). H_2O diente als Kontrolle. 24 h später wurden die Zellen geerntet und die Überstände analysiert. Balken zeigen Mittelwerte +/- Standardabweichung eines von zwei individuell durchgeführten Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. X: die Präparation *B. subtilis* evemc. zeigt keine derart starke Hemmung der Lysozymsekretion im Vergleich zur experimentspezifischen Kontrolle (vgl. Anhang)

4.1.4 Einfluss mikrobieller Präparationen auf die Expression von IL-1α, IL-6 und IL-10

Wissenschaftliche Untersuchungen haben gezeigt, dass Makrophagen, neben ihrer Rolle als pro-inflammatorische Fresszellen, auch immunmodulierende Eigenschaften haben (Benoit et al, 2008). Diese sogenannte Makrophagenpolarisation kann nach Benoit *et al.* anhand des Sekretionsmusters und der Expression bestimmter Oberflächenmarker kategorisiert werden. In Kombination mit TNFα sind vor allem IL-1 und IL-10 bei der Einordnung in die verschiedenen Unterkategorien bedeutsam. Aufgrund der schwachen Ansprechbarkeit undifferenzierter THP-1 Zellen auf die Stimulation mit IFNγ und mikrobiellen Präparationen, wurden die folgenden Experimente nur mit PMA stimulierten THP-1 Zellen durchgeführt. Untersucht wurden die Bakterienpräparationen *Bacillus subtilis (evemc.)*, *Bacillus cereus (evemc.)*, *Bacillus firmus (evemc.)*, *Mycobacterium phlei (evemc.)*, *Mycobacterium bovis (evemc.)*, *Propionibacterium avidum (evemc.)*, *Escherichia Coli (extr.)* und *Serratia marcescens (extr.)*, sowie die Pilzpräparationen *Candida albicans (evc.)*, *Candida parapsilosis (evc.)*, *Mucor racemosus (evc.)*, *Mucor mucedo (+) (evc.)* und *Penicillium chryogenum (evc.)*.

Die Sekretion von IL-1α und IL-10 war im Allgemeinen sehr schwach und stieg durch die Stimulation mit IFNγ und den untersuchten mikrobiellen Präparationen nur geringfügig oberhalb des Leerwerts, weshalb auf eine Leerwertbereinigung verzichtet wurde. IFNγ alleine führte zu einem Anstieg von messbarem IL-1α und IL-10 auf das zirka 1,2 – 1,3-Fache im Vergleich zur Kontrolle; die zusätzliche Gabe von LPS führte zu keinem weiteren Anstieg. In Kombination mit IFNγ waren lediglich die Präparationen *Mycobacterium bovis (evemc.)* und *Propionibacterium avidum (evemc.)* in der Lage die Sekretion von IL-1α um den Faktor 1,7 im Vergleich zur Kontrolle zu erhöhen. Die Sekretion von IL-10 konnte durch IFNγ und die Präparationen *Bacillus subtilis (evemc.)*, *Mycobacterium phlei (evemc.)* und *Mycobacterium bovis (evemc.)* auf das 1,4-Fache und durch die Präparation *Propionibacterium avidum (evemc.)* auf das 1,6-fache erhöht werden. Die zusätzliche Gabe der Präparation *Candida parapsilosis (evc.)* hingegen führte sowohl bei IL-1α, als auch bei IL-10 zu einem Abfall der Sekretion auf zirka 80 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9)

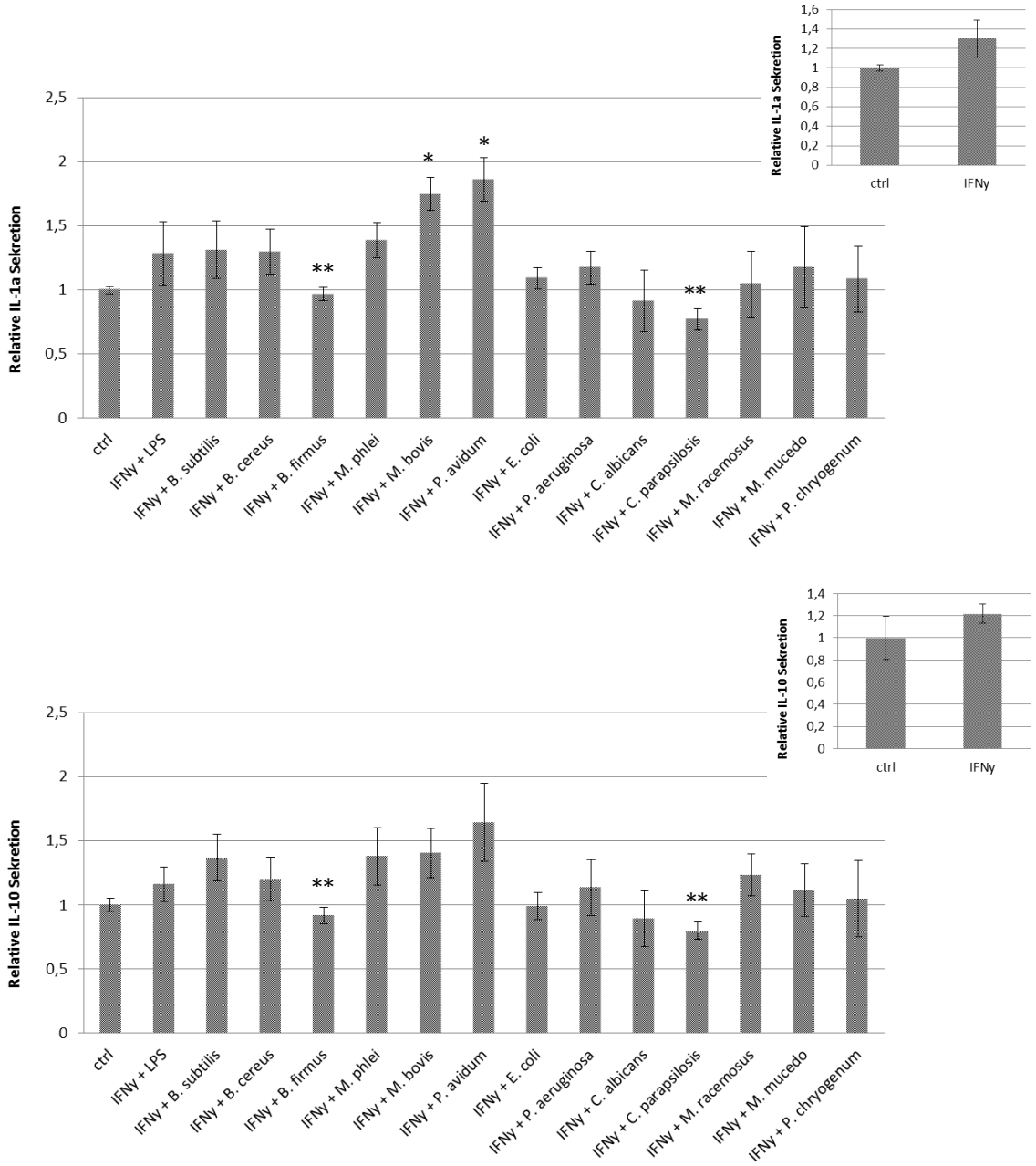


Abb. 9: Einfluss von IFNγ und verschiedener mikrobieller Präparationen auf die Sekretion von IL-1α und IL-10. THP-1 Zellen wurden in einer Konzentration von 300.000 Zellen/well in einer 24-well Platte ausgesät. Nach 24 h Inkubation mit PMA erfolgte die Stimulation mit IFNγ (10ng/mL), LPS (100ng/mL) und verschiedener Bakterien- und Pilzpräparationen (1 µg/mL) für 24 h. Interleukinsekretion wurde mittels ELISA quantifiziert. Graphen zeigen Mittelwerte +/- Standardabweichung von zwei vereinten Experimenten. Jedes einzelne Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Aufgrund der geringen Expression wurde keine Leerwertkorrektur durchgeführt. */** Signifikanter Unterschied zur Kontrolle (+ IFNγ), $\alpha < 0.05$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, einseitiger U-Test).

4.1.5 Einfluss von LPS auf die Aktivierbarkeit von THP-1 Zellen durch Pilzpräparationen

Experimente mit murinen *bone marrow-derived myeloid dendritic cells* (BMDCs) haben gezeigt, dass ß-Glucane aus Pilzmembranen in Kombination mit TLR-Agonisten zu einer gesteigerten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine führen (Huang et al. 2009). Um herauszufinden, ob die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pilzpräparationen ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf eine *in vitro* induzierte Entzündung in humanen immunkompetenten Zellen haben, wurden undifferenzierte und differenzierte THP-1 Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von IFNγ und LPS mit verschiedenen Pilzpräparationen stimuliert. Untersucht wurden die Pilzpräparationen *Candida albicans (evc.)*, *Candida parapsilosis (evc.)*, *Mucor racemosus (evc.)*, *Mucor mucedo (+) (evc.)* und *Penicillium chryogenum (evc.)*.

Die Ergebnisse zeigen, dass die TNFα-Sekretion durch die Präparationen *Candida albicans (evc.)*, *Candida parapsilosis (evc.)*, *Mucor mucedo (+) (evc.)* und *Penicillium chryogenum (evc.)* in Abwesenheit von LPS auf unter 50% im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt werden konnte (Abb.10). In Gegenwart von LPS war dieser Abfall jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Einzig *Mucor racemosus (evc.)* zeigte keinen hemmenden Einfluss auf die TNFα-Sekretion. Durch die kombinierte Gabe von Pilzpräparationen und LPS konnten weder stimulierende noch hemmende Effekte hinsichtlich der Sekretion von IL-1α, IL6 und IL-10 beobachtet werden.

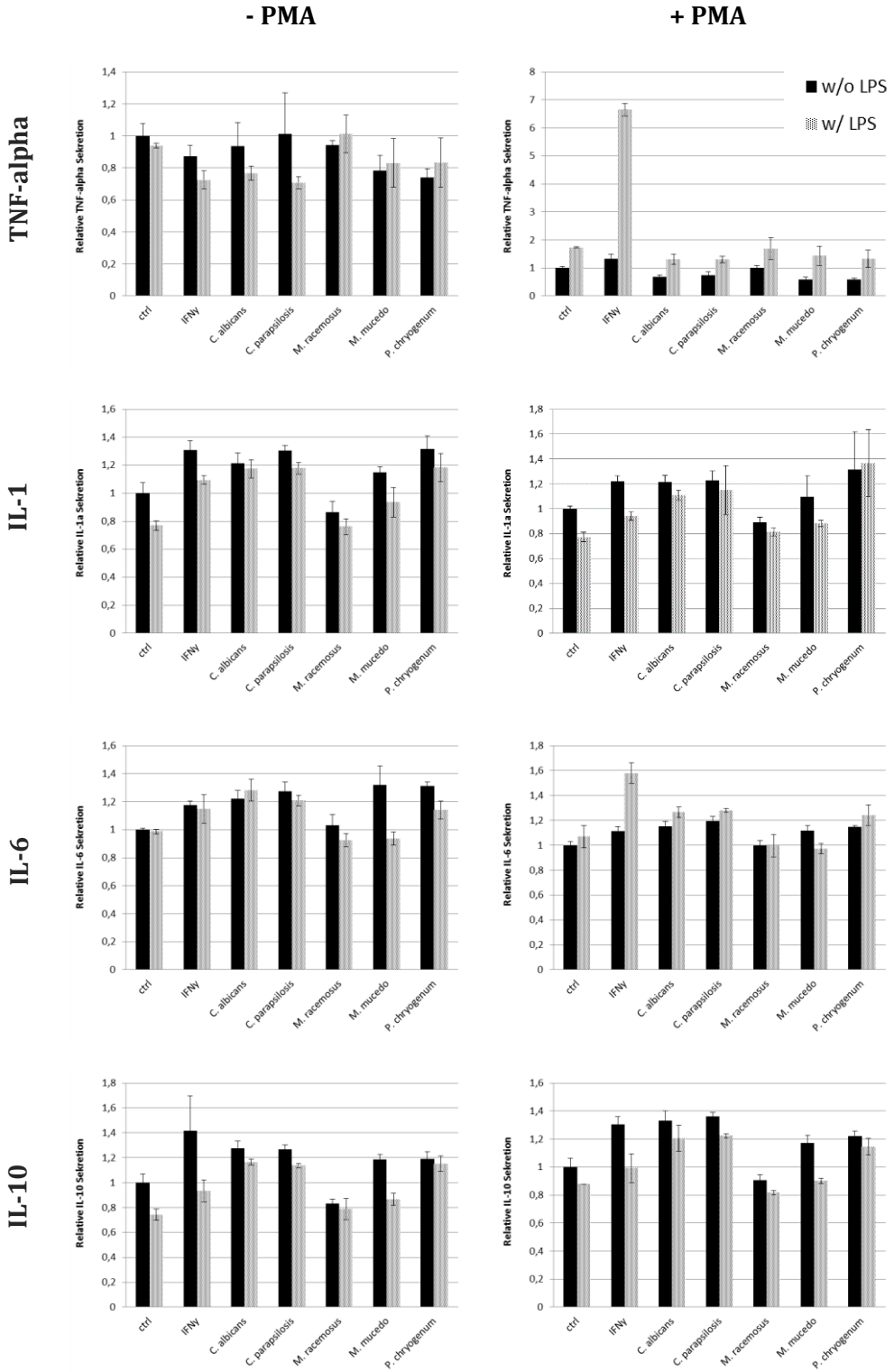


Abb. 10: Einfluss von LPS auf die Aktivierbarkeit undifferenzierter und differenzierter THP-1 Zellen durch Pilzpräparationen. THP-1 Zellen wurden in einer Konzentration von 300.000 Zellen/well in einer 24-well Platte ausgesät. Nach 23 h Inkubation erfolgte die Stimulation mit LPS (100ng/mL) für 1 h. Im Anschluss wurden verschiedene Pilzpräparationen (1 µg/mL) für 24 h hinzugegeben und die Interleukinsekretion mittels ELISA quantifiziert. Graphen zeigen eines von zwei individuellen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. IL-1α, IL-6 und IL-10 ELISA wurden ohne Leerwertkorrektur dargestellt.

4.2 Beeinflussung der TNFα-Sekretion durch verschiedene Naturstoffe pflanzlichen Ursprungs

Die Hemmung der TNFα-Aktivierung ist eine der zentralen Strategien bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen (Bradley 2008; Murdaca et al. 2009). Bereits seit der Antike wird eine Vielzahl von Pflanzen und Naturstoffen als anti-inflammatorische Medikamente eingesetzt (Petrovska 2012). Obwohl im vergangenen Jahrhundert die Bedeutung der klassischen Phytotherapie auf Kosten der „modernen" chemisch-orientierten Pharmazie deutlich zurückgegangen ist, erfreuen sich gerade in jüngerer Zeit alternative Heilmethoden zunehmender Beliebtheit. Aus diesem Grund und um der evidenzbasierten Medizin gerecht zu werden, wurde im Rahmen dieser Promotion die Wirkung verschiedener Naturstoffe auf die TNFα-Sekretion im Kontext einer IFNγ- und LPS-induzierten Entzündung untersucht. Verwendung fanden die Iridoidglycoside Aucubin, Catalpol, Harpagosid und Harpagid, sowie die Aglyka Aucubeginin und Catalpolsid. Des Weiteren wurden das Diterpen Aconitin und das Amid Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid näher betrachtet (Abb. 2).

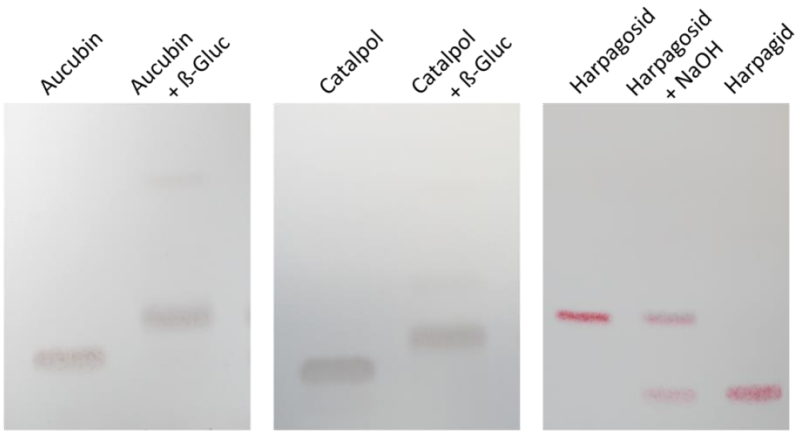
4.2.1 Spaltung der Iridoidglykoside in ihre Aglyka

Die Beschaffenheit unseres Verdauungstrakts, mit seinen pH-Extrema und bakteriellen Enzymen führt zu einer Prozessierung der mit der Nahrung aufgenommenen Bestandteile. Aufgrund der gebundenen β-D-Glucose ist es daher wahrscheinlich, dass pflanzliche Iridoidglykoside nicht zu 100 % in ihrer genuinen Form aufgenommen, sondern zuvor durch Spaltungs- und Umbauprozesse in leichter resorbierbare Formen überführt werden. Vom Zeitpunkt der oralen Aufnahme bis zur Resorption im Darm sind es im Wesentlichen drei Bereiche, in denen diese molekulare Strukturveränderungen erfolgen können: Im sauren Milieu des Magens, im alkalischen Milieu des Dünndarms und durch bakterielle Glukosidasen. Um zu überprüfen, ob Aucubin, Catalpol und Harpagosid innerhalb physiologischer Grenzen (pH = 1 bis 9, Temperatur 37 °C, β-Glukosidase 1 U/mL) in Aglykon und Zuckerrest gespalten werden können, wurden die Iridoidglykoside verschiedenen Bedingungen ausgesetzt und mögliche Spaltungsprodukte über Dünnschichtchromatographie analysiert.

Aucubin und Catalpol bildeten deutliche Banden nach Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure, eine Änderung des pH im Bereich zwischen pH 1 und pH 9 führte jedoch zu keiner Spaltung (k.A.). Eine 15-minütige Inkubation von Aucubin mit β-Glykosidase hingegen ergab eine deutliche Änderung der Laufeigenschaften (R_F (Auc) = 0,2; R_F (Auc + β-Glu) = 0,3). Das entstandene, stärker unpolare Produkt bildete eine deutliche blau-graue Bande, die nach Färbung mit Vanillin-Schwefelsäure noch eine Farbintensität von zirka 50 % im Vergleich zum Ausgangsstoff hatte (Abb. 11). Eine schwach-diffuse Färbung des Bereichs oberhalb der besagten Ban-

de deutete auf weitere, unspezifische Spaltungsprodukte hin. Auch Catalpol konnte nach 15 Minuten Inkubation mit β-Glukosidase gespalten werden. Ausgangsstoff und entstandenes Produkt bildeten im Vergleich zu Aucubin etwas stärker gefärbte Banden, wobei auch hier das Produkt auf der unpolaren Matrix eine längere Laufstrecke (R_F (Cat) = 0,18; R_F (Cat + β-Glu) = 0,27) und eine um zirka 50 % reduzierte Farbintensität im Vergleich zum Ausgangsstoff aufwies (Abb. 11). Da diese Ergebnisse auf eine Überführung der Iridoidglykoside in ihre Aglyka hindeuten, wird im Folgenden für das β-Glukosidase behandelte Iridoid Aucubin von Aucubeginin und für das β-Glukosidase behandelte Iridoid Catalpol von Catalpolsid gesprochen. Sowohl bei Aucubin, als auch bei Catalpol bildeten sich bei der Hitzeinaktivierung der β-Glukosidase braun-schwarze Flocken, die jedoch vor Probenauftrag abzentrifugiert wurden und beim Betüpfeln der DC-Platte und der späteren Stimulation der THP-1 Zellen keine Verwendung fanden.

Auffälligster struktureller Unterschied von Harpagosid im Vergleich zu Aucubin und Catalpol ist der gebundene Zimtsäurerest. Durch diese zusätzliche Esterbindung ist es anscheinend auch möglich ohne vorherige Spaltung vom Organismus aufgenommen zu werden (Büechi und Wegener, 2002). Interessanterweise konnte Harpagosid weder durch β-Glukosidase noch Änderungen des pH im Bereich von 1 bis 9 gespalten werden. Erst die Erhöhung des pH auf 11,7 führte zu einer Spaltung von Harpagosid in Harpagid, wie am Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie erkannt werden kann (Abb. 11). Aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit von Harpagid wurde demnach die Reinsubstanz zur Stimulation in der Zellkultur verwendet.



.

Abb. 11: Hydrolyse der Iridoidglykoside Aucubin, Catalpol und Harpagosid. Zur Spaltung der Iridoidglykoside Aucubin und Catalpol in ihre entsprechende Aglyka wurden 5 mmol/L Glykosid, mit 1 U β-Glukosidase (ß-Gluc) für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Da Harpagosid nicht durch β-Glukosidase in sein Aglykon überführt werden konnte, wurde eine alkalische Hydrolyse (pH 11,7) durchgeführt, wodurch aber nicht der Zucker abgespalten wurde, sondern der Zimtsäurerest.

4.2.2 Beeinflussung der Zellviabilität durch Iridoidglykoside und ihre Aglyka

Zur Überprüfung eines möglichen zytotoxischen Einflusses der untersuchten Iridoidglykoside, ihrer entsprechenden Aglyka, sowie des Diterpens Aconitin und des Amins Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid, wurde die Zellviabilität von THP-1 Zellen in Gegenwart verschiedener Substanzkonzentrationen bestimmt. Mit Hilfe des XTT-Assays konnte gezeigt werden, dass keine der untersuchten Substanzen nach 48 h Inkubation die Zellviabilität differenzierter THP-1 Zellen signifikant beeinflusste (Abb. 12a, b). Auch die Zellviabilität undifferenzierter THP-1 Zellen wurde durch Aucubin, Aucubeginin, Catalpol, Catalpolsid, Harpagid, Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid nicht beeinflusst. Interessanterweise wirkte sich einzig Harpagosid durch eine Steigerung der Zytotoxizität (k.A.) aus negativ auf die Zellviabilität (Abb. 12 b).

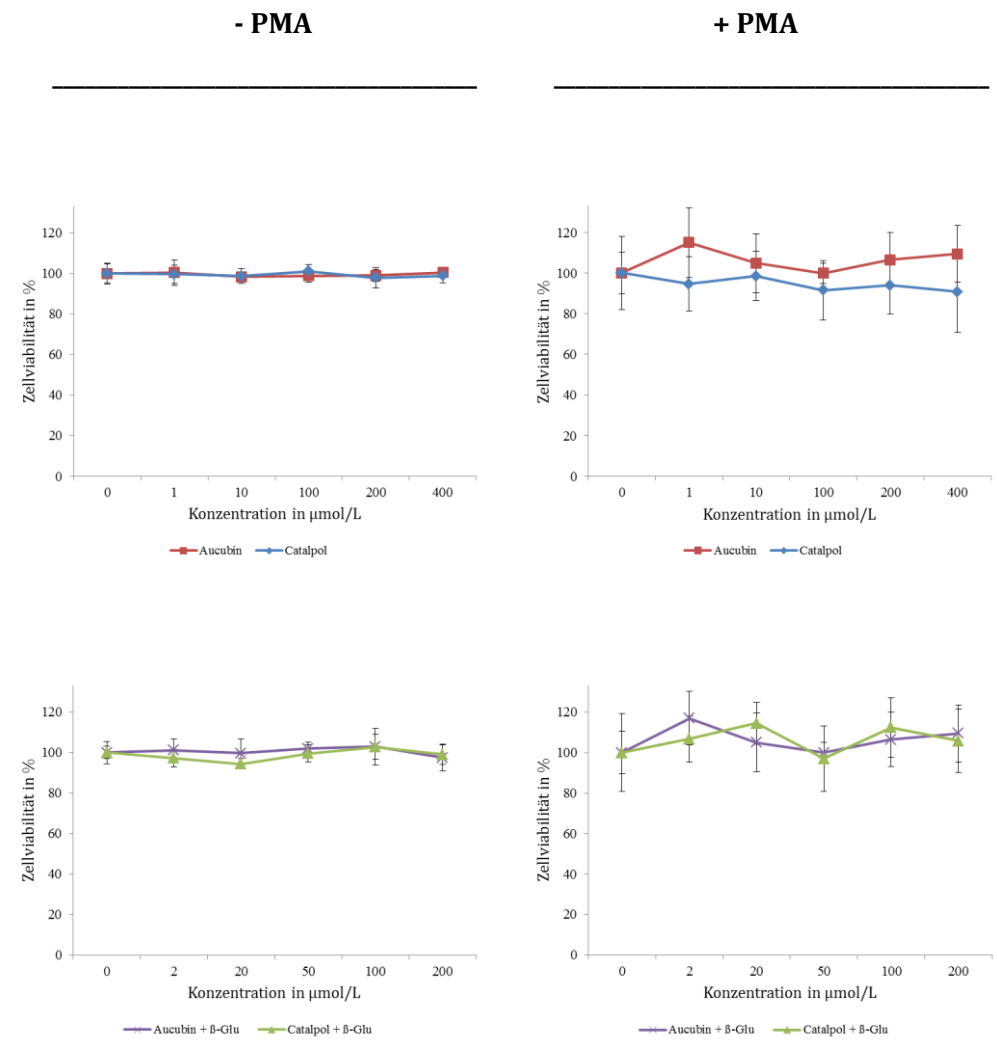


Abb. 12a: XTT-Zellviabilitätstest. 20.000 (-PMA) bzw. 50.000 (+PMA) THP-1 Zellen wurden pro well einer 96-well Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Im Anschluss wurden die mit β-Glukosidase behandelten und unbehandelten Iridoidglykoside in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben und für weitere 48 h inkubiert. Die Durchführung des XTT-Tests erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

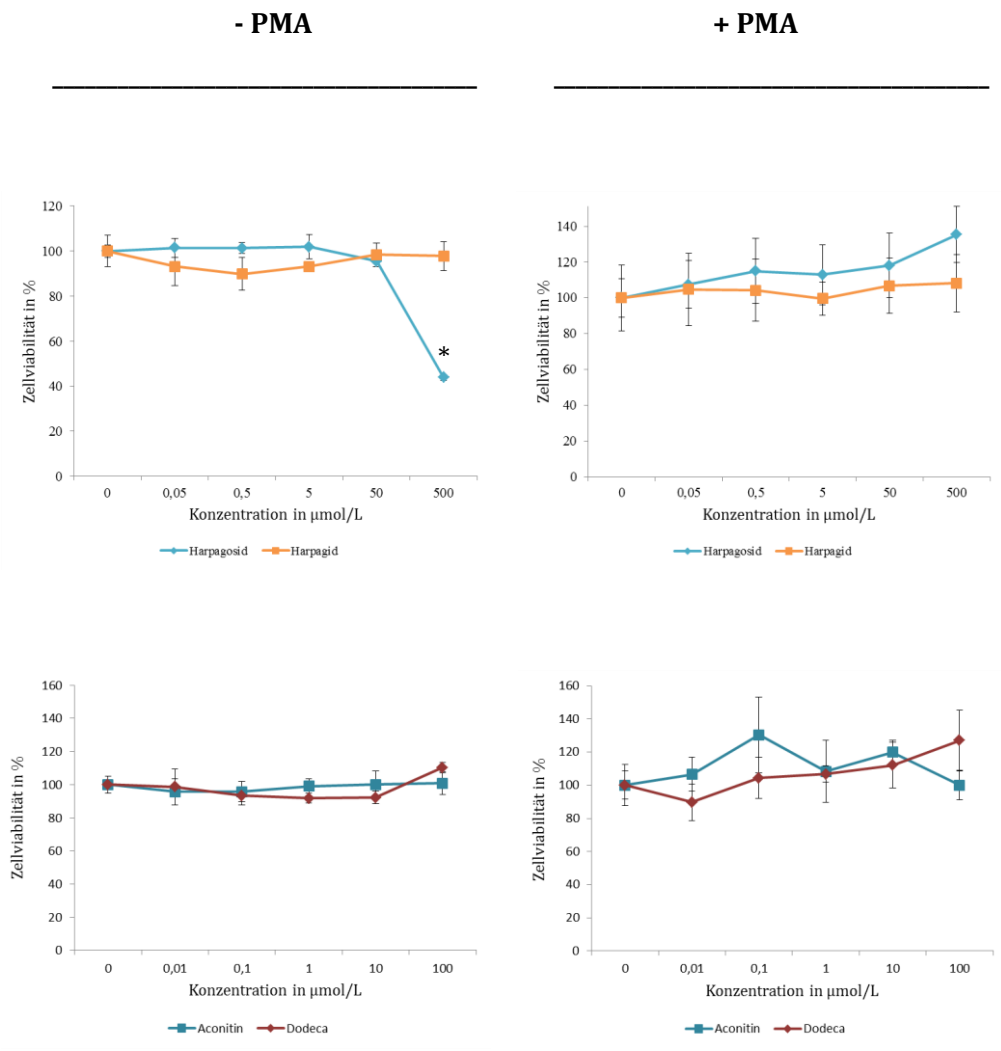


Abb. 12b: XTT-Zellviabilitätstest. 20.000 (-PMA) bzw. 50.000 (+PMA) THP-1 Zellen wurden pro well einer 96-well Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Im Anschluss wurden Aconitin, Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid, Harpagosid und Harpagid in den angegebenen Konzentrationen hinzugegeben und für weitere 48 h inkubiert. Die Durchführung des XTT-Tests erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. * = Signifikanter Unterschied zur Kontrolle; n = 6, $\alpha < 0.01$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, U-Test).

4.2.3 Beeinflussung der TNFα-Sekretion durch Iridoidglycoside und ihre Aglyka

Die Vorstimulation der undifferenzierten THP-1 Zellen mit Aucubin oder Catalpol sowie ihrer Aglyka hatte keinen Einfluss auf die TNFα-Sekretion, weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von IFNγ und LPS (k.A.). In differenzierten THP-1 Zellen hingegen führte vor allem die Stimulation mit hohen Konzentrationen (400 µM) zu einer deutlichen Reduktion von sekretiertem TNFα auf zirka 20 % für Aucubin und 60 % für Catalpol (Abb. 13). Die anschließende Stimulation mit IFNγ und LPS bewirkte zwar einen deutlichen Anstieg auf über das 10-Fache im Vergleich zur Kontrolle, jedoch hatten weder Aucubin noch Catalpol einen nennenswerten Einfluss darauf. Anders zeigten sich die Ergebnisse der β-Glukosidase behandelten Iridoide. Hier führten die Aglyka in hohen Konzentrationen (200 µM) zu einem deutlichen Anstieg der TNFα-Sekretion auf mehr als das 4-Fache für Aucubin und fast das Doppelte für Catalpol. Interessant ist auch, dass im Kontext der IFNγ/LPS-induzierten Entzündung die Vorstimulation mit Aucubeginin und mit Catalpolsid zu einer weiteren deutlichen Steigerung der TNFα-Sekretion führte. Bei Catalpolsid zeigte sich im Speziellen eine dosisabhängige Wirkung. Es scheint, dass vor allem die Gegenwart von IFNγ den Aucubeginin und Catalpolsid induzierten Anstieg fördert (Abb. 13).

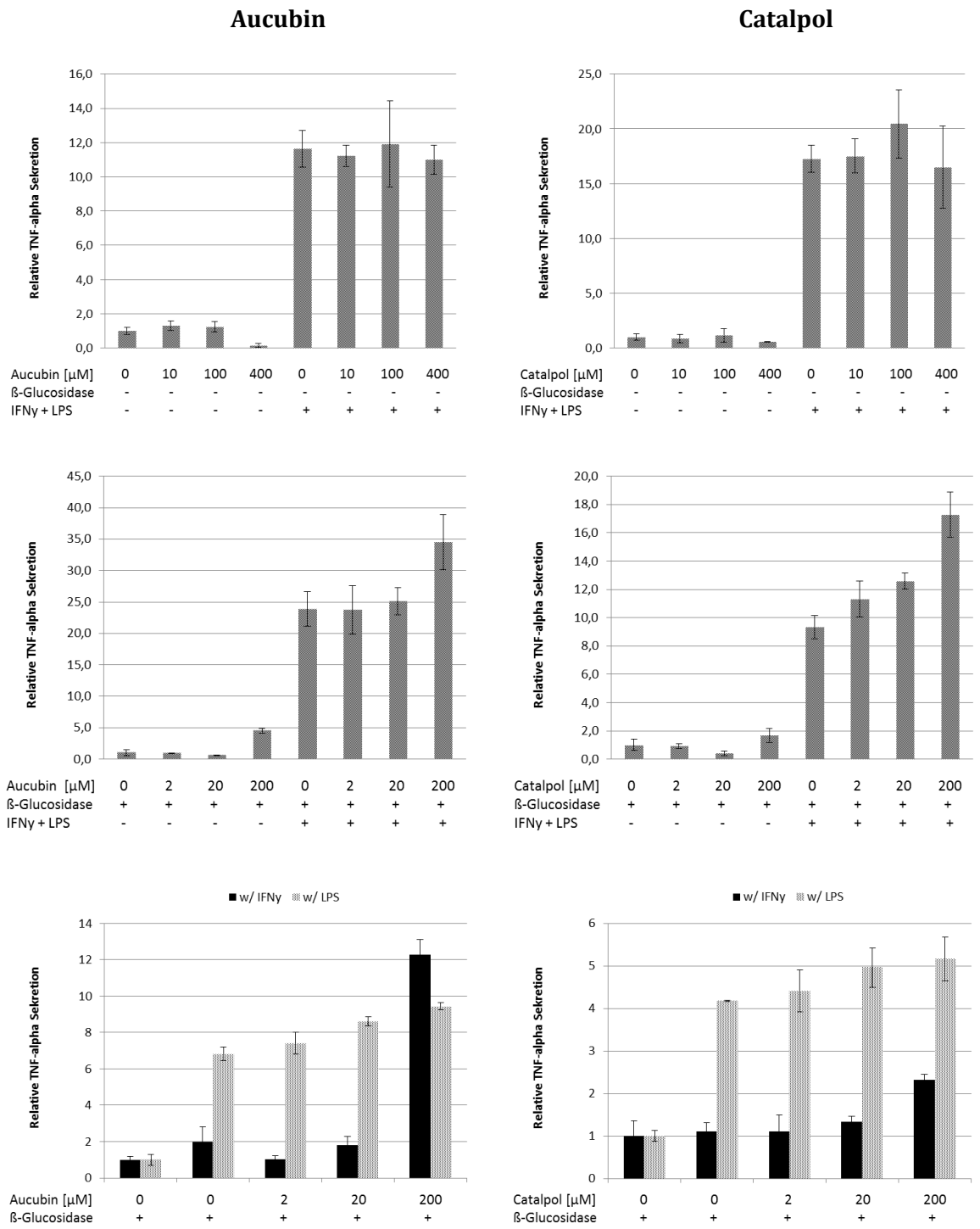


Abb. 13: Einfluss von Aucubin und Catalpol auf die TNFα-Sekretion in differenzierten THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden für 23 h mit PMA (100 ng/mL) differenziert. Danach erfolgte die Vorstimulation mit Aucubin (-/+ β-Gal) oder Catalpol (-/+ β-Gal) in verschiedenen Konzentrationen. Eine Stunde später wurde ein Entzündungsreiz durch die Gabe von IFNγ (10 ng/mL) und LPS (100 ng/mL) gesetzt. 24 h später wurden die Zellen geerntet und der TNFα-Gehalt in den Überständen mittels ELISA quantifiziert. Diagramme zeigen repräsentative Experimente (Mittelwert +/- Standardabweichung) von mindestens zwei individuellen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

Abbildung 14 zeigt, dass Harpagosid und Harpagid die TNFα-Sekretion in undifferenzierten THP-1 Zellen mit und ohne IFNγ/LPS nur geringfügig beeinflussen. Im Gegensatz zu Aucubin und Catalpol, die bei undifferenzierten Zellen im Kontext der TNFα-Sekretion wirkungslos waren führten Harpagosid und Harpagid zumindest zu einer Abnahme der TNFα-Sekretion auf 80 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Reduktion war auch in Gegenwart von IFNγ und LPS deutlich sichtbar. Der Einfluss beider Iridoidglykoside auf differenzierte THP-1 Zellen war hingegen noch deutlicher. In Abwesenheit von IFNγ und LPS hatte Harpagosid keinen Einfluss auf die TNFα-Sekretion, anders als Harpagid, welches bereits ab einer Konzentration von 50 µM zu einer deutlichen Abnahme auf unter 50 % führte. Im Gegensatz zu Aucubeginin und Catalpolsid, die einen Anstieg der TNFα-Sekretion in IFNγ- und LPS-stimulierten Zellen induzierten, bewirkte die Vorstimulation sowohl mit Harpagosid als auch mit Harpagid eine deutliche, dosisabhängige Reduktion der IFNγ- und LPS-induzierten TNFα-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle auf zirka 60 % für Harpagosid und unter 50 % für Harpagid (Abb. 14). An dieser Stelle sei auch noch einmal darauf hingewiesen, dass die Zellviabilität durch Harpagosid und Harpagid in differenzierten THP-1 Zellen nicht beeinflusst war (s. Abb. 12).

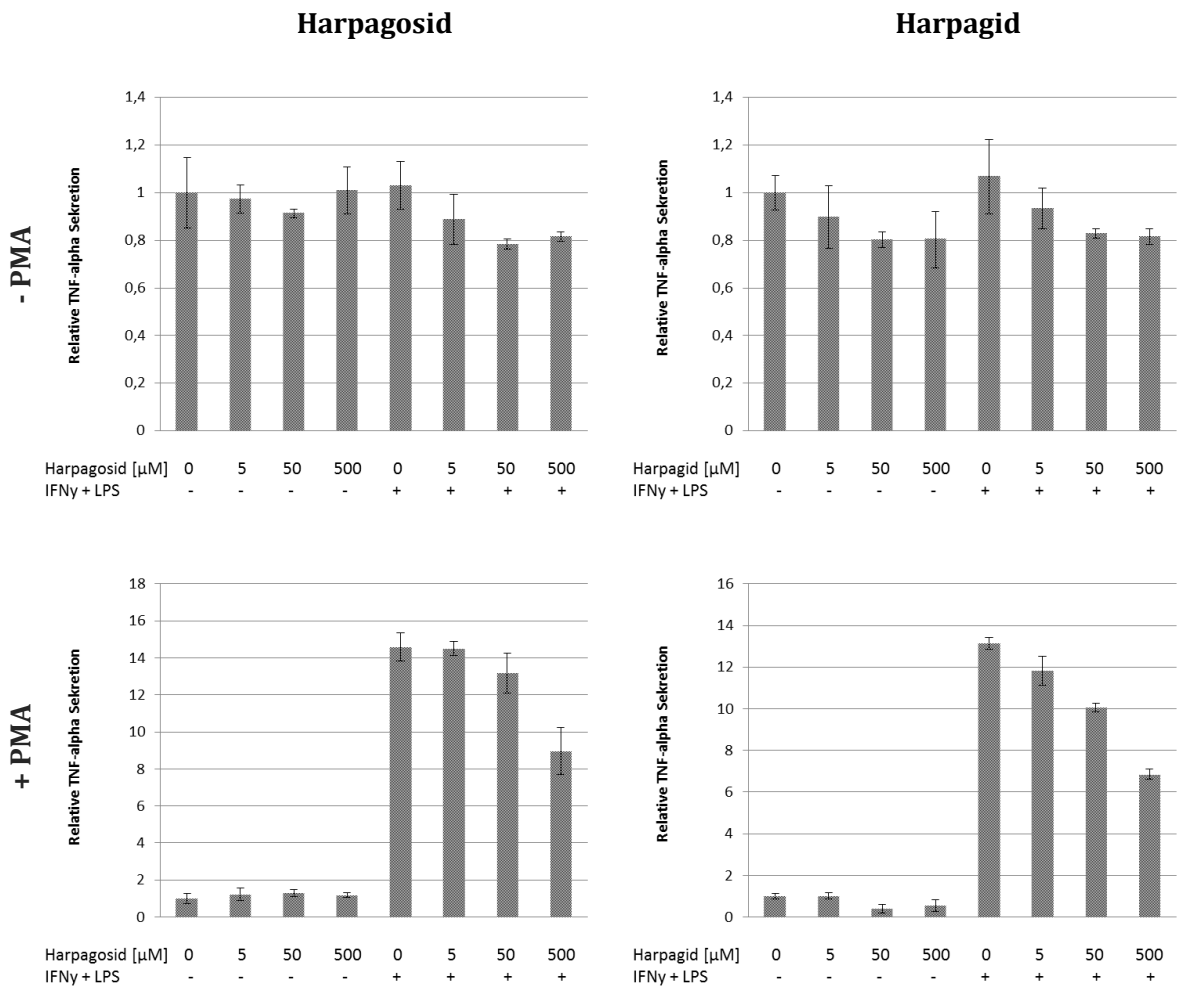


Abb. 14: Einfluss von Harpagosid und Harpagid auf die TNFα-Sekretion in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen. Die Differenzierung der THP-1 Zellen erfolgte für 23 h mit PMA (100 ng/mL). Undifferenzierte Zellen wurden zur Kontrolle für 23 h mit DMSO (1:10000) behandelt. Danach erfolgte die Vorstimulation mit Harpagosid und Harpagid in verschiedenen Konzentrationen. Eine Stunde später wurde ein Entzündungsreiz durch die Gabe von IFNγ (10 ng/mL) und LPS (100 ng/mL) gesetzt. 24 h später wurden die Zellen geerntet und der TNFα-Gehalt in den Überständen mittels ELISA quantifiziert. Diagramme zeigen repräsentative Experimente (Mittelwert +/- Standardabweichung) von drei individuellen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

4.2.4 Beeinflussung der TNFα-Sekretion durch Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid

Aconitin ist ein Naturstoff aus der Pflanzengattung *Aconitum*, der bereits in geringen Dosen kardiotoxische und neurotoxische Effekte zeigt, in entsprechenden homöopathischen Verdünnungen aber auch zur Therapie entzündlicher und nervaler Erkrankungen verwendet wird. Für die Durchführung der Experimente wurde eine absolute Aconitinkonzentration von 100 µM nicht überschritten. Die letale Dosis von Aconitin wird mit 5 mg angegeben. Bei einer 100 % igen Aufnahme entspricht dies bei einem Erwachsenen mit 5 L Blutvolumen einer finalen Konzentration von 1 mg/L. Aconitin hat eine molare Masse von 645 g/mol. Die im Rahmen der Versuche eingesetzte maximale molare Konzentration von 100 µM entspricht einer Massenkonzentration von 0,645 mg/L und liegt damit zwar unterhalb der angegebenen letalen Dosis, aber immer noch im toxischen Bereich. Die hier untersuchte Stoffkonzentration ist also nur für *in vitro* Untersuchungen geeignet; von einer Anwendung derartig hoher Konzentrationen im Kontext von *in vivo* Untersuchungen wird daher strengstens abgeraten.

Die Stimulation undifferenzierter THP-1 Zellen mit Aconitin hatte keinen Einfluss auf die Menge an sekretiertem TNFα. Auch die anschließende Stimulation mit IFNγ und LPS änderte nichts an der messbaren TNFα-Konzentration im Medium. In differenzierten THP-1 Zellen hingegen konnte die TNFα-Sekretion mit 100 µM Aconitin auf 50 % reduziert werden. Auch der durch IFNγ und LPS induzierte starke Anstieg der TNFα-Sekretion konnte durch 100 µM Aconitin auf 50 % reduziert werden (Abb. 15).

Pflanzen der Gattung *Ecchinacea* werden vor allem im nordamerikanischen Raum traditionell als phytotherapeutisches Tonikum des Immunsystems und zur Behandlung verschiedener infektiöser Erkrankungen verwendet (Hudson 2012). Einer der Wirkstoffe, dem eine immunstimulierende Wirkung zugeschrieben wird, ist Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid. Die Stimulation von undifferenzierten aber auch von differenzierten THP-1 Zellen mit Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid führte weder in Abwesenheit, noch in Gegenwart von IFNγ und LPS zu einer Änderung der TNFα-Sekretion (Abb. 12). Im Rahmen des verwendeten Zellmodels konnte also keine Wirkung festgestellt werden.

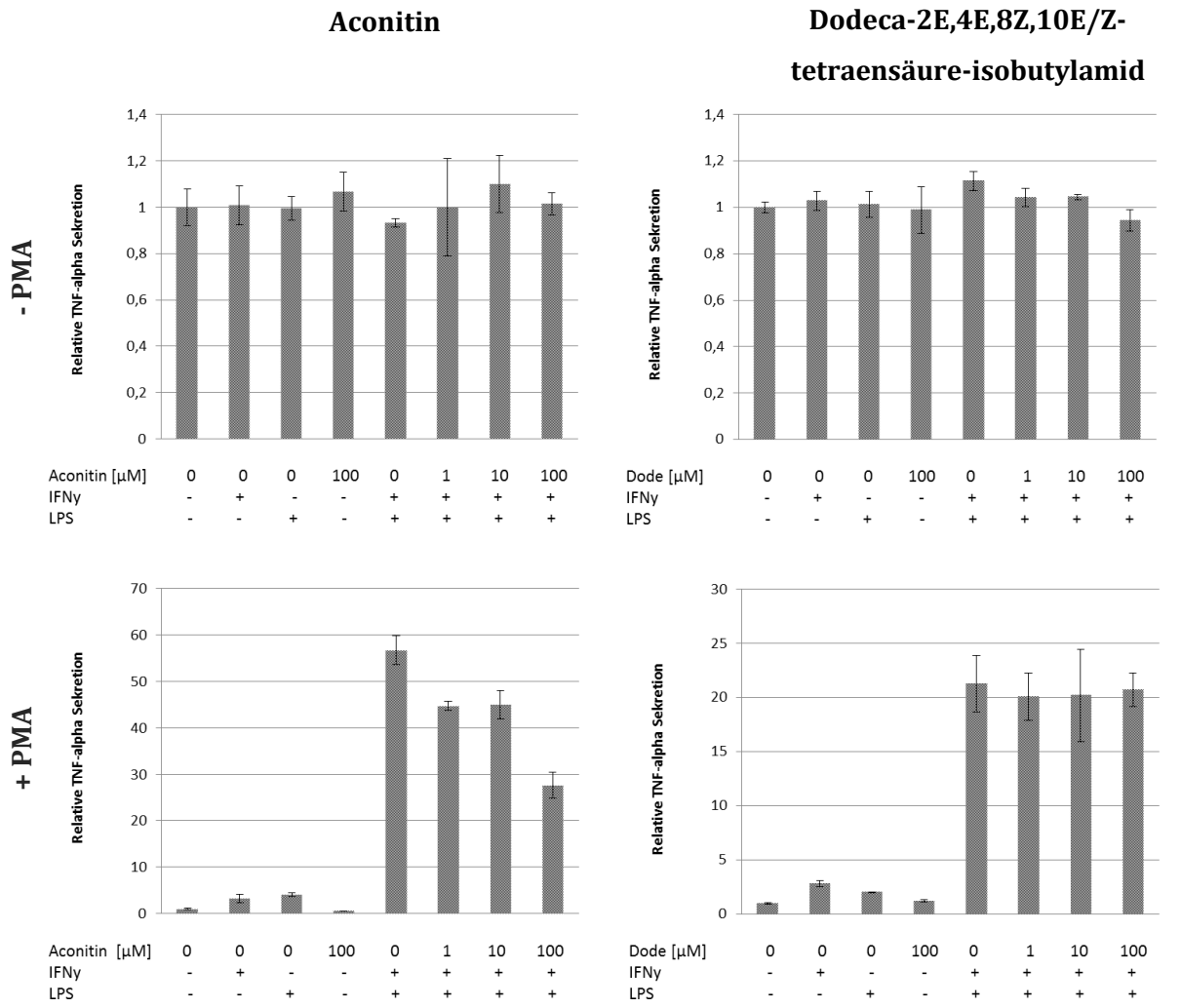


Abb. 15: Einfluss von Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid auf die TNFα-Sekretion in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen. Die Differenzierung der THP-1 Zellen erfolgte für 23 h mit PMA (100 ng/mL). Undifferenzierte Zellen wurden zur Kontrolle für 23 h mit DMSO (1:10000) behandelt. Danach erfolgte die Vorstimulation mit Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid in verschiedenen Konzentrationen. Eine Stunde später wurde ein Entzündungsreiz durch die Gabe von IFNγ (10 ng/mL) und LPS (100 ng/mL) gesetzt. Wiederum 24 h später wurden die Zellen geerntet und der TNFα-Gehalt in den Überständen mittels ELISA quantifiziert. Diagramme zeigen repräsentative Experimente (Mittelwert +/- Standardabweichung) von mindestens drei individuellen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

4.3 Änderungen in der mRNA-Expression von Zelladhäsionsmolekülen im Kontext einer gesetzten Entzündung

4.3.1 Änderung der mRNA-Expression von Zelladhäsionsmolekülen nach Stimulation mit IFNγ und synthetischen TLR-Agonisten

Für die erfolgreiche Beseitigung pathogener Strukturen im Körper ist es von entscheidender Bedeutung, dass immunkompetente Zellen aus dem Blut gezielt in das betroffene Gewebe einwandern können. Zwar führte die Stimulation undifferenzierter THP-1 Zellen mit IFNγ und den untersuchten TLR-Agonisten zu keiner eindeutigen Änderung der TNFα-Sekretion, jedoch konnte unter dem Mikroskop eine deutliche Steigerung der interzellulären Adhäsion beobachtet werden (Abb. 16). Vor Allem die gemeinsame Stimulation mit IFNγ und LPS beziehungsweise FSL-1 führte zur Bildung großer Zellhaufen.

Um herauszufinden, ob die beobachtete interzelluläre Adhäsion ebenfalls mit einer Änderung der Expression der Adhäsions- und Transmigrationsmoleküle ICAM-1, PECAM-1, L-Selektin, MAC-1, ESL-1 und PSGL-1 auf mRNA-Ebene einhergeht, wurden undifferenzierte THP-1 Zellen mit IFNγ und/oder LPS bzw. dem TLR6/4 Agonisten FSL-1 stimuliert und die mRNA-Expression im Anschluss quantifiziert. Darüber hinaus wurde überprüft, ob die TNFα- und CD86-Expression undifferenzierter THP-1 Zellen durch IFNγ und TLR-Agonisten auf mRNA-Ebene beeinflusst wird (Abb. 17 und 18).

Obwohl undifferenzierte THP-1 Zellen weder durch die einfache noch durch die kombinierte Gabe von IFNγ und TLR-Agonisten mit einer Änderung der TNFα-Sekretion reagierten, bewirkten die Stimulation eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression. Die Stimulation der Zellen für 24 h mit IFNγ führte zu einer Verdopplung der TNFα mRNA-Expression. Die Stimulation mit LPS erhöhte die Expression auf zirka das 1,5-Fache. Der TLR-Agonist FSL-1 hingegen schaffte es bereits alleine die Expression der TNFα-mRNA auf das 3-Fache im Vergleich zur Kontrolle anzuheben, ähnlich der kombinierten Gabe von IFNγ und LPS zusammen. Die Kombination von IFNγ mit FSL-1 hob die TNFα-Expression sogar auf über das 6-Fache an. Ähnlich sah das Bild für die Expression von CD86 aus, einem Mitglied der Immunglobulin Superfamilie, welches bei der Aktivierung von T-Zellen mitwirkt und als Marker pro-inflammatorischer Makrophagen betrachtet wird (Benoit et al. 2008). Besonders FSL-1 steigerte die Expression von CD86 in Kombination mit IFNγ auf über das 7-Fache (Abb. 17 und 18).

Im Kontext, der bei der Extravasation beteiligten Proteine, zeigte sich ein heterogeneres Bild. Die Stimulation der THP-1 Zellen mit dem Makrophagenaktivator IFNγ bewirkte einen deutlichen Anstieg der ICAM-1 mRNA-Expression. Auch die TLR-Agonisten LPS und FSL-1

bewirkten, wenn auch in wesentlich geringerem Ausmaß, einen Anstieg der Expression. Die kombinierte Gabe von IFNγ mit LPS beziehungsweise FSL-1 führten zu einer Steigerung auf zirka das 20-Fache im Vergleich zur Kontrolle. Für das vorrangig bei der parazellulären Transmigration involvierte PECAM-1 war eine ähnliche Tendenz zu sehen, jedoch bewirkte die kombinierte Gabe von IFNγ und LPS beziehungsweise FSL-1 nur einen Anstieg auf zirka das 1,5-Fache. Die Expression des Integrins L-Selektin konnte durch IFNγ auf zirka das 2-Fache angehoben werden und sowohl LPS als auch FSL-1 hatten weder alleine noch in Kombination mit IFNγ einen Effekt. Anders verhielt sich dagegen die Expression der ESL-1 mRNA. Sie konnte nur unwesentlich durch IFNγ angehoben werden und auch die beiden TLR-Agonisten alleine hatten keinen maßgeblichen Einfluss, dennoch führte gerade die Kombination von IFNγ und FSL-1 zu einem deutlichen Anstieg auf mehr als das 3-Fache im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression des Makrophagenrezeptors MAC-1 konnte weder durch IFNγ noch durch LPS nennenswert beeinflusst werden und auch FSL-1 hatte in diesem Kontext nur einen sehr geringen Effekt (Abb. 17 und 18).

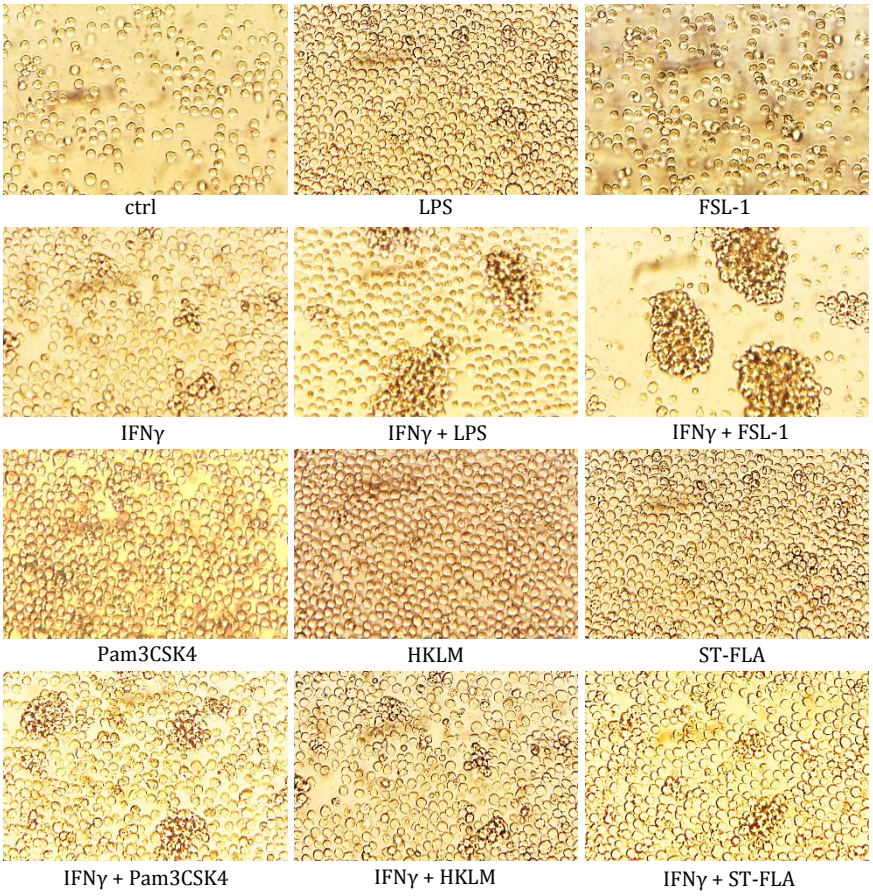


Abb. 16: Morphologische Änderungen nach Stimulation mit IFNγ und den verschiedenen synthetischen TLR-Agonisten. Das „Priming" undifferenzierter THP-1 Zellen erfolgte mit IFNγ (10 ng/mL) oder PBS 24 h nach der Aussaat. Das zweite Priming mit IFNγ und die Stimulation mit den TLR-Agonist LPS und FSL-1 (100 ng/mL) erfolgte nach einem Mediumwechsel mit serumreduzierten RPMI 48 h nach Aussaat (Stimulationsprotokoll A). Die Bilder wurden 24 h nach der Stimulation mit den TLR-Agonisten aufgenommen. Gleicher Phänotyp auch mit dem Stimulationsprotokoll B.

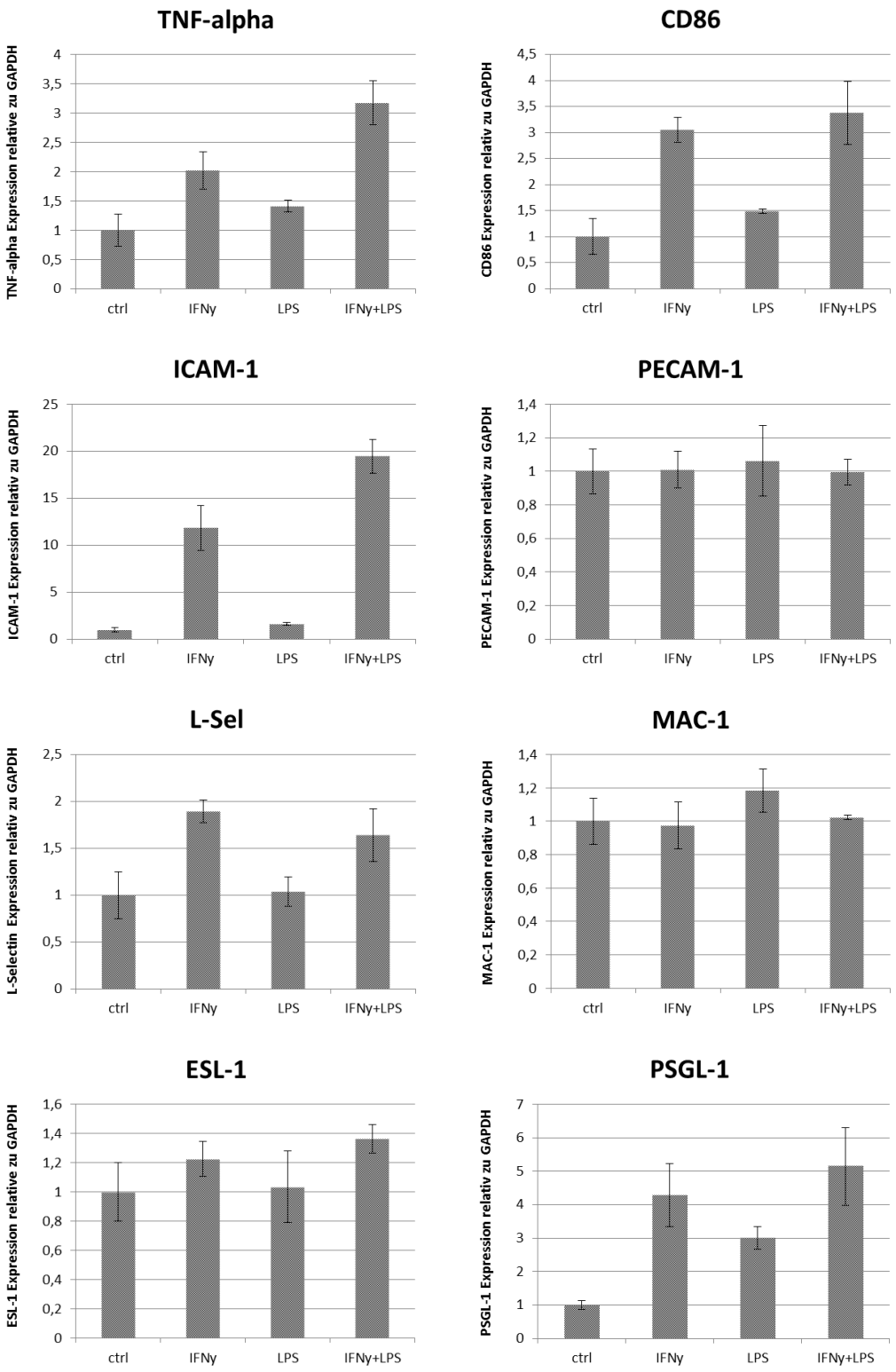


Abbildung 17: Einfluss von IFNγ und LPS auf die mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen. 250.000 THP-1 Zellen/well einer 24-well Platte wurden für 24 h mit IFNγ (10 ng/mL) und LPS (100 ng/mL) stimuliert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über RT-qPCR. Die Abbildung zeigt repräsentative Graphen von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

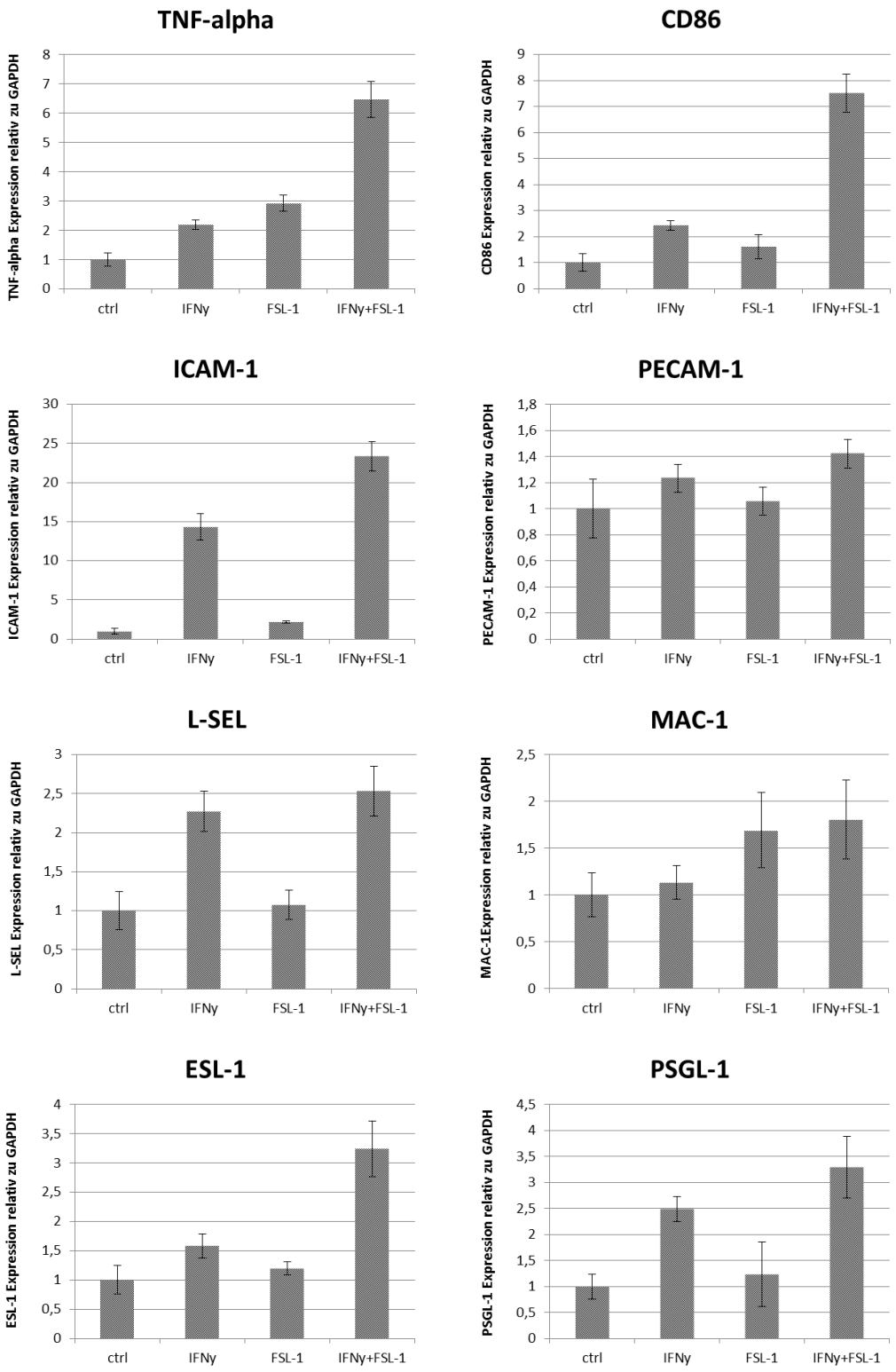


Abb. 18: Einfluss von IFNγ und FSL-1 auf die mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen. 250.000 THP-1 Zellen/well einer 24-well Platte wurden für 24 h mit IFNγ (10 ng/mL) und LPS (100 ng/mL) stimuliert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über RT-qPCR. Die Abbildung zeigt repräsentative Graphen von drei unabhängigen Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

4.3.2 Änderung der mRNA-Expression von Zelladhäsionsmolekülen nach Stimulation mit IFNγ und mikrobiellen Präparationen

Mikroskopisch konnte eine deutliche Aggregation der THP-1 Zellen auch durch die Stimulation mit verschiedenen Bakterienpräparationen beobachtet werden (Abb. 19). Um zu überprüfen, ob zusätzlich zu den synthetischen TLR-Agonisten auch komplexe Mischungen mikrobieller Bestandteile einen Einfluss auf die Expression migrationsspezifischer mRNAs haben, wurden undifferenzierte THP-1 Zellen mit IFNγ und verschiedenen Präparationen stimuliert und die mRNA-Expression über RT-qPCR quantifiziert. Aufgrund der großen Anzahl der zur Verfügung stehenden Präparationen wurde, unter anderem anhand der Fähigkeit die TNFα-Sekretion zu stimulieren, vorselektiert – untersucht wurden die Bakterienpräparationen *Bacillus subtilis (evemc.)*, *Bacillus cereus (evemc.)*, *Bacillus firmus (evemc.)*, *Mycobacterium phlei (evemc.)*, *Mycobacterium bovis (evemc.)*, *Propionibacterium avidum (evemc.)*, *Escherichia coli (extr.)* und *Serratia marcescens (extr.)*, sowie die Pilzpräparationen *Candida albicans (evc.)*, *Candida parapsilosis (evc.)*, *Mucor racemosus (evc.)*, *Mucor mucedo (+) (evc.)* und *Penicillium chryogenum (evc.).*

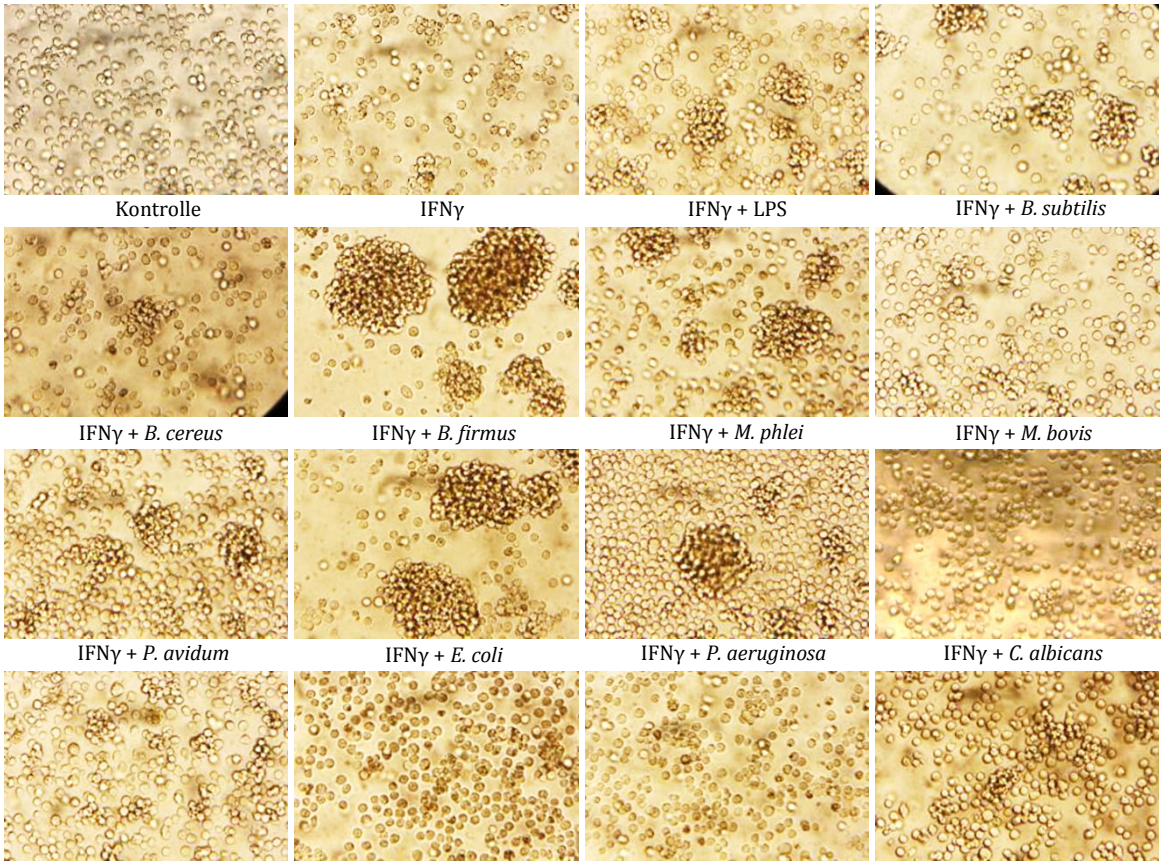


Abb. 19: Aggregation von THP-1 Zellen nach Stimulation mit IFNγ und verschiedenen mikrobiellen Präparationen. THP-1 Zellen wurden bei einer Konzentration von 300.000 Zellen/well einer 24-well Platte für 24 h in Zellkulturmedium ausplattiert. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit IFNγ (10 ng/mL) und verschiedenen mikrobiellen Präparationen (1 µg/mL) bzw. LPS (100 ng/mL) stimuliert (Stimulationsprotokoll B). Lichtmikroskopische Aufnahmen erfolgten 48 h nach Stimulationsbeginn bei 100-facher Vergrößerung.

Die Stimulation von undifferenzierten THP-1 Zellen mit IFNγ und verschiedenen mikrobiellen Präparationen zeigte auch auf mRNA-Ebene deutliche Unterschiede zwischen Pilz- und Bakterienpräparationen. Die Expression der mRNAs für TNFα, CD86, L-Selektin und I-CAM-1 konnte durch IFNγ positiv beeinflusst werden. Die mRNAs MAC-1, ESL-1, PSGL-1 und PECAM-1 wurden nicht oder nur geringfügig in ihrer Expression beeinflusst. Die gemeinsame Stimulation mit IFNγ und den Pilzpräparationen *Candida albicans (evc.)*, *Candida parapsilosis (evc.)*, *Mucor racemosus (evc.)*, *Mucor mucedo (+) (evc.)* und *Penicillium chryogenum (evc.)* hatten keinen weiteren Einfluss (Abb. 20).

Auch bei den untersuchten Bakterienpräparationen hatten nicht alle eine Wirkung auf die Expression der untersuchten mRNAs. Im Kontext von TNFα konnten die Präparate *Bacillus subtilis (evemc.)*, *Bacillus cereus (evemc.)*, *Bacillus firmus (evemc.)*, *Mycobacterium phlei (evemc.)*, und *Escherichia coli (extr.)* zusätzlich zu IFNγ die mRNA-Expression stimulieren. Die Expression von CD86, einem wichtigen Marker zur Unterscheidung von Makrophagen Subpopulationen, wurde durch die Präparationen *Bacillus subtilis (evemc.), Bacillus firmus (evemc.)*, *Mycobacterium phlei (evemc.)*, und *Escherichia coli (extr.)* positiv beeinflusst. Die Menge der gemessenen MAC-1, L-Selektin, ESL-1, PSGL-1 und PECAM-1 mRNA blieben durch die zusätzliche Stimulation mit den untersuchten Bakterienpräparationen nahezu unverändert. Lediglich die Expression von ICAM-1 konnte als einzige für die interzelluläre Adhäsion bedeutsame mRNA durch die Präparationen *Bacillus subtilis (evemc.)*, *Bacillus firmus (evemc.)*, und *Escherichia coli (extr.)* deutlich angehoben werden (Abb. 21).

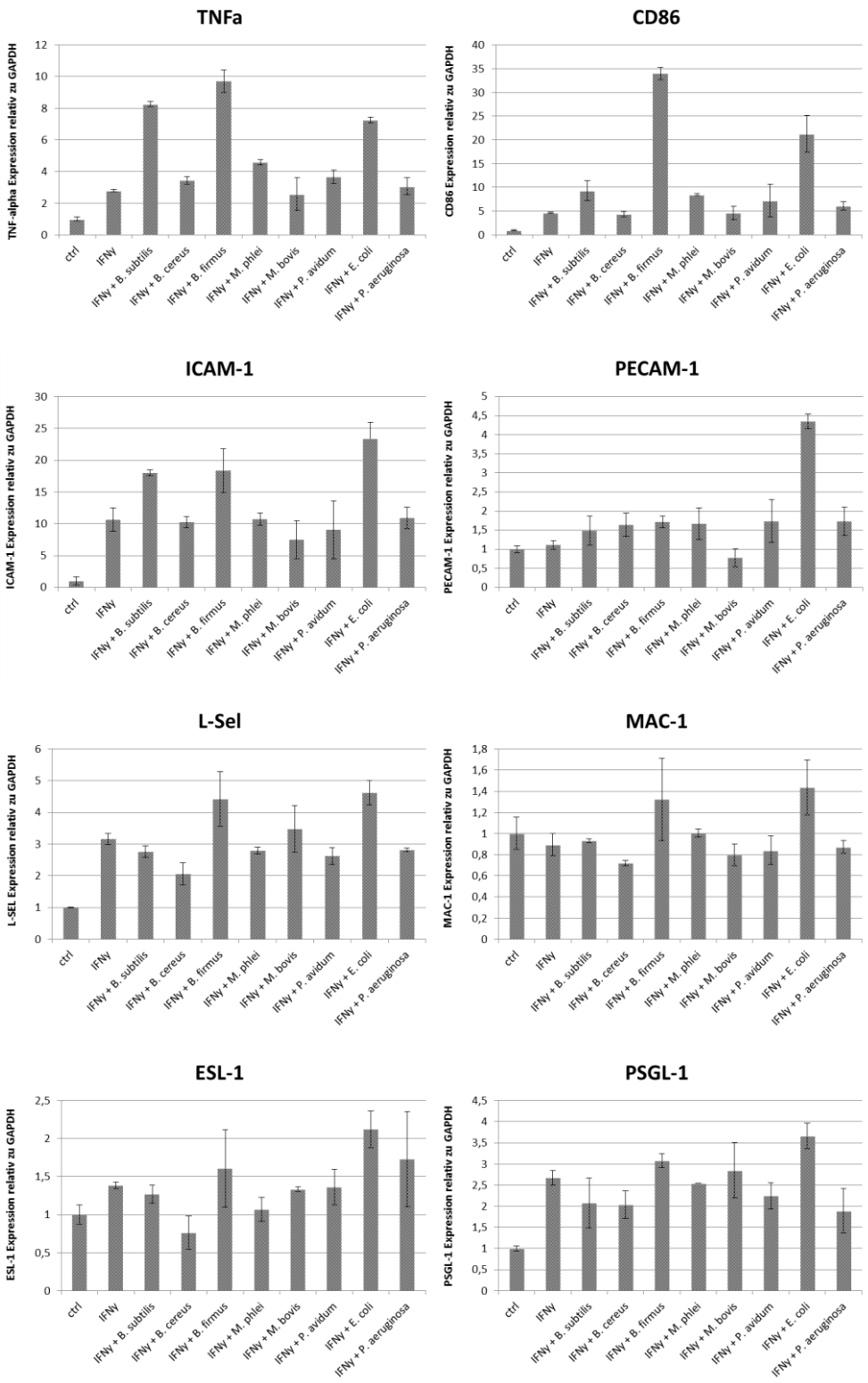


Abb. 20: Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Bakterienpräparaten in undifferenzierten THP-1 Zellen. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden undifferenzierte THP-1 Zellen mit IFNγ (10 ng/mL) und verschiedenen Bakterienpräparationen (1 µg/mL) für weitere 24 h stimuliert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über RT-qPCR. Die Abbildung zeigt Mittelwert +/- Standardabweichung eines von zwei individuell durchgeführten Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

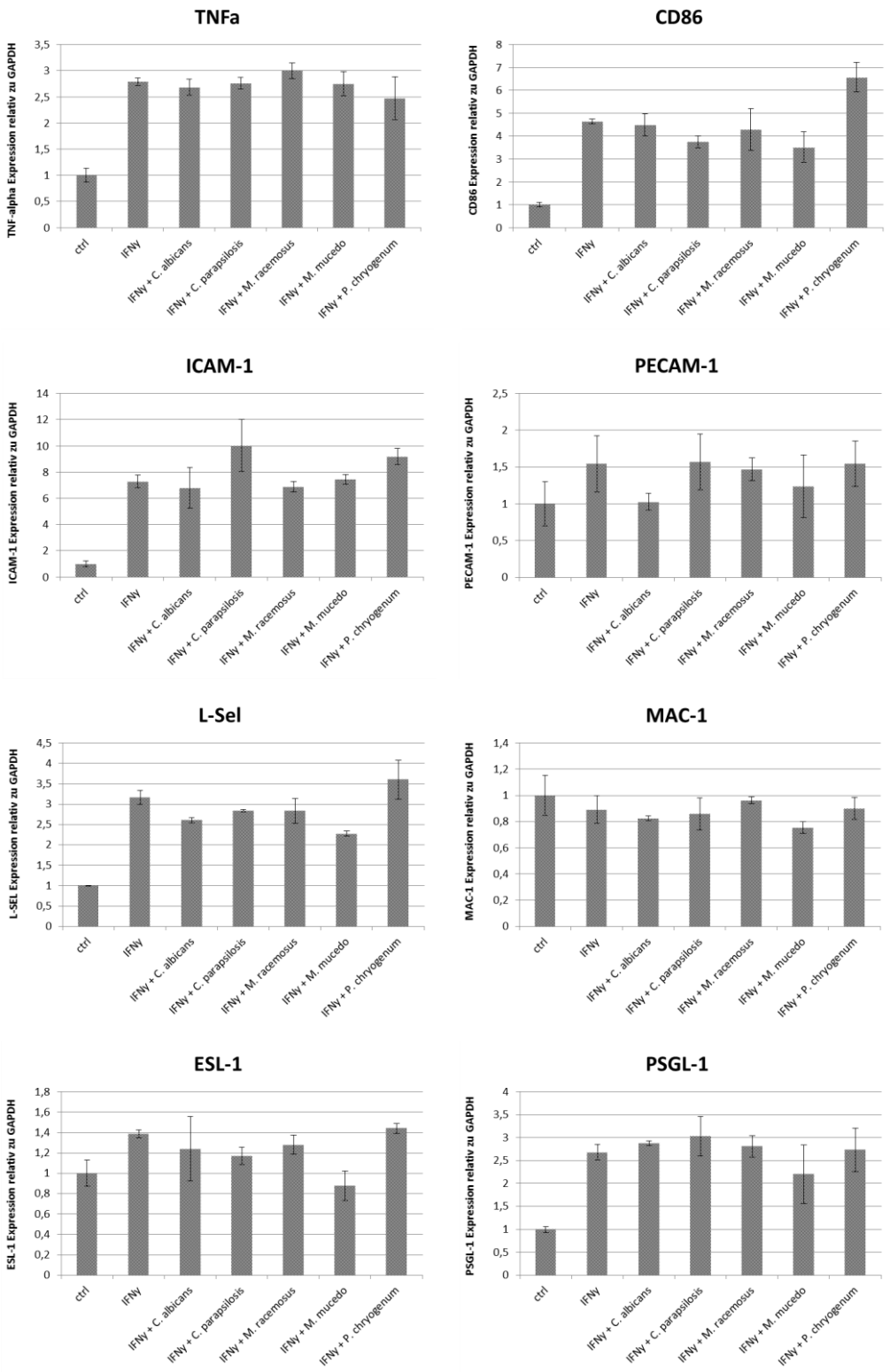


Abbildung 21: Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Pilzpräparaten in undifferenzierten THP-1 Zellen. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden undifferenzierte THP-1 Zellen mit IFNγ (10 ng/mL) und verschiedenen Pilzpräparationen (1 µg/mL) für weitere 24 h stimuliert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über RT-qPCR. Die Abbildung zeigt Mittelwert +/- Standardabweichung eines von zwei individuell durchgeführten Experimenten. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

4.3.3 Zeitlicher Verlauf der mRNA-Expression durch Stimulation mit IFNγ und synthetischen TLR-Agonisten

Es verwunderte, dass die Expression der für die Migration verantwortlichen Proteine nur in solch geringem Ausmaß erfolgte. Da die Halbwertszeit vieler mRNAs sehr gering ist, erschien es daher sinnvoll auch die Zeit unmittelbar nach der Stimulation mit zu betrachten. Zur Erstellung einer Expressionskinetik wurden die undifferenzierten THP-1 Zellen mit IFNγ und LPS stimuliert und die Expression der betrachteten mRNAs zu verschiedenen Zeiten zwischen 0 und 48 Stunden bestimmt (Abb. 22).

Die Auswertung der Expressionskinetik zeigte, dass die Expression von TNFα und ICAM-1 bereits nach 2 bzw. 4 Stunden ihr Maximum erreichte und danach stetig abfiel. Dennoch blieb die Expression auf hohem Niveau und betrug nach 48 Stunden für TNFα noch das 3-Fache und für ICAM-1 noch das 23-Fache im Vergleich zur Kontrolle. Anders verhielten sich CD86, L-Selektin, MAC-1, ESL-1, PSGL-1 und PECAM-1. Ihre Expression war nach 8 Stunden noch unverändert, stieg nach 24 Stunden langsam an und erreichte erst nach 48 Stunden (Ende der Messung) ihr Maximum.

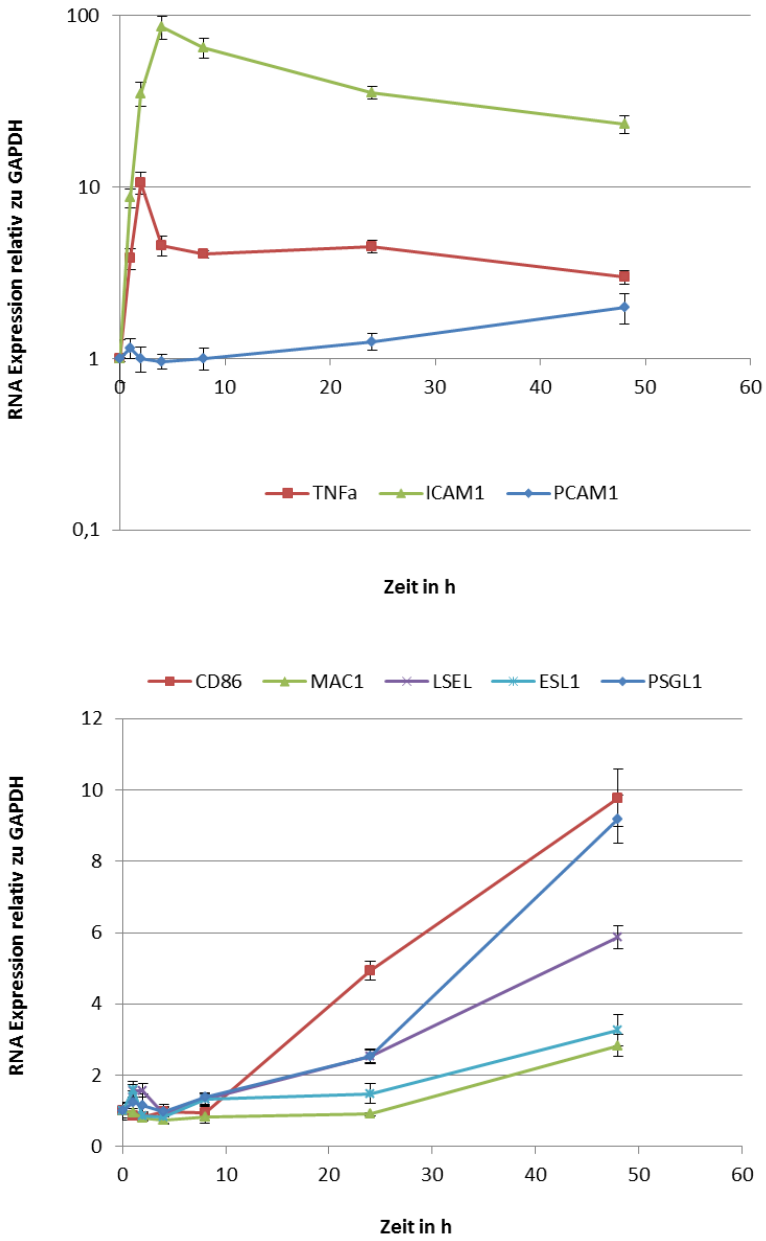


Abb. 22: mRNA-Expressionskinetik nach Stimulation IFNγ und LPS in undifferenzierten THP-1 Zellen. THP-1 Zellen wurden in einer 24-well Platte (300.000 Zellen/well) ausgesät und bei 37 °C und 5% CO_2 für 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit IFNγ (10 ng/mL) und LPS (100 ng/mL) für 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 und 48 stimuliert. Im Anschluss an die Ernte wurden die Zellen vom Überstand befreit und bei -20 °C gelagert bis jeder Messpunkt geerntet wurde. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über RT-qPCR.

4.4 Einfluss pflanzlicher Naturstoffe auf die IFNγ und LPS induzierte mRNA-Expression in THP-1 Zellen

Änderungen der TNFα-Konzentration haben einen großen Einfluss auf entzündliche Prozesse im menschlichen Körper, aber auch Änderungen bezüglich der Expression von Adhäsionsmolekülen, die bei der Extravasation von Immunzellen beteiligt sind, können die Schwere und den Verlauf der Entzündung beeinflussen. Um zu untersuchen, ob und inwiefern die Gegenwart verschiedener Naturstoffe einen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle hat, wurden undifferenzierte THP-1 Zellen vor ihrer Stimulation mit IFNγ und LPS mit Aconitin, Harpagosid beziehungsweise Harpagid vorbehandelt und die mRNA-Expression nach 3 und nach 48 Stunden quantifiziert (Abb. 23, 24 und 25).

4.4.1 Einfluss von Aconitin auf die IFNγ und LPS induzierte mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen

In differenzierten THP-1 Zellen führte die Behandlung mit 100 µM Aconitin zu einer deutlichen Abnahme der TNFα-Sekretion. Dieser Effekt konnte in undifferenzierten THP-1 Zellen nicht beobachtet werden. Die Stimulation undifferenzierter THP-1 Zellen mit Aconitin bewirkte jedoch sowohl nach 3 h als auch nach 48 h eine Erhöhung der TNFα-Expression auf zirka das 1,5 fache. Im Kontext einer gesetzten Entzündung zeigte sich darüber hinaus, dass Aconitin den initialen Anstieg der TNFα-Expression zwar nicht beeinflusste, dafür aber dem zu erwartenden Abfall stark entgegen wirkte. So betrug die IFNγ und LPS induzierte TNFα-Expression in Abwesenheit von Aconitin nur noch das 2-Fache im Vergleich zur Kontrolle, in Gegenwart von Aconitin lag dieser Wert mit über dem 4-Fachen bei mehr als doppelt so hoch. Auch bei ICAM-1 konnte die Gabe von Aconitin dem im zeitlichen Verlauf auftretenden Abfall der Expression entgegenwirken. In der Zeit direkt nach der Stimulation konnte Aconitin die Expression der später aktivierten Proteine nicht wesentlich beeinflussen. Lediglich die Expression von PECAM-1 wurde durch Aconitin auf das zirka 1,5-Fache angehoben und die Expression von ESL-1 auf knapp über 60 % herabgesetzt. Nach 48 h war der Einfluss von Aconitin aber auch hier deutlicher. Vor allem die Expression von PECAM-1 und MAC-1 wurde durch Aconitin angehoben, sie betrug das 2,5-Fache für PECAM-1 und das 3-Fache für MAC-1. Selbst IFNγ und LPS konnten diesen hohen Anstieg nicht bewirken. Interessanterweise wirkte dieser Anstieg nicht zusätzlich zur Stimulation mit IFNγ und LPS. Auf L-Selektin wirkte Aconitin stimulierend, aber der IFNγ und LPS induzierte Anstieg auf knapp das 4-Fache konnte nicht weiter angehoben werden. Die ESL-1 und PSGL-1 Expression wurde durch Aconitin sowohl in Abwesenheit, als auch in Gegenwart von IFNγ und LPS weiter angehoben. Besonders deutlich war dies bei der Expression von CD86 zu beobachten (Abb. 23 a und b).

4.4.2 Einfluss von Harpagosid auf die IFNγ und LPS induzierte mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen

Die Stimulation von undifferenzierten THP-1 Zellen mit dem Iridoid Harpagosid bewirkte einen Anstieg der TNFα-Expression auf das 2-Fache nach 3 h und auf das 4-Fache nach 48 Stunden. Der nach 3 h gemessene, IFNγ und LPS induzierte Anstieg wurde durch die Vorstimulation mit Harpagosid vom 8-Fachen auf das 13-Fache angehoben. Der im zeitlichen Verlauf beobachtete Abfall der TNFα-Expression auf nur noch knapp mehr als das 2-Fache wurde auch in Gegenwart von Harpagosid reduziert, sodass nach 48 h noch über die 10-fache Menge an TNFα-mRNA im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden konnte. Dieser positive Effekt von Harpagosid auf die mRNA-Expression war besonders deutlich im Kontext von I-CAM-1. Hier fiel die Expression nach 48 h auf das 4-Fache im Vergleich zur Kontrolle ab, in Gegenwart von Harpagosid nur auf das 18-Fache.

Die Expression der mRNAs für PECAM-1, CD86, MAC-1 und L-Selektin wurde nach 3 h Stimulation weder durch Harpagosid noch durch IFNγ und LPS wesentlich beeinflusst. Nach 48 h jedoch zeigte sich eine Zunahme der Expression von CD86 und L-Selektin durch Harpagosid. Dieser Anstieg erfolgte zusätzlich zur IFNγ und LPS induzierten Zunahme der Expression. Vor Allem die L-Selektin Expression konnte auf über das 12-Fache im Vergleich zur Kontrolle angehoben werden. Interessanterweise wirkte sich Harpagosid hemmend auf die Expression von PECAM-1 und MAC-1 aus.

Die ESL-1 Expression wurde, ähnlich wie bei Aconitin, durch die Stimulation mit Harpagosid auf unter 40 % gesenkt. Diese Absenkung konnte in Gegenwart von IFNγ und LPS allerdings nicht erreicht werden. Nach 48 h war dieser Inhibitorische Effekt aufgehoben und gerade die gemeinsame Gabe von Harpagosid und IFNγ und LPS bewirkte einen eindeutigen Anstieg.

Die Expression von PSGL-1 konnte zwar durch IFNγ und LPS nach 3 h nahezu verdoppelt werden, wurde aber durch Harpagosid nicht wesentlich beeinflusst. Dies änderte sich nach 48 h. Während die IFNγ und LPS induzierte Verdopplung des PSGL-1 Expression geringfügig zunahm, führte die Vorstimulation mit Harpagosid zu einem Anstieg auf das 6-Fache. Die Gegenwart von Harpagosid, IFNγ und LPS bewirkte sogar einen Anstieg der PSGL-1 Expression auf mehr als das 17-Fache im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24 a und b).

4.4.3 Einfluss von Harpagid auf die IFNγ und LPS induzierte mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen

Der Einfluss von Harpagid erscheint wie eine Mischung aus der Wirkung von Aconitin und Harpagosid. Während vor allem der Einfluss auf die Expression von TNFα und ICAM-1 eher der Wirkung von Aconitin gleicht, ähnelt der inhibitorische Einfluss auf die PECAM-1 und MAC-1 Expression eher der Wirkung von Harpagosid. Der inhibitorische Einfluss auf die ESL-1 Expression nach 3 h ist bei allen untersuchten pflanzlichen Naturstoffen zu beobachten. Nur im Kontext der CD86-Expression nimmt Harpagid eine Sonderstellung ein. Bereits nach 3 Stunden führt die gemeinsame Stimulation von Harpagid und IFNγ und LPS zu einer Zunahme der Expression. Anders als bei Aconitin und Harpagosid fällt sie bei Harpagid nach 48 h aber wieder ab und liegt mit 40 % deutlich unterhalb der Kontrolle. In Gegenwart von IFNγ und LPS war dieser inhibitorische Einfluss jedoch nicht mehr nachweisbar (Abb. 25 a und b).

Aconitin (3 h)

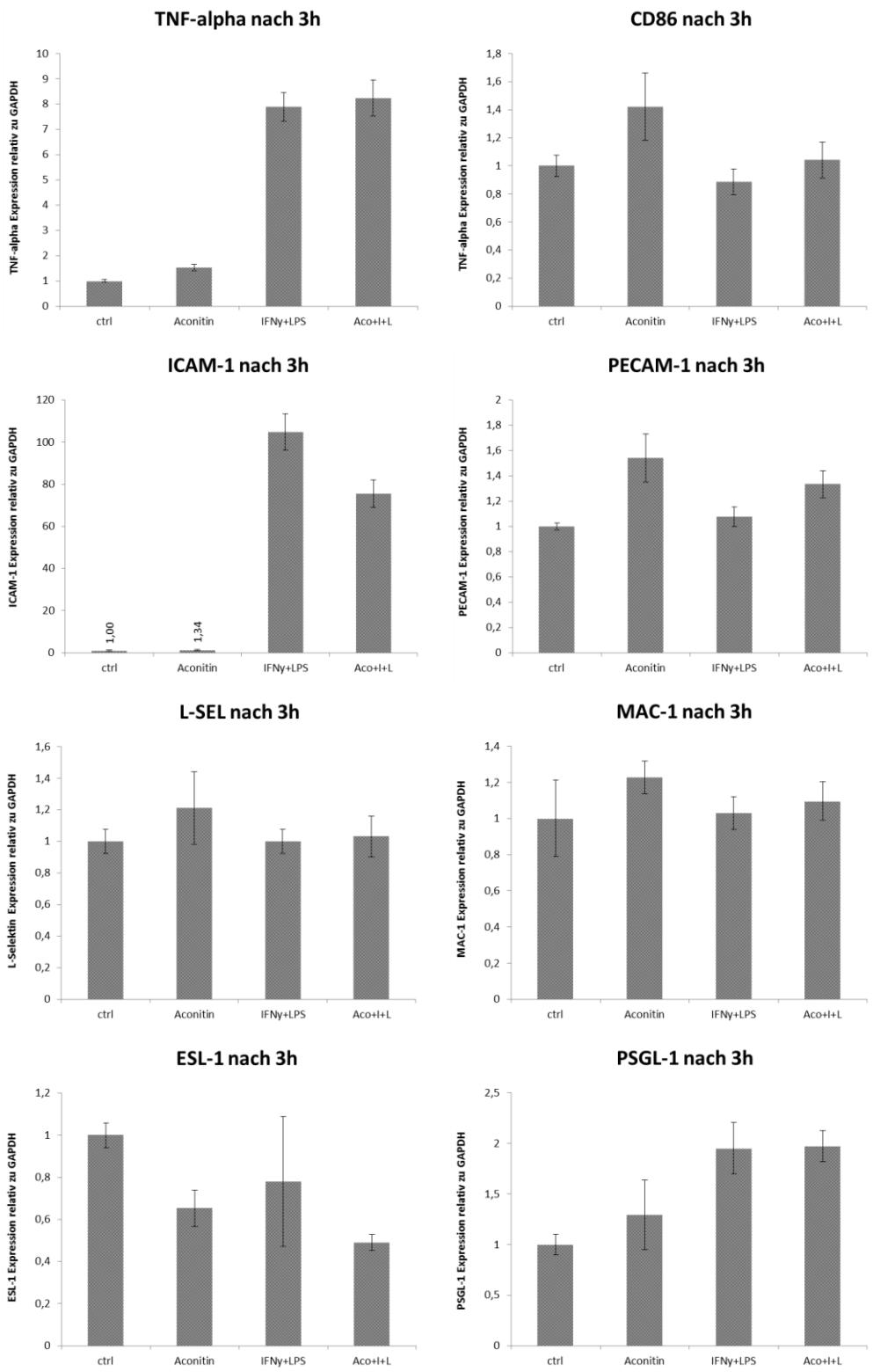


Abbildung 23a: Einfluss von Aconitin auf die mRNA-Expression nach 3 h Stimulation

Aconitin (48 h)

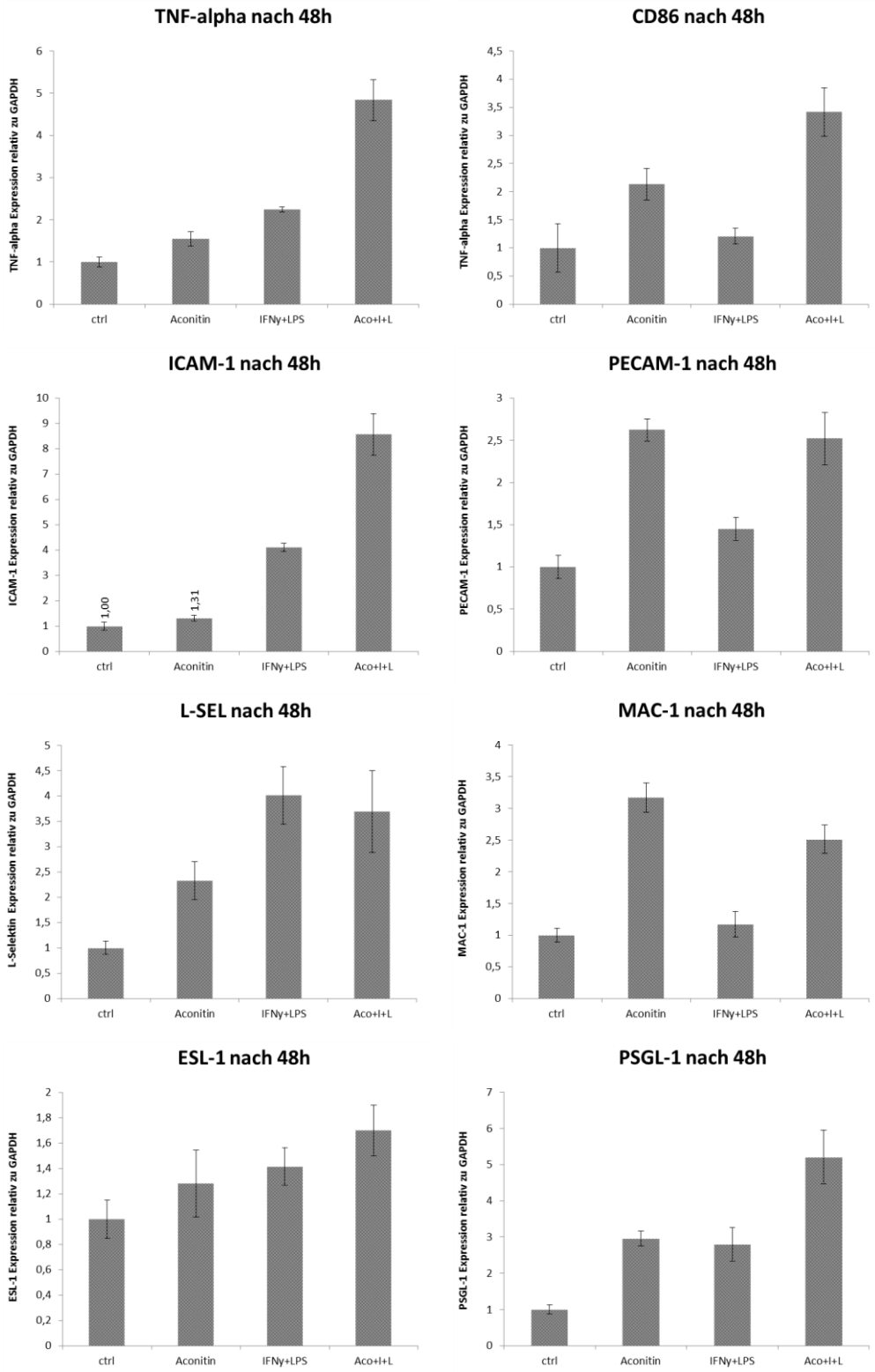


Abbildung 23b: Einfluss von Harpagid auf die mRNA-Expression nach 48 h Stimulation

Harpagosid (3 h)

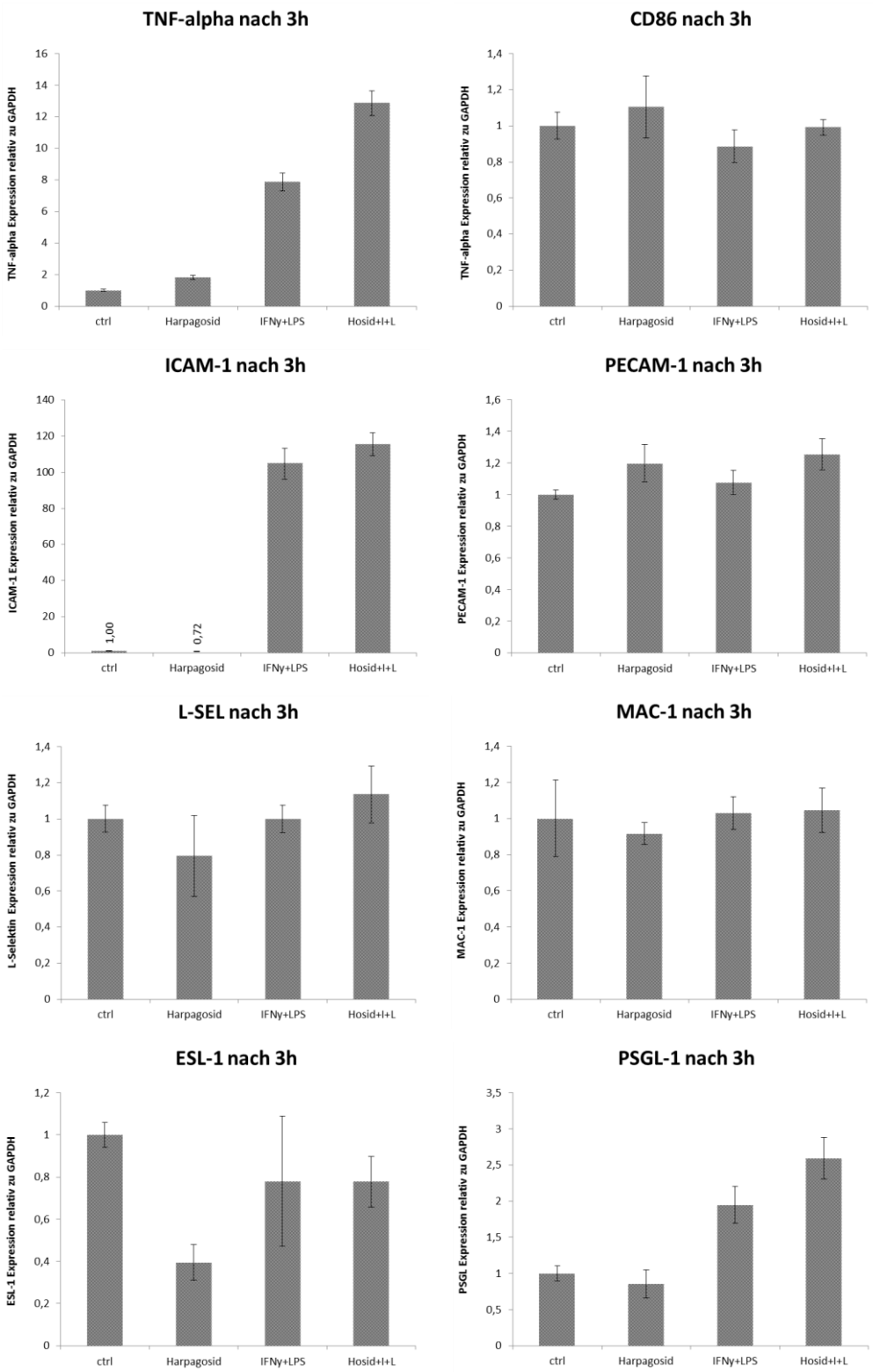


Abbildung 24a: Einfluss von Harpagosid auf die mRNA-Expression nach 3 h Stimulation

Harpagosid (48 h)

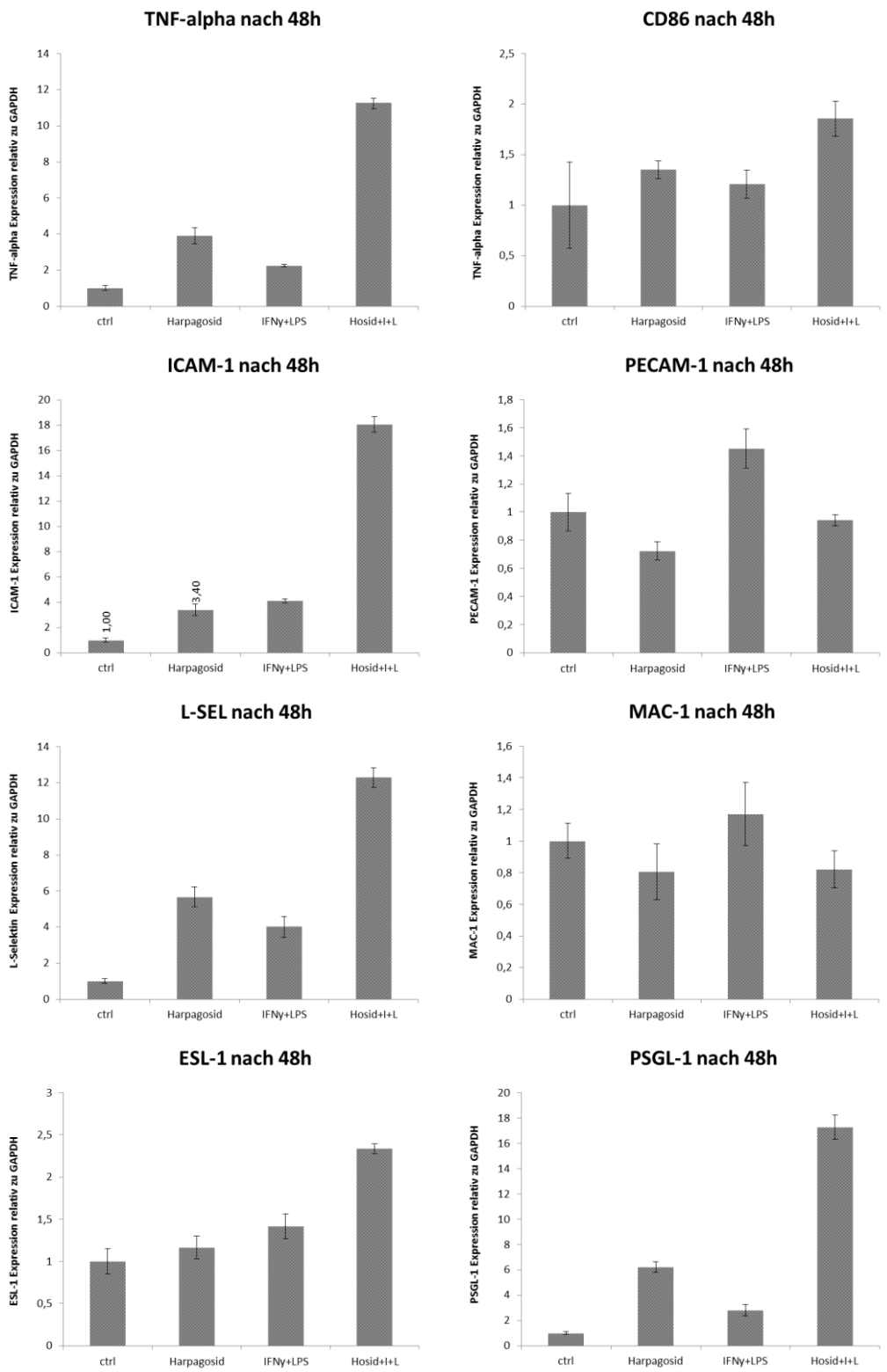


Abbildung 24b: Einfluss von Harpagid auf die mRNA-Expression nach 48 h Stimulation

Harpagid (3 h)

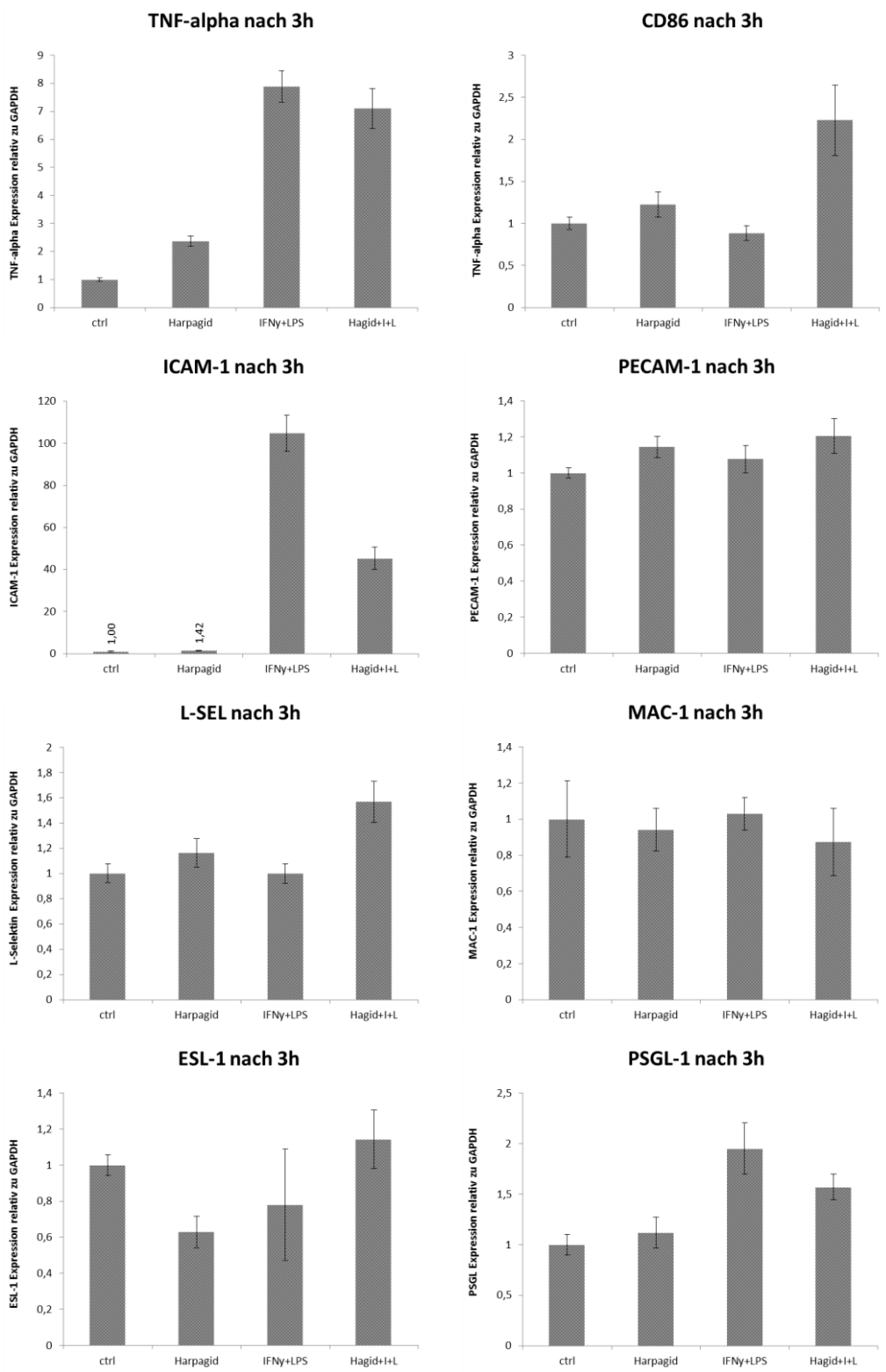


Abbildung 25a: Einfluss von Harpagid auf die mRNA-Expression nach 3 h Stimulation

Harpagid (48 h)

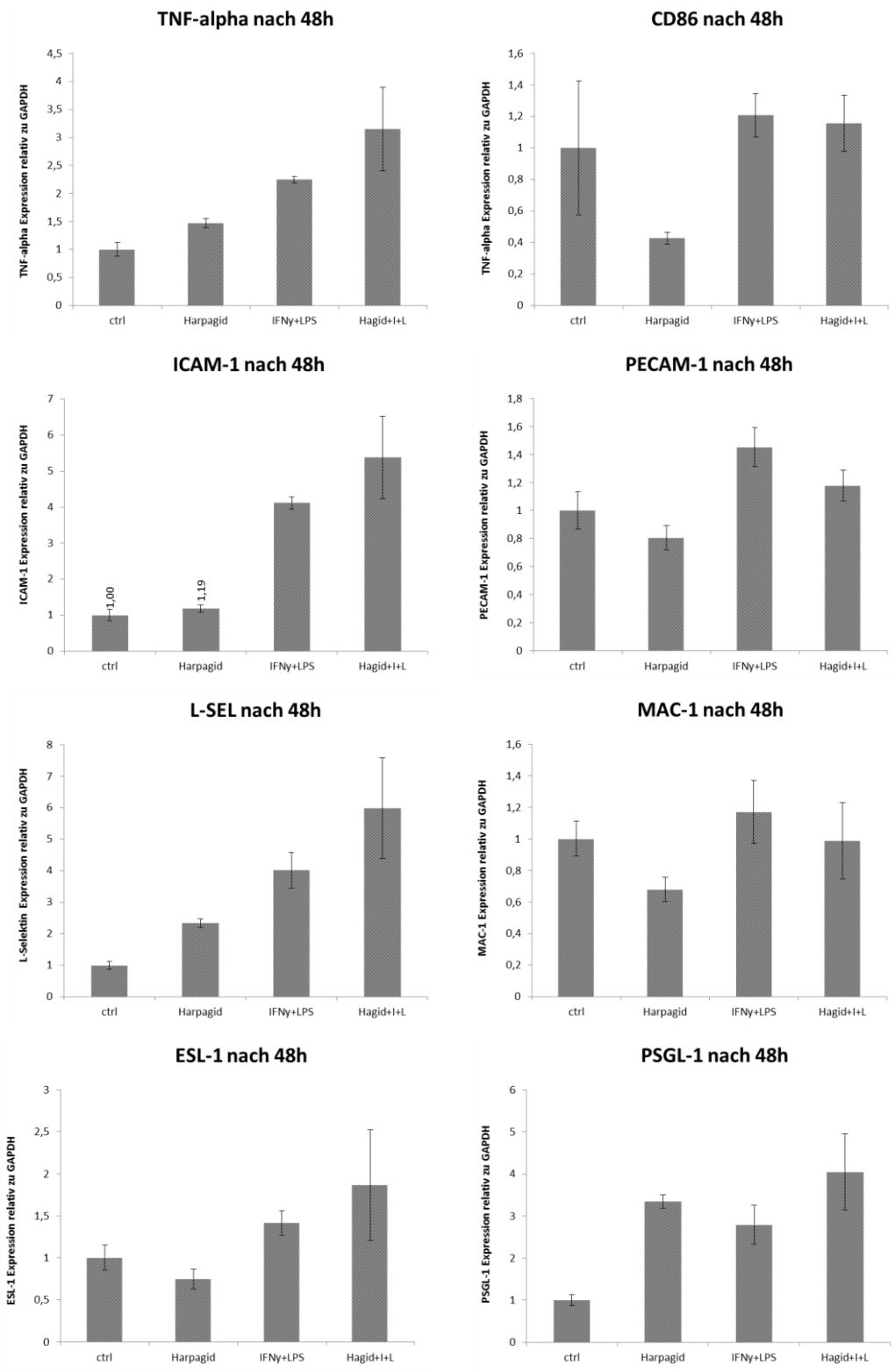


Abbildung 25b: Einfluss von Harpagid auf die mRNA-Expression nach 48 h Stimulation

5 Diskussion

5.1 Regulation der Entzündungsreaktion in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 durch IFNγ und synthetische TLR-Agonisten

5.1.1 Etablierung eines reproduzierbaren Protokoll für die stabile Differenzierung humaner THP-1 Zellen in makrophagenähnliche Zellen

Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in Granulozyten/Monozyten Vorläuferzellen erfolgt *in vivo* durch eine Stimulation mit IL-1, IL-3 und/oder IL-6. Die anschließende Aktivierung durch IL-3, sowie GM-CSF und M-CSF führt über die Bildung weiterer Vorläuferstadien zur Differenzierung in Monozyten und Makrophagen (Valledor et al. 1998). Für die *in vitro* Differenzierung der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeten monozytären Zelllinie THP-1 wurde der PKC-Aktivator PMA verwendet, da er im Gegensatz zu 1,25-Dihydroxyvitamin D3 eher die Bildung von pro-inflammatorischen Makrophagen begünstigt (Schwende et al. 1996). THP-1 Zellen sind Suspensionszellen, die bevorzugt in kleinen Zellgruppen wachsen. Die Stimulation mit PMA führt neben einer verstärkten Freisetzung von Prostaglandin E2 und in einer Steigerung der Expression und Aktivität der Phospholipase A2 auch zu einer Änderung der phänotypischen Erscheinung durch eine gesteigerte Adhäsion (Abb. 4). Darüber hinaus erhöht die Aktivierung der PKC auch die Ansprechbarkeit auf Stimulation mit dem TLR-Agonisten LPS (Greenberger et al. 1980; Schwende et al. 1996; Takashiba et al. 1999).

Es ist bekannt, dass TNFα hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten produziert wird und als wichtiger Regulator der Entzündungsregulation wirkt (Bradley 2008), jedoch scheint der Effekt von PMA auf die Sekretion von TNFα widersprüchlich (Schwende et al. 1996; Takashiba et al. 1999). Um ein stabiles Model für die Differenzierung zu etablieren wurden THP-1 Zellen mit einer finalen PMA Konzentrationen im Bereich von 10 ng/mL bis 1000 ng/mL für 72 Stunden stimuliert und die Überstände anschließend analysiert. Obwohl alternative Differenzierungsprotokolle vorgeschlagen wurden (Park et al. 2007; Daigneault et al. 2010), konnte im Rahmen meiner Experimente eine stabile Differenzierung für mehr als 72 Stunden nur mit PMA Konzentration von 100 ng/mL oder höher erreicht werden. Aus diesem Grund und obwohl die Stimulation zu einem deutlichen Anstieg der TNFα-Konzentration im Medium führte, wurden für die weiteren Experimente eine Konzentration von 100 ng/mL PMA zur Differenzierung der monozytären Zelllinie THP-1 in Makrophagen verwendet (Abb. 4). Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen also die Beobachtungen von Schwende *et al.*, dass PMA nicht nur eine Differenzierung von THP-1 Zellen bewirkt, sondern auch zu einem deutlichen Anstieg der TNFα Sekretion führte.

5.1.2 Einfluss von IFNγ und synthetischer TLR-Agonisten auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität

Die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen ist ein wichtiger Schritt für die effiziente Erradikation pathogener Strukturen und die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Gewebshomöostase. Untersuchungen in den 1990er Jahren zeigten, dass die Stimulation der murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 mit LPS alleine bereits ausreichte, um sowohl die TNFα-Expression als auch die TNFα-Sekretion zu stimulieren, wohingegen in der humanen Makrophagenzelllinie Mono Mac 6 zur Stimulation der TNFα-Sekretion zusätzlich die Aktivierung der PKC durch den Phorbolester PMA erfolgen musste (Pradines-Figueres and Raetz 1992). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 die TNFα mRNA-Expression durch LPS, als auch durch IFNγ stimuliert werden konnte (s. Abb. 17), die TNFα-Sekretion ins Medium ohne die Aktivierung der PKC jedoch ausblieb (s. Abb. 5). Anders als bei den Mono Mac 6 Zellen hatte die Aktivierung der THP-1 Zellen durch 100 ng/mL PMA aber bereits einen deutlich stimulatorischen Effekt auf die TNFα-Sekretion (s. Abb. 4). Dies verwunderte jedoch nicht, da die Aktivierung der PKC bei einer Vielzahl regulatorischer Prozesse, wie der Sekretion und dem vesikulären Transport zur Plasmamembran involviert ist und sich somit positiv auf die Sekretion von Proteinen auswirken kann (Scott et al. 2003; Karunakaran et al. 2013).

Aus Untersuchungen hinsichtlich der Lysozymexpression war bekannt, dass die Proteinkinasen A und C in der aviären Zelllinie HD11 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Lysozym Genlocus haben (Regenhard et al. 2001). Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass auch in der humanen Zelllinie THP-1 sowohl die meisten synthetischen TLR-Agonisten als auch die untersuchten mikrobiellen Präparationen alleine keinen Einfluss auf die Höhe der gemessenen Lysozymaktivität im Medium hatten und sich erst durch die Aktivierung der PKC durch PMA ein modulativer Effekt der untersuchten Substanzen darstellte (s. Abb. 5, 6, 7 und 8). Die Daten verdeutlichen darüber hinaus, dass die PMA-induzierte Aktivierung der PKC die verwendeten THP-1 Zellen ebenfalls für die Stimulation mit IFNγ sensibilisierte, wodurch nicht nur eine Erhöhung der TNFα-Sekretion sondern auch der Lysozymaktivität erzielt werden konnte.

Die Rolle von LPS und anderen TLR-Agonisten in humanen Monozyten und Makrophagen erscheint jedoch verwirrend. Ähnlich wie TNFα, spielt auch Lysozym eine wichtige Rolle bei der effektiven Abwehr eindringender pathogener Bakterien und die Expression beider Proteine ist positiv beeinflusst durch Transkriptionsfaktoren wie NF-κB und C/EBPβ (Phi van 1996; Goethe and Phi-van 1997; Liu et al. 2000; Pope et al. 2000; Lefevre et al. 2001; Lefevre et al. 2003; Lu et al. 2009). Jedoch hatte die Stimulation mit den Zelloberflächen-TLR-

Agonisten Pam3CSK4, HKLM, ST-FLA, FSL-1 und vor allem LPS in Gegenwart und Abwesenheit von IFNγ antagonistische Effekte hinsichtlich der Lysozymaktivität und der TNFα-Sekretion in THP-1 Zellen – also einer Stimulation der TNFα-Sekretion auf der einen Seite und einer Hemmung der Lysozymaktivität auf der anderen Seite.

Entsprechend der Literatur resultiert die Stimulation von THP-1 Zellen mit LPS in einem Anstieg der Lysozymexpression (Goethe and Phi-van 1998). Posttranslationale Modifikationen wurden bei der Interpretation jedoch nachrangig berücksichtigt. Goethe und Phi-van untersuchten den Einfluss von LPS auf die Regulation des Primärtranskripts des Lysozymgens in HD11 Zellen und die fanden, dass die LPS Stimulation zu einem Anstieg der Lysozym prämRNA und zu Änderungen der Polyadenylierung führte, die eine Stabilisierung des Transkript bewirkte. Obwohl die Rekrutierung der Ribosomen durch die Änderung der Polyadenylierung nicht beeinflusst wurde und die Menge an reifer Lysozym mRNA im Zytoplasma während der Inkubationszeiten konstant blieb, fanden die Autoren jedoch einen Anstieg der inrazellulären Lysozymkonzentration und eine gesteigerte Sekretion.

Die Ergebnisse dieser Studie hingegen zeigen eine eindeutige Reduktion der Lysozymaktivität im Medium durch die Stimulation mit LPS. Einer der Hauptunterschiede zwischen den Versuchsaufbauten war die Vorstimulation mit IFNγ. Zusammen mit anderen Proteinen, welche die Beseitigung von Mikroben durch Makrophagen unterstützen (Schroder et al. 2004) ist IFNγ ein potenter Makrophagenaktivator, der besonders in geringen Konzentrationen, zu einer Sensibilisierung dieses Zelltyps für die Stimulation mit Endotoxinen wie LPS und CpG-DNA führt (Williams et al. 1992; Lorsbach et al. 1993; Sweet et al. 1998). Diese pro-inflammatorische Vorwärtsverstärkung wird unter anderem über die Akkumulation des intrazellulären Signaltransduktors und Aktivator der Transkription 1 (STAT1) und seiner Kooperation mit NF-κB bei der Aktivierung verschiedener Genpromotoren vermittelt. Da sowohl die Expression von Lysozym als auch von TNFα durch NF-κB positiv beeinflusst wird, verwunderte es nicht, dass die Stimulation mit IFNγ zu einem Anstieg der Sekretion beider Proteine führte (s. Abb. 5). Höhere Konzentrationen von IFNγ hingegen wirken jedoch über die Aktivierung von *suppressor of cytokine activation* (SOCS1) eher inhibitorisch. Denn SOCS1 wirkt der pro-inflammatorischen Aktivität von STAT1 entgegen, indem es (a) um die gleiche Bindungsstelle am IFNγ-Rezeptor konkurriert und (b) die Stabilität NF-κB im Zellkern herabsetzt. (Hu et al. 2008; Strebovsky et al. 2011). Diese STAT1 vermittelte SOCS1 Aktivierung erfolgt aufgrund einer gesteigerten Expression von *interferon regulatory factor* 1 (IRF1), einem Positivregulator der SOCS1 Transkription in humanen Keratinozyten, der ebenfalls durch die TLR4-Signaltransduktion aktiviert wird (Nhu et al. 2006; Madonna et al. 2010). Obgleich sowohl die Stimulation mit IFNγ als auch mit LPS in der Aktivierung von NF-κB kumulieren, induzieren sie beide inhibitorische Rückkopplungen die einer übermäßigen Entzündung entge-

gen wirken. Die Stimulation des TLR4 führt jedoch über zwei intrazellulären Signalkaskaden zur Transkription pro-inflammatorischer Zytokine: dem MYD88-abhängigen und dem MYD88-unabhängigen Signalweg. Der MYD88-abhängige Signalweg mündet in der Aktivierung von NF-κB und seiner Translokation in den Zellkern, wohingegen der MYD88-unabhängige Signalweg über die Aktivierung von IRF3 wirkt. Die Aktivierung von IRF3 hält die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNFα und IFNβ und somit auch die Aktivität von NF-κB aufrecht (Moynagh 2005; Mogensen 2009). Dieser Umstand könnte erklären, warum die TNFα-Sekretion weiter fortbesteht, obwohl inhibitorische Rückkopplungen aktiv sind. Es scheint, dass die Lysozymexpression vor Allem von IFNγ stimuliert wird, durch eine gemeinsame Aktivierung des IFNγ-Rezeptors und der TLRs aber eher inhibitorische Rückkopplungen dominieren und so die Lysozymsekretion gehemmt wird. Dass auch LPS alleine zu einem Abfall der Lysozymaktivität führte, steht im Widerspruch zu Goethe und Phi-Van und lässt sich nur durch Unterschiede in der Interleukinkonzentration und –komposition des verwendeten Serums erklären. Die hier beobachteten Unterschiede hinsichtlich TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität erscheinen dennoch schlüssig, da bereits ins Gewebe eingedrungene Bakterien eine der ersten unspezifischen Barrieren, wie das bakteriolytische Enzym Lysozym, bereits überwunden haben, und ein Strategiewechsel zur effektiven Bekämpfung der Bakterien sinnvoll erscheint. Das Immunsystem kann nun seine energetischen Ressourcen neu organisieren und sich bei der Bekämpfung eingedrungener Pathogen weg von einer generalisierten hin zu eher spezifischen Abwehr ausrichten. Nichtsdestotrotz erscheint eine genauere Untersuchung der zugrunde liegenden, antagonistischen Regulation von TNFα und Lysozym sinnvoll.

Ein weiterer interessanter Aspekt war, dass lediglich TLR-Agonisten, die an Zelloberflächen TLRs binden, zu einer Steigerung der TNFα-Sekretion führten, die Stimulation intrazellulärer TLRs jedoch wirkungslos blieb. Ursächlich dafür könnten entweder eine gehinderte Aufnahme der Reinsubstanzen in die Zelle oder eine fehlende Expression entsprechender TLR in den THP-1 Zellen sein. Beides konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden. Doch auch bei den Zelloberflächen TLRs wurde die volle Aktivierung nur in der Gegenwart von IFNγ erreicht. Interessanterweise schaffte es FSL-1, ein synthetisches Lipoprotein, welches den TLR 6/2 aktiviert, auch in der Abwesenheit von IFNγ die TNFα-Sekretion maximal zu stimulieren. Die Gabe von IFNγ, welches im Vergleich zu den synthetischen TLR-Agonisten einen wesentlich stärkeren Effekt hatte, konnte die FSL-1-indzierte Stimulation also nicht wesentlich mehr anheben. Dies lässt vermuten, dass eine Sättigung des Systems vorlag. Der enorme Unterschied in der molekulare Masse, die beim LPS zirka 10 x höher liegt, als beim FSL-1, könnte den starken Unterschied in der Wirkung beider Stoffe erklären, da zur

Bestimmung der Konzentration nicht die Molarität verwendet wurde, sondern Gewicht pro Volumen.

5.1.3 Einfluss von IFNγ und synthetischer TLR-Agonisten auf die mRNA-Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle

Ein Vergleich der Abbildungen 6 und 16 zeigt eine interessante Korrelation zwischen der TNFα-Sekretion differenzierter und dem mikroskopischen sichtbaren Phänotyp undifferenzierter THP-1 Zellen. So führten TLR-Agonisten, die einen Anstieg der TNFα-Sekretion in differenzierten Zellen bewirkten, ebenfalls zur Bildung von großen Zellaggregationen in undifferenzierten, IFNγ-behandelten THP-1 Zellen. Von der Aktivierung von TLRs ist bekannt, dass sie die Expression einer Vielzahl von Proteinen erhöhen, die für die zelluläre Kommunikation, sowie für die Transmigration von Monozyten in lymphatische Organe oder entzündete Gewebe wichtig sind (Imhof and Aurrand-Lions 2004; Newton and Dixit 2012). Obwohl undifferenzierte THP-1 Zellen nach Stimulation mit IFNγ und/oder der TLR-Agonisten Pam3CSK4, HKLM, LPS-EK, ST-FLA keine Änderung der TNFα-Sekretion oder Lysozymaktivität aufzeigten, wurde ihre Fähigkeit zur interzellulären Adhäsion dennoch maßgeblich erhöht. Der stärkste Induktor der interzellulären Adhäsion war FSL-1, was jedoch vermutlich auf die zirka 10-mal höhere Anzahl an Molekülen im Vergleich zu beispielsweise LPS zurückzuführen war (s. 5.1.2).

Die Stimulation mit IFNγ führt zur Hochregulation von ICAM-1 und VCAM-1 in der Mucosa von Mäusen und induziert die Rekrutierung zirkulierender Lymphozyten in Herpes Simplex infizierte Gewebe (Parr and Parr 2000). Auch die Aktivierung von endothelialen Oberflächen durch IFNγ, TNFα und TLR-Agonisten führt zu einer gesteigerten Aktivierung von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin und ist für die Transmigration von Leukozyten von großer Bedeutung (Jersmann et al. 2001; Wang et al. 2007). Wenig geklärt ist jedoch die Frage, inwieweit IFNγ und TLR-Agonisten die Expression und Sekretion spezifischer Adhäsionsmoleküle in Monozyten beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde die mRNA-Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle nach Stimulation mit IFNγ und den TLR-Agonisten LPS und FSL-1 in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 untersucht.

Wie nun im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stimulierten die TLR-Agonisten LPS und FSL-1 alleine und in Gegenwart von IFNγ die Adhäsionsmolekülexpression auch in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 nachweislich. Somit wurde verdeutlicht, dass lokale und zirkulierende PAMPs als Lockstoffe dienen, die sowohl Endothelzellen aber auch systemisch zirkulierende Monozyten aktivieren und dadurch das Rollen und folglich die Adhäsion von Leukozyten am Endothel in der unmittelbaren Umgebung des infizierten Gewebes ermöglichen und die Extravasation erleichtern. Diese Beobachtung gilt für ICAM-1 und im zeitlich fortgeschrittenen Verlauf auch für PECAM-1, sowie MAC-1, ESL-1, PSGL-1 und L-Selektin. Entsprechend der mikroskopischen Bilder, in denen die interzelluläre Adhäsion deutlich zu erkennen war, hatten, neben LPS und FSL-1, auch die TLR-Agonisten Pam3CSK4, HKLM und

ST-FLA einen positiven Einfluss auf die interzelluläre Adhäsion, was ebenfalls auf eine gesteigerte mRNA- und Rezeptorexpression schließen lässt.

PSGL-1 wird von Monozyten exprimiert und kann an die Glykoproteine P-Selektin, E-Selektin and L-Selektin binden (Martinez et al. 2005). Die Interaktion von PSGL-1 mit P-Selektin und E-Selektin ist ein kritischer Schritt bei der Initiation des Leukozytenrollens auf endothelialen Oberflächen. Sowohl PSGL-1, als auch ESL-1, welches hauptsächlich mit E-Selektin interagiert, ermöglichen die Bindung zirkulierender Leukozyten an das Endothel unter Blutflussbedingungen. Die Interaktion von PSGL-1 mit L-Selektin, dass ebenfalls von den meisten Leukozyten exprimiert wird, unterstützt das Anhaften von Leukozyten untereinander und stimuliert die Rekrutierung weiterer zirkulierender Monozyten zum entzündeten Gewebe (Martinez et al. 2005; Ley et al. 2007). Auf die Expression von L-Selektin scheint vor allem IFNγ einen positiven Einfluss zu haben, wie die in Abbildung 17, 18 und 22 dargestellten Ergebnisse zeigen. Ähnlich verhielt sich PSGL-1, dessen Expression primär durch IFNγ aktiviert wurde, durch LPS und FSL-1 aber noch weiter stimuliert werden konnte. Diese Ergebnisse widersprechen den Beobachtungen von Marsik *et al.* die eine Runterregulation von PSGL-1 nach Stimulation mit LPS in humanen Neutrophilen Granulozyten und Monozyten festgestellt hatten (Marsik et al. 2004). Ihr beobachteter Abfall war jedoch moderat (-22 %) und wurde darüber hinaus bereits nach 6-8 Stunden gemessen, was über den weiteren zeitlichen Verlauf der Expression keine Aussage zulässt.

5.1.4 Schlussfolgerung zum Einfluss von IFNγ und synthetischer TLR-Agonisten auf die TNFα-Sekretion und mRNA-Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle in humanen THP-1 Zellen

Die Integration der hier gewonnenen Ergebnisse in bereits bestehende Daten der Literatur bezüglich der TNFα-Aktivierung und der Extravasation von Monozyten und Makrophagen ergänzt das Bild hinsichtlich der pro-inflammatorischen Aktivität des Entzündungsmediators IFNγ und verschiedener TLR-Agonisten im Kontext des angeborenen Immunsystems (Abb. 26). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass vor allem in Gegenwart von IFNγ und der TLR-Agonisten LPS und FSL-1 die Expression verschiedener für die Transmigration relevanten Adhäsionsmoleküle in der Monozytenzelllinie THP-1 hochreguliert und die interzelluläre Adhäsion dadurch deutlich gesteigert werden konnte. Auch die TNFα-Expression konnte maßgeblich erhöht werden. Für eine Freisetzung ins Medium war jedoch die Aktivierung der PKC durch den Phorbolester PMA, zumindest im Kontext der hier untersuchten Konzentration, erforderlich, wobei höhere Molaritäten auch undifferenzierte Monozyten zur TNFα-Sekretion anregten. Die beobachtete Reduktion der Lysozymsekretion, zu Gunsten einer gesteigerten TNFα-Sekretion, ließ die Vermutung zu, dass durch die Aktivierung mit IFNγ und verschiedenen TLRs Monozyten und Makrophagen ihre unspezifische Aktivität senken und eher spezifischere Prozesse aktivieren. Anhand bestehender Daten und der hier gemachten Ergebnisse ergibt sich nun folgendes Bild: Durch die erhöhte TNFα-Sekretion werden benachbarte Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen angeregt (a), wodurch zirkulierende Monozyten, die durch die Gegenwart von IFNγ und TLR-Agonisten ebenfalls in ihrer Adhäsionsmolekülexpression stimuliert werden, gezielt an den Ort des Geschehens gelangen können (b). Durch die Expression von Selektinen und anderer Adhäsionsmoleküle werden weitere Leukozyten rekrutiert (c). Die gesteigerte Expression von CD86 erhöht zudem die Wahrscheinlichkeit der Rekrutierung und Aktivierung zirkulierender T-Zellen, wodurch die spezifische Immunantwort noch weiter stimuliert wird (d). Eine schematische Zusammenfassung findet sich in Abbildung 26.

5.2 Einfluss pflanzlicher Naturstoffe im Kontext bakterieller Entzündungen

5.2.1 Einfluss von pH und β-Glukosidase auf die pflanzlichen Iridoidglykoside Aucubin, Catalpol, Harpagosid und Harpagid

In verschiedenen Pflanzen, wie beispielsweise dem Spitzwegerich *(Plantago lanceolatae* L.*)*, der Wollblume *(Verbascum densiflorum* BERTOL.*)* oder der Teufelskralle *(Harpagophytum procumbens* DC. ex MEISN.*)*, die traditionell bei der Therapie entzündlicher Erkrankungen verwendet werden, finden sich die Iridoidglykoside Aucubin, Catalpol und Harpagosid (s. Abb. 2). Schon seit längerem wird ihre anti-inflammatorische Wirkung diskutiert (Viljoen et al. 2012), jedoch ist die Frage nach ihrer Bioverfügbarkeit, also ob und in welcher Konzentration die genannten Iridoide an ihren Wirkort gelangen, bisher nur unzureichend geklärt worden (Epriliati and Ginjom, 2012).

Pharmakokinetische Untersuchungen in Ratten zeigten deutliche Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von intravenös, intraperitoneal und peroraler Administration von Aucubin (Suh et al. 1991). Lediglich 19,3 % des peroral verabreichten Aucubins konnten im Rahmen der Studie noch im Blut der Versuchstiere nachgewiesen werden. Die Autoren argumentieren, dass eine pH-Instabilität des Iridoids für diesen Effekt verantwortlich ist, da seine Halbwertszeiten bei einem pH von 1,2 lediglich 5,1 Stunden und bei einem pH von 2,0 noch 14,8 Stunden betrugen. Aucubinhaltige Heilpflanzen, wie *P. lanceolata* oder die *V. densiflorum* werden jedoch traditionell als Teezubereitung zur Therapie akut entzündlicher Erkrankungen eingesetzt, wodurch die Zeit für die Magenpassage in der Regel deutlich unterhalb von 5 Stunden liegen sollte und somit eine pH-abhängige Spaltung als Ursache für die geringe Plasmakonzentration des Aucubins unwahrscheinlich erscheint. Diese Annahme konnte durch die hier gewonnenen Ergebnisse weiter bekräftigt werden, da durch pH-Änderungen zwischen 1 und 9 für kürzere Zeiträume keine Spaltung der Glykoside Aucubin und Catalpol in ihre Aglyka nachgewiesen werden konnte. Die Gegenwart von β-Glukosidase, die auch das bakterielle Milieu des Darms mitcharakterisiert, änderte jedoch das Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie derart, dass, im Zusammenhang mit der hohen Spezifität der β-Glukosidase, von einer Spaltung der Iridoide in Aglykon und Zuckerrest ausgegangen werden kann (vgl. Abb. 11). Eine β-glykosidische Spaltung der Iridoidglykoside scheint somit eher der ausschlaggebende Grund dafür zu sein, dass von 100 % peroral verabreichtem Aucubin lediglich 19,3 % im Plasma der Versuchstiere nachgewiesen werden konnten (Suh et al. 1991). Die Bedeutung des Mikrobioms bei der Prozessierung wird daher zunehmend deutlicher und eine Unterscheidung zwischen Glykosid und Aglykon, sowie weiterer bakteriell generierter Me-

tabolite im Kontext von *in vitro* Untersuchungen dringend erforderlich (Piwowarski et al. 2014).

Anders als Aucubin und Catalpol konnte beim Iridoidglykosid Harpagosid, weder durch eine physiologische Änderung des pH-Werts noch durch die Gegenwart von β-Glukosidase, eine Spaltung in Aglykon und Zuckerrest bewirkt werden. Lediglich die Änderung des pH-Werts auf über 11 führte zu einer Überführung von Harpagosid in Harpagid, einem Iridoidglykosid, welches im Vergleich zu Harpagosid durch das Fehlen des Zimtsäurerests charakterisiert ist. Obwohl ein physiologisches pH-Maximum von pH 9 nicht ausreichte, die Abspaltung des Zimtsäurerests innerhalb des Versuchszeitraums zu katalysieren, ist es dennoch denkbar, dass eine Darmpassage von mehreren Stunden selbst in physiologischen pH-Grenzen zu einer quantitativ nachweisbaren Spaltung führt. Ausgehend von einer äquivalenten Resorption ist somit anzunehmen, dass sowohl Harpagosid als auch Harpagid nach der Einnahme von *H. procumbens* Präparaten quantitativ im Blut nachweisbar sind.

5.2.2 Immunmodulatorische Effekte der pflanzlichen Iridoidglykoside Aucubin, Catalpol, Harpagosid und Harpagid in humanen THP-1 Zellen

Die β-Glukosidase katalysierte Überführung von Aucubin und Catalpol in ihre Aglyka scheint für ihre positive Wirkung im Kontext akut entzündlicher Erkrankungen eine große Bedeutung zu spielen, wie die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt haben. Lediglich die β-Glukosidase behandelten Iridoidglykoside Aucubin und Catalpol bewirkten einen deutlichen Anstieg der TNFα-Sekretion in differenzierten IFNγ und LPS-behandelten und -unbehandelten THP-1 Zellen und bestätigen somit Untersuchungen von Park *et al.*, die eine spezifische Aktivität nur für β-Glukosidase behandeltes Aucubin nachweisen konnten (Park et al. 2010). Die genuinen Glykoside Aucubin und Catalpol zeigten auch in dieser Arbeit keine Wirkung im Kontext der IFNγ und LPS induzierten Entzündung, führten aber in hohen Konzentrationen zumindest in differenzierten, IFNγ und LPS-unbehandelten THP-1 Zellen zu einem deutlichen Abfall der TNFα-Sekretion. Für den stimulierenden Einfluss, vor allem von Aucubeginin, scheint insbesondere die Gegenwart von IFNγ von großer Bedeutung zu sein, was auf eine Interaktion innerhalb der IFNγ-spezifischen Signaltransduktion schließen lässt.

Interessanterweise steht der hier beobachtete Aucubeginin-induzierte Anstieg der TNFα-Sekretion im Widerspruch zu Untersuchungen in murinen RAW 264.7 Zellen, in denen eine deutliche Abnahme der IFNγ und LPS-induzierten TNFα-Sekretion durch Stimulation mit β-Glukosidase behandeltem Aucubin festgestellt werden konnte (Park and Chang 2004). Auch Catalpolsid bewirkte in LPS-stimulierten murinen RAW264.7 Zellen keine Zunahme, sondern eine Abnahme der TNFα-Sekretion (An et al. 2002). Die Autoren um S. J. An sprechen in ihrer Studie jedoch von Catalpolsid, was auf das Aglykon des Iridoidglykosids Catalpol schließen lässt. Entsprechend ihrer Darstellung verwendeten sie aber die glykosylierte Form, also das genuine Iridoid Catalpol, die nach Park *et al.* in murinen RAW 264.7 Zellen und Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit auch in humanen THP-1 Zellen keine Wirkung bezüglich der TNFα-Sekretion haben sollte (Park et al. 2010). Die entgegengesetzte Wirkung hinsichtlich des Einflusses von Aucubin und Catalpol auf LPS-stimulierte Makrophagen verwirrt. Dennoch, die Erfahrung der Grundlagenforschung zeigt, dass trotz phylogenetischer Nähe, distinkte Unterschiede zwischen den Spezies Mensch und Maus im Kontext immunologischer Untersuchungen zu beobachten sind (Mestas and Hughes 2004). Ein wesentlicher Unterschied, der somit für die entgegen gesetzte Wirkung verantwortlich sein könnte, ist also das Zellsystem, da zum einen murine RAW 264.7 Zellen verwendet wurden, im Kontext dieser Arbeit jedoch humane THP-1 Zellen Verwendung fanden.

Harpagophytum procumbens wird vor allem im afrikanischen Raum seit langem bei der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen, wie Fieber, Diabetes und Diarrhoe eingesetzt

(Mncwangi et al. 2012). Wässrige Extrakte der Teufelskralle zeigen analgetische und anti-inflammatorische Eigenschaften und tragen wesentlich zur Verbesserung der Symptomatik chronisch-entzündlicher Erkrankungen, wie der Hüft- und Kniegelenksarthrose, bei (Chrubasik et al. 2002; Wegener and Lüpke 2003; Mahomed and Ojewole 2004). Auch eine zunehmende Anzahl von *in vitro* Studien bestätigt darüber hinaus ihre anti-inflammatorischen, anti-oxidativen und analgetischen Eigenschaften (Mncwangi et al. 2012).

Zwei der aktiven Komponenten von *H. procumbens*, denen eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben wird, sind Harpagosid und Harpagid. Der anti-inflammatorische Effekt von Harpagosid wird unter anderem auf die Reduktion der iNOS und COX-2 mRNA-Expression und Proteinsekretion zurückgeführt, welche sowohl in LPS-stimulierten als auch in LPS-unstimulierten RAW264.7 Zellen und *rat mesangial cells* erfolgte und durch die Hemmung der NF-κB Promotoraktivität sowie seiner Translokation in den Zellkern begründet ist (Kaszkin et al. 2004; Huang et al. 2006). Die Gruppe um Fiebich *et al*. konnte ebenfalls zeigen, dass der ethanolische Extrakt von *Harpagophytum procumbens* zu einer Reduktion der TNFα-Expression und TNFα-Sekretion in primären humanen Monozyten führte (Fiebich et al. 2012). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Huang *et al*. konnten sie aber keine Hemmung auf die LPS-induzierte Promotorbindung von NF-κB in RAW 264.7 Zellen oder auf die LPS-induzierte Degradierung der IκB-Proteine in primären humanen Monozyten feststellen, sondern argumentieren eine Hemmung der LPS-vermittelten AP-1 Aktivierung durch das verwendete ethanolische Extrakt als zugrunde liegenden Mechanismus. Darüber hinaus schließen Fiebich *et al*. die maßgebliche Rolle von Harpagosid und Harpagid als Ursache für die Hemmung der LPS-vermittelten Stimulation der TNFα-Sekretion in primären humanen Monozyten aus (Fiebich et al. 2001). Dies verwundert, konnten doch in anderen Experimenten – obwohl schwächer als der Gesamtextrakt – anti-rheumatische Effekte der Einzelsubstanz Harpagosid nachgewiesen werden (Eichler und Koch, 1970). Zudem stehen sie im Widerspruch zu den hier gemachten Ergebnissen, die eine eindeutige Inhibition der IFNγ und LPS-vermittelten TNFα-Sekretion sowohl durch Harpagosid als auch Harpagid in humanen THP-1 Zellen aufzeigen (Abb. 14). Die Gabe beider Iridoidglykoside führte zu einem eindeutigen, dosisabhängigen Abfall auf 50 %, was dafür spricht, dass, zumindest bezüglich der Sekretion, der Zimtsäurerest keine besondere Relevanz spielte. Interessanterweise führten sowohl Harpagosid, als auch Harpagid zu einer deutlichen Zunahme der TNFα mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen in Gegenwart und in Abwesenheit von IFNγ und LPS. Darüber hinaus wirkten sowohl Harpagosid als auch Harpagid dem zeitlich bedingten Abfall der IFNγ und LPS stimulierten TNFα- und ICAM-1-Expression eindeutig entgegen. Dieser stimulatorische Effekt auf mRNA-Ebene spiegelte sich allerdings nicht auf Proteinebene wider. Im Gegenteil, PMA-differenzierte THP-1 Zellen reagierten mit einer deutlichen Abnahme der IFNγ

und LPS-induzierten TNFα-Sekretion in der Gegenwart von Harpagosid und Harpagid. Dies lässt vermuten, dass der Einfluss beider Iridoidglykoside ebenfalls im Kontext der PMA-induzierten Sekretion begründet ist. Untersuchungen, ob und inwiefern sich Harpagosid und Harpagid auf die Aktivität der PKC auswirken, sollten sich anschließen.

Im Kontext der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle zeigte sich, dass sowohl Harpagosid als auch Harpagid vor allem bezüglich ICAM-1 und L-Selektin einen stark positiven Einfluss auf die Expression hatten. Die Expressionskinetik (s. Abb. 22) zeigte, dass gerade die ICAM-1 Expression bereits nach 4 h Stunden wieder abfällt während die L-Selektin Expression dann erst einsetzt. In Gegenwart von Harpagosid und Harpagid konnte die ICAM-1 Expression jedoch auf einem deutlich höheren Niveau gehalten und dadurch einem Abfall entgegen gewirkt werden. In besonderem Maße wurde dann auch die L-Selektin Expression durch beide Iridoidglykoside, vor allem jedoch durch Harpagosid stark stimuliert (s. Abb. 24 und 25). Dies verwunderte, da aufgrund traditioneller Anwendungen *H. procumbens* eindeutig anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Unter Berücksichtigung des Hemmenden Einflusses auf die TNFα-Sekretion wird dadurch jedoch seine Rolle als Immunmodulator – der immunkompetente Zellen zwar zum Ort der Entzündung rekrutiert, ihre pro-inflammatorischen Eigenschaften aber dagegen hemmt – umso deutlicher.

Sowohl Harpagosid als auch Harpagid verhielten sich ähnlich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die TNFα-Sekretion und die mRNA-Expression spezifischer Proteine, doch hatte nur Harpagosid einen zytotoxischen Einfluss auf undifferenzierte THP-1 Zellen. Untersuchungen von Niero und Machando-Santelli zeigten, dass sich höhere Konzentrationen von Zimtsäure über eine Aktivierung der Caaspase-3 zytotxisch auf die humane Melanomzellline HT-144 und isolierte Melanozyten auswirkten (Niero and Machado-Santelli 2013). Da der strukturelle Unterschied der Iridoidglykoside Harpagosid und Harpagid durch das Vorhandensein eines Zimtsäurerests beim Harpagosid charakterisiert ist, könnte dieser, unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Niero und Machando-Santelli, eine Erklärung für die hier beobachtete Zytotoxizität darstellen. Nichtsdestotrotz wurde der positive Einfluss auf die mRNA-Expression dadurch nicht negativ beeinflusst. Im Gegenteil, in undifferenzierten THP-1 Zellen konnte die mRNA-Expression durch Harpagosid wesentlich stärker stimuliert werden, als durch Harpagid. Wodurch dieser stark-positive Effekt auf die Transkription trotz auftretender Zytotoxizität herrührte, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden.

5.2.3 Immunmodulatorische Effekte von Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid

Einer griechischen Sage zufolge findet sich der Ursprung der Pflanze *Aconitum* im zu Boden tropfenden Geifer des Höllenhundes Kerberos, als dieser am Hügel Akonitos von Herakles aus der Unterwelt geholt wurde. Kerberos' Aufgabe als Wächter der Unterwelt – die Toten in der Unterwelt zu halten und die Lebenden vom Eindringen abzuhalten – verdeutlicht die ambivalente Wirkung des Aconitins, dem vor allem toxische Eigenschaften zugeschrieben werden, jedoch auch, wie im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden konnte, positive Eigenschaften innewohnen.

Viele Untersuchungen beschäftigten sich mit den kardio- und neurotoxischen Eigenschaften des Aconitins, jedoch ist wenig über seine Wirkung im Kontext des Immunsystems bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten einen eindeutig anti-inflammatorischen Effekt, der sich durch die Inhibition der TNFα-Sekretion in PMA-differenzierten THP-1 Zellen äußerte. Gewebsständige Makrophagen werden somit in ihrer pro-inflammatorischen Aktivität gehemmt und immunmodulatorische Prozesse gefördert. Seine positive Wirkung auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, PECAM-1, L-Selektin, MAC-1, ESL-1 und PSGL-1 in undifferenzierten THP-1 Zellen deuteten ebenfalls auf einen immunmodulatorischen Einfluss hin. Der IFNγ und LPS induzierte Anstieg der ICAM-1 und TNFα mRNA-Expression fiel nach 48 h Stimulation deutlich ab, wurde jedoch durch die Gegenwart von Aconitin weiterhin aufrechterhalten (siehe Abb. 23). Diese primär induzierte Aktivierung der mRNA-Expression, sowie die Hemmung des zeitlich bedingten Abfalls, vor allem der ICAM-1 Expression deutet darauf hin, dass Aconitin zwar, ähnlich wie auch Harpagosid und Harpagid, die Migration zirkulierender Monozyten in entzündliche Gewebe fördert, jedoch gewebsständige Makrophagen an der Sekretion von pro-inflammatorisch wirksamen TNFα hindert. Die gesteigerte Expression von CD86 in undifferenzierten THP-1 Zellen deutet zudem auf die Möglichkeit einer gesteigerten T-Helferzellaktivierung hin. Ob die gesteigerte CD86-Expression durch Aconitin, Harpagosid und Harpagid auch in gewebsständigen Makrophagen erfolgt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Ein großes Problem bei der Therapie entzündlicher Erkrankungen mit Aconitin ist jedoch seine starke Toxizität, die eine Behandlung mit höheren Dosen ausschließt. Zwar wurden im Rahmen dieser Arbeit subletale Dosen verwendet, doch bereits Konzentration von 1 µM reichen aus um die intrazelluläre Kalziumkonzentration signifikant zu verschieben (Zhou et al. 2013). Klassische chinesische Prozessierungsmethoden, welche die toxischen Diester-Diterpenalkaloide in weniger toxische oder nicht-toxische Derivate überführen, erscheinen in diesem Zusammenhang vielversprechend für die Zukunft des Eisenhuts als potentes anti-inflammatorisches und analgetisches Phytotherapeutikum (Singhuber et al. 2009).

5.2.4 Schlussfolgerung zum Einfluss pflanzlicher Naturstoffe im Kontext bakterieller Entzündungen

Die Messung der TNFα-Serumkonzentration ist ein wichtiger Marker im Kontext entzündlicher Erkrankungen und spezifische TNFα-Inhibitoren zeigen große Erfolge bei der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen (Bradley 2008). Dennoch ist die Anwendung von Medikamenten, wie Adalimumab, Etanercept und Infliximab nicht risikofrei, werden doch teilweise starke Nebenwirkungen, wie erhöhte Infektanfälligkeit, Neutropenie sowie lokale und systemische Reaktionen beobachtet (Scheinfeld 2004). Die Identifikation alternativer, kostengünstiger TNFα-Inhibitoren auf pflanzlicher Basis, deren Nebenwirkungsspektrum geringer und weniger drastisch ist, erscheint somit sinnvoll. Die hier gewonnen Ergebnisse lassen sich gut in bestehende Beobachtungen eingliedern und ergänzen das Bild hinsichtlich der Wirkung pflanzlicher Naturstoffe auf das angeborene Immunsystem (Abb. 26).

Pflanzen, wie *Plantago lanceolata* und *Verbascum densiflorum* werden traditionell zur Behandlung akut entzündlicher Erkrankungen des Nasen-Rachen-Raumes eingesetzt. Zwar erscheint eine Beseitigung der Entzündung Ziel der Therapie zu sein, jedoch sollte die Wahl der Strategie stets im Kontext der Erkrankung betrachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Iridoide Aucubin und Catalpol in Gegenwart von β-Glukosidase in ihre Aglyka überführt werden können und auch *in vivo* vermutlich in dieser Form systemisch vorkommen. Auf differenzierte, IFNγ und TLR-aktivierte THP-1 Zellen wirkten Aucubeginin und Catalpolsid proinflammatorisch, was hinsichtlich der Behandlung entzündlicher Erkrankungen kontraproduktiv erscheint. Doch bei der Behandlung gerade akuter bakterieller oder viraler Infektionen ist die initiale Aktivierung des Immunsystems, durch die Steigerung der TNFα-Sekretion gewebsständiger Makrophagen, durchaus sinnvoll, da es durch eine TNFα-vermittelte Aktivierung des Endothels zu einer verstärkten Rekrutierung weiterer immunkompetenter Zellen zum Ort des Geschehens kommt und eine effiziente Beseitigung der Pathogene unterstützt wird.

Im Gegensatz dazu wird *Harpagophytum procumbens* eher im Kontext chronischer Entzündungen, wie sie bei Arthritis oder Arthrose vorzufinden sind, verwendet. Anders als bei akuten Entzündungen steht hier nicht mehr das entzündungsauslösende Pathogen im Vordergrund der Therapie, sondern die persistierende Entzündung selbst. Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen demonstrierten einen deutlich anti-inflammatorischen Effekt der Iridoide Harpagosid und Harpagid auf gewebsständige Makrophagen indem sie die IFNγ und TLR-induzierte TNFα-Sekretion auf unter 50 % senkten. Die Tatsache, dass vor allem nach längerer Behandlung bestimmte Adhäsionsmoleküle auf mRNA-Ebene hochreguliert werden, verwirrte zunächst. Doch im Kontext der Hemmung der TNFα-Sekretion ge-

webssständiger Makrophagen lässt sich vermuten, dass durch Harpagosid und Harpagid, ebenso wie durch Aconitin, zwar vermehrt immunkompetente Zellen zum Ort der Entzündung rekrutiert werden, sie dort aber eher einen immunregulierenden, hemmenden Einfluss haben. Hinsichtlich der Anwendung isolierter Einzelsubtanzen bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen *in vivo* sollten jedoch Besonderheiten bezüglich der Zytotoxizität und Wirkungsstärke von Harpagosid und Harpagid berücksichtigt werden.

5.3 Pilz- und Bakterienpräparationen im Kontext des angeborenen Immunsystems

5.3.1 Zytokinsekretion durch Stimulation mit IFNγ und Pilz- und Bakterienpräparationen

Das Zytokin TNFα spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen sowie bei der Beseitigung bakterieller Infektionen (Bradley 2008). Als zentrales pro-inflammatorisches Zytokin kommt TNFα eine große Bedeutung zu, sodass untersucht werden sollte, inwiefern sich die Präparate der Firma SANUM-Kehlbeck GmbH & Co. KG, die bei einer Vielzahl von Erkrankungen therapeutisch angewendet werden, auf die Sekretion von TNFα in THP-1 Zellen auswirken.

Die TNFα-Sekretion, ebenso wie die Lysozymaktivität, konnte in PMA-unstimulierten THP-1 Zellen durch die Stimulation mit IFNγ nur minimal beeinflusst werden. Die Stimulation mit den mikrobiellen Aufbereitungen führte ebenfalls zu keinem nennenswerten Anstieg der TNFα-Konzentration im Medium. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den zuvor gemachten Beobachtungen hinsichtlich der Stimulation mit den synthetischen TLR-Agonisten. Anders als in murinen Makrophagenzelllinen, in denen sowohl die TNFα mRNA-Expression als auch die Sekretion ins Medium durch den TLR-Agonisten LPS erzielt werden konnte (Pradines-Figueres and Raetz 1992), wird für die Sekretion in THP-1 Zellen die Aktivität der PKC benötigt. Denn in PMA-stimulierten THP-1 Zellen konnte sowohl durch IFNγ, als auch durch einige der bakteriellen Präparationen die TNFα-Sekretion signifikant gesteigert werden. Dabei wurden teilweise nicht nur additive, sondern auch synergistische Effekte hinsichtlich IFNγ und der bakteriellen Präparationen beobachtet. Interessant scheint zudem die Tatsache, dass es bezüglich der TNFα-Sekretion keine große Bedeutung hatte, ob die Präparate von grampositiven oder gramnegativen Bakterien entstammen, noch ob es sich bei den Proben um Ganzzellpräparationen oder Zytoplasmapräparationen handelte. Die Stimulation aller TLR kumuliert in einer Aktivierung von NF-κB und wirkt sich daher positiv auf die TNFα-Sekretion aus (Kawai and Akira 2010) und auch in den verwendeten THP-1 Zellen führte zumindest die Stimulation mit den synthetischen TLR-Agonisten Pam3CSK4, HKLM, ST-FLA, FSL-1 und LPS zu einem signifikanten Anstieg der TNFα-Sekretion. Da es sich bei den Präparationen um Mehrkomponentengemische handelte und demnach davon ausgegangen werden kann, dass stets CpG-DNA und/oder Lipopolysaccharide bzw. Lipoproteine vorhanden sind, verwunderte es nicht, dass ein Anstieg der TNFα-Sekretion unabhängig der Herkunft und der Präparationsmethode zu beobachten war. Eine einzige Ausnahme bildete die Aufarbeitung „*culturae filtratum*“ bei der in 3/3 Proben nur bei 1/6 Experimenten ein minimaler Anstieg der TNFα-Sekretion beobachtet werden konnte (vgl. Anhang, Nr. 24). Dies ist in der Hinsicht

bemerkenswert, da durch die anderen Präparationen des gleichen Stammes eine eindeutige Wirkung nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Besonderheit war, dass der positive Einfluss auf die TNFα-Sekretion spezifisch nur für bestimmte Bakterienstämme war. Im Gegensatz dazu zeigten beispielsweise die grampositiven Bakterienstämme *Bacillus cereus, Mycobacterium bovis, Propionibakterium acnes, Corynebacterium stationis, Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus,* sowie die gramnegativen Stämme *Brucella melitensis* und *Salmonella enteritidis* in allen untersuchten Aufarbeitungen keinen stimulatorischen Einfluss. Ob spezifische Bakterientoxine bestimmter Präparationen für die Inaktivität bezüglich der TNFα-Sekretion verantwortlich waren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Interessant war auch, dass die untersuchten Pilzpräparate *Candida albicans (evc.)*, *Candida parapsilosis (evc.)*, *Mucor racemosus (evc.)*, *Mucor mucedo (+) (evc.)* und *Penicillium chryogenum (evc.)* nur durch das Stimulationsprotokoll C einen nachweislich inhibitorischen Effekt auf die TNFα-Sekretion ausüben konnten (s. Abb. 10). Da sich die Stimulationsprotokolle A und C im Wesentlichen durch die Konzentration des zugefügten FBS unterschieden, lässt sich vermuten, dass für die volle Aktivität der Pilzpräparationen weitere Faktoren benötigt zu wurden, die sich im Serum des Zellkulturmediums befanden. Im Allgemeinen zeigte sich jedoch, dass vor allem im Kontext der Lysozymaktivität und der mRNA-Expression die Pilzpräparationen keine eindeutige Wirkung hatten. Dies verwunderte, sind doch TLRs bei der Detektion und Beseitigung pathogener Pilze, wie *Candida albicans* und *Pneumocystis murina* beteiligt (Villamón et al. 2004; Zhang et al. 2006). Wichtig für die volle Aktivierung scheinen jedoch Dectine zu sein, die in Synergie mit TLRs die Antwort auf Pilzinfektionen moderieren (Gantner et al. 2003; Ferwerda et al. 2008). Dectine gehören zur Familie der PRRs. Sie finden sich auf der Zelloberfläche von Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und DCs und spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Beseitigung von Pilzbestandteilen (Taylor et al. 2007), werden aber auf THP-1 Zellen nur in geringer Menge exprimiert. Untersuchungen hinsichtlich der kombinierten Gabe bakterieller und mykotischer Bestandteile zeigten, dass die Stimulation mit bakteriellem LPS die Expression von Dectin-1 in THP-1 Zellen und *peripheal blood monocytes* (PMBCs) verstärkt, wodurch ihre Aktivierbarkeit durch *C. albicans* stark heraufgesetzt wurde (Rogers et al. 2013). Auch im Therapiekonzept der Firma SANUM-Kehlbeck GmbH und Co. KG findet sich eine kombinierte Gabe von Bakterien- und Pilzpräparationen bei der Behandlung spezifischer Erkrankungen. Dieser positive Einfluss von LPS auf die Stimulation mit Pilzpräparaten konnte im Rahmen dieser Arbeit durch das verwendete Zellmodel jedoch nicht bestätigt werden. Die Vorstimulation mit LPS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von TNFα, IL-1α, IL-6 und IL-10 (s. Abb. 10). In Anbetracht der Tatsache, dass Mycotoxine einen negativen Einfluss auf die TLR-Agonist-induzierte Sek-

retion von inflammatorischen Zytokinen haben (Seeboth et al, 2012) und in den Ganzzellpräparationen, unabhängig von Toxinen, sowohl stimulierende als auch hemmende Komponenten enthalten sein können, erscheint eine Untersuchung der Einzelkomponenten hinsichtlich ihrer Wirkung zwingend erforderlich um abschließende Aussagen über ihre Wirkung treffen zu können.

5.3.2 Makrophagenpolarisation durch die Stimulation mit Bakterienpräparationen

Die differenzierten THP-1 Zellen zeigten als Antwort auf die Stimulation mit IFNγ und den untersuchten mikrobiellen Präparationen ein stark heterogenes Bild. Unter Berücksichtigung der Sekretion von TNFα, IL-1α und IL-10, sowie der mRNA-Expressionsniveaus können bezüglich der untersuchten Präparate hinsichtlich der Makrophagenpolarisation gemäß der Darstellung von Benoit *et al.* (s. Abb. 1) jedoch folgende Aussagen getroffen werden:

Die Präparationen *B. firmus (evemc), E. coli (extr.)* und *P. aeruginosa (extr.)* bewirkten in Kombination mit IFNγ eine Differenzierung der THP-1 Zellen hin zu M1 Makrophagen, da sie eine deutlich gesteigerte TNFα-Sekretion induzierten, die Sekretion von IL-1α und IL-10 aber nicht erhöht war. Die gesteigerte CD86 mRNA-Expression durch die Stimulation mit IFNγ und den drei genannten Präparationen unterstrich diese Aussage. *B. firmus (evemc), E. coli (extr.)* und *P. aeruginosa (extr.)* zeigten sich somit als die potentesten Aktivatoren des angeborenen Immunsystems, mit deren Hilfe vor allem pro-inflammatorische Prozesse in Gang gesetzt werden konnten.

In Kombination mit IFNγ bewirkte die Präparation *P. avidum (evemc)* eine Differenzierung in Richtung Makrophagensubpopulation M2b, da sowohl die Sekretion von TNFα, als auch IL-1α und IL-10 erhöht waren. Ebenfalls erhöht war die Expression der CD86 mRNA, was ebenfalls eine Differenzierung in M2b Makrophagen nahe legt. Auch die Präparation *B. subtilis (evemc)* kann als Stimulanz dieser Subpopulation angesehen werden, obwohl die gesteigerte Sekretion von IL-1α ausblieb.

Die Stimulation mit der Präparation *M. bovis (evemc)* führte eher zu einer Polarisation hin zu den Subpopulationen M2a oder M2c, da zwar die IL-1α und IL-10 Sekretion leicht erhöht war, eine gesteigerte Sekretion von TNFα, sowie die Expression von CD86 dagegen ausblieben. Aufgrund dieser Daten wirkt *M. bovis (evemc)* somit anti-inflammatorisch.

Bei den Pilzpräparationen lässt sich anhand der Datenlage noch keine zuverlässige Aussage bezüglich ihres Einflusses auf die Sekretion von TNFα, IL-1α oder IL-10 treffen. Die Pilzpräparationen scheinen jedoch im Allgemeinen einen eher Hemmenden Einfluss auf die TNFα-Sekretion zu haben, wie die Experimente mit dem Stimulationsprotokoll gezeigt haben (s. Abb. 10). Ferner wirkte sich die Pilzpräparation *C. parapsilosis coli (evc.)* leicht hemmend auf die Sekretion von IL-1α und IL-10 aus. Hinsichtlich einer Makrophagenpolarisation kann aufgrund der geringen Datenlage aber keine eindeutige Aussage getroffen werden.

5.3.3 Schlussfolgerung zum Einfluss von IFNγ und verschiedener Pilz- und Bakterienpräparationen auf die Makrophagenpolarisation in humanen THP-1 Zellen

Im Kontext der Makrophagenpolarisation konnte gezeigt werden, dass vor allem die untersuchten Bakterienpräparationen einen starken immunmodulierenden Effekt hatten. Dabei zeigten sich Unterschiede hinsichtlich verschiedener Stämme, aber auch der Aufarbeitungsmethode. Eine differenzierte Betrachtung vorhandener Einzelkomponenten und ihr Potential die Aktivität immunkompetenter Zellen in pro- oder anti-inflammatorische Richtung zu lenken, erscheint sinnvoll im Kontext zukünftiger *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen. So böte sich die Möglichkeit neue Präparat- oder Substanzkombinationen zu etablieren, mit deren Hilfe die Immunantwort noch gezielter in die vom Therapeuten gewünschte Richtung gelenkt und die Behandlung spezifischer Erkrankungen noch effektiver gestaltet werden könnte. Die guten Erfahrung bezüglich Wirksamkeit und Verträglichkeit der mikrobiellen Präparationen der Firma SANUM-Kehlbeck GmbH und Co. KG in Kombination mit den hier gemachten Ergebnissen bieten zudem die ideale Voraussetzung für die Konzeption klinischer Studien, in denen die Wirksamkeit der bereits bestehenden Präparationen, sowie neu etablierter Substanzkombinationen validiert und weitere Anwendungsgebiete identifiziert werden könnten.

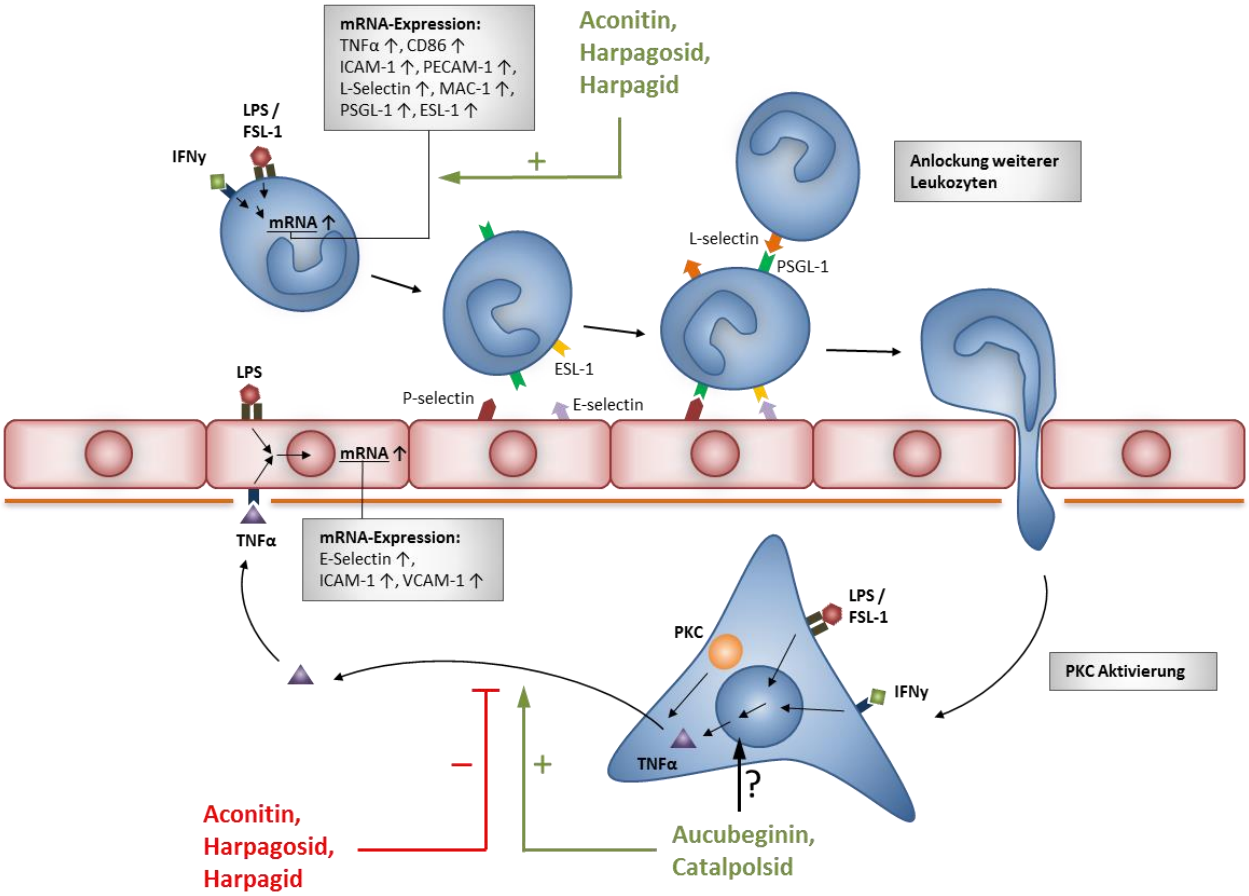


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Aktivierung zirkulierender Monozyten und gewebsständiger Makrophagen durch IFNγ, synthetischer TLR-Agonisten und pflanzlicher Naturstoffe.

6 Zusammenfassung

Monozyten und Makrophagen gehören zu den zellulären Bestandteilen des Immunsystems denen vielfältige Aufgaben bei der Eradikation eindringender Pathogene und der Aufrechterhaltung der Homöostase zukommen. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von IFNγ und verschiedener Toll-Like Rezeptor (TLR)-Agonisten auf die undifferenzierte und differenzierte Monozytenzelllinie THP-1 zu untersuchen. Des Weiteren wurde überprüft, ob und inwiefern pflanzliche Naturstoffe Einfluss auf eine derartig ausgelöste Entzündung im Kontext der TNFα-Sekretion und der mRNA-Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichten, dass die Stimulation mit IFNγ und TLR-Agonisten alleine sowie in Kombination zu einer starken Aktivierung spezifischer immunologischer Prozesse führte. In undifferenzierten THP-1 Zellen äußerte sich dies in einer frühen (3 h) Steigerung der mRNA-Expression von TNFα und ICAM-1 und einer späten (24 h) Aktivierung von PECAM-1, MAC-1, L-Selektin, ESL-1, PSGL-1 und CD86, sowie einer starken interzellulären Adhäsion. Für die gesteigerte Sekretion von TNFα und die beobachtete Hemmung der Lysozymaktivität bedurfte es jedoch der Aktivierung der Proteinkinase C durch den Phorbolester PMA. Die oben beschriebenen Effekte äußerten sich am stärksten bei der Kombination von IFNγ mit den synthetischen TLR-Agonisten LPS und FSL-1, sowie bestimmten bakteriellen Präparationen von *Bacillus subtilis, Bacillus firmus* und *Escherichia coli* und demonstrieren die Bedeutung von TLR-Agonisten bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems.

Traditionelle Heilpflanzen erfreuen sich zunehmender Beliebtheit, doch sind molekularbiologische Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung einzelner Bestandteile selten. β-glykosidisch gespaltenes Aucubin und Catalpol zeigten einen stimulatorischen Einfluss auf differenzierte, IFNγ/LPS-unbehandelte und -behandelte THP-1 Zellen. Die Iridoidglykoside Harpagosid und Harpagid sowie das Diterpen Aconitin führten hingegen zu einer Reduktion der TNFα-Sekretion auf zirka 50 %. Im Gegensatz dazu stimulierten sie die mRNA-Expression von TNFα, ICAM-1, L-Selektin, ESL-1, PSGL-1 und CD86 deutlich und wirkten einem zeitlich bedingten Abfall der Expression von TNFα und ICAM-1 entgegen, wodurch die Rolle pflanzlicher Naturstoffe als Immunmodulatoren, die immunkompetente Zellen zum Ort der Entzündung dirigieren, dort jedoch anti-inflammatorische Prozesse induzieren, verdeutlicht wurde.

Abstract

Monocytes and Macrophages are part of the cellular immune system and play a vital role in the eradication of foreign particles and the maintenance of homeostasis. Aim of this study was the investigation of the influence of IFNγ and different Toll-like receptor (TLR)-agonist on the undifferentiated and differentiated monocytic cell line THP-1. Furthermore it was addressed if and to what extend various natural products of plant origin had an effect on an induced infection in the context of TNFα-secretion and mRNA-expression of certain adhesion molecules.

The results of this work showed that the stimulation with IFNγ and TLR-agonists alone and in combination led to a strong activation of specific immunologic processes. In undifferentiated THP-1 cells this stimulation resulted in an early (3 h) increase of TNFα and ICAM-1 mRNA-expression and a late (24 h) activation of PECAM-1, MAC-1, L-Selectin, ESL-1, PSGL-1 and CD86, as well as a strong intercellular adhesion. Yet, for the increase of TNFα-secretion and the observed inhibition of lysozyme activity the stimulation of the protein kinase C with the phorbol ester PMA was required. The above mentioned effects showed to be the strongest in the combination of IFNγ with either the synthetic TLR-agonists LPS and FSL-1 as well as certain bacterial preparations of *Bacillus subtilis, Bacillus firmus* and *Escherichia coli* which demonstrates the importance of TLR-agonists on the activation of the innate immune system.

Traditional medicinal plants become more and more popular yet molecular insights into underlying mechanisms are scarce. β-glycosidically cleaved Aucubin and Catalpol exhibited a stimulatory impact on differentiated, IFNγ/LPS untreated and treated THP-1 cells. The iridoid glycosides Harpagoside and Harpagide as well as the diterpene Aconitin led to a reduction of TNFα-secretion down to 50 %. On the other hand they stimulated mRNA-expression of TNFα, ICAM-1, L-Selectin, ESL-1, PSGL-1 and CD86 and diminished the time related decrease of TNFα and ICAM-1 expression which demonstrates the importance of natural products as immune modulators that not only guide immune competent cells to sites of infection but also impair local pro-inflammatory stimuli.

7 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erweitern unsere Erkenntnisse über die Rolle von IFNγ und verschiedener TLR-Agonisten im Kontext des angeborenen Immunsystems. Ihr antagonistischer Einfluss auf die TNFα-Sekretion und die Lysozymaktivität wirft jedoch weitere Fragen auf. Die Vermutung, dass die Hemmung der Lysozymaktivität maßgeblich über SOCS-Proteine gesteuert wird, könnte über eine plasmidinduzierte Überexpression von beispielsweise SOCS1 überprüft werden. Aber auch ein si-RNA induzierter *knock-down* von IRF3 oder -7 könnte Auskunft darüber geben, ob die TNFα-Sekretion über die MYD88-unabhängige TLR-Signalkaskade trotz inhibitorischer Rückkopplungsmechanismen aufrechterhalten werden kann.

Im Kontext der untersuchten pflanzlichen Naturstoffe konnte ihr Einfluss auf die TNFα-Sekretion und die mRNA-Expression gezeigt werden, jedoch stellen sich viele Fragen hinsichtlich der zugrunde liegenden Mechanismen. Aufgrund ihres positiven Effekts auf die mRNA-Expression liegt die Vermutung nahe, dass die Wirkstoffe Aconitin, Harpagosid und Harpagid über eine Bindung an den IFNγ-Rezeptors oder spezifischer TLRs diese Aktivieren und darüber ihre Wirkung ausüben. Ferner wäre jedoch auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, beispielsweise über eine Inaktivierung der IκB-Proteine oder eine Steigerung der DNA-Bindungsaffinität von NF-κB Dimeren, denkbar. Die Tatsache, dass die pflanzlichen Naturstoffe primär in PMA-aktivierten THP-1 Zellen die TNFα-Sekretion inhibieren, lässt vermuten, dass eine Beeinflussung der PKC beziehungsweise PKC-assoziierter Faktoren für den beobachteten Effekt verantwortlich sind. Untersuchungen in diese Richtung sollten sich anschließen.

Literaturverzeichnis

Abdel-Raheem, I. T., I. Hide, Y. Yanase, Y. Shigemoto-Mogami, N. Sakai, Y. Shirai, N. Saito, F. M. Hamada, N. A. El-Mahdy, A. l.-D. Elsisy, S. S. Sokar and Y. Nakata (2005). "Protein kinase C-alpha mediates TNF release process in RBL-2H3 mast cells." Br J Pharmacol **145**(4): 415-423.

Ammon, C., K. Mondal, R. Andreesen and S. W. Krause (2000). "Differential expression of the transcription factor NF-kappaB during human mononuclear phagocyte differentiation to macrophages and dendritic cells." Biochem Biophys Res Commun **268**(1): 99-105.

An, S. J., H. O. Pae, G. S. Oh, B. M. Choi, S. Jeong, S. I. Jang, H. Oh, T. O. Kwon, C. E. Song and H. T. Chung (2002). "Inhibition of TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 productions and NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from Catalpa ovata G. Don (Bignoniaceae)." Int Immunopharmacol **2**(8): 1173-1181.

Banyer, J. L., N. H. Hamilton, I. A. Ramshaw and A. J. Ramsay (2000). "Cytokines in innate and adaptive immunity." Rev Immunogenet **2**(3): 359-373.

Benoit, M., B. Desnues and J. L. Mege (2008). "Macrophage polarization in bacterial infections." J Immunol **181**(6): 3733-3739.

Bernot, D., F. Peiretti, M. Canault, I. Juhan-Vague and G. Nalbone (2005). "Upregulation of TNF-alpha-induced ICAM-1 surface expression by adenylate cyclase-dependent pathway in human endothelial cells." J Cell Physiol **202**(2): 434-441.

Beyaert, R., L. Beaugerie, G. Van Assche, L. Brochez, J. C. Renauld, M. Viguier, V. Cocquyt, G. Jerusalem, J. P. Machiels, H. Prenen, P. Masson, E. Louis and F. De Keyser (2013). "Cancer risk in immune-mediated inflammatory diseases (IMID)." Mol Cancer **12**(1): 98.

Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-733.

Bottero, V., S. Withoff and I. M. Verma (2006). "NF-kappaB and the regulation of hematopoiesis." Cell Death Differ **13**(5): 785-797.

Bradley, J. R. (2008). "TNF-mediated inflammatory disease." J Pathol **214**(2): 149-160.

Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol **6**(1): 33-43.

Büechi, S.; Wegener, T. (2002): „Harpagophyti radix (Teufelskrallenwurzel): Pharmakologische, toxikologische und klinische Aspekte“. Zeitschrift für Phytotherapie Nr. 4: pp. 28-33

Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore and B. Williamson (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.

Chan, T. Y. (2009). "Aconite poisoning." Clin Toxicol (Phila) **47**(4): 279-285.

Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S3-23.

Chen, Q. and A. C. Ross (2004). "Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells." Exp Cell Res **297**(1): 68-81.

Chesnutt, B. C., D. F. Smith, N. A. Raffler, M. L. Smith, E. J. White and K. Ley (2006). "Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin." Microcirculation **13**(2): 99-109.

Chrubasik, S., S. Pollak and A. Black (2002). "Effectiveness of devil's claw for osteoarthritis." Rheumatology (Oxford) **41**(11): 1332-1333; author reply 1333.

da Costa Martins, P., J. J. García-Vallejo, J. V. van Thienen, M. Fernandez-Borja, J. M. van Gils, C. Beckers, A. J. Horrevoets, P. L. Hordijk and J. J. Zwaginga (2007). "P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(5): 1023-1029.

Daigneault, M., J. A. Preston, H. M. Marriott, M. K. Whyte and D. H. Dockrell (2010). "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages." PLoS One **5**(1): e8668.

de Mejia, E. G., M. V. Ramirez-Mares and S. Puangpraphant (2009). "Bioactive components of tea: cancer, inflammation and behavior." Brain Behav Immun **23**(6): 721-731.

DeKoter, R. P. and H. Singh (2000). "Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1." Science **288**(5470): 1439-1441.

Donath, M. Y. and S. E. Shoelson (2011). "Type 2 diabetes as an inflammatory disease." Nat Rev Immunol **11**(2): 98-107.

Dunne, J. L., C. M. Ballantyne, A. L. Beaudet and K. Ley (2002). "Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1." Blood **99**(1): 336-341.

Eichler, O., Koch, C. (1970). Über die antiphlogistische, analgetische und spasmolytische Wirksamkeit von Harpagosid, Einem Glykosid aus der Wurzel von Harpagophytum procumbens DC. Arzneimittel-Forsch 20, 107–109.

El-Naggar, L. J. and J. L. Beal (1980). "Iridoids. A review." J Nat Prod **43**(6): 649-707.

Epriliati and Ginjom (2012): Indah Epriliati and Irine R. Ginjom (2012). Bioavailability of Phytochemicals, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0,

Eriksson, E. E., X. Xie, J. Werr, P. Thoren and L. Lindbom (2001). "Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo." J Exp Med **194**(2): 205-218.

Faust, N., C. Bonifer and A. E. Sippel (1999). "Differential activity of the -2.7 kb chicken lysozyme enhancer in macrophages of different ontogenic origins is regulated by C/EBP and PU.1 transcription factors." DNA Cell Biol **18**(8): 631-642.

Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, B. J. Kullberg, M. G. Netea and G. J. Adema (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." Cell Microbiol **10**(10): 2058-2066.

Fiebich, B. L., M. Heinrich, K. O. Hiller and N. Kammerer (2001). "Inhibition of TNF-alpha synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by Harpagophytum extract SteiHap 69." Phytomedicine **8**(1): 28-30.

Fiebich, B. L., E. Muñoz, T. Rose, G. Weiss and G. P. McGregor (2012). "Molecular targets of the antiinflammatory Harpagophytum procumbens (devil's claw): inhibition of TNFα and COX-2 gene expression by preventing activation of AP-1." Phytother Res **26**(6): 806-811.

Fleming, A. (1922). "On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions." Proc. R. Soc. Lond. B **93**: 306-317.

Forman, H. J. and M. Torres (2001). "Redox signaling in macrophages." Mol Aspects Med **22**(4-5): 189-216.

Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira and D. M. Underhill (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." J Exp Med **197**(9): 1107-1117.

Gay, N. J., M. F. Symmons, M. Gangloff and C. E. Bryant (2014). "Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes." Nat Rev Immunol **14**(8): 546-558.

Georgiev, M. I., N. Ivanovska, K. Alipieva, P. Dimitrova and R. Verpoorte (2013). "Harpagoside: from Kalahari Desert to pharmacy shelf." Phytochemistry **92**: 8-15.

Ginhoux, F. and S. Jung (2014). "Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis." Nat Rev Immunol **14**(6): 392-404.

Goethe, R. and L. Phi-van (1997). "Evidence for an enhanced transcription-dependent de novo synthesis of C/EBPbeta in the LPS activation of the chicken lysozyme gene." J Leukoc Biol **61**(3): 367-374.

Goethe, R. and L. Phi-van (1998). "Posttranscriptional lipopolysaccharide regulation of the lysozyme gene at processing of the primary transcript in myelomonocytic HD11 cells." J Immunol **160**(10): 4970-4978.

Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.

Gordon, S., J. Todd and Z. A. Cohn (1974). "In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes." J Exp Med **139**(5): 1228-1248.

Greenberger, J. S., P. E. Newburger and M. Sakakeeny (1980). "Phorbol myristate acetate stimulates macrophage differentiation and replication and alters granulopoiesis and leukemogenesis in long-term bone marrow cultures." Blood **56**(3): 368-379.

Helal, R., G. Bader and M. F. Melzig (2012). "Stimulation of lysozyme release by selected microbial preparations." Pharmazie **67**(6): 564-566.

Hu, X., S. D. Chakravarty and L. B. Ivashkiv (2008). "Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms." Immunol Rev **226**: 41-56.

Huang, H., G. R. Ostroff, C. K. Lee, J. P. Wang, C. A. Specht and S. M. Levitz (2009). "Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and toll-like receptor agonists." Infect Immun **77**(5): 1774-1781.

Huang, T. H., V. H. Tran, R. K. Duke, S. Tan, S. Chrubasik, B. D. Roufogalis and C. C. Duke (2006). "Harpagoside suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF-kappa B activation." J Ethnopharmacol **104**(1-2): 149-155.

Hudson, J. B. (2012). "Applications of the phytomedicine Echinacea purpurea (Purple Coneflower) in infectious diseases." J Biomed Biotechnol **2012**: 769896.

Imhof, B. A. and M. Aurrand-Lions (2004). "Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes." Nat Rev Immunol **4**(6): 432-444.

Inoue, M., A. Kishimoto, Y. Takai and Y. Nishizuka (1977). "Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain." J Biol Chem **252**(21): 7610-7616.

Isakov, N. and A. Altman (2013). "Regulation of immune system cell functions by protein kinase C." Front Immunol **4**: 384.

Jersmann, H. P., C. S. Hii, J. V. Ferrante and A. Ferrante (2001). "Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways." Infect Immun **69**(3): 1273-1279.

Jones, D. S., S. H. Podolsky and J. A. Greene (2012). "The burden of disease and the changing task of medicine." N Engl J Med **366**(25): 2333-2338.

Kadono, T., G. M. Venturi, D. A. Steeber and T. F. Tedder (2002). "Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions." J Immunol **169**(8): 4542-4550.

Kansas, G. S. (1996). "Selectins and their ligands: current concepts and controversies." Blood **88**(9): 3259-3287.

Karunakaran, D., M. Kockx, D. M. Owen, J. R. Burnett, W. Jessup and L. Kritharides (2013). "Protein kinase C controls vesicular transport and secretion of apolipoprotein E from primary human macrophages." J Biol Chem **288**(7): 5186-5197.

Kaszkin, M., K. F. Beck, E. Koch, C. Erdelmeier, S. Kusch, J. Pfeilschifter and D. Loew (2004). "Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of Harpagophytum procumbens derives from harpagoside-dependent and independent effects." Phytomedicine **11**(7-8): 585-595.

Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-384.

Kikkawa, U. and Y. Nishizuka (1986). "The role of protein kinase C in transmembrane signalling." Annu Rev Cell Biol **2**: 149-178.

Kirby, A. J. (2001). "The lysozyme mechanism sorted -- after 50 years." Nat Struct Biol **8**(9): 737-739.

Kishimoto, A., Y. Takai, T. Mori, U. Kikkawa and Y. Nishizuka (1980). "Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover." J Biol Chem **255**(6): 2273-2276.

Klockars, M. and S. Reitamo (1975). "Tissue distribution of lysozyme in man." J Histochem Cytochem **23**(12): 932-940.

Kolb-Mäurer, A., U. Kämmerer, M. Mäurer, I. Gentschev, E. B. Bröcker, P. Rieckmann and E. Kämpgen (2003). "Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by Listeria monocytogenes." FEMS Immunol Med Microbiol **35**(3): 255-262.

Lefevre, P., J. Kontaraki and C. Bonifer (2001). "Identification of factors mediating the developmental regulation of the early acting -3.9 kb chicken lysozyme enhancer element." Nucleic Acids Res **29**(22): 4551-4560.

Lefevre, P., S. Melnik, N. Wilson, A. D. Riggs and C. Bonifer (2003). "Developmentally regulated recruitment of transcription factors and chromatin modification activities to chicken lysozyme cis-regulatory elements in vivo." Mol Cell Biol **23**(12): 4386-4400.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-689.

Li, H. and X. Lin (2008). "Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation." Cytokine **41**(1): 1-8.

Libby, P. (2006). "Inflammation and cardiovascular disease mechanisms." Am J Clin Nutr **83**(2): 456S-460S.

Liu, H., P. Sidiropoulos, G. Song, L. J. Pagliari, M. J. Birrer, B. Stein, J. Anrather and R. M. Pope (2000). "TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta." J Immunol **164**(8): 4277-4285.

Lorsbach, R. B., W. J. Murphy, C. J. Lowenstein, S. H. Snyder and S. W. Russell (1993). "Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide." J Biol Chem **268**(3): 1908-1913.

Lu, Y. C., I. Kim, E. Lye, F. Shen, N. Suzuki, S. Suzuki, S. Gerondakis, S. Akira, S. L. Gaffen, W. C. Yeh and P. S. Ohashi (2009). "Differential role for c-Rel and C/EBPbeta/delta in TLR-mediated induction of proinflammatory cytokines." J Immunol **182**(11): 7212-7221.

Lux, Johann Joseph W (1833). Die Isopathik der Contagionen oder: alle ansteckenden Krankheiten tragen in ihrem eigenen Ansteckungsstoffe das Mittel zu ihrer Heilung. Den Coriphäen der Homöopathik zur strengen Prüfung vorgelegt. Christian Ernst Kollmann Verlag, Leipzig 1833.

Madonna, S., C. Scarponi, R. Sestito, S. Pallotta, A. Cavani and C. Albanesi (2010). "The IFN-gamma-dependent suppressor of cytokine signaling 1 promoter activity is positively regulated by IFN regulatory factor-1 and Sp1 but repressed by growth factor independence-1b and Krüppel-like factor-4, and it is dysregulated in psoriatic keratinocytes." J Immunol **185**(4): 2467-2481.

Mahomed, I. M. and J. A. Ojewole (2004). "Analgesic, antiinflammatory and antidiabetic properties of Harpagophytum procumbens DC (Pedaliaceae) secondary root aqueous extract." Phytother Res **18**(12): 982-989.

Margulis L 1970. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, CT

Mark, K. S., W. J. Trickler and D. W. Miller (2001). "Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells." J Pharmacol Exp Ther **297**(3): 1051-1058.

Marsik, C., F. Mayr, F. Cardona, G. Schaller, O. F. Wagner and B. Jilma (2004). "Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans." J Clin Immunol **24**(1): 62-65.

Martinez, F. O., S. Gordon, M. Locati and A. Mantovani (2006). "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression." J Immunol **177**(10): 7303-7311.

Martinez, M., M. Joffraud, S. Giraud, B. Baïsse, M. P. Bernimoulin, M. Schapira and O. Spertini (2005). "Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and -VII." J Biol Chem **280**(7): 5378-5390.

Mathieson, W., S. Kirkland, R. Leonard and G. A. Thomas (2011). "Antimicrobials and in vitro systems: antibiotics and antimycotics alter the proteome of MCF-7 cells in culture." J Cell Biochem **112**(8): 2170-2178.

McEver, R. P. and R. D. Cummings (1997). "Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S97-103.

Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-2738.

Mncwangi, N., W. Chen, I. Vermaak, A. M. Viljoen and N. Gericke (2012). "Devil's Claw-a review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of Harpagophytum procumbens." J Ethnopharmacol **143**(3): 755-771.

Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." Clin Microbiol Rev **22**(2): 240-273, Table of Contents.

Mohan, M. J., T. Seaton, J. Mitchell, A. Howe, K. Blackburn, W. Burkhart, M. Moyer, I. Patel, G. M. Waitt, J. D. Becherer, M. L. Moss and M. E. Milla (2002). "The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity." Biochemistry **41**(30): 9462-9469.

Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-212.

Moynagh, P. N. (2005). "TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway." Trends Immunol **26**(9): 469-476.

Murdaca, G., B. M. Colombo and F. Puppo (2009). "Anti-TNF-alpha inhibitors: a new therapeutic approach for inflammatory immune-mediated diseases: an update upon efficacy and adverse events." Int J Immunopathol Pharmacol **22**(3): 557-565.

Nakamura, K. (2011). "Central circuitries for body temperature regulation and fever." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **301**(5): R1207-1228.

Newton, K. and V. M. Dixit (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(3).

Nhu, Q. M., N. Cuesta and S. N. Vogel (2006). "Transcriptional regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced Toll-like receptor (TLR) expression in murine macrophages: role of interferon regulatory factors 1 (IRF-1) and 2 (IRF-2)." J Endotoxin Res **12**(5): 285-295.

Niero, E. L. and G. M. Machado-Santelli (2013). "Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells." J Exp Clin Cancer Res **32**: 31.

Pagliari, L. J., H. Perlman, H. Liu and R. M. Pope (2000). "Macrophages require constitutive NF-kappaB activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis." Mol Cell Biol **20**(23): 8855-8865.

Paracelsus (1538). Die dritte Defension wegen des Schreibens der neuen Rezepte. In: Septem Defensiones 1538. Werke Bd. 2, Darmstadt 1965, S. 510.

Park, E. K., H. S. Jung, H. I. Yang, M. C. Yoo, C. Kim and K. S. Kim (2007). "Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli." Inflamm Res **56**(1): 45-50.

Park, K. S. and I. M. Chang (2004). "Anti-inflammatory activity of aucubin by inhibition of tumor necrosis factor-alpha production in RAW 264.7 cells." Planta Med **70**(8): 778-779.

Park, K. S., B. H. Kim and I. M. Chang (2010). "Inhibitory Potencies of Several Iridoids on Cyclooxygenase-1, Cyclooxygnase-2 Enzymes Activities, Tumor Necrosis factor-α and Nitric Oxide Production In Vitro." Evid Based Complement Alternat Med **7**(1): 41-45.

Parr, M. B. and E. L. Parr (2000). "Interferon-gamma up-regulates intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 and recruits lymphocytes into the vagina of immune mice challenged with herpes simplex virus-2." Immunology **99**(4): 540-545.

Pennington, K. N., J. A. Taylor, G. D. Bren and C. V. Paya (2001). "IkappaB kinase-dependent chronic activation of NF-kappaB is necessary for p21(WAF1/Cip1) inhibition of differentiation-induced apoptosis of monocytes." Mol Cell Biol **21**(6): 1930-1941.

Petrovska, B. B. (2012). "Historical review of medicinal plants' usage." Pharmacogn Rev **6**(11): 1-5.

Phi van, L. (1996). "Transcriptional activation of the chicken lysozyme gene by NF-kappa Bp65 (RelA) and c-Rel, but not by NF-kappa Bp50." Biochem J **313 (Pt 1)**: 39-44.

Piwowarski, J. P., S. Granica, M. Zwierzyńska, J. Stefańska, P. Schopohl, M. F. Melzig and A. K. Kiss (2014). "Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials." J Ethnopharmacol **155**(1): 801-809.

Pope, R., S. Mungre, H. Liu and B. Thimmapaya (2000). "Regulation of TNF-alpha expression in normal macrophages: the role of C/EBPbeta." Cytokine **12**(8): 1171-1181.

Pradines-Figueres, A. and C. R. Raetz (1992). "Processing and secretion of tumor necrosis factor alpha in endotoxin-treated Mono Mac 6 cells are dependent on phorbol myristate acetate." J Biol Chem **267**(32): 23261-23268.

Rätsch C (2007). Lexikon der Psychoaktiven Pflanzen. AT Verlag. 12. Auflage. ISBN-13: 978-3038003526

Regenhard, P., R. Goethe and L. Phi-van (2001). "Involvement of PKA, PKC, and Ca2+ in LPS-activated expression of the chicken lysozyme gene." J Leukoc Biol **69**(4): 651-658.

Rogers, H., D. W. Williams, G. J. Feng, M. A. Lewis and X. Q. Wei (2013). "Role of bacterial lipopolysaccharide in enhancing host immune response to Candida albicans." Clin Dev Immunol **2013**: 320168.

Rosenbauer, F. and D. G. Tenen (2007). "Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation." Nat Rev Immunol **7**(2): 105-117.

Salas, A., M. Shimaoka, A. N. Kogan, C. Harwood, U. H. von Andrian and T. A. Springer (2004). "Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction." Immunity **20**(4): 393-406.

Sarma, J. V. and P. A. Ward (2011). "The complement system." Cell Tissue Res **343**(1): 227-235.

Scheinfeld, N. (2004). "A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab." J Dermatolog Treat **15**(5): 280-294.

Schimper F W, (1883): Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. Botanische Zeitung. **41**, 1883, Sp. 105–120, 126–131 und 137–160.

Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-189.

Schwende, H., E. Fitzke, P. Ambs and P. Dieter (1996). "Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3." J Leukoc Biol **59**(4): 555-561.

Scott, D. B., T. A. Blanpied and M. D. Ehlers (2003). "Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors." Neuropharmacology **45**(6): 755-767.

Scott, L. M., C. I. Civin, P. Rorth and A. D. Friedman (1992). "A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells." Blood **80**(7): 1725-1735.

Serafini, M., I. Peluso and A. Raguzzini (2010). "Flavonoids as anti-inflammatory agents." Proc Nutr Soc **69**(3): 273-278.

Singhuber, J., M. Zhu, S. Prinz and B. Kopp (2009). "Aconitum in traditional Chinese medicine: a valuable drug or an unpredictable risk?" J Ethnopharmacol **126**(1): 18-30.

Slater, S. J., M. B. Kelly, F. J. Taddeo, E. Rubin and C. D. Stubbs (1994). "Evidence for discrete diacylglycerol and phorbol ester activator sites on protein kinase C. Differences in effects of 1-alkanol inhibition, activation by phosphatidylethanolamine and calcium chelation." J Biol Chem **269**(25): 17160-17165.

Strebovsky, J., P. Walker, R. Lang and A. H. Dalpke (2011). "Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus." FASEB J **25**(3): 863-874.

Suh, N. J., C. K. Shim, M. H. Lee, S. K. Kim and I. M. Chang (1991). "Pharmacokinetic study of an iridoid glucoside: aucubin." Pharm Res **8**(8): 1059-1063.

Sun, J. and E. B. Chang (2014). "Exploring gut microbes in human health and disease: Pushing the envelope." Genes Dis **1**(2): 132-139.

Sun, Z. and R. Andersson (2002). "NF-kappaB activation and inhibition: a review." Shock **18**(2): 99-106.

Sweet, M. J., K. J. Stacey, D. K. Kakuda, D. Markovich and D. A. Hume (1998). "IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA." J Interferon Cytokine Res **18**(4): 263-271.

Takashiba, S., T. E. Van Dyke, S. Amar, Y. Murayama, A. W. Soskolne and L. Shapira (1999). "Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide

stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB." Infect Immun **67**(11): 5573-5578.

Taylor, P. R., S. V. Tsoni, J. A. Willment, K. M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon and G. D. Brown (2007). "Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection." Nat Immunol **8**(1): 31-38.

Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno and K. Tada (1982). "Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester." Cancer Res **42**(4): 1530-1536.

Valledor, A. F., F. E. Borràs, M. Cullell-Young and A. Celada (1998). "Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation." J Leukoc Biol **63**(4): 405-417.

Viljoen, A., N. Mncwangi and I. Vermaak (2012). "Anti-inflammatory iridoids of botanical origin." Curr Med Chem **19**(14): 2104-2127.

Villamón, E., D. Gozalbo, P. Roig, J. E. O'Connor, D. Fradelizi and M. L. Gil (2004). "Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against Candida albicans infections." Microbes Infect **6**(1): 1-7.

Voulgari, P. V. (2010). "Golimumab: a new anti-TNF-alpha agent for rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis." Expert Rev Clin Immunol **6**(5): 721-733.

Wang, X., S. A. Michie, B. Xu and Y. Suzuki (2007). "Importance of IFN-gamma-mediated expression of endothelial VCAM-1 on recruitment of CD8+ T cells into the brain during chronic infection with Toxoplasma gondii." J Interferon Cytokine Res **27**(4): 329-338.

Wegener T (2000): Devil's Claw: From African Traditional Remedy to Modern Analgesic and Anti-inflammatory. HerbalGram. 2000; 50:47-54 American Botanical Council

Wegener, T. and N. P. Lüpke (2003). "Treatment of patients with arthrosis of hip or knee with an aqueous extract of devil's claw (Harpagophytum procumbens DC.)." Phytother Res **17**(10): 1165-1172.

Williams, J. G., G. J. Jurkovich, G. B. Hahnel and R. V. Maier (1992). "Macrophage priming by interferon gamma: a selective process with potentially harmful effects." J Leukoc Biol **52**(6): 579-584.

Xiao, B., B. Coste, J. Mathur and A. Patapoutian (2011). "Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca^2+ influx and modulates gene expression." Nat Chem Biol **7**(6): 351-358.

Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer and S. Jung (2013). "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis." Immunity **38**(1): 79-91.

Zhang, C., S. H. Wang, M. E. Lasbury, D. Tschang, C. P. Liao, P. J. Durant and C. H. Lee (2006). "Toll-like receptor 2 mediates alveolar macrophage response to Pneumocystis murina." Infect Immun **74**(3): 1857-1864.

Zhang, F., W. Yu, J. L. Hargrove, P. Greenspan, R. G. Dean, E. W. Taylor and D. K. Hartle (2002). "Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium." Atherosclerosis **161**(2): 381-386.

Zhou, Y. H., X. M. Piao, X. Liu, H. H. Liang, L. M. Wang, X. H. Xiong, L. Wang, Y. J. Lu and H. L. Shan (2013). "Arrhythmogenesis toxicity of aconitine is related to intracellular ca(2+) signals." Int J Med Sci **10**(9): 1242-1249.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Makrophagenpolarisation nach Benoit et al. 2008	S. 10
Abb. 2:	Strukturformeln der untersuchten pflanzlichen Naturstoffe	S. 18
Abb. 3:	Für die zellbiologischen Arbeiten verwendeten Stimulationsprotokolle	S. 32
Abb. 4:	Änderungen im Phänotyp und der TNFα-Sekretion nach Stimulation mit PMA	S. 38
Abb. 5:	Einfluss von PMA, IFNγ und LPS auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in THP-1 Zellen	S. 39
Abb. 6:	Einfluss von IFNγ und synthetischer TLR-Agonisten auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen	S. 42
Abb. 7:	Einfluss verschiedener Pilzpräparationen auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen	S. 45
Abb. 8:	Einfluss verschiedener Bakterienpräparationen auf die TNFα-Sekretion und Lysozymaktivität in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen	S. 46
Abb. 9:	Einfluss von IFNγ und verschiedener mikrobieller Präparationen auf die Sekretion von IL-1α und IL-10	S. 48
Abb. 10:	Einfluss von LPS auf die Aktivierbarkeit undifferenzierter und differenzierter THP-1 Zellen durch Pilzpräparationen	S. 50
Abb. 11:	Hydrolyse der Iridoidglykoside Aucubin, Catalpol und Harpagosid	S. 53
Abb. 12:	XTT-Zellviabilitätstest	S. 55 f.
Abb. 13:	Einfluss von Aucubin und Catalpol auf die TNFα-Sekretion in differenzierten THP-1 Zellen	S. 58
Abb. 14:	Einfluss von Harpagosid und Harpagid auf die TNFα-Sekretion in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen	S. 60
Abb. 15:	Einfluss von Aconitin und Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid auf die TNFα-Sekretion in undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen	S. 62
Abb. 16:	Morphologische Änderungen nach Stimulation mit IFNγ und den verschiedenen synthetischen TLR-Agonisten	S. 65
Abb. 17:	Einfluss von IFNγ und LPS auf die mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen	S. 66

Abb. 18: Einfluss von IFNγ und FSL-1 auf die mRNA-Expression in undifferenzierten THP-1 Zellen S. 67
Abb. 19: Aggregation von THP-1 Zellen nach Stimulation mit IFNγ und verschiedenen mikrobiellen Präparationen S. 69
Abb. 20: Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Bakterienpräparaten in undifferenzierten THP-1 Zellen S. 71
Abb. 21: Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit Pilzpräparaten in undifferenzierten THP-1 Zellen S. 72
Abb. 22: mRNA-Expressionskinetik nach Stimulation IFNγ und LPS in undifferenzierten THP-1 Zellen S. 74
Abb. 23: Einfluss von Aconitin auf die mRNA-Expression nach 3 h / 48 h Stimulation S. 78 f.
Abb. 24: Einfluss von Harpagosid auf die mRNA-Expression nach 3 h / 48 h Stimulation S. 80 f.
Abb. 25: Einfluss von Harpagid auf die mRNA-Expression nach 3 h / 48 h Stimulation S. 82 f.
Abb. 26: Schematische Darstellung der Aktivierung zirkulierender Monozyten und gewebsständiger Makrophagen durch IFNγ, synthetischer TLR-Agonisten und pflanzlicher Naturstoffe S. 105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete synthetische Toll-Like Rezeptoren S. 25
Tabelle 2: Verwendete mikrobielle Präparationen S. 26 f.
Tabelle 3: Verwendete pflanzliche Naturstoffe S. 28
Tabelle 4: Primer für die quantitative PCR S. 28 f.

Publikationsverzeichnis

Fachzeitschriften

Piwowarski, J. P., S. Granica, M. Zwierzyńska, J. Stefańska, P. Schopohl, M. F. Melzig and A. K. Kiss (2014). "Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials." J Ethnopharmacol **155**(1): 801-809.

Schopohl, P.; Melzig, M. F. The influence of toll-like receptor (TLR-) agonists on lysozyme activity, TNF-alpha secretion and intercellular adhesion in THP-1 cells. Pharmazie, v. 69, n. 8, p. 602-9, Aug 2014. ISSN 0031-7144.

Poster

Schopohl, P.; Melzig, M. F.. The influence of TLR-agonists, diterpenes and alkylamides on undifferentiated and PMA-differentiated THP-1 cells. 61th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Münster, Germany, September 1st – 4th 2013

Schopohl, P.; Melzig, M. F. The influence of the Iridoids Aucubin, Catalpol and Harpagosid as well as their metabolites on innate immune function. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Guimaraes, Portugal, August 31st – September 4th 2014

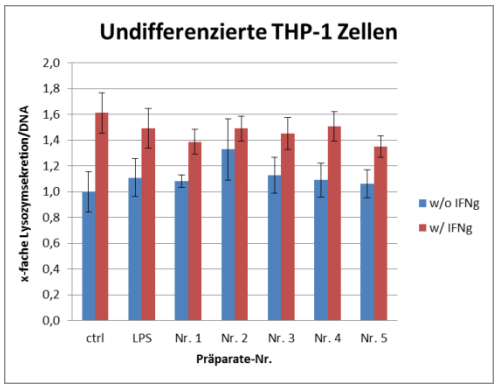
Minisymposia

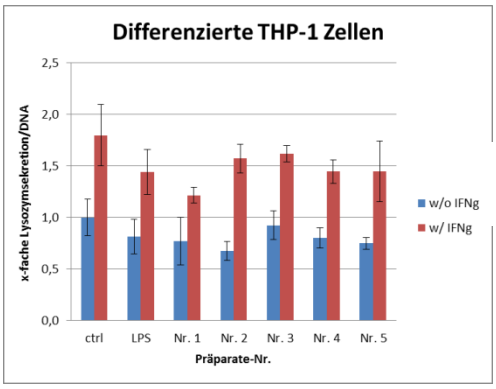
Schopohl, P. Investigation of the influence of natural compounds on the innate immune system. Dahlem Centre of Plant Sciences, Open House Short Lectures, Berlin, Germany, January 29th 2014

Schopohl, P. Influence of natural products of plant origin on TNFα-secretion in human THP-1 cells, Minisymposium for International Scientific Exchange, Berlin, Germany, March 7th 2015

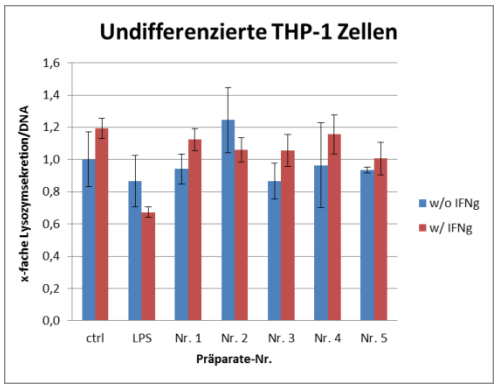
Anhang

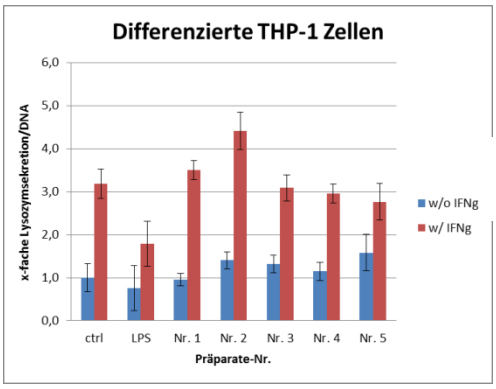
Lysozym:





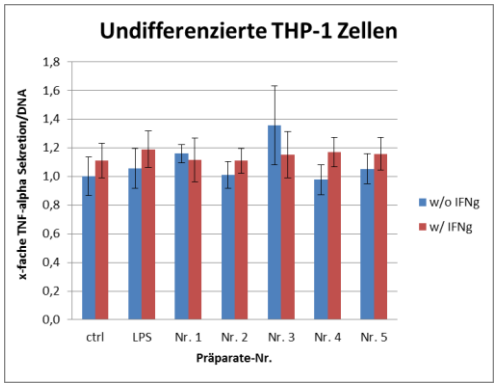
Exp. A

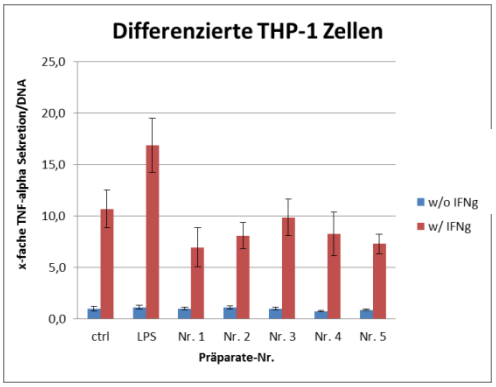




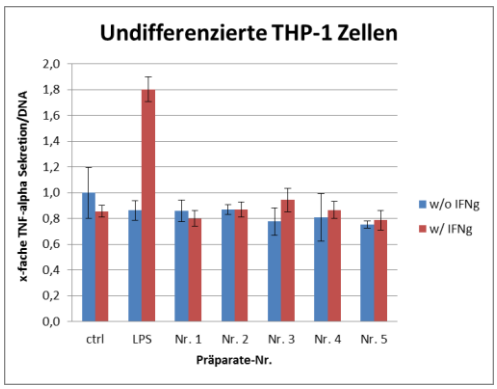
Exp. B

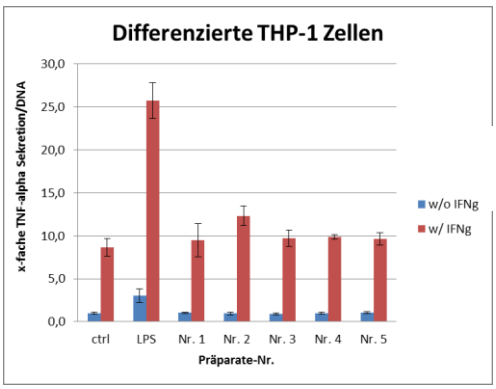
TNF-alpha:





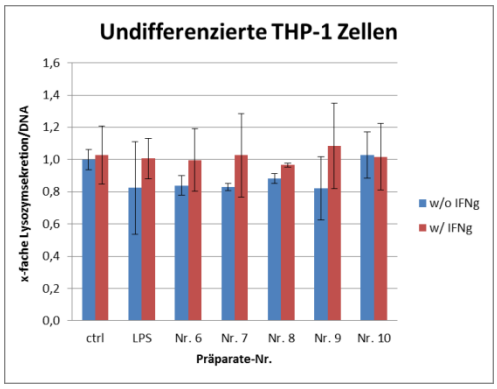
Exp. A

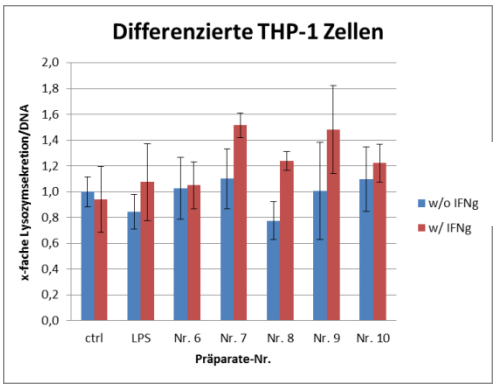




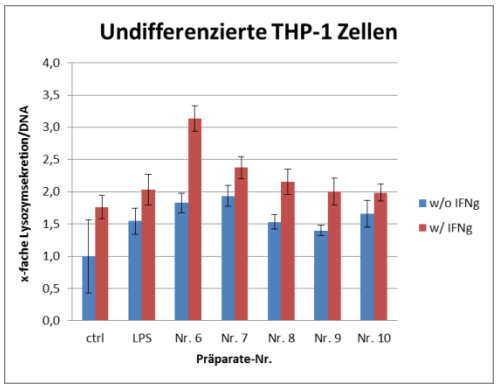
Exp. B

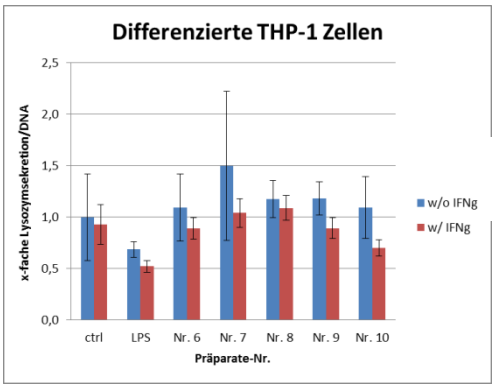
Lysozym:





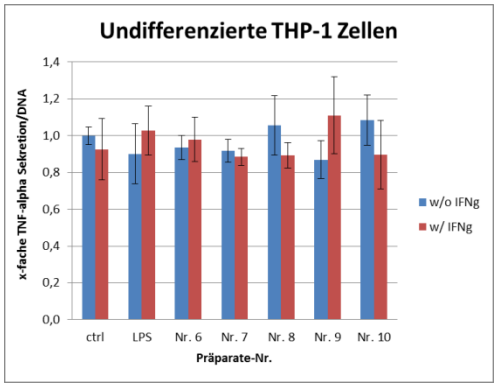
Exp. A

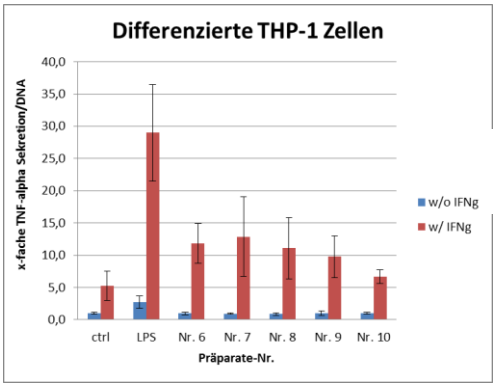




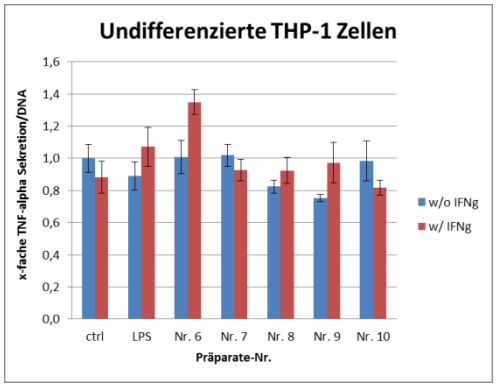
Exp. B

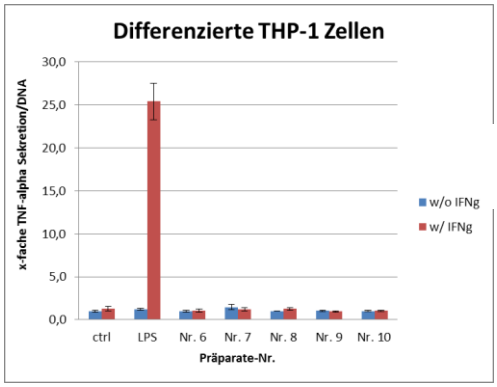
TNF-alpha:





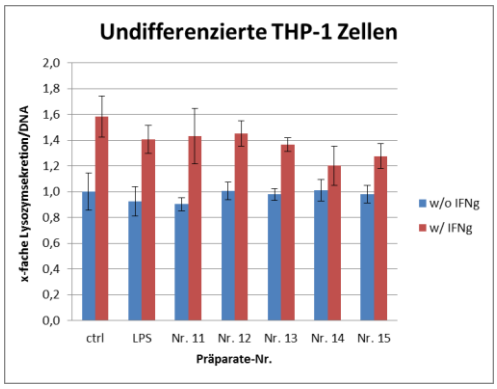
Exp. A

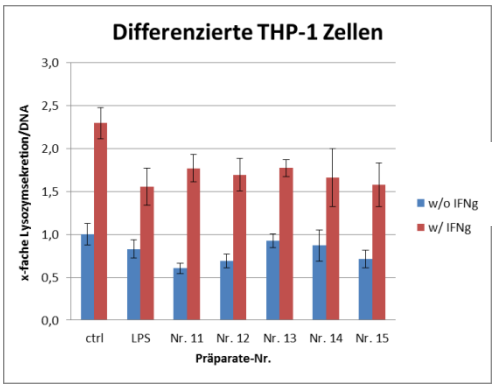




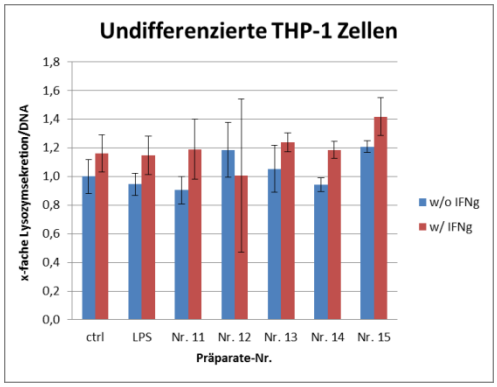
Exp. B

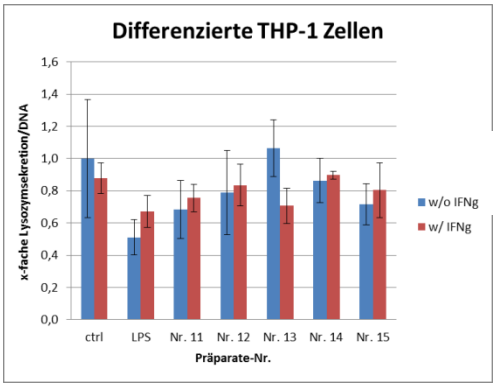
Lysozym:





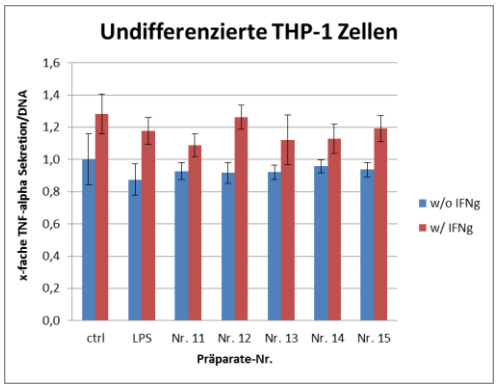
Exp. A

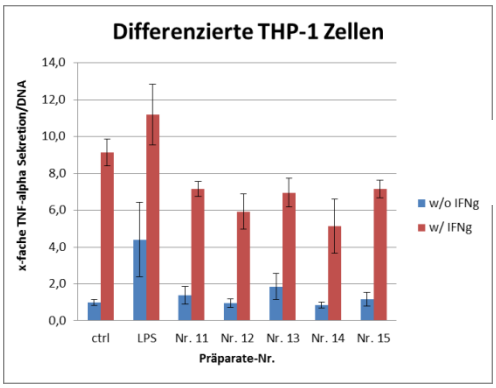




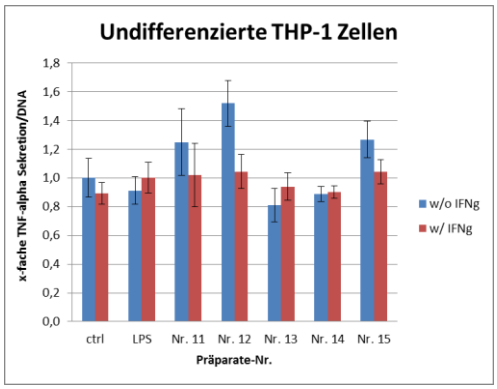
Exp. B

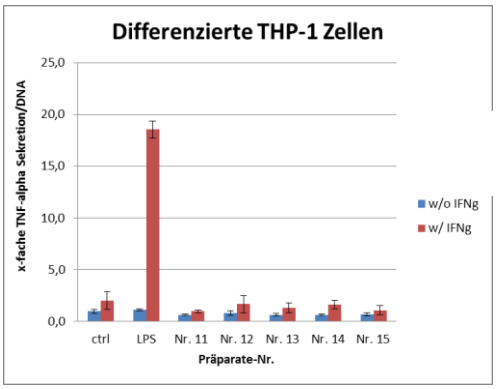
TNF-alpha:





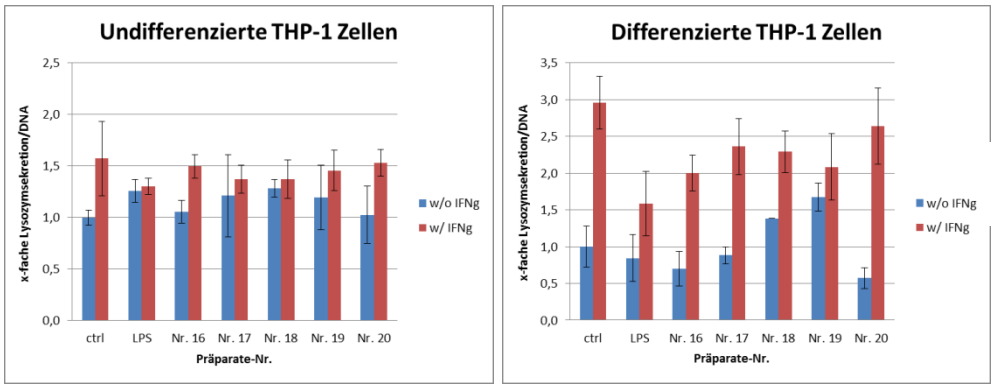
Exp. A



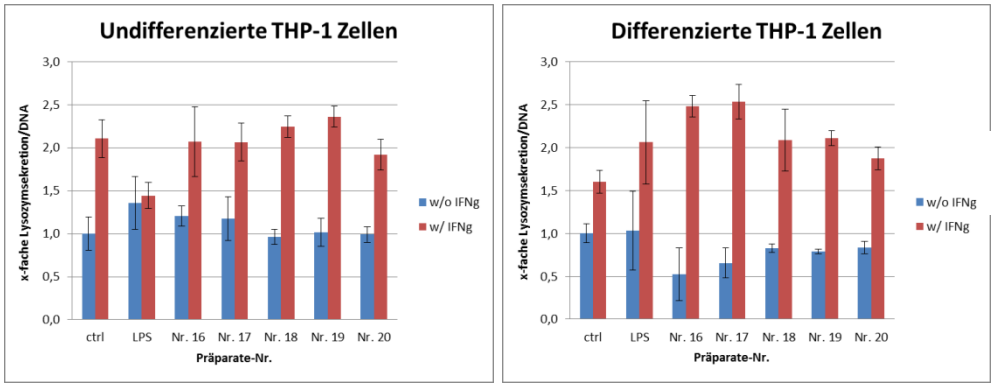


Exp. B

Lysozym:

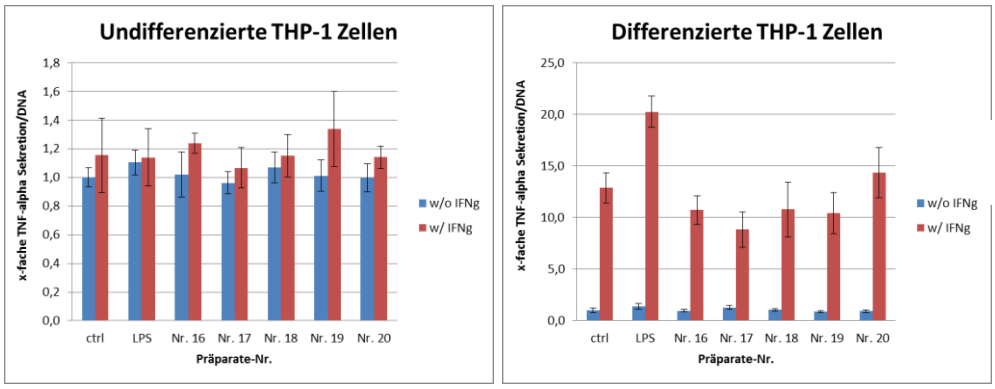


Exp. A

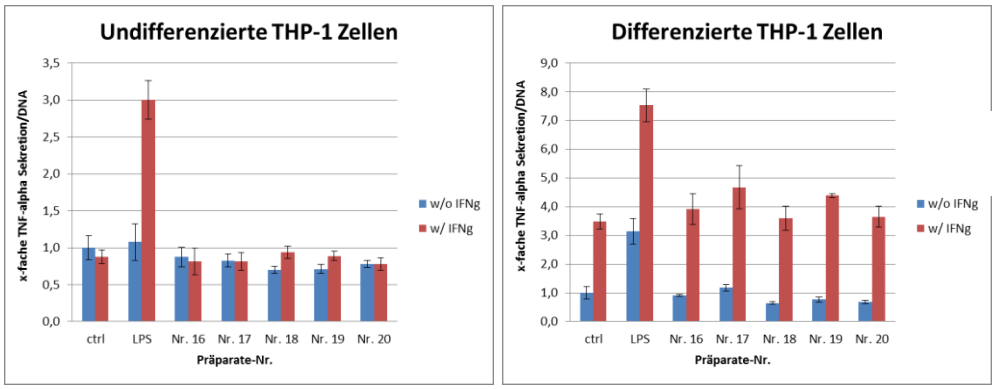


Exp. B

TNF-alpha:

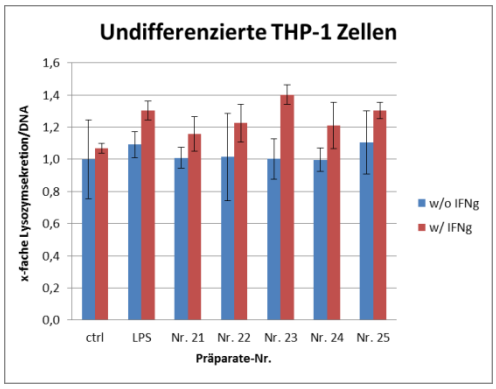


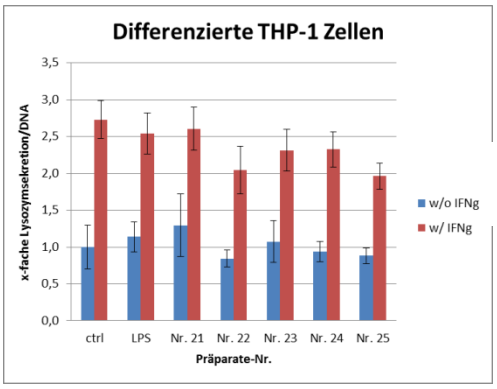
Exp. A



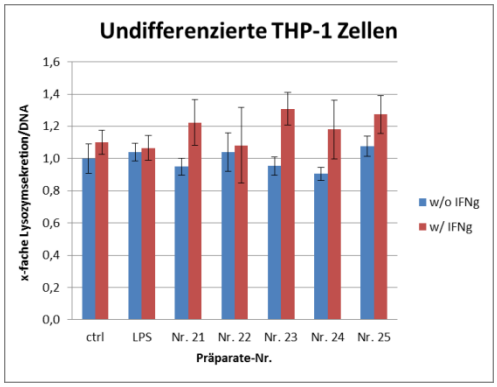
Exp. B

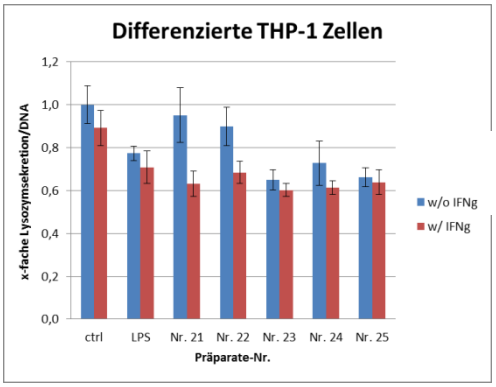
Lysozym:





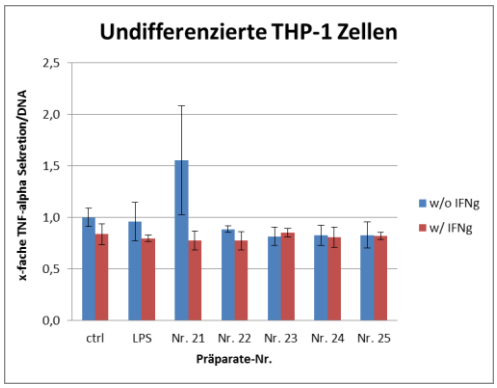
Exp. A

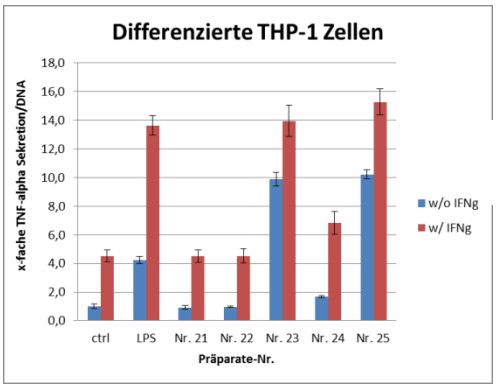




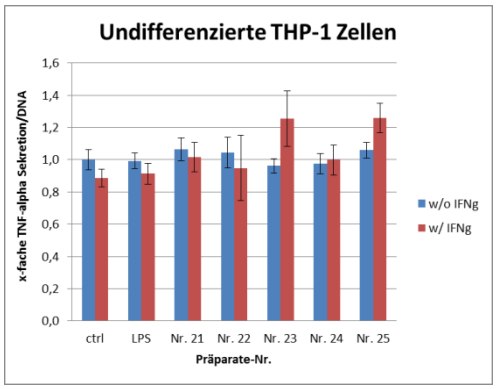
Exp. B

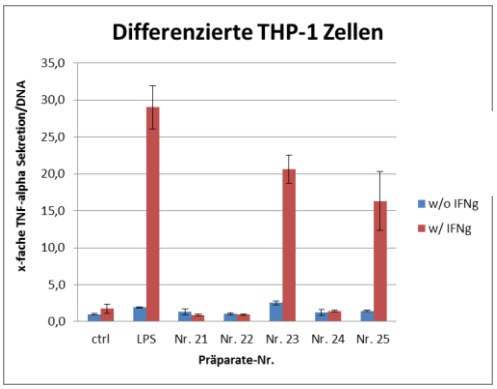
TNF-alpha:





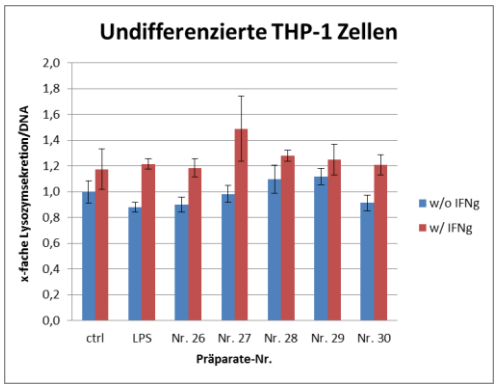
Exp. A

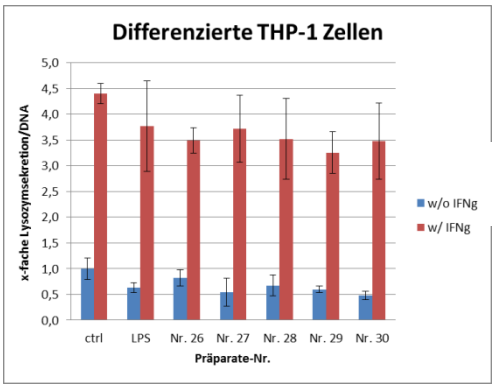




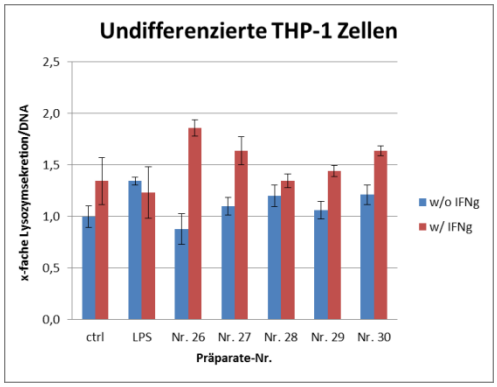
Exp. B

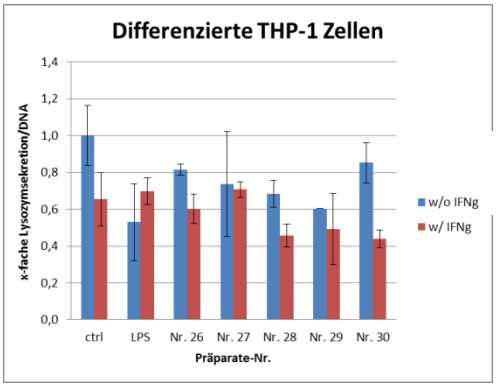
Lysozym:





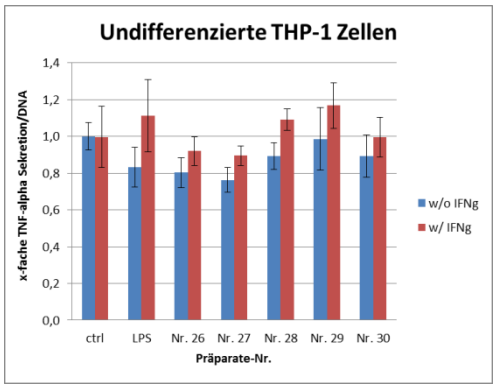
Exp. A

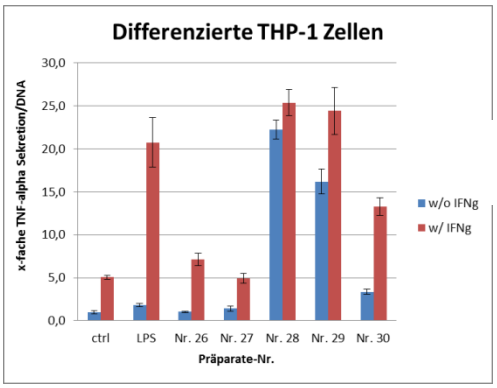




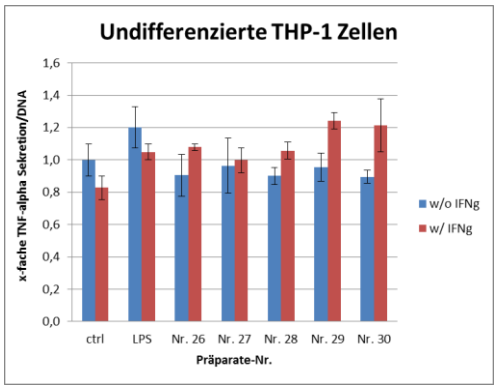
Exp. B

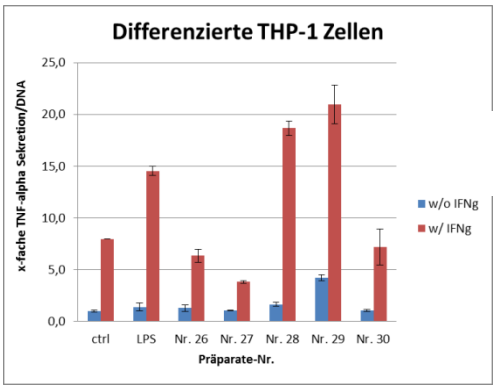
TNF-alpha:





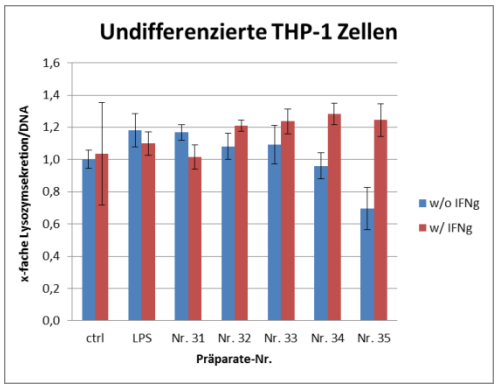
Exp. A

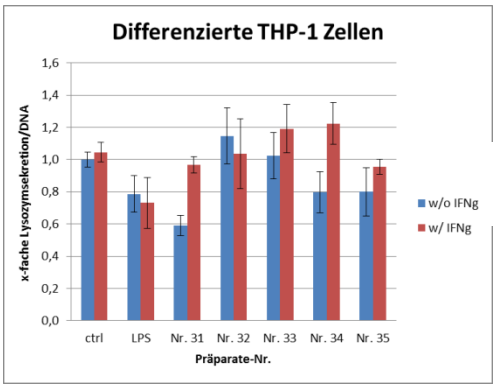




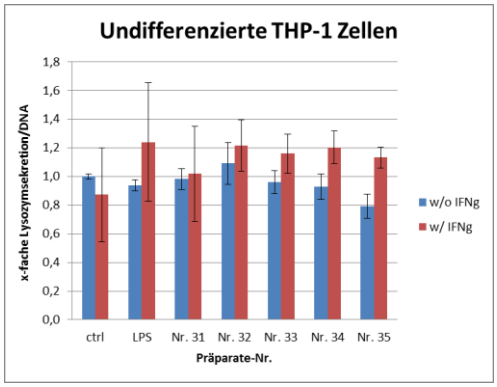
Exp. B

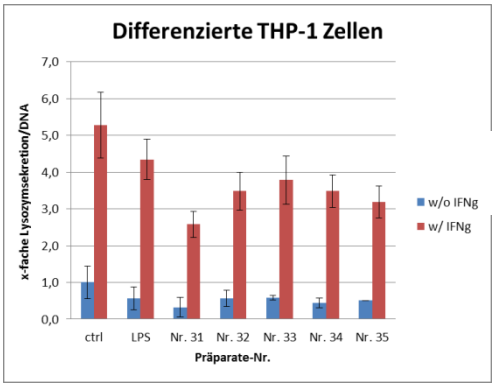
Lysozym:





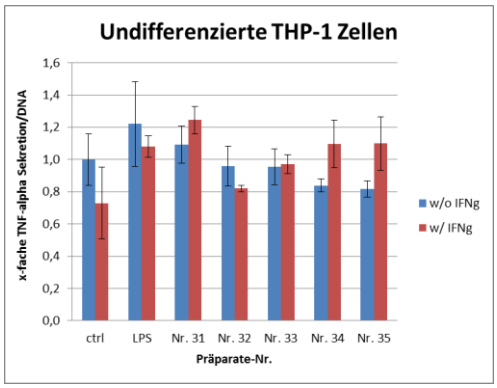
Exp. A

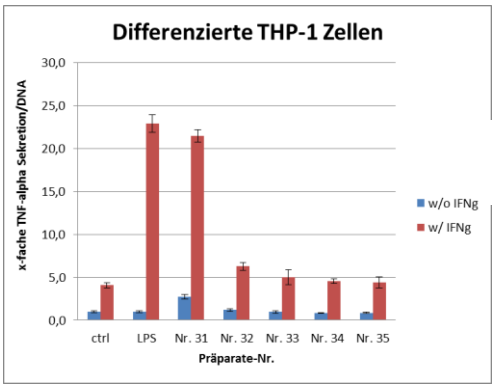




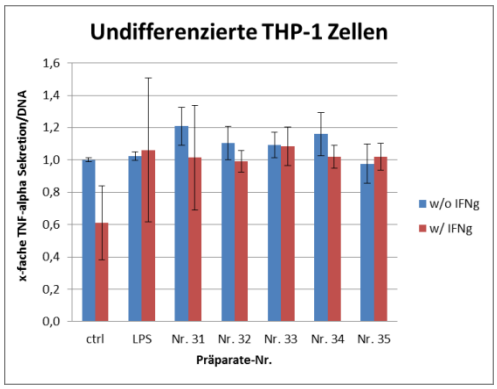
Exp. B

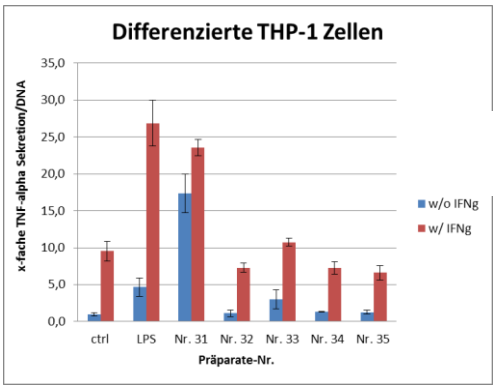
TNF-alpha:





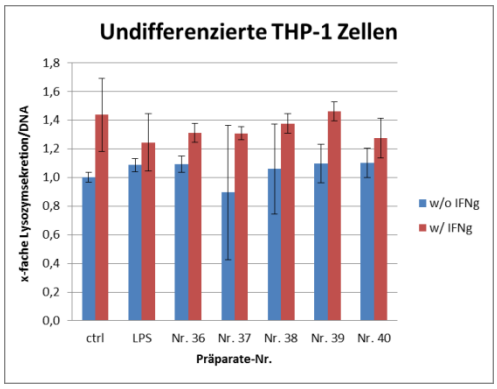
Exp. A

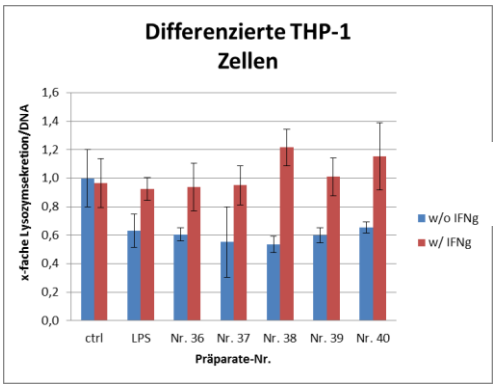




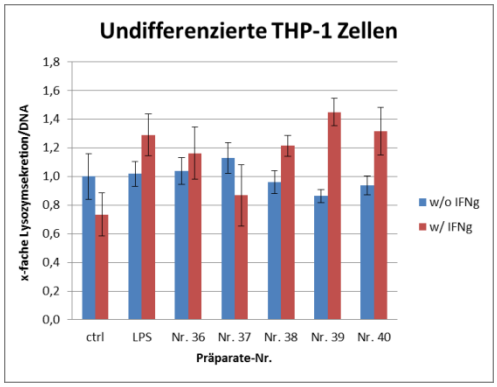
Exp. B

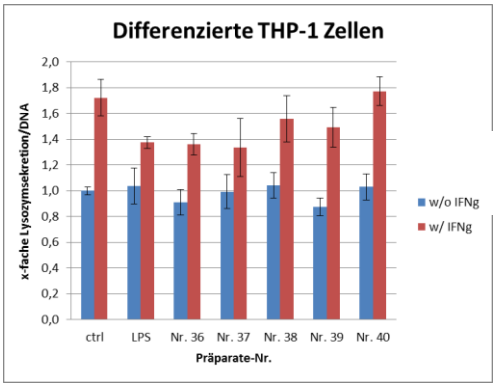
Lysozym:





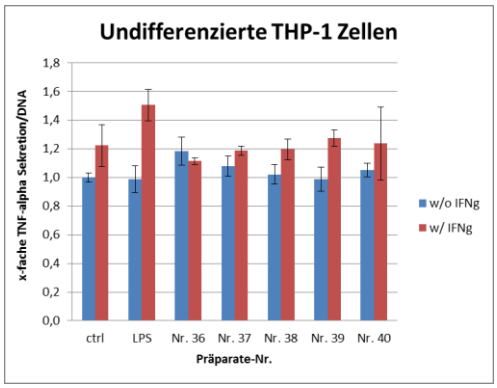
Exp. A

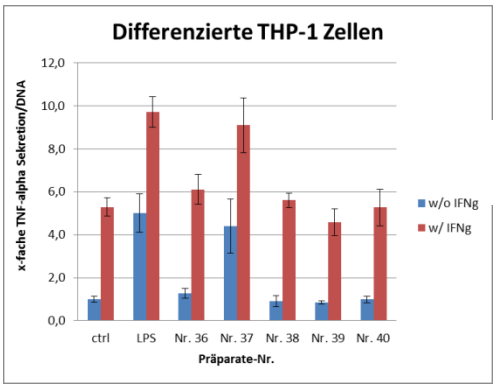




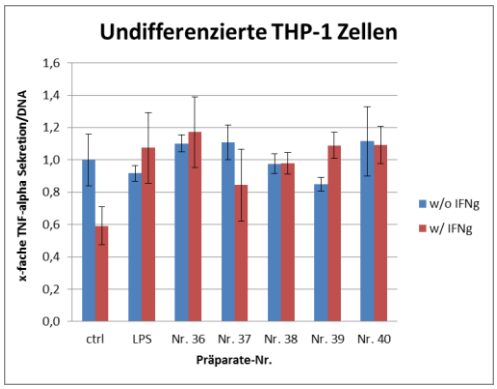
Exp. B

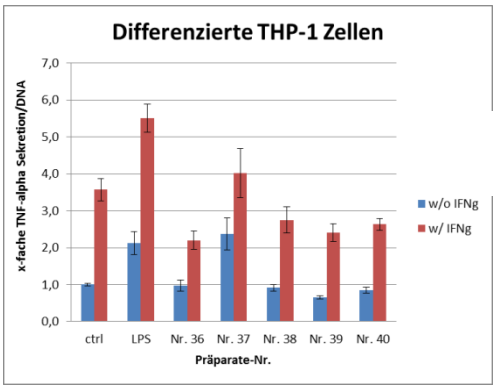
TNF-alpha:





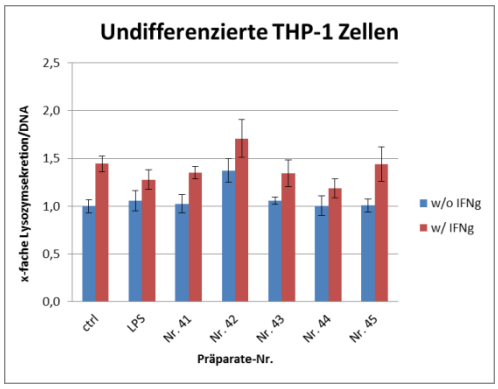
Exp. A

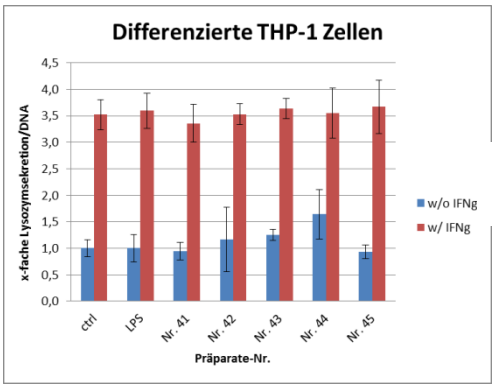




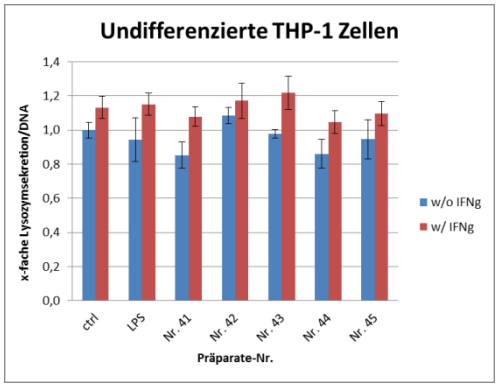
Exp. B

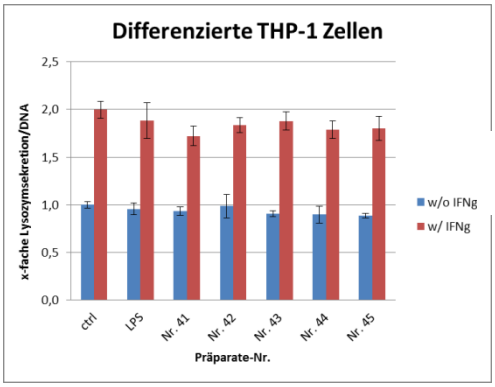
Lysozym:





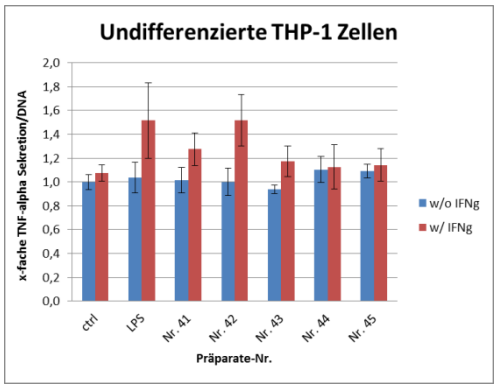
Exp. A

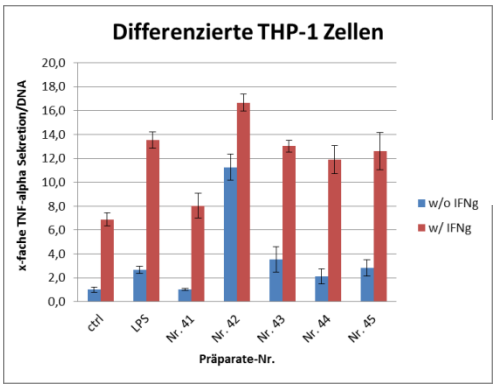




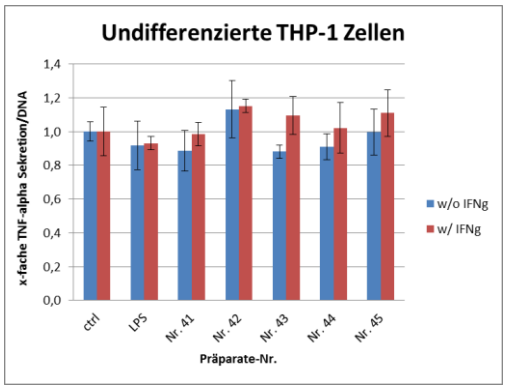
Exp. B

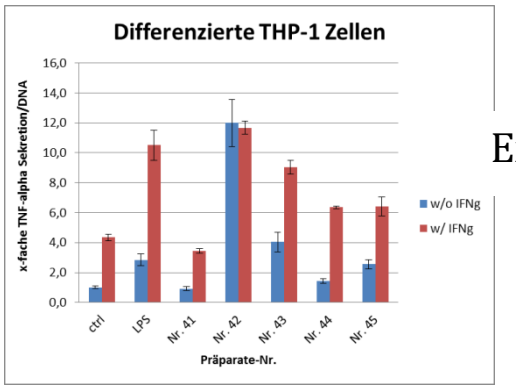
TNF-alpha:





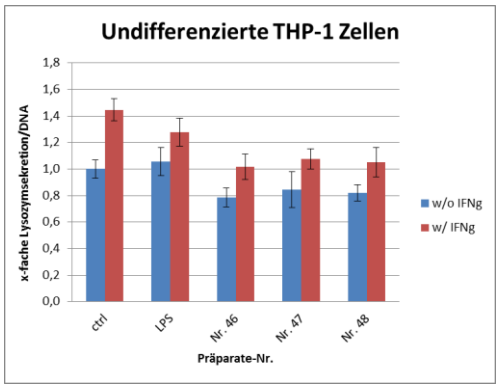
Exp. A

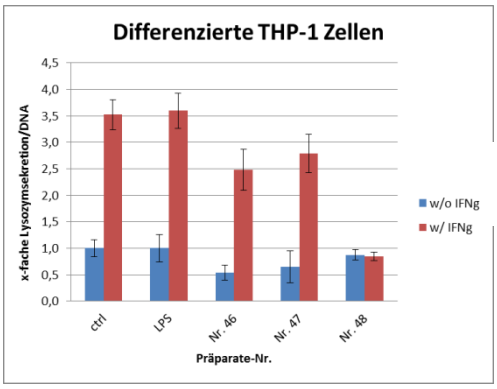




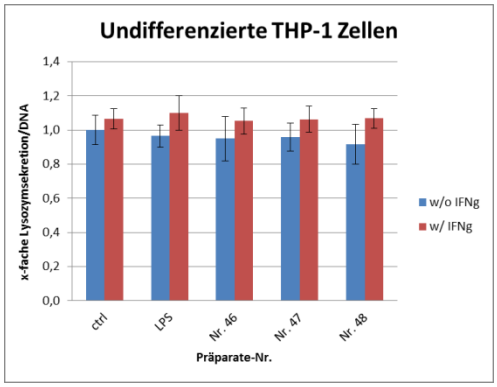
Exp. B

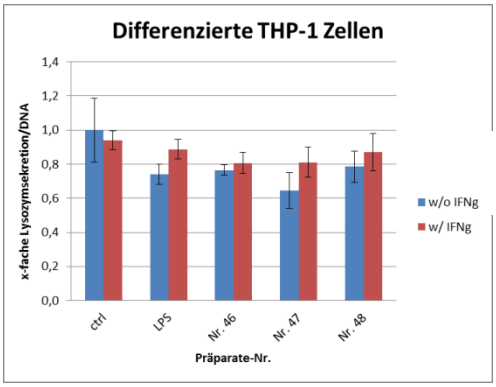
Lysozym:





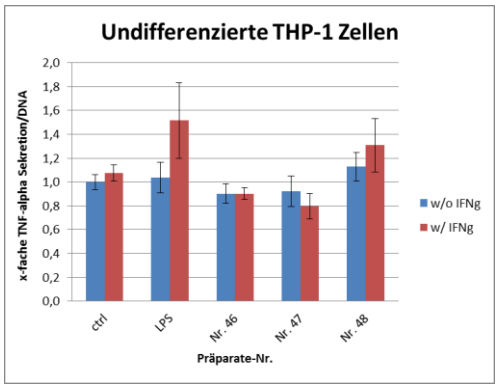
Exp. A

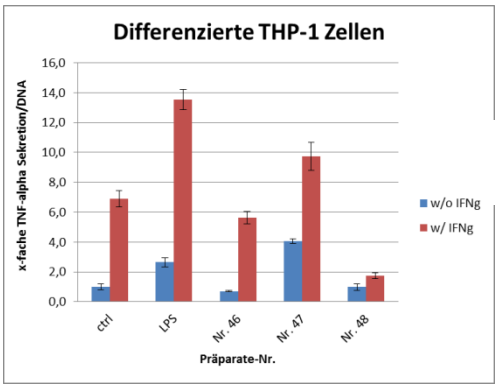




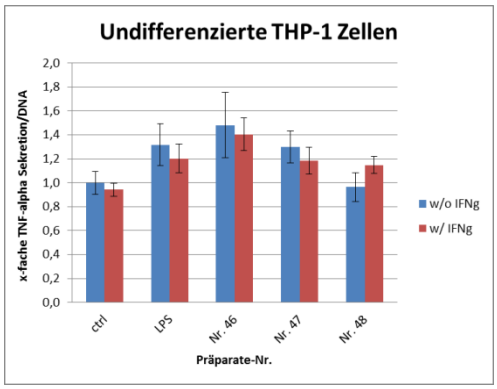
Exp. B

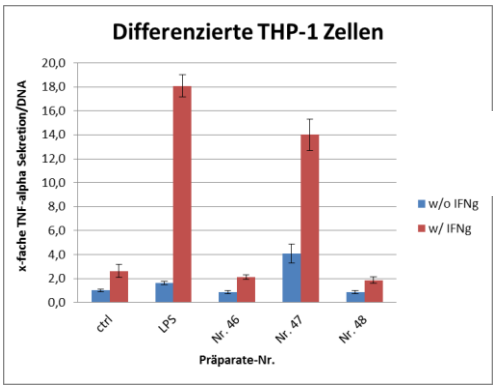
TNF-alpha:





Exp. A





Exp. B

Lebenslauf

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

Eidestattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, 01.04.2015

Patrick Schopohl