

# Inaugural – Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

M.Sc. Katinka Patricia Karenberg

aus: Lüneburg

Tag der mündlichen Prüfung: 17.05.2019

# ***Die immunmodulierende Wirkung von TUDCA in der Fetalzeit***

Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Karin Müller-Decker

Prof. Dr. med. David Frommhold

***All denen, die mich begleitet und unterstützt haben***

***Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.***

***The important thing is not to stop questioning.***

***- Albert Einstein***

# Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung.....	I
II. Summary .....	III
1. Einleitung .....	1
1.1. Leukozytenrekrutierung .....	2
1.1.1. Ausreifung der fetalen Leukozytenrekrutierung .....	6
1.1.2. Forschungsmethoden und deren analytische Einschränkungen .....	9
1.2. Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) .....	10
2. Ziel der Arbeit.....	15
3. Material .....	16
3.1. Geräte.....	16
3.2. Verbrauchsmaterialien .....	18
3.3. Chemikalien & Reagenzien .....	19
3.4. Kits .....	22
3.5. Software .....	22
3.6. Antikörper .....	23
3.7. Rekombinante Proteine .....	24
3.8. Zelllinien .....	24
3.9. Primer .....	25
3.10. Puffer und Lösungen .....	26
3.11. Versuchstiere.....	27
4. Methoden.....	29
4.1. Limulus-Amöbozyten-Test (LAL-Test).....	29
4.2. HPLC ( <i>high performance liquid chromatography</i> ) mit Massenspektrometrie .....	29
4.3. Induktion der Inflammation .....	30
4.4. Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit und Frühgeburtenrate.....	31
4.5. Intravitalmikroskopie .....	31
4.6. Immunhistochemie .....	34

4.7. Bestimmung des Zytokin-Plasmaspiegels mittels CBA-Kit.....	36
4.8. Zellkultur .....	36
4.8.1. Kultivierung der murinen aortalen Endothelzellen (MAECs).....	36
4.8.2. Durchführung von <i>in vitro</i> -Versuchen .....	37
4.8.3. Wirkung des TGR5-Inhibitors .....	38
4.9. <i>Real-time</i> -qPCR.....	38
4.9.1. Aufreinigung der Proben .....	38
4.9.2. RNA-Isolation.....	39
4.9.3. cDNA-Synthese .....	40
4.9.4. <i>Real-time</i> -qPCR.....	40
4.10. Durchflusszytometrie .....	43
4.11. Mikroflussskammer .....	43
4.12. Western Blot .....	45
4.12.1 Proteinisolation .....	45
4.12.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay.....	45
4.12.3. Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE.....	46
4.12.4. Proteintransfer .....	46
4.13. Statistik.....	47
5. Ergebnisse .....	48
5.1. Vorversuche .....	48
5.1.1. Substanz & Dosierung .....	48
5.1.2. Plazentagängigkeit von TUDCA .....	48
5.1.3. <i>In vitro</i> TUDCA-Dosis-Wirkungskurve .....	49
5.2. Inflammation.....	51
5.2.1. Systemische Inflammation des fetalen und maternalen Organismus <i>in vivo</i> .....	51
5.2.1.1. Überlebenswahrscheinlichkeit .....	51
5.2.1.2. Frühgeburtenrate .....	52
5.2.1.3. Zusammenfassung.....	53
5.2.2. <i>In vivo</i> Leukozytenrekrutierung in der fetalen Mikrozirkulation.....	54
5.2.2.1. Intravitalmikroskopie .....	54
5.2.2.1.1. Leukozytenrollen .....	54

5.2.2.1.2. Leukozytenadhäsion.....	55
5.2.2.1.3. Zusammenfassung.....	56
5.2.2.2. Leukozyteninfiltration in verschiedene fetale Organe .....	57
5.2.3. <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (ICAM-1) als Inflammationsmarker in fetalem und maternalem Gewebe .....	64
5.2.4. Plasmakonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine.....	69
5.2.5. Expression verschiedener Inflammationsmarker auf Neutrophilen Granulozyten .....	71
5.2.6. Leukozytenrekrutierung der Neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> .....	73
5.2.7. Expression verschiedener Inflammationsmarker auf Endothelzellen (MAECs).....	74
5.2.7.1. Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen .....	74
5.2.7.2. Zytokine der Endothelzellen.....	76
5.3. Molekularer Mechanismus von TUDCA.....	78
5.3.1. ER-Stress ( <i>unfolded protein response</i> (UPR)) .....	78
5.3.1.1. Untersuchungen von <i>Inositol-requiring enzyme 1 alpha</i> (IRE1 $\alpha$ ).....	78
5.3.1.2. Untersuchungen des Chaperons <i>Binding immunoglobulin Protein</i> (BiP) .....	81
5.3.1.3. Untersuchungen des <i>Activating transcription factor 4</i> (ATF4).....	84
5.3.1.4. Untersuchungen von <i>X-box binding Protein 1</i> (XBP1) .....	87
5.3.1.5. Untersuchungen von <i>CCAAT/-enhancer-binding-protein homologous protein</i> (CHOP) .....	89
5.3.1.6. Ergebniszusammenfassung zur Rolle von ausgewählten ER-Stressmolekülen im Projekt.....	92
5.3.2. Weitere Signalwege.....	92
5.3.2.1. TGR5-mRNA-Expression von MAECs ( <i>in vitro</i> ).....	93
5.3.2.2. TGR5-mRNA-Expression der Neutrophilen Granulozyten ( <i>in vitro</i> ) .....	94
5.3.2.3. TUDCA-abhängige TGR5-mRNA-Expression in MAECs .....	95
5.3.2.4. TGR5-Inhibitor .....	95
5.3.3. Zusammenfassung molekularer Mechanismus.....	97
6. Diskussion.....	98
6.1. Inflammation.....	99
6.2. Die anti-inflammatorisch wirkende Substanz TUDCA .....	103

6.3. Molekularer Mechanismus.....	108
6.3.1. ER-Stress und ER-Stress-Hemmung.....	108
6.3.2. Alternative Mechanismen und TGR5-Signalweg .....	114
7. Schlussfolgerungen .....	117
8. Ausblick .....	119
9. Wissenschaftliche Beiträge .....	120
10. Danksagung.....	121
11. Literaturverzeichnis.....	123
12. Abbildungsverzeichnis.....	135
13. Tabellenverzeichnis.....	138
14. Abkürzungsverzeichnis.....	139
15. Anhang .....	145

## I. Zusammenfassung

Bei Früh- und Neugeborenen treten häufig Infektionen, eine Sepsis oder ein septischer Schock auf, verbunden mit einer hohen Rate an Morbidität und Mortalität. Aufgrund der Tatsache, dass die Frühgeburtlichkeit der wichtigste Risikofaktor für neonatale Morbidität und Mortalität ist und aktuell mehr als jede zehnte Geburt eine Frühgeburt ist, besteht ein großes Interesse daran die Inflammationszustände in den Feten sowie Neugeborenen zu lindern und somit die Frühgeburtlichkeit, Morbidität und Mortalität zu verbessern.

Zunächst wurde das murine Amnioninfektionsmodell so weiterentwickelt, dass verschiedene potentiell anti-inflammatorische/immunmodulierende Substanzen *in vivo* getestet werden können. Durch eine intraperitoneale LPS-Injektion wurde in der schwangeren Maus eine Inflammation ausgelöst, die auf die Feten übertragen wurde. Nachdem der Phänotyp und das Ausmaß der dadurch verursachten Inflammation des Feten ausreichend untersucht war, wurde das anti-inflammatorische Potential der natürlichen Gallensäure Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) in Bezug auf die einzelnen Facetten der fetalen Inflammation untersucht:

1. Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit sowie die Frühgeburtenrate
2. Modulation der Leukozytenrekutierung (Rollen, Adhäsion, Infiltration)
3. Beeinflussung von Inflammationsmarkern im Gewebe und im Blut
4. Untersuchung molekularer Mechanismen von TUDCA in verschiedenen Zelltypen (Neutrophile Granulozyten und Endothelzellen)

Von makroskopischer bis mikroskopischer Ebene war der pro-inflammatorische Effekt von LPS und der anti-inflammatorische Effekt von TUDCA zu detektieren. Durch die zusätzliche Applikation von TUDCA zum LPS konnte eine signifikante Reduzierung der Frühgeburtenrate und eine signifikante Steigerung der Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu LPS beobachtet werden. Der anti-inflammatorische Effekt von TUDCA spiegelte sich auch in der reduzierten Anzahl an adhären und infiltrierten Neutrophilen sowie reduzierten Expression pro-inflammatorischer Marker im Gewebe und im Plasma wider. Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass Neutrophile Granulozyten und Endothelzellen anti-inflammatorische Effekte von TUDCA vermitteln. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

Da eine konsistente signifikante Linderung des ER-Stresses im Feten nicht zuverlässig nachgewiesen werden konnte, ist ein zytokinvermittelter anti-inflammatorischer Effekt durch die Hemmung des maternalen ER-Stresses denkbar. Auch andere Signalwege sind zu diskutieren. Beispielsweise könnte die Bindung von TUDCA an den TGR5-Rezeptor zur Aktivierung eines anti-inflammatorischen Signalwegs führen.

Angesichts dieser Ergebnisse ist die Basis für weiterführende Studien an anderen Spezies und ggf. höheren Säugetieren geschaffen bis hin zur potentiellen Behandlung von septischen Früh- und Neugeborenen.

## II. Summary

Prematurity is the most prominent risk factor for neonatal diseases and neonatal death. Currently more than every 10th birth is a premature birth. Especially among very immature infants, infection and sepsis are still the leading causes for mortality and morbidity. Hence, there is a great demand in alleviating the inflammatory conditions in the foetus and newborn and thus improve preterm delivery, morbidity and mortality.

In this work, the anti-inflammatory potential of natural bile acid tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) in mouse foetuses was investigated. For this we used the chorioamnionitis model. This model was used to establish a platform for testing various potentially anti-inflammatory and immunomodulatory substances *in vivo*. Intraperitoneal injection of LPS triggered inflammation in the pregnant mouse, which was transferred to the foetuses. After investigating the foetal phenotype and severity of inflammation the anti-inflammatory capacity of TUDCA was tested at several levels:

1. Effects on survival and premature birth
2. Modulation of leucocyte recruitment (rolling, adhesion, infiltration)
3. Impact on various inflammation markers in tissue and blood
4. Investigations of molecular mechanisms of TUDCA in different cell types (neutrophil granulocytes and endothelial cells)

Using the chorioamnionitis model TUDCA was able to inhibit LPS induced foetal inflammation at all experimental levels. TUDCA in addition to LPS significantly reduced premature birth and increased survival compared to LPS. Furthermore, the anti-inflammatory effect of TUDCA was also demonstrated by a lower number of adherent and infiltrated neutrophils and a reduced expression of pro-inflammatory markers in tissue as well as plasma. Based on the experimental results, neutrophil granulocytes and endothelial cells are likely to mediate anti-inflammatory effects of TUDCA. However, in the given experimental setting the exact underlying molecular mechanism of TUDCA is still uncovered. While there was no consistent and significant decrease of ER stress in the mouse foetus after TUDCA application, maternal cytokine-mediated anti-inflammatory immune response might be transferred to the foetus. Discussion of other potential TUDCA signalling pathways should include TGR5 receptor dependent anti-inflammatory signalling.

Based on the promising effects of TUDCA in the chorioamnionitis model, future studies investigating TUDCA as an anti-inflammatory agent in other mammalian models are needed before TUDCA may be discussed as an anti-inflammatory therapeutic option in humans.

## 1. Einleitung

Die Frühgeburtlichkeit ist die wichtigste Ursache für neonatale Morbidität und Mortalität. Nach den aktuellen Daten der WHO von 2018 ist mehr als jede zehnte Geburt eine Frühgeburt [1]. Trotz des medizinischen Fortschritts in der Neugeborenenmedizin bleibt die Sterblichkeit recht hoch, da die Zahl der Säuglinge mit sehr geringem Geburtsgewicht ( $\leq 1500$  g) weltweit zunimmt [2-4]. Durch die Frühgeburtlichkeit, deren Komplikationen und Folgen sterben auch heutzutage jährlich immer noch mehr als eine Million Kinder unter fünf Jahren [5].

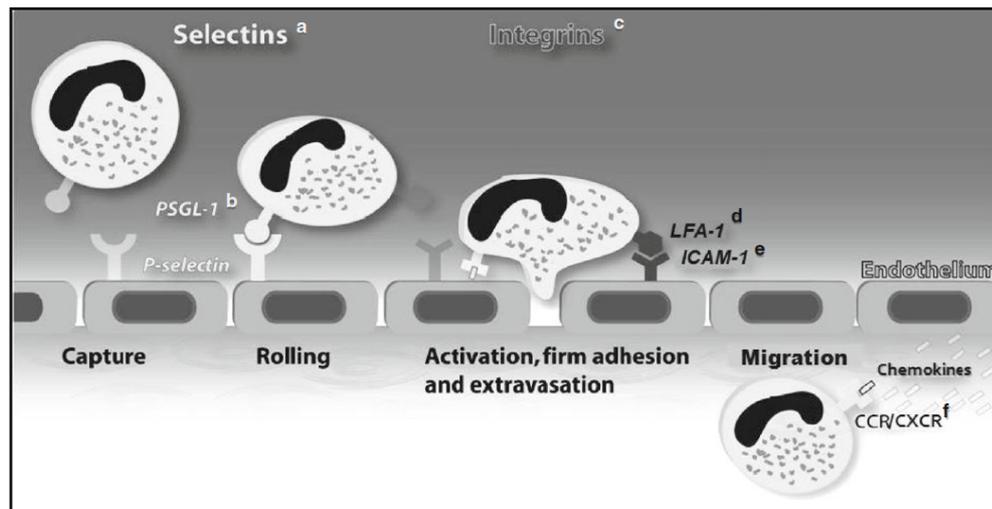
Infektionen, Sepsis und septischer Schock sind besonders bei sehr kleinen und unreifen Kindern mit einer hohen Rate an Morbidität und Mortalität verbunden [2, 6]. Dies liegt unter anderem an der Unreife des angeborenen Immunsystems. Frühchen ( $< 37$  Schwangerschaftswochen (SWS)) sind insbesondere auf das angeborene Immunsystem angewiesen, da das adaptive Immunsystem noch nicht gebildet bzw. ausgereift ist. Die fetale Immunsuppression ist während der Schwangerschaft die Basis für die fetomaternale Immuntoleranz an Schnittstellen wie z. B. der Plazenta. Ebenso dient die natürliche Plazentaschranke als Filtermembran, die den Übertritt von verschiedenen Substanzen (wie z. B. Sauerstoff oder Glukose) ermöglicht, aber auch den Übertritt von anderen Substanzen verhindert. Dies ist abhängig von der Molekülgröße und den biochemischen Eigenschaften. Die veränderte Immunbalance des Feten erweist sich jedoch bei Frühgeborenen als nachteilig, da der Schutz durch das maternale Immunsystem wegfällt und sie nun einem hohen Grad an Pathogenen ausgesetzt sind. Bis zu 60 % der extrem kleinen Frühgeborenen ( $< 28$  SWS und / oder  $< 1000$  g Geburtsgewicht) leiden an einer bakteriellen Sepsis im Vergleich zu 2 % der reifen Neugeborenen ( $> 37$  SWS) [7]. Diese Zahlen deuten auf eine Ausreifung des Immunsystems im Laufe der Gestation hin. Des Weiteren zeigen diverse Studien eine deutliche Reduktion des Mortalitätsrisikos mit jeder zusätzlichen Gestationswoche und höherem Geburtsgewicht [4]. Die komplexe ontogenetische Entwicklung des fetalen Immunsystems und mögliche Interventionen stehen im Fokus zunehmender Forschungsprojekte.

Die Ursachen einer Frühgeburt sind vielfältig, maternal oder fetal bedingt und vielfach nicht zu klären. Häufige maternale Ursachen sind unter anderem ein vorzeitiger Blasensprung, Plazentainsuffizienz, oder -ablösung, Uterusruptur, vorzeitige Wehen, Schwangerschaftsgestose, Anämien, Präeklampsie, uteroplazentale Vaskulopathie, Plazenta praevia, Infektionen wie z. B. das Amnioninfektionssyndrom, Diabetes oder auch chronischer Stress [8]. Fetale Ursachen können eine Mangelentwicklung, Chromosomenstörungen, Fehlbildung oder Mehrlingsschwangerschaften sein [9, 10]. Mögliche Probleme und Folgeschäden von Frühgeborenen sind unter anderem Atemwegserkrankungen (Atemnotsyndrom, Apnoen), Nierenunterfunktion, Hirnblutungen, nekrotisierende Enterokolitis, persistierender Ductus arteriosus, Sepsis, Retinopathie, Hypoglykämie, Hypothermie oder Bronchopulmonale Dysplasie [11, 12].

Infektionen, Sepsis und septischer Schock sind besonders bei Frühchen eine der führenden Todesursachen, da das Immunsystem noch nicht komplett ausgereift ist [2, 6]. Die meisten Sepsisfälle (62 %) werden durch gram-positive Bakterien wie z. B. Streptokokken oder Staphylokokken ausgelöst, am zweit häufigsten (29 %) durch gram-negative Bakterien wie z. B. *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* oder *Escherichia coli* und in wenigen Fällen (5 %) durch Hefen [2].

### **1.1. Leukozytenrekrutierung**

Die Leukozytenrekrutierung ist ein wesentlicher Bestandteil der zellulären Immunantwort. Wie wichtig eine funktionierende Leukozytenrekrutierung ist, wird anhand der LAD II (*Leukocyte Adhesion Deficiency II*)-Krankheit deutlich, die unter anderem zu Entwicklungsfehlern und einem Immundefekt führen kann [13]. Die Rekrutierung von Leukozyten folgt einer definierten Kaskade von Ereignissen [14]. Nach der Erkennung und Registrierung von eindringenden Pathogenen werden Leukozyten stimuliert, um die Entzündungsursache zu bekämpfen. Dieser mehrstufige Prozess beginnt mit dem Einfangen von freifließenden zirkulierenden Leukozyten vornehmlich aus postkapillären Venolen in unmittelbarer Nähe des entzündeten Gewebes [15]. Die Leukozytenrekrutierungskaskade ist in Abbildung 1 exemplarisch für Neutrophile Granulozyten dargestellt; die angegebenen Fußnoten beziehen sich auf Entwicklungsaspekte und werden im Folgenden näher erläutert.



**Abbildung 1 Leukozytenrekrutierungskaskade.** Die mehrstufige Rekrutierungskaskade wurde beispielhaft für einen Neutrophilen Granulozyten dargestellt. Die Kaskade startet mit dem Einfangen freifließender zirkulierender Neutrophile aus dem Blutstrom, gefolgt von Selektin-abhängigem Rollen und Chemokin- sowie Integrin-abhängiger Adhäsion. Nach der Transmigration folgt der Neutrophile Granulozyt einem Chemokingradienten zum Entzündungsherd. Entwicklungsbedingte Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen wurden in der Abbildung mittels Fußnoten wie folgt dargestellt (Expression vom Fetus / Frühchen im Vergleich zu der Expression im Erwachsenen): a L-Selektin: reduziert [16-20], unverändert [21]; E-Selektin: reduziert [22-24]; P-Selektin: reduziert [23-26], b PSGL-1: reduziert [22, 23, 26], c Mac-1: reduziert [16, 22, 27], unverändert [17, 28], erhöht [18], d LFA-1: reduziert [16, 19], unverändert [18, 22, 27, 28], e ICAM-1: reduziert [22-24], f CXCR2: unverändert [22]. Abbildung aus Karenberg *et al.* [29].

Nach dem Einfangen folgt das Leukozytenrollen, das auf dem Gefäßendothel durch Selektine vermittelt wird, die an ihre jeweiligen Liganden binden wie z. B. *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1), CD44 oder *E-selectin ligand 1* (ESL-1) [30-32]. Die drei bekannten Selektine sind L-, P- und E-Selektin. L-Selektin ist auf Leukozyten exprimiert, wohingegen E- und P-Selektin nach einer Entzündung auf Endothelzellen exprimiert werden. P-Selektin wird zusätzlich auch auf aktivierten Thrombozyten exprimiert [14]. Durch pro-inflammatorische Mediatoren (wie z. B. Zytokine oder Lipopolysaccharide (LPS)) wird das Endothel aktiviert und Adhäsionsmoleküle werden hochreguliert, wodurch die Leukozyten durch die Interaktion der Selektine und deren Liganden an der Gefäßwand adhären. Die Interaktion von Selektinen und Chemokinen mit ihren entsprechenden Rezeptoren führt zu der Aktivierung von Integrinen (z. B. *macrophage antigen 1* (Mac-1) und *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1)), die wiederum an ihre endothelialen Liganden (*intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE)) binden [33]. Dies führt zum weiteren Abbremsen der Leukozyten und schlussendlich zur festen Adhäsion [34]. Die feste Leukozytenadhäsion wird entscheidend durch eine enge Bindung zwischen den Integrinen und deren Liganden

vermittelt, die durch eine Balance zwischen permanentem *inside-out signalling* (intrazelluläres *Signalling* aktiviert zelloberflächen Rezeptoren) und *outside-in signalling* (durch die Bindung von Integrinen an deren Liganden induziertes intrazelluläres *Signalling*) aufrechterhalten wird [14, 35-37]. Anschließend wird das sogenannte *spreading* (Spreizung) der Leukozyten durch eine Integrin-vermittelte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts initiiert, gefolgt vom Kriechen (*crawling*) der Leukozyten entlang des Endothels, um eine geeignete Stelle zur Transmigration hinein ins entzündete Gewebe zu finden [38, 39]. Durch intravaskuläre Chemokingradienten werden die Leukozyten anschließend zum Entzündungsherd geleitet. Die Transmigration hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab [40], wie z. B. der Verteilung und Dichte von Integrin-Liganden, Lockstoffen und anderen Zytokinen sowie von den Liganden der Adhäsionsmoleküle [41]. Es gibt zwei verschiedene Arten der Transmigration: Parazellulär an endothelialen Grenzen (70 – 90 %) oder transzellulär [30]. Nach der transendothelialen Zellmigration (*transendothelial cell migration* = TEM) haben die Leukozyten einen veränderten Phänotyp, eine erhöhte Überlebensrate und eine verbesserte Fähigkeit Pathogene zu eliminieren [30]. Für eine ausreichende Diapedese sind eine Schwächung der endothelialen Zell-Zell-Verbindungen und eine Erhöhung des zytosolischen freien Calciums erforderlich [42]. Die Transmigrationsstelle kann vom Zustand der Zell-Zell-Verbindungen abhängen, sodass die Leukozyten wahrscheinlich den kürzesten Weg mit dem geringsten Widerstand in einem akzeptablen Bereich verwenden. Basierend auf einem Review von Vestweber sind in der folgenden Tabelle 1 die Schlüsselmoleküle der Leukozytenrekrutierungskaskade, deren Liganden sowie ihre Funktionen in der Leukozytenrekrutierung dargestellt [43].

Tabelle 1 Adhäsionsmoleküle, deren Liganden und Funktionen \*

Endotheliale Adhäsionsmoleküle	Leukozytäre Liganden	Endotheliale Liganden	Funktionen
E-Selektin	PSGL-1, CD44, ESL-1	Keinen	Einfangen, Rollen, Integrinaktivierung
P-Selektin	PSGL-1	Keinen	Einfangen, Rollen, Integrinaktivierung
ICAM-1	LFA-1, Mac-1	Keinen	Rollen, Adhäsion, <i>crawling</i>
VCAM-1	VLA-4	Keinen	Rollen, Adhäsion, <i>crawling</i>
RAGE	Mac-1	Keinen	Adhäsion, <i>crawling</i> , Transmigration
ICAM-2	LFA-1, Mac-1	Keinen	<i>crawling</i> , Initiieren der Diapedese
JAM-A	LFA-1	JAM-A	Leukodiapedese
JAM-B	VLA-4	JAM-B, JAM-C	Verhinderung umgekehrter TEM
JAM-C	Mac-1	JAM-C, JAM-B	Verhinderung umgekehrter TEM
ESAM	Nicht bekannt	ESAM	Diapedese
PECAM-1	PECAM-1	PECAM-1	Vorantreiben von TEM
CD99	CD99	CD99	Vorantreiben von TEM
CD99L2	CD99L2	CD99L2	Vorantreiben von TEM
VE-Cadherin	Keinen	VE-Cadherin	Verhinderung der Diapedese

\*Lage und Funktion von Schlüssel-Adhäsionsmolekülen und deren Liganden [33, 43, 44]. ESAM: *endothelial cell-selective adhesion molecule*, CD99L2: *CD99 antigen-like protein 2*, JAM: *junctional adhesion molecule*, PECAM-1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, VE-cadherin: *vascular endothelial cadherin*, VLA-4: *very late antigen 4* [29].

### 1.1.1. Ausreifung der fetalen Leukozytenrekrutierung

Für die gezielte Prävention und Therapie von schweren Infektionen Frühgeborener ist das Verständnis des fetalen angeborenen Immunsystems von entscheidender Bedeutung. Das Immunsystem von Frühgeborenen besitzt noch kein ausgereiftes Komplementsystem, kein immunologisches Gedächtnis und daher nicht die Fähigkeit gegen eindringende Erreger spezifische Antikörper zu bilden. Die hohe Anfälligkeit von Frühgeborenen für schwere Infektionen und/oder eine Sepsis wird unter anderem einer gestörten Rekrutierung von Leukozyten in der Fetalzeit zugeschrieben [45]. Des Weiteren liegt es auch an dem geringen Anteil von Neutrophilen Granulozyten an den kernhaltigen Blutbestandteilen (< 2 %) im fetalen Stadium E14. Dies steigt jedoch kontinuierlich bis zu 20 % bereits bei E18 an [46]. Die reduzierte fetale Leukozytenrekrutierung und Chemotaxis wird hauptsächlich durch eine geringere Expression von leukozytären Adhäsionsmolekülen und einer geringeren Produktion von Zytokinen erklärt [16, 47, 48]. Dies wird in Tabelle 2 deutlich. Es ist ein Vergleich der Expressionsprofile der leukozytären Adhäsionsmoleküle von Feten und Erwachsenen dargestellt (siehe Abbildung 1 Fußnoten). Sperandio *et al.* postulierten ein reduziertes Leukozytenrollen und eine verminderte Adhäsion in der frühen Gestationsphase in murinen Dottersackgefäßen *in vivo*, welches sich dann während der gesamten Gestation erhöhte [23]. Diese Beobachtungen wurden mittels Versuchen mit humanen Leukozyten von Früh- sowie Neugeborenen *in vitro* validiert. Buschmann *et al.* zeigten, dass RAGE, ein wichtiger metabolischer Rezeptor in Diabetespatienten, die Adhäsion von Neutrophilen in Früh- und Neugeborenen kontrolliert [28]. Die postnatale Ausreifung des Immunsystems und der Leukozytenrekrutierung wird durch viele Umweltfaktoren beeinflusst und gefördert [22]. In vielen Studien wurde eine signifikante Reduzierung der Neutrophilen Transmigration und Chemotaxis in Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen beschrieben [23, 45, 49]. Des Weiteren zeigte sich, dass die Ausreifung der zellulären Immunantwort in Frühchen langsamer und später vonstattengeht als in reifen Neugeborenen [45]. Ebenfalls wurde eine geringere Expression von L-, P- und E-Selektin in reifen Neugeborenen im Vergleich zu Kindern und Erwachsenen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen [17, 22, 25]. In den meisten Studien wurde beschrieben, dass die Expression von Integrinen wie Mac-1 und LFA-1 im Feten geringer bzw. gleich hoch war im Vergleich zu denen von Erwachsenen [16-18, 22, 27, 28]. Auch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1/-2, VCAM-1, VLA-4 und PSGL-1 wurden in der frühen Gestation als niedriger beschrieben [22-24, 26].

Aus diesen Erkenntnissen wird deutlich, dass sich die Fähigkeit von Neutrophilen Granulozyten zu rollen und zu adhären während der Gestation und im frühen postnatalen Leben verbessert. Darüber hinaus verändern sich die Expression und die posttranslationale Glykosylierung von Selektinliganden während der Reifung [50]. In Tabelle 2 wird ersichtlich, dass die fetale Expression von diversen Adhäsionsmolekülen geringer als die von Erwachsenen ist [16, 27, 45]. Im Gegensatz dazu gibt es auch Moleküle wie CXCR2, PECAM-1, VE-Cadherin und LFA-1, deren Expression im Frühchen und Neugeborenen genauso hoch ist wie die von Erwachsenen [18, 22, 23].

Tabelle 2 Veränderung der Expression in der fetalen Entwicklung

Molekül	Zelltyp	Fetus/ Frühchen Vergleich zu Erwachsenen
Mac-1	<i>Polymorphonuclear cells</i> (PMN)	↓ Reduziert [16, 22, 27] ↑ Erhöht [18] ↔ Unverändert [17, 28]
LFA-1	PMN	↓ Reduziert [16, 19] ↔ Unverändert [18, 22, 27, 28]
CXCR2	PMN	↔ Unverändert [22]
CD 18	PMN	↓ Reduziert [16]
L-Selektin	PMN	↓ Reduziert [16-20] ↔ Unverändert [21]
E- Selektin	Haut Endothelzellen (EC) Dottersackgefäße	↓ Reduziert [24] ↓ Reduziert [22] ↓ Reduziert [23]
P- Selektin	EC Fetale Haut PMN Dottersackgefäße	↓ Reduziert [25] ↓ Reduziert [24] ↓ Reduziert [26] ↓ Reduziert [23]
RAGE	PMN	↑ Erhöht [28]
ICAM-1	Haut EC Dottersackgefäße	↓ Reduziert [24] ↓ Reduziert [22] ↓ Reduziert [23]
ICAM-2	Dottersackgefäße	↓ Reduziert [23]
VCAM-1	Haut Dottersackgefäße	↓ Reduziert [24] ↓ Reduziert [23]
PSGL-1	PMN Dottersackgefäße	↓ Reduziert [22, 26] ↓ Reduziert [23]
PECAM-1	EC Dottersackgefäße	↔ Unverändert [22] ↔ Unverändert [23]
VE-Cadherin	EC	↔ Unverändert [22]
VLA-4	PMN	↓ Reduziert [19]

Abschließend lässt sich sagen, dass der Nettoeffekt der gestationsabhängigen Hochregulation der Adhäsionsmoleküle zu einer funktionalen Verbesserung der Leukozytenrekrutierung im Verlauf der Gestation führt und somit zu einer stetigen Verbesserung der angeborenen Immunantwort.

### 1.1.2. Forschungsmethoden und deren analytische Einschränkungen

Trotz des technischen Fortschritts ist derzeit eine *in vivo*-Analyse der Leukozytenrekrutierung von humanen neonatalen Zellen nicht möglich. Daher wurde die fetale Leukozytenrekrutierung bisher hauptsächlich *in vitro* unter Verwendung von Leukozyten und Endothelzellen (EC) in dynamischen Flusskammer- oder Transmigrationsassays untersucht [22, 28, 33, 51, 52]. Insgesamt gibt es nur wenige publizierte *in vivo*-Studien bzgl. der fetalen Leukozytenrekrutierung in Tieren, die überwiegend nicht in Säugetieren durchgeführt wurden [53, 54]. Von Adrian, Sperandio und Frommhold entwickelten ein einmaliges intravitalmikroskopisches Mausmodell, um das Roll- und Adhäsionsverhalten von Leukozyten während verschiedener Stadien der fetalen Entwicklung (E13 – 18) in den Dottersackgefäßen *in vivo* in der Maus zu visualisieren [23]. Die Visualisierung der Leukozytenrekrutierung funktioniert in diesem Modell durch eine Insertion von GFP in den Lysozym M (*lys*) Genlocus, der spezifisch für Neutrophile und Monozyten ist. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ist es so möglich das Verhalten der GFP-markierten Leukozyten in fetalen Gefäßen in Echtzeit zu betrachten. Dazu wird ein Eingriff ähnlich eines Kaiserschnitts bei einer schwangeren Maus durchgeführt, bei dem ein Uterushorn freigelegt, ein Fetus isoliert und der fetale Dottersack freipräpariert wird. Dies birgt viele Schwierigkeiten, da der Dottersack sehr fragil ist und leicht einreißen kann. Diese Tierart entspricht einem guten Modellorganismus für diese Forschungsrichtung, da der Ablauf einer Schwangerschaft im Prinzip auf den Menschen übertragbar und die Plazenta der Maus vom Aufbau her identisch zu der des Menschen ist [55, 56]. Es sind jedoch auch immunologische Unterschiede vorhanden [57, 58]. Diese mikrochirurgische und mikroskopische Methode ist technisch sehr anspruchsvoll und die Anwendung von klinisch relevanten Bedingungen schwierig [59], aufgrund dessen gibt es nur wenige Arbeitsgruppen, die diese Methode durchführen können. Darüber hinaus ist die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen der Leukozytenrekrutierung aufgrund des limitierten Probenvolumens nur begrenzt möglich [22, 47, 48]. Obwohl unser Wissen und Verständnis bzgl. des fetalen und frühen neonatalen Immunsystems immer größer wird, sind die Behandlungsmöglichkeiten der Frühchen immer noch limitiert, da pharmakologische Studien zur Testung neuer Substanzen vorwiegend bei Erwachsenen mit einem vollständig ausgereiften adaptiven Immunsystem durchgeführt werden. Aus diesem Grund werden zusätzliche analytische Methoden und Modelle zur Untersuchung der angeborenen

Immunität benötigt, um die Entwicklung neuer Ansätze zur gezielten Unterstützung des Immunsystems von Frühgeborenen und zur Behandlung neonataler Infektionen und Sepsis zu fördern. Darüber hinaus sollten die therapeutischen Ansätze auf das Gestationsalter und das Sepsis-Stadium abgestimmt sein [29, 60].

Bezüglich einer drohenden Neugeborenensepsis ist es noch nicht gelungen zuverlässige und hoch prädiktive Biomarker zu identifizieren [12]. Blutkulturen stellen immer noch den Goldstandard der Diagnoseverfahren dar, liefern allerdings häufig keine positiven Befunde. Außerdem werden auch *Liquor cerebrospinalis*, Urin, Röntgenaufnahmen sowie Abstriche untersucht, sind jedoch häufig nicht aussagekräftig genug. Anhaltspunkte auf eine Entzündung im Körper zeigen beispielsweise der CRP (C reaktives Protein)-Wert, die Anzahl der Leukozyten, der Procalcitonin-Wert oder die Zytokin-Spiegel von z. B. IL-6, IL-8, IL-10, TNF alpha oder auch MCP-1 und Interferon  $\gamma$ . Allerdings ist bei einigen dieser Moleküle die Halbwertszeit recht kurz und daher ein Nachweis nur bedingt möglich. Insgesamt bieten die Expressionen dieser Moleküle viele Anhaltspunkte, um eine Inflammation und eine mögliche Sepsis zu erkennen, allerdings ist noch kein zuverlässiger geeigneter Biomarker für eine Neugeborenensepsis identifiziert worden [12].

## **1.2. Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA)**

Die Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) hat eine molare Masse von 499,71 g/mol, ist eine in geringen Konzentrationen im Menschen natürlich vorkommende Gallensäure und gehört wie alle anderen Gallensäuren zur Gruppe der Steroide. In den Hepatozyten der Leber wird aus Cholesterol die primäre Gallensäure Cholsäure gebildet und in der Gallenblase zwischengelagert. Durch bakterielle Prozesse werden die primären Gallensäuren im Darm zu sekundären Gallensäuren wie z. B. UDCA, woraus nach Konjugation mit Taurin TUDCA entsteht, umgewandelt. Gallensäuren dienen als Bestandteil der Gallenflüssigkeit als natürliche Emulgatoren zur Fettverdauung. Ihr Wirkungsort ist im Duodenum und anschließend werden sie im terminalen Ileum wieder resorbiert und dem enterohepatischen Kreislauf zurückgeführt. Im Gegensatz zu den meisten Gallensäuren, die aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften zellschädigend und apoptotisch wirken, hat TUDCA aufgrund der freien Hydroxylgruppe hydrophile Eigenschaften (Abbildung 2).

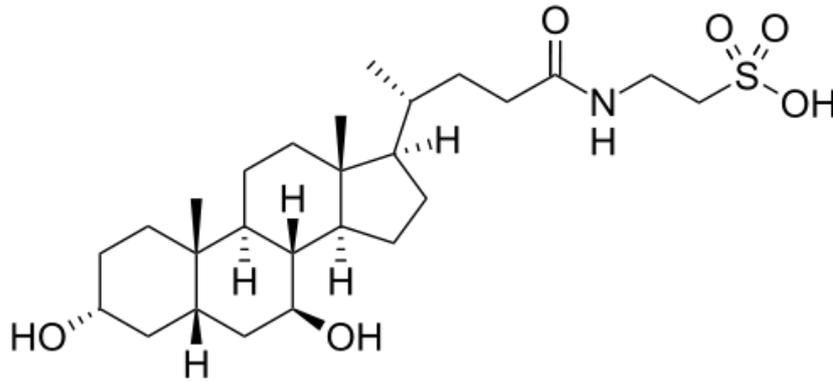
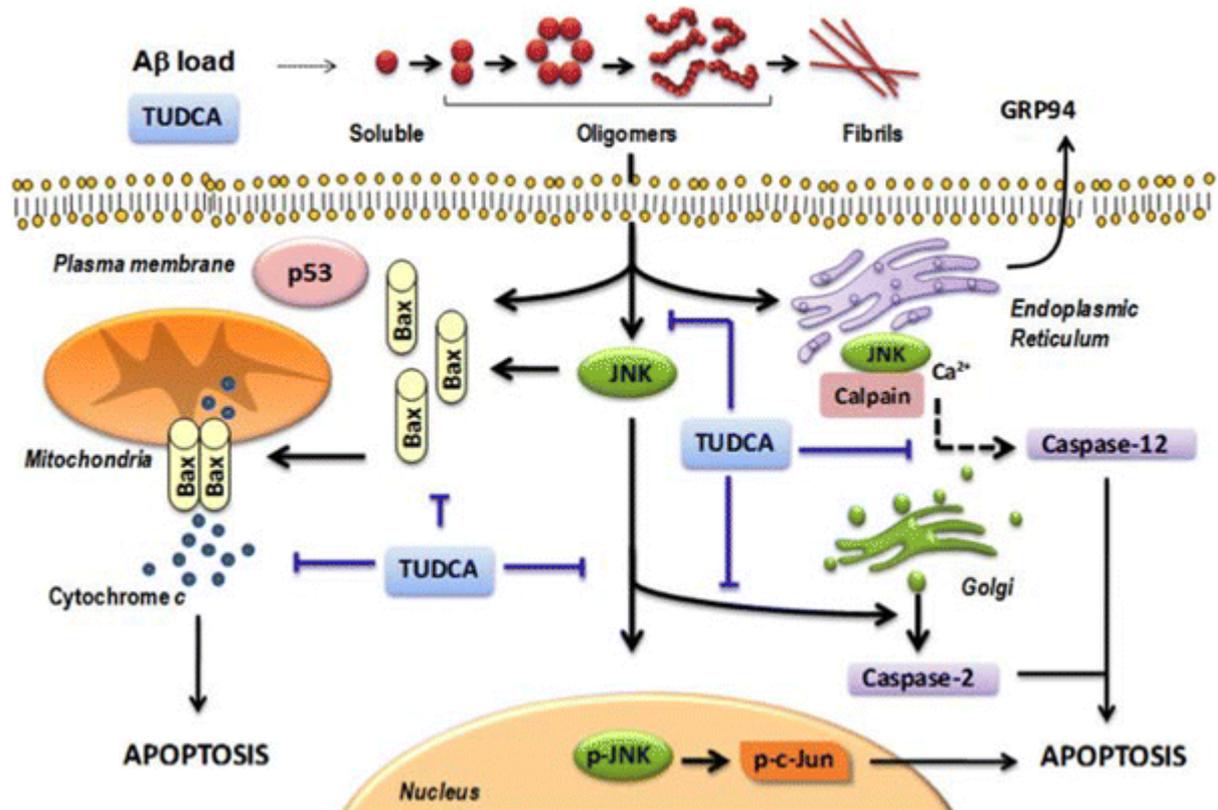


Abbildung 2 Struktur der Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) [61].

In der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) wurden Gallensäuren schon seit Jahrhunderten verwendet. Vornehmlich wurden sie Schwarzbären entnommen, die eine höhere Konzentration der hydrophilen Gallensäuren haben. Die Konzentration von UDCA innerhalb der Gallensäuren ist beim Schwarzbären mit fast 40 % viel höher als beim Menschen ( $\leq 5\%$ ) [62]. Die Analyse von Gallensäurekonzentrationen im Menschen, der Ratte und der Maus zeigten, dass der Mensch die niedrigste (2,7 nM) und die Maus die höchste Konzentration von TUDCA im Serum (17 nM) aufwies. Hierbei ist zu beachten, dass in humanem Serum die niedrigste Gesamtmenge an Gallensäuren detektiert wurde im Vergleich zur Maus und Ratte [63]. Die Halbwertszeit von UDCA beträgt ca. 17 Stunden [64]. Seit vielen Jahren fanden diese Substanzen Anwendung als Medikament bei der Prophylaxe und Behandlung von Gallensteinen [65]. In den letzten Jahren wurden die positiven Effekte von TUDCA bzgl. anderer Erkrankungen intensiv erforscht und es wurde festgestellt, dass sie zellprotektiv sowie anti-apoptotisch wirkt und einen positiven Einfluss auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen sowie metabolische Erkrankungen hat. In vielen Studien werden UDCA und TUDCA als potentielle Inhibitoren der Apoptose anhand von Interaktionen mit dem mitochondrialen Weg des Zelltods, durch eine Hemmung der Produktion von radikalen Sauerstoffspezies und durch die Reduktion von ER-Stress sowie der Caspase-Aktivierung bezeichnet [66]. In den meisten Studien wurde TUDCA bzgl. neurodegenerativer Erkrankungen erforscht und es zeigte sich, dass es neuroprotektive Eigenschaften besonders durch die Hemmung von Apoptose aufweist. TUDCA inhibiert die Apoptose durch die regulierende Wirkung auf die Stabilisierung der mitochondrialen Membran, auf die *B cell lymphoma 2* (Bcl-2)-assoziierte Protein X (BAX)-Translokation, auf die Cytochrom C-Freisetzung und die Caspase-Aktivierung [67]. Weiterhin inhibiert TUDCA

die Amyloid beta-induzierte sowie die p53-induzierte und Fas-Liganden-induzierte Apoptose. Es ist in der Lage das *cAMP response element-binding protein* (CREB) zu aktivieren, radikale Sauerstoffspezies zu reduzieren und kann zytoprotektive Signalwege initiieren. Viele dieser Faktoren wurden als Schlüsselkomponenten von verschiedenen Krankheiten identifiziert [67]. Das chemische Chaperon TUDCA soll außerdem durch Stabilisierung der Proteinfaltung und durch Beeinflussung der *unfolded protein response* (UPR)-Kaskade (über den *activated transcription factor 6*) den ER-Stress lindern [66]. Miller *et al.* zeigten, dass TUDCA zytoprotektive Effekte hat und dass es so das Zellüberleben positiv beeinflusst [68]. Dies geschieht aufgrund der Reduzierung der Apoptose durch Hemmung von BAD, welches ein pro-apoptotisches Protein ist, das zur Hemmung des anti-apoptotischen Bcl-2 führt. Wenn BAD nun phosphoryliert und somit inaktiviert ist, kann es nicht mit Bcl-2 assoziieren, wodurch Bcl-2 mit BAX assoziieren kann, welches schlussendlich zu einem gesteigerten Zellüberleben führt. Durch Zugabe von ER-Stressoren wie Tunicamycin oder Thapsigargin kann BAD wieder dephosphoryliert und der Effekt von TUDCA rückgängig gemacht werden. In anderen Studien wurde gezeigt, dass TUDCA auch über den MAPK-Signalweg das Zellüberleben fördert. Schoemaker *et al.* zeigten, dass TUDCA den p38- sowie ERK- *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs)-Signalweg aktivieren kann [68, 69]. In Abbildung 3 sind die verschiedenen Wirkungsorte von TUDCA in einer Zelle dargestellt. All diese positiven Eigenschaften TUDCA's wurden hauptsächlich *in vitro* oder in Erwachsenen beschrieben und sind noch nicht in der Fetalzeit untersucht worden.



**Abbildung 3 Darstellung der Wirkungsorte von TUDCA.** In verschiedenen Studien wurde der facettenreiche Einfluss von TUDCA auf u. a. die Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum, den Nucleus und den Golgi-Apparat dargestellt. Diese Interaktionen erwiesen sich als u. a. zytoprotektiv, anti-apoptotisch und anti-inflammatorisch (Abbildung aus [67]).

Gallensäuren, unter anderem TUDCA, sind Liganden für G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCRs) wie der *Takeda-G-protein-receptor-5* (TGR5), der nukleäre Hormonrezeptor *Farnesoid X Receptor* (FXR) oder wie der *Formyl Peptide Receptor* (FPR) und können die nachfolgenden Signalwege aktivieren [70]. Es wurde gezeigt, dass durch die Aktivierung dieser drei Signalwege nicht nur die Synthese und der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren beeinflusst wird, sondern auch Triglyceride, Cholesterole sowie die Energie- und Glukose-Homöostase. Die Aktivierung von FXR schützt vor einer toxischen Akkumulation der Gallensäuren, es beeinflusst den enterohepatischen Zyklus, führt zu einer gesunkenen Gallensäure-Synthese und einer gesteigerten Konjugation von Gallensäuren. Außerdem beeinflusst es den Cholesterole-Metabolismus (durch eine Steigerung des LDL-Cholesterole-Serumwerts sowie durch eine Senkung des HDL-Cholesterole-Serumwerts), es beeinflusst den Triglycerin-Metabolismus (durch Senkung des TG-Serumwertes) und es beeinflusst den Glukose-Haushalt (durch Senkung der Glukoneogenese und einer Steigerung der Glykogenese) [70].

Die Aktivierung von TGR5 hingegen beeinflusst die Energie-Homöostase durch eine Erhöhung des Energieverbrauchs (Muskeln, braunes Fettgewebe), zusätzlich beeinflusst es den Glukose-Metabolismus durch eine gesteigerte Inkretin-Freisetzung. Die Aktivierung von TGR5 zeigte sich allerdings auch als protektiv bei Hepatozyten und als immunmodulierend [70]. Ebenfalls wurden potentielle Effekte auf die Zellproliferation sowie Apoptose beschrieben [71]. Außerdem wurden auch anti-inflammatorische Eigenschaften dieser drei Rezeptortypen beschrieben. Beispielsweise wurde postuliert, dass durch Aktivierung von FPR die humane Leukozyten-Chemotaxis sowie die Expression von IL-1, IL-6 und TNF alpha gehemmt wurde [72].

Insgesamt zeigte sich TUDCA in diversen klinischen Studien als nicht toxisch. In einer humanen Studie wurde TUDCA bei oraler Gabe von bis zu 1500 mg/Tag für 6 Monate von Erwachsenen gut toleriert [67].

## 2. Ziel der Arbeit

Hintergrund der Arbeit ist die aus dem Amnioninfektionssyndrom entstehenden Sepsis von Früh- und Neugeborenen, die nach wie vor zu erheblicher Morbidität und Mortalität in dieser Altersgruppe führt. Im Amnioninfektionsmodell der Maus sollte eine vergleichbare Infektion simuliert werden, um neue potenziell anti-inflammatorische Substanzen zu testen.

### - **Untersuchung der Inflammation im Amnioninfektionsmodell *in vivo* sowie *in vitro***

Der Grad der Inflammation sollte auf unterschiedlichen Ebenen *in vivo* (Organismus, Gewebe, Proteine, mRNA) mittels verschiedener Methoden (Überlebensanalysen, Intravitalmikroskopie, Histologie, Durchflusszytometrie, qPCR) verifiziert werden. Es sollte die Analyse der Leukozytenrekrutierung in Bezug auf Rollen, Adhäsion und Infiltration von Neutrophilen Granulozyten folgen und auch eine Analyse diverser Zytokin-Plasmaspiegel dargestellt werden.

Die Basisinflammation sollte ebenfalls *in vitro* (MAECs und Neutrophile) mittels verschiedener Methoden (qPCR, Durchflusszytometrie, Mikroflusskammer) an unterschiedlichen Zelltypen dargestellt werden. Es sollte untersucht werden, ob der pro-inflammatorische Effekt bei den isolierten Zelltypen detektierbar ist.

### - **Untersuchungen anti-inflammatorischer Effekte von TUDCA im Amnioninfektionsmodell**

Gleichzeitig zu den oben erwähnten Untersuchungen und Methoden sollte die natürlich vorkommende Gallensäure, die Tauroursodeoxycholsäure, als potentiell anti-inflammatorisch wirkende Substanz getestet werden.

### - **Untersuchungen zugrunde liegender molekularer Mechanismen**

Es sollte mittels diverser molekularbiologischer Analysen (Western Blot, qPCR, IHC) und unter zu Hilfenahme eines Inhibitors (gegen TGR5) mögliche Signalwege (ER-Stress, oxidativer Stress, TNF) untersucht werden, die möglicherweise die Effekte von TUDCA vermitteln.

Im Fall anti-inflammatorischer Eigenschaften von TUDCA im o. g. Amnioninfektionsmodell und unter Beachtung eingeschränkter Übertragbarkeit der Ergebnisse des Mausmodells auf den Menschen, sind weitere Studien zur Vorbereitung eines potentiellen Einsatzes von TUDCA als Prophylaxe oder Therapie eines Amnioninfektionssyndroms denkbar.

### 3. Material

#### 3.1. Geräte

Tabelle 3 Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
20x Objektiv	Olympus, Japan
20x Wasserimmersionsobjektiv	Zeiss, Jena
CCD-Kamera (Olympus U-CMAD3)	Olympus, Hamburg
CCD-Kamera (pixelfly)	PCO AG, Kehlheim
ChemiDoc XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Memmert, Schwabach
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Jena
Einbettssystem EG1150C	Leica, Wetzlar
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzlampe X-Cite series 120 EXFO	Excelitas Technologies GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Gel-Set von BioRad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hämocytometer	Hausser Scientific, Horsham, USA
Hereaus Fresco 17 centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Intravitalmikroskop BX51WI	Olympus, Hamburg
Inverses Mikroskop (DMIL)	Leica, Wetzlar
Kern 474 Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Kern 510 Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
LSR II	BD Bioscience, San Jose, USA
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Microflow Biological safety cabinet	Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden
Mikrochirurgisches Präparierbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Mikropipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Mikroskop Olympus Bx41	Olympus, Hamburg
Mikroskop-Binokular M651	Leica, Wetzlar

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Odyssey classic	LI-COR Biosciences GmbH, Nebraska, USA
Perfusor: Harvard Apparatus, Syringe Pump 55-2226	FMI GmbH, Seeheim
pH-Meter MP 220	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Photometer iMark	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pumpe BVC 21	Vacubrand, Wertheim
Rotationsmikrotom RM2125RTS	Leica, Wetzlar
Schüttler Swip	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen
StepOnePlus	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermal cycler LifeEco	Bioer, Hangzhou, P.R. China
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Tischzentrifuge SU1550	Sunlab GmbH, Aschaffenburg
Trans-Blot SD Semi dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trockenschrank (50 °C)	Hereaus Instruments GmbH, Hanau
Trockenschrank (65 °C) Kelvitron	Hereaus Instruments GmbH, Hanau
Ultra Turrax T8	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
Wärmepad Isopad TD 2000	Thermocoax Isopad GmbH, Heidelberg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserbad HI1210	Leica, Wetzlar
Webcam	Logitech Europe S.A., Lausanne, CH
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

### 3.2. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4** Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
0,2 ml 8 Twin Strip Star PCR Tubes	StarLab International GmbH, Hamburg
25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
5 ml Polystyrene Round Bottom Tube (12 x 75 mm)	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
5 ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
6-Well-Multiwellplatten (9,6 cm <sup>2</sup> /Well)	Corning Holding GmbH, Wiesbaden
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Clear Round Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	Corning Holding GmbH, Wiesbaden
Amersham Protran 0,45 µm Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
BD Intramedic Polyethylenschlauch (PE 10 & PE 90)	Becton Dickinson, San Jose, USA
Cryo Tube Vials	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
EDTA KE	Sarstedt, Nümbrecht
Einbettkassetten Bio-Net	Sanowa, Leimen
Einbettkassetten Universal	Sanowa, Leimen
Injekt Einmalspritze 2 ml	Braun, Melsungen
Injektionsspritzen (Omnican, 1 ml)	Braun, Melsungen
Intramedic™ PE50	Becton Dickinson, San Jose, USA
Kanülen 23G Microlance	Becton Dickinson, San Jose, USA
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, USA
Microcapillary tube (10 µl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Microslides 0,2 x 2 mm	Composite Metal Services, Shipley, USA
Objektträger (Superfrost)	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GMBH & CO KG, Wertheim

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Pasteurpipetten PE	Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rotilabo Silikonschlauch, Ø1,5 mm	Roth, Karlsruhe
Seide (6/0)	Resorba, Nürnberg
Siliconfett Korasilon-Paste	Kurt Obermeier GmbH & Co KG, Bad Berleburg
Sterilfilter Millex-GS	Merck Millipore, Darmstadt
UHU plus sofortfest	UHU GmbH & Co KG, Bühl
Vollpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Holding GmbH, Wiesbaden
Whatman-Papier 3 MM CHR	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen

### 3.3. Chemikalien & Reagenzien

Tabelle 5 Verwendete Chemikalien & Reagenzien

<b>Chemikalien &amp; Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
6X MassRuler Loading Dye Solution	Fermentas, Waltham, USA
Accutase solution	Sigma, Taufkirchen
Acrylamide/Bis Solution (30 % w/v)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Biocoll Separating Solution	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Honeywell, Morris Plains, USA
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller
Dako Pen	Dako, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) low Glucose	CCpro, Oberdorla
DNase	Qiagen GmbH, Hilden
Dodecylsulfate-Na-salt (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Ethanol absolut	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
FastRuler Low Range DNA Ladder	Fermentas, Waltham, USA
Fetal Bovine Serum (FCS) (hitzeinaktiviert)	Sigma, Taufkirchen
Fluoromount-G	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10000X	Biotium Inc., Fremont, USA
Glycine	AppliChem, Darmstadt
Goat serum	Sigma, Taufkirchen
Heparin-Natrium 25 000	Ratiopharm GmbH, Ulm
Hepes	AppliChem, Darmstadt
Hydrochloric acid 32 %	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Honeywell, Morris Plains, USA
Isotone Natriumchlorid-Lösung (0,9 % NaCl)	Braun, Melsungen
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Ketanest S	Pfizer, Berlin
LPS (Lipopolysaccharid) ( <i>Escherichia coli</i> , Serotyp 0111:B4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LTA (Lipoteichoic acid from <i>Staphylococcus aureus</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid	Fluka, München
MESA GREEN qPCR 2X MasterMixPlus 7.5 ml	Eurogentec, Seraing, Belgium
Methanol	Honeywell, Morris Plains, USA

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	CCpro, Oberdorla
Odyssees Protein Molecular Weight Marker	LI-COR Biosciences GmbH, Nebraska, USA
Paraplast	Leica, Wetzlar
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Peptidoglycan from <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S Solution	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
RIPA-Puffer	Sigma, Taufkirchen
Rompun	Bayer, Leverkusen
Roti-Histofix 4 %	Roth, Karlsruhe
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
RotiLoad 1	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Roth, Karlsruhe
TGR5-Inhibitor (SB756050)	MedChemExpress, New Jersey, USA
Thapsigargin	Enzo Life Sciences, Lausen
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
TUDCA (Tauroursodeoxycholic Acid)	Merck, Darmstadt
Tunicamycin from <i>Streptomyces sp.</i>	Sigma, Taufkirchen
Türks Lösung	Merck Millipore, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

### 3.4. Kits

Tabelle 6 Verwendete Kits

Kits	Hersteller
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Mouse Inflammation Kit (CBA)	BD Bioscience, San Jose, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit	Genscript, New Jersey, USA

### 3.5. Software

Tabelle 7 Verwendete Software

Software	Hersteller
BD FACS Diva™ software v 6.1.1	BD Biosciences, San Jose, USA
BD FCAP Array software v 3.0	BD Biosciences, San Jose, USA
Cell <sup>D</sup> software	Olympus, Hamburg
FlowJo™ v 10.1r5	Tree Star Inc., Ashland, USA
Histo v 3.0	W. Gross, Exp. Chirurgie, Uniklinik Heidelberg
Image Studio Lite v 5.2	LI-COR Biosciences GmbH, Nebraska, USA
Image Studio v 3.1	LI-COR Biosciences GmbH, Nebraska, USA
ImageJ v 1.51s	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Inspector Pro v 4.0.469	LaVision BioTec GmbH, Bielefeld
Prism 7	GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA
R2: Genomics analysis and visualization platform	Prof. Dr. R. Versteeg, Academic Medical Center (AMC), Amsterdam, Netherlands
StepOne Software v 2.2.2	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 3.6. Antikörper

Tabelle 8 Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
<b><i>Durchflusszytometrie-Antikörper</i></b>	
anti-mouse CD 106 APC (VCAM-1, clone 429 MVCAM.A)	BioLegend, San Diego, USA
anti-mouse CD 62E APC (E-Selektin, clone RM0034-9J12)	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden
anti-mouse CD 11a APC (LFA-1, clone M17/4)	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CD11b APC (Mac-1, clone M1/70)	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CD54 FITC (ICAM-1, clone YN1/1.7.4)	eBioscience, San Diego, USA
Rat IgG2a K Isotype Control APC (clone eBR2a)	eBioscience, San Diego, USA
Rat IgG2b Isotype Control FITC (clone eB149/10H5)	eBioscience, San Diego, USA
Rat IgG2b K Isotype Control APC (clone eB149/10H5)	eBioscience, San Diego, USA
<b><i>Immunfluoreszenz/Western Blot-Antikörper</i></b>	
anti-mouse ATF4	Abcam plc, Cambridge, United Kingdom
anti-mouse CD 54 (ICAM-1, clone eBioKAT-1)	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CHOP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-mouse GRP78/BiP	Enzo Life Sciences, Lausen
anti-mouse IRE1 $\alpha$ [p Ser724]	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden
anti-mouse Ly-6G (clone 1A8)	BD Pharmingen, San Jose, USA
anti-mouse XBP1	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Goat anti-rabbit IgG (H + L) Cyanine 5	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Goat anti-rat IgG (H + L) Cyanine 5	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA

Antikörper	Hersteller
<b>Western Blot-Antikörper</b>	
anti-mouse GAPDH (C-Terminal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
IRDye® 680RD Donkey anti-Goat IgG (H+L)	LI-COR Biosciences GmbH, Nebraska, USA
IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	LI-COR Biosciences GmbH, Nebraska, USA

### 3.7. Rekombinante Proteine

Tabelle 9 Verwendete rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Hersteller
Recombinant Mouse ICAM-1/CD54 Fc Chimera Protein, CF	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden
Recombinant Mouse P-Selectin/CD62P Fc Chimera Protein, CF	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden
Recombinant Murine KC (CXCL1)	PeptoTech, Rocky Hill, New Jersey, USA

### 3.8. Zelllinien

Tabelle 10 Verwendete Zelllinien

Zellen	Hersteller
MAECs	AG Nawroth, Medizinische Klinik Heidelberg

### 3.9. Primer

Alle Primer wurden mit Hilfe der Universal Probelibrary von Roche entworfen und bei Eurofins erworben.

**Tabelle 11 Verwendete Primer**

<b>Name</b>	<b>Primer forward (5´ - 3´)</b>	<b>Primer reverse (5´ - 3´)</b>	<b>Amplicon (bp)</b>
18S	agt tgg tgg agc gat ttg tc	cgg aca tct aag ggc atc ac	152 bp
ATF4	atg atg gct tgg cca gtg	cca ttt tct cca aca tcc aat c	78 bp
ATF6	gga cga ggt ggt gtc aga g	gac agc tct tcg ctt tgg ac	61 bp
BiP	tgc gtg tgt gtg agg taa gc	gga gga gac acg agc aga ct	68 bp
Casp12	aaa caa acc caa gat tct cat ca	tgt gga tac cca aat agt tcc a	70 bp
CHOP	gcg aca gag cca gaa taa ca	gat gca ctt cct tct gga aca	61 bp
E-Selektin	tcc tct gga gag tgg agt gc	ggg ggg tca aag ctt cac at	67 bp
GAPDH	aag agg gat gct gcc ctt ac	cca ttt tgt cta cgg gac ga	112 bp
ICAM-1	gct acc atc acc gtg tat tcg	tga ggt cct tgc cta ctt gc	82 bp
IL-6	gct acc aaa ctg gat ata atc agga	cca ggt agc tat ggt act cca gaa	78 bp
IRE1 $\alpha$	ctg cct cca gct acc aag a	tcc cca cat aca gtg tca tca	78 bp
CXCL1	aga ctc cag cca cac tcc aa	tga cag cgc agc tca ttg	130 bp
LFA-1	ccc cag act ttt gct act gg	cgt gtg tcc agg ttg tag ctc	66 bp
Mac-1	caa tag cca gcc tca tgt c	gag ccc agg gga gaa gtg	65 bp
MCP-1	cat cca cgt gtt ggc tca	gat cat ctt gct ggt gaa tga gt	76 bp
NUP133	cta ggg aag gag cca gag tat g	cat gac tgc tgt gcg gat ac	72 bp
p47(phox)	cag aga cct cat tca tga cca a	ccc cag cat aaa acc tgc t	74 bp
PERK	cct tgg ttt cat cta gcc tca	atc cag gga ggg gat gat	68 bp
RPL19	cca caa gct ctt tcc ttt cg	gga tcc aac cag acc ttc ttt	114 bp
RPS9	atc cgc caa cgt cac att a	tct tca ctc ggc ctg gac	136 bp
TGR5	gct agg gct ctc acc tgg a	ccc caa cac agc aag aag ag	71 bp
TNF	ctg tag ccc acg tcg tag c	ttg aga tcc atg ccg ttg	97 bp
TRAF2	tca ggt gtg cat cca ttc tc	gcc ttc ttc ata cag gcc ttc	80 bp
VCAM-1	tct tac ctg tgc gct gtg ac	act gga tct tca ggg aat gag t	86 bp
XBP1	tga cga ggt tcc aga ggt g	tgc aga ggt gca cat agt ctg	96 bp

### 3.10. Puffer und Lösungen

Tabelle 12 Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Narkosezusammensetzung	125 mg/kg Esketaminhydrochlorid (Ketanest S), 12,5 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun), 0,5 ml/8 g NaCl (0,9 %)
Superfusionslösung I	NaCl 73,2 g, KCl 3,3 g, CaCl <sub>2</sub> 2,8 g, MgCl <sub>2</sub> 1,9 g, ad 1000 ml Aqua dest.
Superfusionslösung II	14,4 g NaHCO <sub>3</sub> , ad 1000 ml Aqua dest.
IVM-Superfusionslösung	400 ml Aqua dest., 50 ml Superfusionslösung I, 50 ml Superfusionslösung II, CO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> -Gasgemisch
Ammoniumchloridlyse 10x:	1,5 M NH <sub>4</sub> Cl (20,05 g), 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> (2,1 g), 0,01 M EDTA (0,93 g), Add to 250 ml ddH <sub>2</sub> O, Sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern, vor der Verwendung 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnen
TBE	1 M Tris-HCl (121,1 g), 1 M Borsäure (61,8 g), 20 mM EDTA (7,4 g), pH 8,3 mit HCl einstellen
TBS (10X)	60,6 g Tris, 85,2 g NaCl, mit 1 M HCl auf pH 7,6 einstellen, ad H <sub>2</sub> O auf 1000 ml, vor der Verwendung 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnen
TBS-Triton	100 ml TBS, 0,025 ml Triton X-100
TBS + 1 % BSA	8 ml TBS, 0,08 g BSA
TBS + 1 % BSA + 10 % goat serum	3600 µl TBS + 1 % BSA, 400 µl normal goat serum
10 % APS	5 g APS, 50 ml H <sub>2</sub> O, bei -20 °C lagern
4X Tris-Cl/SDS pH 8,8	91 g TRIS in 300 ml H <sub>2</sub> O lösen, pH auf 8,8 mit HCl einstellen, 2 g SDS, ad H <sub>2</sub> O auf 500 ml
4X Tris-Cl/SDS pH 6,8	15,13 g TRIS in 100 ml H <sub>2</sub> O lösen, pH auf 6,8 mit HCl einstellen, 1 g SDS, ad H <sub>2</sub> O auf 250 ml
Running Buffer (5X)	15,1 g TRIS, 72 g Glycin, 5 g SDS, ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Transferpuffer	3,03 g TRIS, 14,4 g Glycine, 200 ml Methanol, auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Blockier-Puffer	0,02 % Tween, 2,5 % Milch, TBS
Zellkulturmedium	440 ml DMEM low Glucose, 50 ml FCS, 5 ml NEAA, 5 ml Pen/Strep
Flusskammer-Zellmedium	DMEM, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 % BSA, 10 mM Hepes
Milchpulverlösung 10 %	40 ml PBS, 4 g Milchpulver

### 3.11. Versuchstiere

Die SPF-Haltung der Mäuse erfolgte in einem ausschließlich für Nager vorgesehenen Tierstall der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg. Ein Hygiene-Monitoring nach den Empfehlungen für die Gesundheitsüberwachung von Labornagern gemäß FELASA und GV-SOLAS wird wöchentlich durchgeführt. Die Temperatur liegt bei  $22 \pm 2$  °C und die relative Luftfeuchtigkeit bei 50 - 60 %. Des Weiteren besteht ein künstlicher Tag-/Nachtrhythmus von 12 h. Alle Bedingungen werden konstant geregelt. Standardfutter und Trinkwasser stehen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Tierhaltung sowie die Durchführung der Versuche entsprechen den gesetzlichen Tierschutzverordnungen und wurden vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt (Az 35-9185.81/G-111/12 & Az 35-9185.81/G-101/17).

Für die Intravitalversuche erwiesen sich schwangere Mäuse im Gestationsstadium E13 – E17 von Vorteil, da in diesen Stadien die Feten bzgl. ihrer Größe gut zu untersuchen sind und die Wahrscheinlichkeit einer Frühgeburt begrenzt ist. Für diese Versuche wurden Haremsverpaarungen vom Tierpfleger angesetzt; es wurden also zwei Weibchen mit einem Männchen zusammengesetzt. Nach dem Zusammensetzen der Tiere wurden die weiblichen Mäuse täglich auf einen Vaginalplug untersucht. Sobald dieser festgestellt war, wurde das Weibchen separiert, täglich gewogen und mittels Palpation getestet, ob die Maus gravide ist. Wurde eine Schwangerschaft festgestellt, zählt der Tag, an dem der Vaginalplug entdeckt wurde als Entwicklungstag 0.

Folgende Zuchtstämme wurden verwendet:

- LysEGFP-Mäuse (C57Bl/6-Mäuse der Linie C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr)
- CHOP-KO-Mäuse (B6.129S(Cg)-Ddit3<sup>tm2.1Dron</sup>/J)

Die verwendeten C57Bl/6-Mäuse hatten einen EGFP *knockin*. Die Insertion dieses Transgens erfolgte in den Lysozym M (*lys*) Genlocus, der spezifisch für Neutrophile und Monozyten ist [73], sodass diese Zelltypen dann mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops zu identifizieren waren. Die Insertion wurde in regelmäßigen Abständen mittels Genotypisierung mit Hilfe einer PCR von Schwanzbiopsien überprüft. Vornehmlich wurden diese Mäusestämme in einem Alter von 8 bis 20 Wochen verwendet.

## 4. Methoden

### 4.1. Limulus-Amöbozyten-Test (LAL-Test)

Dieser Test dient der quantitativen *in vitro*-Analyse von Endotoxin-Konzentrationen. Er beruht auf einer Reaktion der Amöbozyten aus dem Blut von Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*) mit den bakteriellen Endotoxinen (Lipopolysacchariden). Zur Detektion wird ein synthetisches Substrat verwendet, dessen Farbumschlag photometrisch bestimmt wird und proportional zur Endotoxinkonzentration ist. Die Messung ist sehr spezifisch und sensitiv in einem Bereich von 0,01 – 1 EU/ml.

Dieser LAL-Test wurde nach Herstellerangaben mit Duplikaten durchgeführt und die Endotoxinunits/ml verschiedener LPS-Chargen mittels *ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit* ermittelt und als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt.

### 4.2. HPLC (*high performance liquid chromatography*) mit Massenspektrometrie

Die Analyse der Plazentagängigkeit von TUDCA erfolgte mit Hilfe der HPLC-MS Methode. Hierfür wurden Blutproben nach den Überlebensversuchen entnommen. Bei den adulten Mäusen per Herzpunktion und bei den Feten nach einer Dekapitation und anschließend in EDTA KE-Röhrchen 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert und das Plasma bis zur Verwendung eingefroren.

Mit diesem chromatographischen Trennverfahren sollten die einzelnen Bestandteile des Plasmas untersucht werden. Das besondere Augenmerk lag hierbei auf der Konzentration der Tauroursodeoxycholsäure bei den fetalen Proben. Durch verschieden starke Interaktionen mit der stationären Phase, verlassen die Bestandteile des Plasmas die Trennsäule nach unterschiedlichen Retentionszeiten und können so mit Hilfe von Standards in der Massenspektrometrie einzeln detektiert werden. Die angeschlossene Massenspektrometrie dient nach einer Ionisierung der Proben in der Gasphase der Identifikation und Quantifizierung der einzelnen Substanzen anhand ihrer Massenspektren. Diese Versuche wurden durch Dr. H. Gan-Schreier in der Abteilung von Prof. Stremmel in der Gastroenterologie, Medizinische Klinik IV in Heidelberg durchgeführt.

### 4.3. Induktion der Inflammation

Zu Beginn des Projektes stand die Findung einer geeigneten Substanz und deren Dosierung, die eine Inflammation in diesem Mausmodell auslöst und vergleichbar zum klinischen Zustand wäre. Es wurden verschiedene Substanzen mit Zellwandbestandteilen wie Peptidoglykan und Lipoteichonsäure (LTA) von dem gram-positiven Bakterium *S. aureus* im Mausmodell getestet. In den Vorversuchen wurden Peptidoglykan (1 µg/µl in PBS) und LTA (1 µg/µl in PBS) den Mäusen (im Stadium E15) 20 h sowie 4 h vor Versuchsbeginn intraperitoneal injiziert. Bei Peptidoglykan wurden drei verschiedene Konzentrationen verwendet (500 – 1000 µg/kg KGW) und bei LTA neun verschiedene (3 – 100 mg/kg KGW).

Es stellte sich heraus, dass Lipopolysacchharide (LPS) des gram-negativen Bakteriums *E. coli* mit dem Serotyp 0111:B4 am besten in folgender Dosis und Applikation geeignet sind: für die Überlebensversuche 1 mg/kg zweimal (20 h und 4 h) vor der OP verabreicht (10 µg LPS/50 µl NaCl). Für die Intravitalversuche wurde eine Konzentration von 0,25 mg/kg LPS verwendet, die eine starke Leukozytenrekrutierung, aber i. d. R. keinen fetalen Tod sowie keine Frühgeburten auslöste. Nach der zweimaligen LPS-Gabe konnte sowohl eine langfristige Leukozyteninfiltration ins Gewebe (durch die 20 h-Gabe), als auch eine akute Leukozytenrekrutierung in den Gefäßen (durch die 4 h-Gabe) detektiert werden. Bei den Kontrolltieren erfolgte eine zweimalige Applikation von 200 µl NaCl, als Vehikel-Kontrolle. Die TUDCA-Kontrolltiere wurden zur Analyse der Überlebenschance und Frühgeburlichkeit mit 3x 1000 mg/kg TUDCA behandelt (28 h, 20 h, 4 h vor Versuchsbeginn). Für die Intravitalversuche wurde eine Konzentration von je 500 mg/kg TUDCA verwendet. Bei den TUDCA/LPS-behandelten Tieren erfolgte zuerst eine alleinige TUDCA-Gabe, danach zwei TUDCA-Injektionen parallel zu der jeweiligen LPS-Applikation (d. h. 3x 1000 mg/kg TUDCA & 2x 1 mg/kg LPS für die Überlebensversuche bzw. 3x 500 mg/kg TUDCA & 2x 0,25 mg/kg LPS für die Leukozyteninfiltration). Die schwangeren Mäuse wurden auf eine Gewichtsveränderung und ihre körperliche Verfassung während der Versuchsdurchführung hin untersucht.

Für die Analyse des ER-Stresses wurden zwei ER-Stressinduktoren als Positivkontrollen verwendet. Hierzu wurde den schwangeren Mäusen 1 mg/kg Thapsigargin (5 mg in 250 µl DMSO gelöst, 1:80 verdünnt mit NaCl (Endkonzentration von 1,25 % DMSO)) sowie 3 mg/kg Tunicamycin (1,25 µg/µl in H<sub>2</sub>O) i. p. (20 h vor Versuchsbeginn) verabreicht.

#### **4.4. Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit und Frühgeburtenrate**

Bei den Überlebensversuchen wurden die Mäuse nach der Injektion mittels einer Digitalkamera über Nacht überwacht, um mögliche Frühgeburten und einen möglichen extrauterinen Tod anhand fehlender Bewegungen festzustellen. Das intrauterine Überleben wurde zum Endpunkt des Versuchs mit Hilfe einer intravitalmikroskopischen Betrachtung anhand des Blutflusses in den Gefäßen des Dottersacks beurteilt.

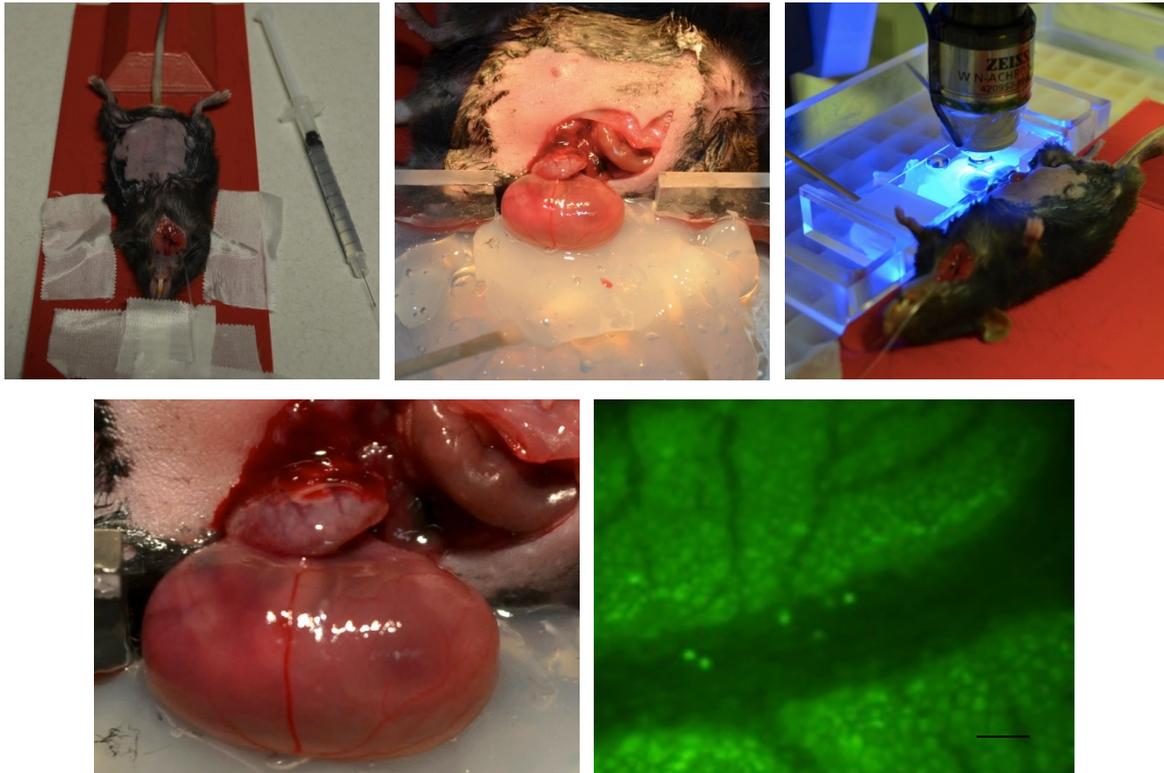
#### **4.5. Intravitalmikroskopie**

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie ist es möglich *in vivo* die dynamischen Prozesse in den Blutgefäßen der Mikrovaskulatur des fetalen Dottersacks in Echtzeit zu beobachten (Abbildung 4). Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse mit Hilfe einer i. p. Injektion des Anästhetikums Ketamin und des Analgetikums Xylazin (siehe Materialliste) narkotisiert. Mit Hilfe einer Heizmatte konnte die Körpertemperatur aufrechterhalten werden. Die Wirkung der Narkose wurde mit Hilfe des Zwischen-Zehen-Reflexes überprüft und anschließend mittels Tracheotomie ein Tubus in die Trachea der Maus eingeführt. Hierzu wurde eine Hautinzision vorgenommen, die Trachea frei präpariert und in einem Zwischenknorpelraum eingeschnitten. Der Tubus wurde in die Trachea eingeführt, mittels zwei vorgelegter Seidenfäden fixiert und diente so der verbesserten Atmung der Maus. Die *Arteria carotis* wurde anschließend mit einer Pinzette frei präpariert, kranial mit einem Faden abgebunden und ein weiterer Faden wurde proximal vorgelegt, um den Katheter zu fixieren (Abbildung 5). Mit Hilfe einer Mikrogefäßklemme wurde temporär der Blutfluss der *A. carotis* unterbunden, um die Arterie eröffnen und den Katheter einführen zu können. Nachdem der Katheter mittels vorgelegten Fadens fixiert wurde, konnte die Gefäßklemme gelöst werden. Dieser Katheter diente der weiteren intraarteriellen Narkoseverabreichung während des Versuchs.



Abbildung 4 Intravitalmikroskopischer Arbeitsplatz.

Anschließend wurde ein Uterushorn mit Hilfe eines abdominal entlang der *Linea alba* vorgenommenen Schnittes freigelegt. Ein einzelner Fetus wurde isoliert, auf einer Plexiglasbühne auf Silikongel gebettet, der fetale Dottersack freipräpariert, mit einem 37 °C warmen Puffer superfundiert und mit einem Objektträger bedeckt. Die Plexiglasbühne wurde auf dem Kreuztisch des Fluoreszenzmikroskops platziert und es folgten die Aufnahmen am Intravitalmikroskop. Das verwendete Fluoreszenzmikroskop war mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv und mit einer charge-coupled-device-(CCD)-Kamera ausgestattet.



**Abbildung 5 Ablauf und Vorbereitung der Intravitalversuche.** Mikrochirurgische Operation mit Trachea-Kanüle, A. carotis-Katheter, Freilegung des fetalen Dottersacks sowie die fluoreszenzbasierte Analyse der Leukozytenrekrutierung in fetalen Dottersackgefäßen. Maßstab 25  $\mu\text{m}$ .

Damit physiologische Untersuchungsbedingungen gewährleistet werden konnten, wurde der fetale Dottersack durchgehend mit einem auf 37 °C temperierten und mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % N<sub>2</sub> begasten Biocarbonat-Puffer superfundiert und die Gefäße des Dottersacks mittels einem Wasserimmersionsobjektivs betrachtet. Gefäße mit einem Durchmesser zwischen 25 – 80  $\mu\text{m}$  und einer Blutflussgeschwindigkeit > 450  $\mu\text{m}/\text{s}$  wurden in den Fokus genommen und eine Minute lang digital videodokumentiert. Ziel war die Aufnahme zweier Feten mit jeweils mindestens fünf Gefäßen. Anschließend wurden die Lunge, Niere und Plazenta der Feten entnommen und in Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Von zwei weiteren Feten wurde jeweils die Lunge und Leber entnommen und in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Von den adulten Mäusen wurde ebenfalls die Lunge und Niere entnommen und in PFA fixiert. Mittels Glaskapillare wurde von den dekapitierten Feten und von den adulten Mäusen retroorbital Blut abgenommen und in einem Röhrchen mit 90  $\mu\text{l}$  Türks-Lösung homogenisiert, um die kernhaltigen Zellen anzufärben. Die Anzahl an Leukozyten/ml Blut konnte anschließend unter einem Durchlichtmikroskop mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

Zur Auswertung der hämodynamischen Parameter wurde das Programm ImageJ verwendet und die Gefäßlänge, -durchmesser sowie die Geschwindigkeit der fließenden Leukozyten bestimmt. Zur Analyse der Mikrozirkulation wurde die Anzahl an rollenden sowie adhären (länger als 30 Sekunden fest am Endothel sitzenden) Leukozyten bestimmt.

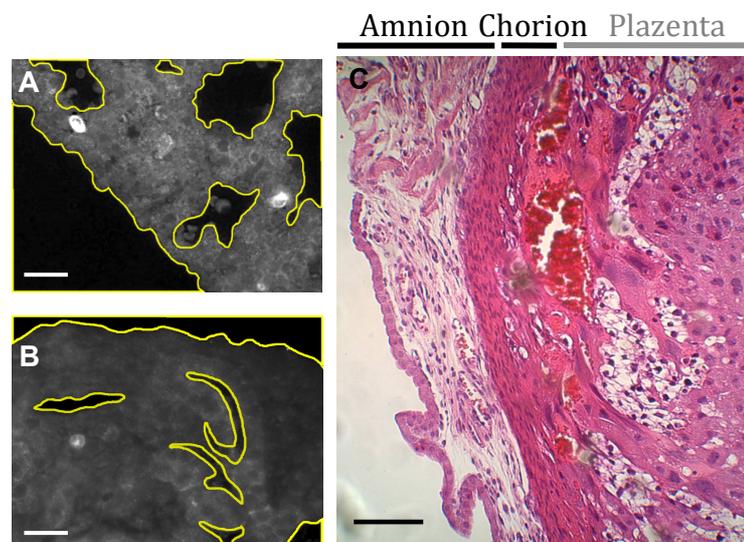
#### **4.6. Immunhistochemie**

Nach einer Fixation von mindestens 24 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C, konnten die Organe in Einbettkassetten zur Entwässerung umgelagert werden. Dies erfolgte mittels einer zweistündigen Inkubation unter fließendem Wasser, um das PFA zu entfernen, dann die weiteren zweistündigen Inkubationsschritte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und anschließend 100 % Ethanol) und einer zweimaligen Chloroform-Inkubation. Abschließend erfolgte die Inkubation in flüssigem Paraffin bei 60 °C über Nacht. Für die Einbettung in Paraffin wurde die Plazenta in der Mitte zerteilt und auf den Schnittflächen platziert, sodass das Chorion später betrachtet werden konnte. Die Paraffinblöcke wurden bei -20 °C gelagert, anschließend im Mikrotom eingespannt, 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrostPlus-Objekträger gezogen.

Nach 30 min Trocknung bei 50 °C wurden die Schnitte zur Entparaffinierung zweimal in Rotihistol für 15 min, anschließend einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) und dest. Wasser für jeweils 7 min inkubiert und dann gefärbt. Sie wurden für eine gezielte Applikation mit einem wasserabweisenden DakoPen umrandet. Eine Feuchtkammer verhinderte das Austrocknen der Gewebsschnitte, anschließend wurden sie zweimal mit TBS-T gewaschen und permeabilisiert, es erfolgte eine einstündige Inkubation mit 10 % normal goat serum mit 1 % BSA in TBS bei Raumtemperatur, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu blockieren. Darauf folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Für die Analyse der Leukozyteninfiltration wurde ein Antikörper gegen Ly-6G (1:200) verwendet; für die Inflammation ein Antikörper gegen ICAM-1 (1:200) und für die Untersuchung des ER-Stresses Antikörper gegen die Moleküle IRE1α (1:200), BiP (1:100), XBP1 (1:100), CHOP (1:200) sowie ATF4 (1:100). Anschließend wurden die Schnitte zweimal 5 min mit TBS-T gewaschen und eine Stunde bei RT im Dunkeln mit dem passenden Sekundärantikörper (Ziege-anti-Ratte oder Ziege-anti-Kaninchen, IgG (H+L) Cy5-konjugiert, 10 µg/ml in TBS mit 1 % BSA) inkubiert.

Der Sekundärantikörper wurde in einem fünfminütigen Waschschrift entfernt und dann die Schnitte mit 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) für eine Minute inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Nach dreimaligem Waschen mit TBS und einmaligen Waschen mit H<sub>2</sub>O, wurden die Schnitte mit Fluoromount-G bedeckt und mit einem Deckglas versiegelt. Anschließend konnten sie mit einem Fluoreszenzmikroskop und einer CCD-Kamera analysiert werden. Pro Organpräparat wurden randomisiert zehn Aufnahmen angefertigt.

Zur Analyse der Organinfiltration wurde die Anzahl an *Foci* bestimmt und auf das Parenchym normiert. Hierzu wurden mittels Histo-Programms die analysierten Flächen von Gefäßen und Respirationstrakt (Alveolen und Bronchiolen) in den Lungenschnitten und die Fläche von Gefäßen und Ducti in den Nierenschnitten von der Gesamtfläche abgezogen (Abbildung 6 A & B). Die Ly6G-positiven Zellen wurden pro Gesichtsfeld bestimmt und als Anzahl pro mm<sup>2</sup> Parenchym  $\pm$  SEM dargestellt. Bei den Plazentaschnitten wurde nur die Anzahl der infiltrierten Leukozyten im Bereich des Chorions untersucht (Abbildung 6 C).



**Abbildung 6 Auswertung der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten.** Darstellung repräsentativer mikroskopischer Aufnahmen der Infiltration von Neutrophilen in A) die fetale Lunge und B) die Niere sowie C) das Chorion, bei denen ausschließlich die Fläche des Parenchyms berücksichtigt wurde (A + B). Zur Auswertung der Plazentaschnitte wurde ausschließlich der Bereich des Chorions analysiert. Maßstab = 25  $\mu$ m.

Die immunhistochemischen Färbungen bzgl. der Inflammation sowie des ER-Stresses wurden anhand von Fluoreszenzintensitäten ab einem jeweiligen individuellen Schwellenwert mittels ImageJ nach einer Kalibrierung bestimmt. Dadurch wurden Bereiche außenvorgelassen, die kein Gewebe enthielten (Lumen von Gefäßen und Ducti).

Der CTCF (*Corrected Total Cell Fluorescence*)-Wert wurde mit folgender Formel berechnet und der Mittelwert der Messungen mit dazugehörigem Standardfehler angegeben:

$$CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} \times \text{Mean fluorescence of background})$$

#### **4.7. Bestimmung des Zytokin-Plasmaspiegels mittels CBA-Kit**

Der fetale sowie maternale Zytokin-Plasmaspiegel zeigt den Grad der Inflammation an, daher wurde nach den oben beschriebenen Intravitalversuchen Blut der dekapitierten Feten mittels Glaskapillare abgenommen und pro Muttermaus gesammelt. Bei der adulten Maus wurde das Blut mittels Herzpunktion entnommen. Anschließend wurde das Blut für 10 min, bei RT und 8000 rpm abzentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei -80 °C gelagert. Für die Analyse von TNF, MCP-1, IL-6 und IFN $\gamma$  wurde das *cytometric bead array (CBA) mouse inflammation kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden mittels BD LSR II Durchflusszytometers gemessen, der BD FCAP Array software v 3.0 ausgewertet und als Mittelwerte von 7 – 20 unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM als absolute Werte in pg/ml dargestellt.

#### **4.8. Zellkultur**

##### **4.8.1. Kultivierung der murinen aortalen Endothelzellen (MAECs)**

Die Kultivierung der MAECs erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO $_2$ -Gehalt, und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar Flow-Bank durchgeführt. Die Endothelzellen wurden in DMEM Zellkulturmedium kultiviert, wobei alle zwei Tage das Medium gewechselt wurde. Ab einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen gesplittet und in neue Zellkulturgefäße passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen mit auf 37 °C erwärmter phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit Accutase für 5 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym dient mit seinen proteolytischen Eigenschaften dazu die Zellverbindungen zu spalten, sodass sich die adhärenen Zellen von der Zellkulturflasche lösen und anschließend in Suspension vorlagen. Unter einem inversen Durchlichtmikroskop wurde das Ablösen der Zellen kontrolliert und anschließend die Accutase-Reaktion mit PBS abgestoppt.

Darauf folgte das Überführen der Zellsuspension in ein Falcon und die Zellen wurden bei 300 g für 5 min bei RT pelletiert. Nachdem der Überstand entfernt und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert wurde, erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl mit Hilfe von Trypanblau und einer Neubauer-Zählkammer. Anschließend wurde die für die Versuche benötigte Zellzahl in Zellkulturplatten oder für die weitere Kultivierung in Kulturflaschen ausgesät.

#### **4.8.2. Durchführung von *in vitro*-Versuchen**

*In vitro* sollte der Inflammationszustand der Endothelzellen auf der mRNA-Ebene analysiert werden. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin sowie die Zytokine KC, MCP-1, IL-6, und TNF sind Indikatoren für den Grad der Inflammation. Auch der ER-Stress-Signalweg wurde anhand der Expression der MAECs untersucht. Im Folgenden wurden wichtige Moleküle der UPR-Kaskade wie z. B. die Rezeptoren IRE1 $\alpha$ , PERK und ATF6 sowie das Chaperon BiP und die Transkriptionsfaktoren ATF4, XBP1, CHOP und Casp12 in den Fokus genommen. Auch für weitere Screening-Versuche wurden die MAECs verwendet, um beispielsweise p47(phox), TRAF2 und TGR5 zu untersuchen. Hierfür wurden die Endothelzellen in einer 6-Well-Platte ausgesät (400.000 Zellen/Well) und für drei Stunden mit den verschiedenen Substanzen behandelt. Bei den beiden Gruppen mit einer zusätzlichen TUDCA-Vorbehandlung, wurde TUDCA zweimal zu den Zellen gegeben (30 min vorher und zum Versuchsbeginn parallel zu den anderen Substanzen). Folgende Konzentrationen wurden verwendet: Kontrolle (200  $\mu$ l PBS); TUDCA-Behandlung 26,7  $\mu$ l TUDCA (2 mg/ml); LPS-Behandlung 200  $\mu$ l LPS (100 ng/ml); TUDCA/LPS-Behandlung 26,7  $\mu$ l TUDCA & 200  $\mu$ l LPS; Vorbehandlung TUDCA 2x 26,7  $\mu$ l TUDCA; Vorbehandlung TUDCA/LPS 2x 26,7  $\mu$ l TUDCA & 1x 200  $\mu$ l LPS; Tunicamycin-Behandlung 8  $\mu$ l TM (5  $\mu$ g/ml); Thapsigargin-Behandlung 40  $\mu$ l TG (5  $\mu$ g/ml). Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 5 min mit Accutase bei 37 °C inkubiert und in ein Falcon überführt. Die Wells wurden mit je 2 ml PBS gespült und der Inhalt ebenfalls in das Falcon überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 300 g und RT, wurde das Pellet in 350  $\mu$ l des RLT-Lyse-Puffers und 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol gelöst und mit der RNA-Isolierung und anschließenden qPCR fortgeföhren.

Für die Untersuchungen bzgl. der TUDCA-Dosis-Wirkungskurve erfolgte eine einmalige TUDCA-Applikation parallel zum LPS (100 ng/ml) bei den Versuchen ohne zusätzliche Vorbehandlung. Bei der zweiten Variante mit einer zusätzlichen TUDCA-Vorbehandlung erfolgte 30 min vor der TUDCA- und LPS-Applikation eine weitere TUDCA-Gabe. Folgende TUDCA-Konzentrationen wurden verwendet: 0,25 mg/ml TUDCA; 0,5 mg/ml TUDCA; 1 mg/ml TUDCA; 2 mg/ml TUDCA; 4 mg/ml TUDCA oder 8 mg/ml TUDCA.

#### **4.8.3. Wirkung des TGR5-Inhibitors**

In einem *in vitro*-Versuch sollten die Effekte des TGR5-Inhibitors SB756050 (1 mg/200 µl DMSO) in einer Konzentration von 10 µM, 1 µM und 1 nM getestet werden. Die zu testenden MAECs (400.000 Zellen/Well) wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Als Kontrolle erfolgte eine Applikation des Inhibitors bei unbehandelten Zellen; so konnten mögliche morphologische Unterschiede oder Apoptose der Zellen optisch detektiert werden. Außerdem wurde der Inhibitor zusätzlich zu der TUDCA (2 mg/ml) & LPS (100 ng/ml)-Behandlung verabreicht, um zu untersuchen ob der zuvor festgestellte Effekt durch TUDCA nun gehemmt wird. Daher wurden jeweils in Duplikaten 10 µM, 1 µM und 1 nM des Inhibitors in das jeweilige Well appliziert und 3 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine RNA-Isolation und RT-qPCR zur Überprüfung des Effekts auf die Genexpression des Inflammationsmarkers ICAM-1.

#### **4.9. Real-time-qPCR**

Für die Analyse der mRNA-Expression von verschiedenen Molekülen wurde aus diversen Zelltypen die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und anschließend eine *real-time*-qPCR durchgeführt.

##### **4.9.1. Aufreinigung der Proben**

Der Grad der Inflammation sollte bei den Neutrophilen Granulozyten auch auf der mRNA-Ebene untersucht werden. Daher wurde der Aktivierungszustand der Neutrophilen mittels RT-qPCR bzgl. der Oberflächenproteine LFA-1 und Mac-1 untersucht.

Hierzu wurde von 12 C57Bl/6-Mäusen mittels einer heparinisierten Spritze durch Herzpunktion das gesamte Blut entnommen und auf 30 ml mittels PBS aufgefüllt. In einem Falcon wurden 20 ml Biocoll Separating Solution vorgelegt und mit 10 ml des Blutes vorsichtig überschichtet. Die auf drei Falcons aufgeteilten Proben wurden 25 min bei 1000 rpm (23 °C, Bremse 0, Anlauf 5) abzentrifugiert und der Überstand bis auf 2 ml abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet in 12 ml Lyse-Puffer resuspendiert, 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert und erneut bei 4 °C für 10 min und 1100 rpm abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde und zwei Waschschriffe mit 8 ml PBS erfolgten, wurde das Pellet in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen und bis zur RNA-Isolation bei -25 °C eingefroren.

#### **4.9.2. RNA-Isolation**

Die Isolation der Ribonukleinsäure erfolgte mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Die Neutrophilen Granulozyten wurden durch das chaotrope Salz Guanidiniumthiocyanat lysiert. Es wurden 350 µl des RLT-Lyse-Puffers und 3,5 µl β-Mercaptoethanol dazugegeben, damit die Zellen lysiert werden und um die Bildung von Disulfidbrücken zu freien Thiolen zu verhindern. Eine Homogenisierung durch eine zusätzliche mechanische Lyse war nicht notwendig, da die Zellen bereits vereinzelt vorlagen. Die Proben wurden nach Herstellerangaben 1:2 mit Ethanol versetzt und anschließend in Zentrifugations-Säulen pipettiert, wobei die RNA dort an die Silica-Membran gebunden wird. Verunreinigungen wurden durch mehrere Waschschriffe mit zwei Waschpuffern weitestgehend eliminiert. Anschließend erfolgte zusätzlich ein enzymatischer Abbau mit dem RNase-Free DNase Set von Qiagen, um möglichst alle DNA-Kontaminationen zu eliminieren. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben und die reine RNA wurde schlussendlich mit 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Um die Reinheit der RNA-Präparation zu bestimmen, wurde das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm bzw. 280 nm mit Hilfe eines NanoDrops bestimmt. Reine RNA liegt vor, wenn das Verhältnis von E260/E280 bei 2,0 liegt.

### 4.9.3. cDNA-Synthese

Nach der RNA-Isolation wurde durch eine reverse Transkription cDNA synthetisiert. Hierzu wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von applied Biosystems verwendet. Pro Ansatz wurde 1 µg Total-RNA in 10 µl verwendet und mit 10 µl des Master Mixes gemischt, der aus 2 µl 10X RT Puffer, 0,8 µl 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10X RT Random Primer, 1 µl MultiScribe Reverse Transkriptase und 4,2 µl nuclease-free H<sub>2</sub>O bestand.

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden zentrifugiert und im Thermocycler platziert (10 min bei 25 °C, 120 min bei 37 °C, 5 min bei 85 °C, Abkühlung auf 4 °C). Anschließend lag die synthetisierte cDNA vor, die mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern durch hinzugegebene Desoxyribonukleosidtriphosphate dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) mit dem Enzym Reverse Transkriptase neu gebildet wurde. Dies konnte nun zur Quantifizierung der Genexpression in der RT-qPCR eingesetzt werden.

### 4.9.4. Real-time-qPCR

Bei diesen Versuchsreihen wurde eine semiquantitative *real-time* PCR durchgeführt. Bei der klassischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden *in vitro* spezifische Nukleinsäure-Sequenzen mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase selektiv exponentiell amplifiziert. Eine PCR durchläuft erstens eine Denaturierung, also eine Auftrennung der DNA-Doppelstränge, zweitens eine Anlagerung der Primer (*Annealing*) und dann die Verlängerung des neu synthetisierten Strangs (*Elongation*). Bei dieser Synthetisierung wird mit Hilfe der DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern, der komplementäre Strang durch hinzugegebene Desoxyribonukleosidtriphosphate dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) gebildet. Bei jedem weiteren Zyklus dienen die bereits neusynthetisierten Stränge als neue Matrizen, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung des Templates erreicht wird. In der Praxis ist eine 100%ige Effizienz, bei der das Template in jedem Zyklus verdoppelt wird, kaum zu erreichen, da die Reaktionen meist nicht optimal verlaufen. Die PCR erreicht nach einer bestimmten Zyklenzahl eine Plateauphase, das heißt zu diesem Zeitpunkt sind entweder die Reaktionspartner wie z. B. die dNTPs oder die Primer aufgebraucht, die Enzymaktivität hat nachgelassen oder die Menge des Produktes behindert die Reaktion. Für eine absolute Quantifizierung der Ausgangsmenge ist eine quantitative PCR nötig.

Der Vorteil einer quantitativen *real-time* PCR ist, dass die Reaktion in Echtzeit mittels Fluoreszenzmessungen verfolgt und am Ende der PCR die absolute Menge der amplifizierten DNA bestimmt werden kann. Für die Fluoreszenzmessung kann SYBR-Green verwendet werden, da sich dies in die Furchen der DNA-Helix einlagert, und daher sich die Fluoreszenzintensität der Probe adäquat erhöht. Am Ende jedes Zyklus findet die Detektion dieser Fluoreszenz statt. Die Reaktion verläuft zuerst linear, dann exponentiell und endet in einer Plateauphase. Sobald das Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen überschreitet, wird der Ct-Wert gemessen. Der Ct-Wert steht für den *cycle threshold*-Wert, dies ist der Schwellenwert, ab dem die Reaktion exponentiell verläuft.

Für die qPCR wurde die cDNA 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Es wurden 18 µl des Master Mixes in einem Well der 96-Well-Platte vorgelegt und 2 µl cDNA hinzugegeben.

- 2 µl cDNA Template (1:10 verdünnt)
- 10 µl SYBR Green Master Mix
- 0,5 µl forward Primer (4 µM)
- 0,5 µl reverse Primer (4 µM)
- 9 µl H<sub>2</sub>O

Jede Probe wurde in Duplikaten und mit Negativkontrollen (H<sub>2</sub>O) aufgetragen. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Universal ProbeLibrary der Firma Roche entworfen und bei EurofinsGenomics erworben. Für jede Probe wurden jeweils drei Referenzgene (RPS9, GAPDH, 18S) verwendet. Diese wurden aus einem Pool von fünf Referenzgenen aufgrund des geringsten Variationskoeffizienten ausgewählt.

Schlussendlich wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie versiegelt, 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert, im Thermocycler platziert und folgendes Programm gestartet:

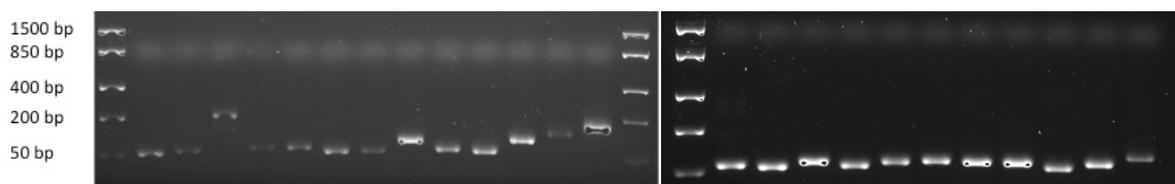
Tabelle 13 Verwendetes qPCR-Programm

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
<i>Pre cycle</i>	50	2 Minuten	1
Enzymaktivierung	95	10 Minuten	1
Denaturierung	95	15 Sekunden	45
<i>Annealing und Elongation</i>	60	1 Minute	
Schmelzkurve	95	15 Sekunden	1
	60	20 Sekunden	1
	95	15 Sekunden	1

Bei der Auswertung werden die Mittelwerte der Ct-Werte der drei Referenzgene (GAPDH, RPS9, 18S) und der Mittelwert der Proben (der Duplikate) voneinander abgezogen ( $\Delta$ -Ct). Der Kontrollwert wurde gleich 1 gesetzt und die ermittelten Werte ( $2^{\Delta - \Delta Ct}$ ) der anderen Behandlungen auf diesen bezogen, sodass eine relative Auswertung möglich war. Dargestellt ist der Mittelwert als *fold change* von drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM.

Die Reinheit der Amplifikate wurde anhand der Schmelzkurve sowie einer gelelektrophoretischen Auftrennung beurteilt (Abbildung 7). Es wurde kontrolliert, ob nach der Auftrennung mit Hilfe eines Agarosegels (1,8 %) nur eine spezifische Bande sowie ein spezifischer *Peak* in der Schmelzkurve vorlag.

Es wurden 1,08 g Agarose in 60 ml TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Durch die Zugabe von 8  $\mu$ l GelRed, konnte später die DNA sichtbar gemacht werden. Nachdem das Gel gegossen und abgekühlt war, konnte es mit den Proben (10  $\mu$ l Probe und 2  $\mu$ l Loading Buffer (6X)) und dem Marker (1,5  $\mu$ l) beladen werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst 20 min bei 60 V und anschließend für weitere 30 min bei 120 V. Die Visualisierung der DNA fand mittels ChemiDoc XRS+ von BioRad statt.



**Abbildung 7 Überprüfung der Primer aus der real-time qPCR.** Auftragung Gel 1: DNA Ladder, TGR5, E-Selektin, KC, ICAM-1, VCAM-1, LFA-1, Mac-1, PSGL-1, MCP-1, IL-6, GAPDH, RPS9, 18S. Gel 2: DNA Ladder, ATF4, CHOP, XBP1, PERK, TRAF2, Casp12, IRE1a, p47(phox), ATF6, BiP, TNF. FastRuler Low Range DNA Ladder von Fermentas.

#### 4.10. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression der Oberflächenproteine (LFA-1 und Mac-1) auf Neutrophilen analysiert. Adulte Mäuse wurden *in vivo* mit 200 µl NaCl; 500 mg/kg TUDCA; 0,25 mg/kg LPS; 500 mg/kg TUDCA & 0,25 mg/kg LPS (d. h. entsprechend dem intravitalmikroskopischen Ansatz) behandelt und nach 3 h das Blut mittels Herzpunktion entnommen. Die Erythrozyten wurden mittels Ammoniumchlorid lysiert. Dabei wurde das Blut auf 2 ml Gesamtvolumen mit PBS aufgefüllt und mit 12 ml des Lysepuffers vermischt. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Proben für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend bei 1000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes und zweimaligem Waschen mit 8 ml FACS-Puffer, wurde das Pellet mit FACS-Puffer resuspendiert und á 100 µl auf die Anzahl der benötigten Röhrchen aufgeteilt. 1 µl des entsprechenden Antikörpers (LFA-1; Mac-1) kam hinzu und es wurde für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch die Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und einem Zentrifugationsschritt von 5 min, 1000 rpm bei 4 °C entfernt. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspendieren des Pellets in 400 µl FACS-Puffer, wurden die Fluoreszenzintensitäten im Neutrophilen-Gate durchflusszytometrisch gemessen. Dabei wurden die Gruppen mit Serumantikörper mit der Isotypenkontrolle und der ungefärbten Probe verglichen.

In Analogie wurden endotheliale Adhäsionsmoleküle (ICAM-1; VCAM-1; E-Selektin) auf MAECs untersucht. Dazu wurden in den jeweiligen experimentellen Gruppen die Endothelzellen isoliert, für 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml FACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 600 µl FACS-Puffer resuspendiert, á 100 µl auf die FACS-Röhrchen aufgeteilt und mit jeweils 1 µl Antikörper gefärbt. Die weitere Prozedur erfolgte vergleichbar zu dem Vorgang bei den Neutrophilen.

#### 4.11. Mikroflussskammer

Mit Hilfe des Mikroflussskammermodells kann die Zelladhäsion von Neutrophilen Granulozyten unter physiologischen, dynamischen Flussbedingungen *in vitro* analysiert werden. Als Vorbereitung für diese Methode erfolgte die Präparation des Knochenmarks aus LysEGFP-Mäusen.

Hierzu wurde die Maus getötet und anschließend beide *Femura* und *Tibiae* entnommen. Nach Entfernung des Muskel- sowie Bindegewebes und nach der Reinigung der Knochen, wurden die Kondylen von den Diaphysen abgetrennt und mit kaltem PBS das Knochenmark aus den Diaphyseschäften gespült. Das Knochenmark wurde auf Eis in 15 ml-Falcons gespült, resuspendiert und anschließend mit PBS auf 14 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C und 1500 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 7,5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 15 ml der Biocoll Separating Solution mit der Zellsuspension überschichtet und 25 min bei 1000 rpm und 23 °C ungebremst zentrifugiert, um die Granulozyten von den restlichen Zellen zu separieren.

Danach wurde der Überstand (Plasma, Lymphozyten, Monozyten, Medium) abgesaugt und das Zellpellet (Erythrozyten, Neutrophile Granulozyten) mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Erythrozytenlyse mittels Ammoniumchlorid im Verhältnis 1:7 (1 ml Zellsuspension und 6 ml Lysemedium) bei Raumtemperatur für 5 min im Dunkeln. Es folgte ein weiterer Waschschrift bei 4 °C, 1500 rpm, ungebremst für 10 min. Das Zellpellet wurde erneut in PBS resuspendiert und gewaschen. Nach einem zweiten Waschschrift wurde das Pellet mit Medium resuspendiert, die Zellzahl der Neutrophilen Granulozyten mittels Neubauer-Zählkammer und einer Türks-Färbung bestimmt und in einem Verhältnis von  $10^6$  Zellen auf 1 ml überführt. Die Zellsuspension wurde auf drei verschiedene Ansätze aufgeteilt, wobei ein Ansatz mit TUDCA inkubiert wurde. Hierzu wurden die Zellen mit 4 mg/ml TUDCA für 3 h inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Die Zellen wurden bis zum Versuchsbeginn auf Eis gelagert.

Glaskapillaren mit einer Breite von 2 mm und einer Höhe von 0,2 mm sollen murine Mikrogefäße simulieren. Es wurden die Glaskapillaren in einem Eppendorf-Gefäß in PBS mit 0,2 % BSA angesetzt und anschließend mit folgenden Adhäsionsmolekülen beschichtet: P-Selektin (2 µg/ml), mit dem Chemokin CXCL1 (5 µg/ml) und ICAM-1 (1 µg/ml). Eine unbeschichtete Kammer diente als Negativkontrolle. Die Kammern wurden mit der Beschichtung für 2 h inkubiert und anschließend mit einer Blockierlösung (10 % Milchpulverlösung) für weitere 2 h inkubiert. Die Mikroflussskammern wurden mit einem Schlauchsystem verbunden, an deren Ende sich eine 5 ml Spritze mit der Zellsuspension der Neutrophilen Granulozyten befand.

Die Suspension wurde mit Hilfe einer Pumpe mit definierter Geschwindigkeit ( $1 \text{ dyne/cm}^2 \sim 0,115 \text{ ml/min}$ ) durch die Flusskammer perfundiert, die auf einer Plexiglasbühne fixiert wurde. Der Fluss wurde nach 10 min mit Hilfe eines 20X-Wasserimmersionsobjektivs und einer CCD-Kamera mit dem Programm Inspector aufgenommen. Anschließend wurden die Mittelwerte der adhärenen Leukozyten der verschiedenen Gesichtsfelder berechnet und mit dem dazugehörigen Standardfehler dargestellt.

#### **4.12. Western Blot**

Zur Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot wurden die nach der Intravitalmikroskopie entnommenen und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagerten fetalen Leber- sowie Lungenproben verwendet. Zuerst erfolgte die Proteinisolierung mit anschließender Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay, die Auftrennung mittels SDS-PAGE und schlussendlich der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran, auf der die Proteine mittels Antikörpern detektiert werden konnten.

##### **4.12.1 Proteinisolation**

Je 30 mg der Organe wurden auf Eis abgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit  $450 \text{ } \mu\text{l}$  vorgelegtem RIPA-Puffer und  $50 \text{ } \mu\text{l}$  Proteaseinhibitor überführt. Der RIPA-Puffer diente der Lyse und der Inhibitor der Verhinderung der Proteindegradierung. Das Gewebe wurde mechanisch mit einem Mörser zerkleinert und nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis bei  $1400 \text{ rpm}$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues eiskaltes Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

Darauf folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Kit. Hierfür wurden die Proben 1:20 verdünnt und die Messung nach Herstellerangaben durchgeführt.

##### **4.12.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay**

Die biochemische Methode des BCA-Tests dient der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels photometrischer Messung eines Farbumschlags und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch die Anwesenheit von Peptiden werden die Kupferionen aus der Stammlösung bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  in alkalischem Milieu reduziert.

Mit der Bicinchoninsäure (BCA) bilden die Kupferionen einen blau-violetten-Farbstoffkomplex, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden kann. Mit Hilfe der BSA-Standardkurve konnte anschließend die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

#### 4.12.3. Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Die Proteine werden anhand ihrer Größe mittels der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das 12 %ige Trenngel (Tabelle 14) wurde in einem 50 ml Falcon hergestellt und die Gelkammer wurde bis auf 3 cm befüllt. Es erfolgte eine Überschichtung des Trenngels mit Isopropanol als Verdunstungsschutz. Nach ca. 30 min Polymerisation wurde das Isopropanol vom Trenngel abgegossen, mit dem Sammelgel überschichtet und ein Kamm eingefügt. Nach erfolgter Polymerisation konnte die Gelelektrophorese gestartet werden.

Tabelle 14 Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE

Substanz	Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	6,8 ml	6,84 ml
30 % Acrylamid Mix	8 ml	2,04 ml
10 % APS	200 µl	120 µl
TEMED	8 µl	12 µl
4X Tris-Cl/SDS pH 8,8	5 ml	/
4X Tris-Cl/SDS pH 6,8	/	3 ml

Es wurden 25 µg Protein mit 4 µl RotiLoad-Ladepuffer (4X) in einem Gesamtvolumen von 16 µl bei 95 °C für 5 min erhitzt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte 25 min bei 80 V und anschließend bei 120 V.

#### 4.12.4. Proteintransfer

Für den Transfer wurden neun mit Blottingbuffer getränkte Whatman-Papiere in den Blotter gelegt, darüber folgten luftblasenfrei die Nitrocellulosemembran, das Trenngel und abschließend neun weitere Whatman-Papiere. Anschließend wurde der Proteintransfer im

Blotter bei 100 mA eine Stunde lang durchgeführt und das Ergebnis mit Hilfe einer Ponceau-Färbung überprüft. Die Membran wurde in einer Schale komplett mit Ponceau-Lösung bedeckt, auf einem Schüttler 5 min inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O gereinigt, bis klare Bandenmuster zu erkennen waren und dies dokumentiert wurde.

Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit 2,5 %igem Milchpulver in TBS-Tween bei RT auf dem Schüttler, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Danach folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran in TBS-Tween dreimal 5 min gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS-Tween für 5 min konnte die fotografische Detektion der Membran mit dem Odyssey classic von LI-COR Biosciences stattfinden.

#### **4.13. Statistik**

Alle dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler von jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm Prism 7 der Firma GraphPad. Die Signifikanz wurde mittels t-test bei einem Zwei-Gruppen-Vergleich, mittels One-Way-Anova und anschließendem Tukey's posthoc test bei einem Mehrgruppen-Vergleich oder mittels Two-Way-ANOVA und Tukey's posthoc test bei einem Mehrgruppen-Vergleich und verschiedenen Altersstufen ermittelt und als \*p < 0,05 dargestellt. Veränderungen der Frühgeburtenrate wurden mittels Chi-square test for trend ermittelt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Vorversuche

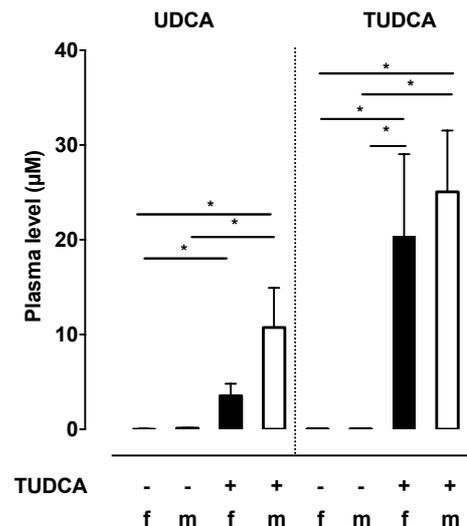
#### 5.1.1. Substanz & Dosierung

In Vorversuchen des Projektes stand die Suche einer geeigneten Substanz und Dosis zur pro-inflammatorischen Stimulation im Mausmodell im fetalen Gestationsstadium E15/16 im Mittelpunkt. Es wurden die Substanzen Peptidoglykan und Lipoteichonsäure des gram-positiven Bakteriums *S. aureus* in Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit und die Frühgeburtenrate untersucht. Die Abbildungen A1 und A2 im Anhang zeigen, dass weder LTA noch Peptidoglykan in der Lage waren ein Amnioninfektionssyndrom mit entsprechender klinischer Relevanz auszulösen. Daher wurde im Weiteren für alle folgenden Untersuchungen LPS des gram-negativen Bakteriums *E. coli* mit dem Serotyp 0111:B4 und 4.776.861,1 EU/ml verwendet.

#### 5.1.2. Plazentagängigkeit von TUDCA

Durch die Analyse der TUDCA-Plasmaspiegel sollte untersucht werden, ob die Gallensäure plazentagängig ist und so direkt beim Feten wirken könnte oder nur indirekt über die schwangere Maus.

Die Analyse des Plasmaspiegels von TUDCA mittels HPLC hat ergeben, dass die mit TUDCA-behandelten Tiere (maternal sowie fetal) signifikant höhere Plasmakonzentrationen der Tauroursodeoxycholsäure im Vergleich zu den Unbehandelten aufwiesen (628-fache & 677-fache Erhöhung). Ebenfalls waren bei dieser Gruppe alle UDCA-Konzentrationen signifikant höher als bei den unbehandelten Tieren (85-fache & 70-fache Erhöhung). Generell gab es zwischen den maternalen und fetalen Proben keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 8).



**Abbildung 8 Maternaler sowie fetaler UDCA- und TUDCA-Plasmaspiegel.** Nach der *in vivo*-Behandlung mit und ohne TUDCA (3x 1000 mg/ml) sowie der Blutentnahme, erfolgte die Analyse des fetalen (E17) sowie maternalen Plasmas mittels HPLC auf die verschiedenen Gallensäurederivate (f / schwarze Säulen = fetal; m / weiße Säulen = maternal). Die Werte aus n = 6 – 12 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p < 0,05 dargestellt.

Bei der Gruppe der TUDCA-behandelten Mäuse waren die Plasmaspiegel von TUDCA sowohl bei den Schwangeren als auch den Feten höher als die von UDCA. Bei den Kontrollen hingegen lag der UDCA-Spiegel immer höher als der TUDCA-Spiegel.

Nachdem die Plasmaspiegel nach einer *in vivo*-TUDCA-Gabe analysiert wurden, sollte nun die *in vitro*-Wirkung von verschiedenen TUDCA-Konzentrationen erforscht werden.

### 5.1.3. *In vitro* TUDCA-Dosis-Wirkungskurve

In einem weiteren Ansatz sollte die konzentrationsabhängige Wirkung von TUDCA *in vitro* untersucht werden. Ziel war es, herauszufinden ab welcher TUDCA-Konzentration eine Reaktion *in vitro* in murinen aortalen Endothelzellen (MAECs) hervorgerufen wird und ob sich die anti-inflammatorischen Effekte, die TUDCA auslöst, bei einer höheren Konzentration verändern oder ob es möglicherweise sogar toxisch wirkt. Dies wurde zusätzlich nach bzw. ohne zusätzliche TUDCA-Vorbehandlung durchgeführt, um die Frage zu klären, ob es einen Unterschied gibt wie oft TUDCA appliziert wird oder ob es sogar einen prophylaktischen Effekt gibt. Dazu wurde die mRNA-Expression verschiedener bereits erprobter Inflammationsmarker (*Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) und Endothel-(E-)Selektin) getestet.

Anhand der TUDCA-Kinetik (von 0,25 mg/ml bis 8 mg/ml) im Anhang (Abbildung A3) wurde deutlich, dass sich die Expression der verschiedenen Inflammationsmarker bei einer unterschiedlichen TUDCA-Konzentration unterschied. Bei ICAM-1, VCAM-1 und auch E-Selektin lagen die höchsten Expressionswerte bei einer TUDCA-Konzentration von 0,5 mg/ml vor. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Anzahl der TUDCA-Applikationen (mit oder ohne Vorbehandlung). In der Regel war ein stärkerer anti-inflammatorischer Effekt ab einer TUDCA-Konzentration von 2 mg/ml zu sehen. Die niedrigsten Expressionslevel traten bei den höchsten TUDCA-Konzentrationen (4 – 8 mg/ml) auf.

---

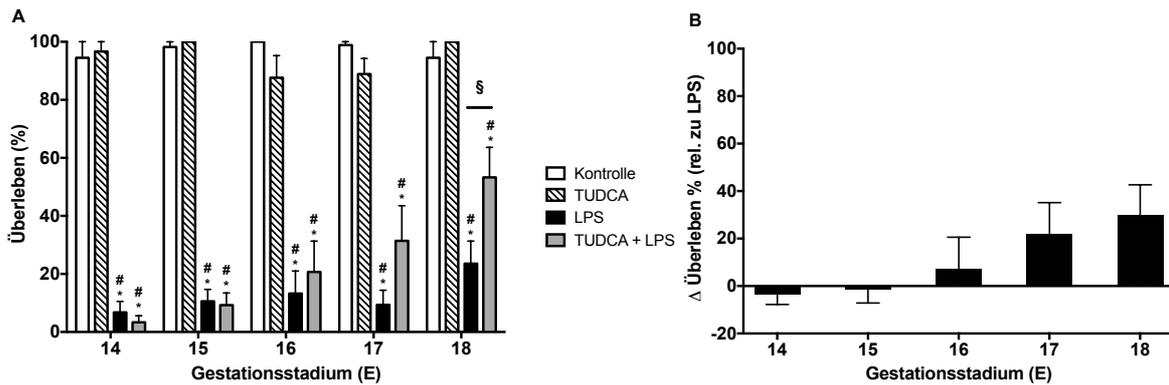
## 5.2. Inflammation

### 5.2.1. Systemische Inflammation des fetalen und maternalen Organismus *in vivo*

Im Hauptteil des Projektes wurde der Inflammationszustand der Feten sowie die körperliche Verfassung der schwangeren Maus nach einer LPS-Behandlung untersucht. Hierzu wurden anhand von Überlebensversuchen die Überlebenswahrscheinlichkeit sowie die Frühgeburtenrate in der jeweiligen Therapiegruppe analysiert. Nach Feststellung des Basis-Inflammationszustandes (Kontrolle/LPS-Behandlung), sollte anschließend die natürlich vorkommende Gallensäure Tauroursodeoxycholsäure als potentiell anti-inflammatorisch wirkende Substanz in denselben Versuchsabläufen getestet werden.

#### 5.2.1.1. Überlebenswahrscheinlichkeit

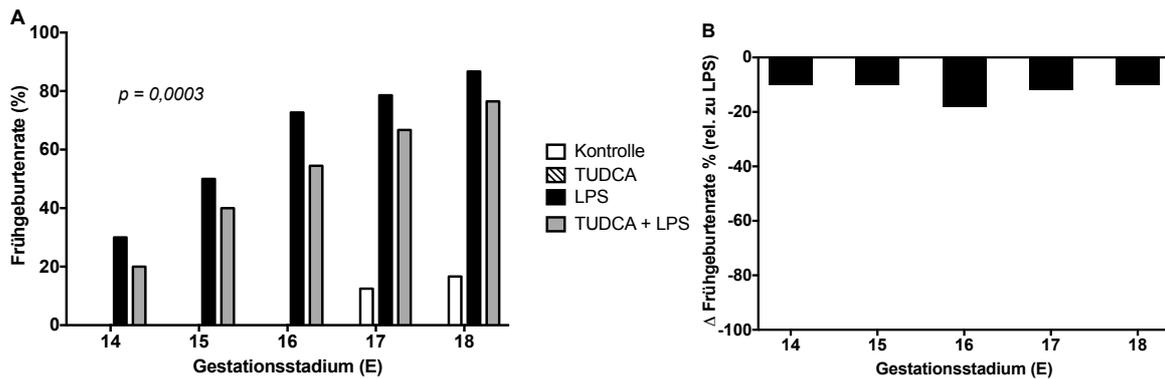
Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Feten aus der Kontrollgruppe lag in allen Altersgruppen zwischen 95 % und 100 % (Abbildung 9 A). Auch bei der TUDCA-Kontrollgruppe lag die Überlebensrate zwischen 88 % und 100 % und zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gestationsstadien. Eine zweimalige LPS-Injektion von 1 mg/kg KGW in eine schwangere Maus setzte jedoch signifikant die Überlebenswahrscheinlichkeit der Feten in allen Altersstufen herab, nahm aber im Verlauf der Gestation von 7 % auf 24 % zu. Durch die zusätzliche TUDCA-Behandlung parallel zur LPS-Behandlung zeigte sich ab E16 ein Trend zu verbesserten Überlebenschancen der Feten. Im höchsten getesteten Gestationsstadium E18 wurde die Überlebensrate durch die zusätzliche TUDCA-Behandlung signifikant verbessert (Abbildung 9 B). Generell stieg die Überlebensrate nach der TUDCA/LPS-Behandlung signifikant mit zunehmender Schwangerschaftsdauer an (E14 bis E18 von 3 % auf 53 %).



**Abbildung 9 Intrauterines fetales Überleben A) sowie Erhöhung der fetalen Überlebenswahrscheinlichkeit durch eine zusätzliche TUDCA-Gabe B).** Bei schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) wurde nach den verschiedenen Behandlungen das intrauterine fetale Überleben zum Versuchsende ermittelt und als Mittelwerte + SEM von  $n = 5 - 17$  schwangeren Mäusen pro Gestationsstadium dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Two-Way-Anova ermittelt und mit \* $p$  vs. Kontrolle, # $p$  vs. TUDCA  $< 0,05$  dargestellt. Die Signifikanz zwischen LPS und TUDCA + LPS wurde mittels t-test ermittelt und mit § $p < 0,05$  dargestellt.

### 5.2.1.2. Frühgeburtenrate

Der klinisch relevante Faktor der Frühgeburtsrate ist ein weiterer wichtiger *Outcome*-Parameter der Überlebensversuche. Hierbei war nicht der prozentuale Anteil der bereits geworfenen Feten von einem Wurf entscheidend, sondern nur der Fakt, ob die Geburt begonnen hat oder nicht. Im Anhang ist eine zusätzliche Darstellung der Anzahl der begonnenen, aber nicht vollendeten Geburten zu Versuchsende dargestellt (Abbildung A4). Abbildung 10 A zeigt, keine einzige schwangere Maus der Kontrollgruppe im Gestationsstadium E14 – E16 hat geworfen. Ab der fetalen Entwicklungsstufe von 17 Tagen kam es in wenigen Fällen zu Geburten (13 % und 17 %); dies stellte aber keinen signifikanten Unterschied dar. Durch die alleinige Gabe von TUDCA wurde keine Geburt ausgelöst. Eine LPS-Behandlung hingegen löste in jedem Gestationsstadium Frühgeburten aus, deren Häufigkeit sich im Verlauf der Gestation von E14 zu E18 signifikant erhöhte (von 30 % auf 87 %). TUDCA/LPS-behandelte Mäuse zeigten eine mit der Gruppe der LPS-behandelten Mäuse vergleichbare Frühgeburtsrate (E14 – 18 von 20 % auf 77 %). Insgesamt gab es nach der TUDCA/LPS-Behandlung signifikant weniger Frühgeburten als nach der alleinigen LPS-Behandlung (Abbildung 10 B).



**Abbildung 10 Frühgeburtenrate A) sowie Reduzierung der Frühgeburtenrate durch eine zusätzliche TUDCA-Gabe B).** Die Werte aus unabhängigen Experimenten sind als Rate in Prozent von  $n = 5 - 17$  schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) pro Gestationsstadium dargestellt. Die Signifikanz zwischen LPS und TUDCA + LPS wurde mittels *Chi-square test for trend* ermittelt.

### 5.2.1.3. Zusammenfassung

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Gabe von 1 mg/kg KGW LPS die Überlebenschance von Feten signifikant herabsetzte, die jedoch durch die Zugabe von TUDCA - besonders im späteren Schwangerschaftsstadium um 7 % – 30 % verbessert werden konnte (Abbildung 9 B). TUDCA alleine wirkte sich nicht signifikant auf die Überlebenschance aus – ebenso wie bei der Kontrollgruppe (88 % – 100 %).

LPS erhöhte die Frühgeburtenrate signifikant im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Durch die zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS war die Frühgeburtenrate zwischen 10 % und 18 % leicht reduziert (Abbildung 10 B).

Insgesamt lag eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuche aufgrund einer nicht signifikant unterschiedlichen Anzahl von Feten vor (Abbildung A5). Des Weiteren hatten alle schwangeren Mäuse in der Kontrollgruppe eine gute körperliche Verfassung. Dies ließ sich auch durch die gemessenen Gewichtszunahmen bestätigen. Bei den anderen drei Behandlungsgruppen befanden sich die adulten Mäuse in einem guten körperlichen Zustand, es erfolgte jedoch eher eine Gewichtsreduktion als eine Zunahme (Abbildung A6).

## 5.2.2. *In vivo* Leukozytenrekrutierung in der fetalen Mikrozirkulation

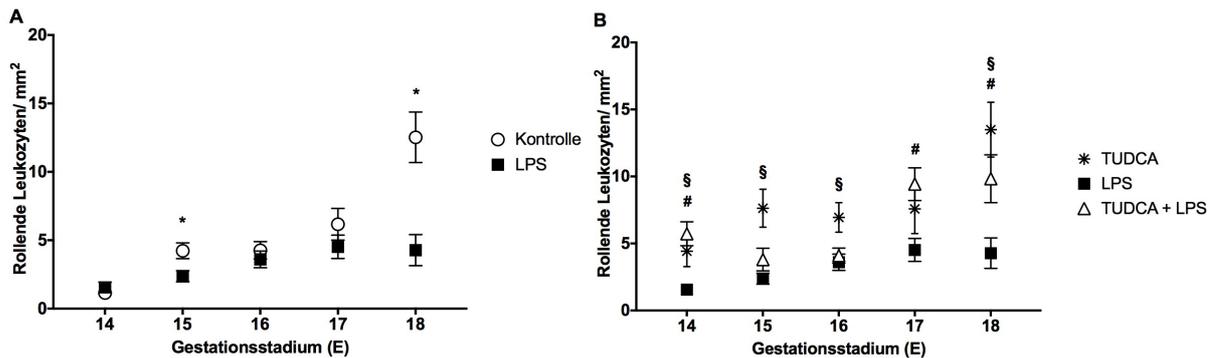
Nachdem die Folgen einer systemischen Inflammation auf den Feten beschrieben wurden, sollte nun die Analyse konkreter Folgen der Inflammation auf zellulärer Ebene innerhalb des fetalen Organismus erfolgen. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie können die ersten Schritte der Leukozytenrekrutierung (Leukozytenrollen, Adhäsion) in der Mikrovaskulatur des fetalen Dottersacks *in vivo* beobachtet werden.

### 5.2.2.1. Intravitalmikroskopie

Die nun folgende Versuchsreihe glich den Überlebensversuchen - jedoch mit einer geringeren Dosis von LPS (2 x 0,25 mg/kg KGW) sowie TUDCA (3x 500 mg/kg KGW), damit eine intrauterine Untersuchung der Feten ohne Senkung der Überlebenswahrscheinlichkeit und Steigerung der Frühgeburtenrate durchgeführt werden konnte. Die Leukozytenrekrutierung, unterteilt in rollende, adhätierende und schlussendlich transmigrierende Neutrophile Granulozyten, ist in den folgenden Diagrammen dargestellt (Abbildung 11 – 17).

#### 5.2.2.1.1. Leukozytenrollen

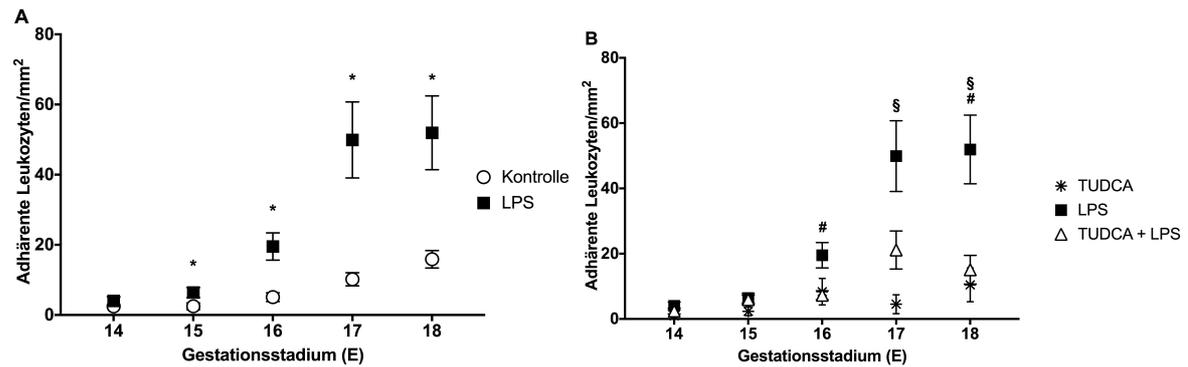
Die rollenden Neutrophilen Granulozyten (der erste Schritt der Leukozytenrekrutierungskaskade) zeigten bei der NaCl-Kontrolle einen signifikanten Anstieg von 1 auf 13 rollende Leukozyten/mm<sup>2</sup> im Verlaufe der Gestation (Abbildung 11 A). Bei der LPS-behandelten Gruppe zeigte sich ebenfalls der Trend, dass die Anzahl der Roller im Verlauf der Gestation von 2 auf 4 rollende Leukozyten/mm<sup>2</sup> anstieg. Im Entwicklungsstadium E18 gab es bei den Kontrollen signifikant mehr Roller als nach der LPS-Behandlung. In Abbildung 11 B wird ersichtlich, dass bei der TUDCA/LPS-Gruppe in drei Entwicklungsstadien eine signifikante Erhöhung der Anzahl an rollenden Neutrophilen im Vergleich zur LPS-Behandlung erfolgt war. Nach der TUDCA/LPS-Behandlung zeigte sich ebenfalls ein Trend zur erhöhten Anzahl rollender Leukozyten im Verlauf der Gestation von 6 auf 10. Nach der alleinigen TUDCA-Gabe lag eine erhöhte Anzahl an rollenden Leukozyten vor (zwischen 4 und 14 rollende Leukozyten/mm<sup>2</sup>).



**Abbildung 11 Anzahl an rollenden Neutrophilen Granulozyten in fetalen Dottersackgefäßen.** Die Werte aus unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 – 17 schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) pro Gestationsstadium dargestellt (N (Feten)= 4 – 30; n (Gefäße) = 13 – 80). Die Signifikanz wurde mittels t-test ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle, #p vs. TUDCA + LPS und §p vs. TUDCA < 0,05 dargestellt.

### 5.2.2.1.2. Leukozytenadhäsion

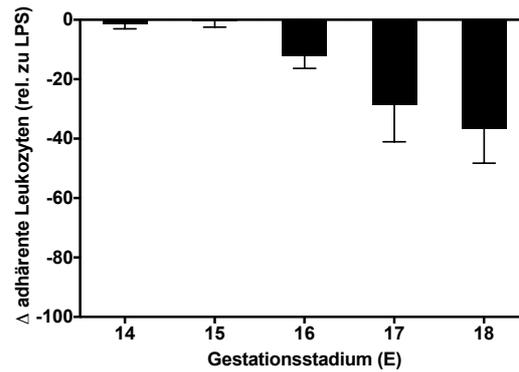
Die Untersuchungen zur Adhäsion, dem zweiten Schritt der Leukozytenrekrutierung, (Abbildung 12 A) ergaben bei den Kontrollen einen signifikanten Anstieg von 2 auf 16 adhärenenten Leukozyten/mm<sup>2</sup> im Verlauf der Gestation, ebenso nach der LPS-Stimulation von 4 auf 52 adhärenenten Leukozyten/mm<sup>2</sup>. Ab dem Gestationsstadium E15 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Adhäsion nach der LPS-Behandlung um bis zu mehr als das Dreifache gegenüber der Kontrolle. Der Vergleich der Adhäsion nach der LPS- und der TUDCA/LPS-Behandlung zeigte deutlich, dass durch die zusätzliche TUDCA-Gabe eine Reduktion der adhärenierenden Leukozyten auf ein ähnliches Niveau wie das der TUDCA-Kontrolle erfolgte. Bei den Entwicklungsstadien E16, E17 und E18 war dieser Effekt signifikant (Abbildung 12 B). Bei der TUDCA/LPS-Behandlung nahm die Anzahl der adhärenenten Leukozyten im Verlauf der Gestation signifikant von 3 auf 15 zu.



**Abbildung 12 Anzahl an adhärenenten Neutrophilen Granulozyten in fetalen Dottersackgefäßen.** Die Werte aus unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 – 17 schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) pro Gestationsstadium dargestellt (N (Feten)= 4 – 30; n (Gefäße) = 13 – 80). Die Signifikanz wurde mittels t-test ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle, #p vs. TUDCA + LPS und \$p vs. TUDCA < 0,05 dargestellt.

### 5.2.2.1.3. Zusammenfassung

Die LPS-Gabe führte zu einer nicht signifikanten Reduktion des Leukozytenrollens und einer signifikanten Erhöhung der Leukozytenadhäsion; ein Befund, der sich durch die zusätzliche Behandlung mit TUDCA nahezu umkehren ließ (zwischen -1 und -37 rollende Leukozyten/mm<sup>2</sup>). Diese Beobachtungen waren in fortschreitender Gestation besonders deutlich (Abbildung 13). Anhand der erhobenen Daten bzgl. hämodynamischer Parameter (Tabelle A1) konnte gezeigt werden, dass sich die Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden und somit miteinander verglichen werden konnten. Insgesamt ergab sich eine Zunahme des Gewichts der Kontrolltiere während der Versuche, im Vergleich zu den meisten anderen behandelten Tieren (Abbildung A6).

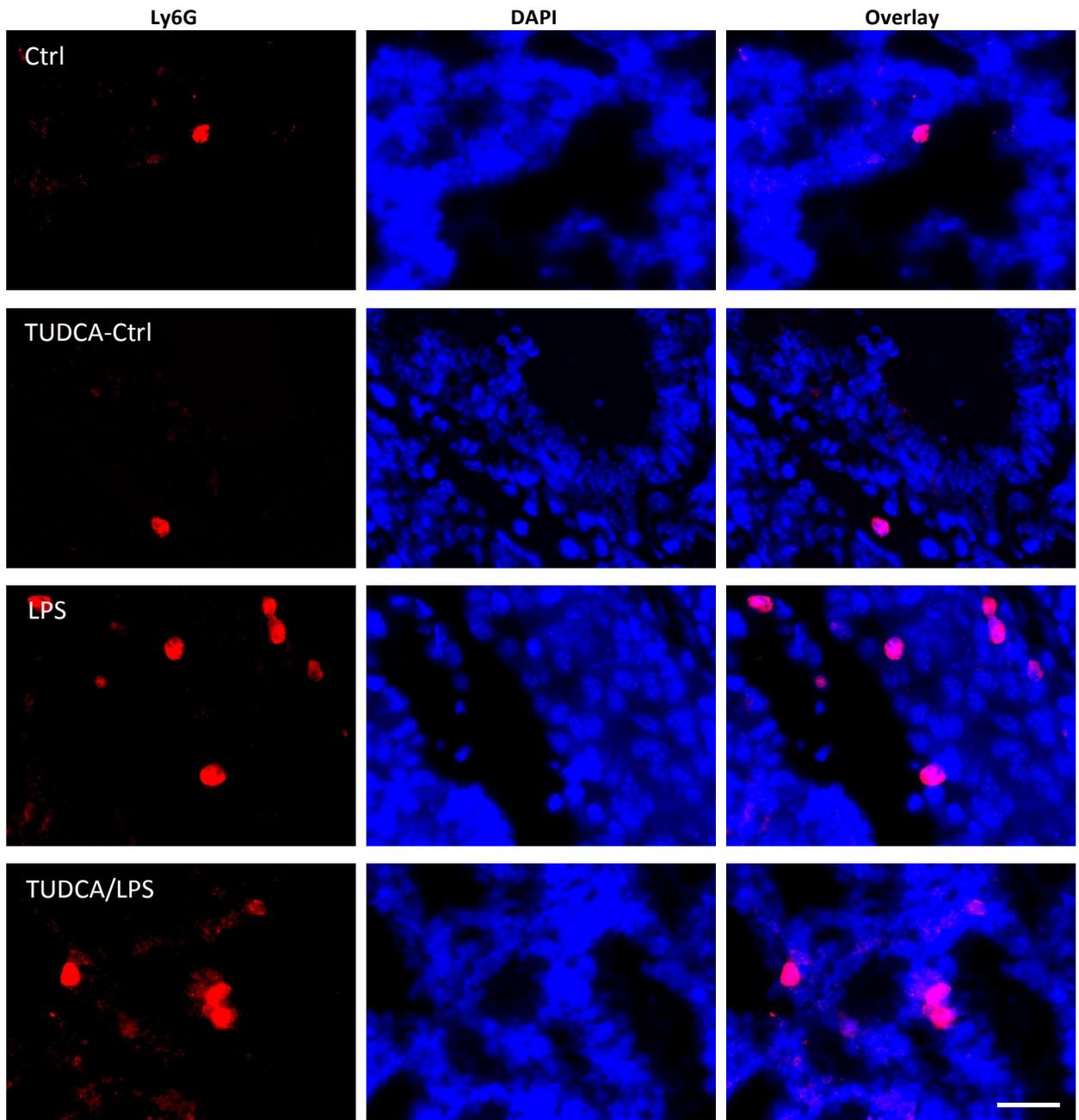


**Abbildung 13 Veränderung der Anzahl der adhärenente Neutrophilen Granulozyten durch eine zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS.** Dargestellt ist der Unterschied zwischen der LPS- und der TUDCA/LPS-Behandlung ( $\Delta$  mean von adhärenente Leukozyten (relativ zur LPS-Behandlung)). Die Werte aus 3 – 17 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Feten)= 4 – 30; n (Gefäße) = 13 – 80).

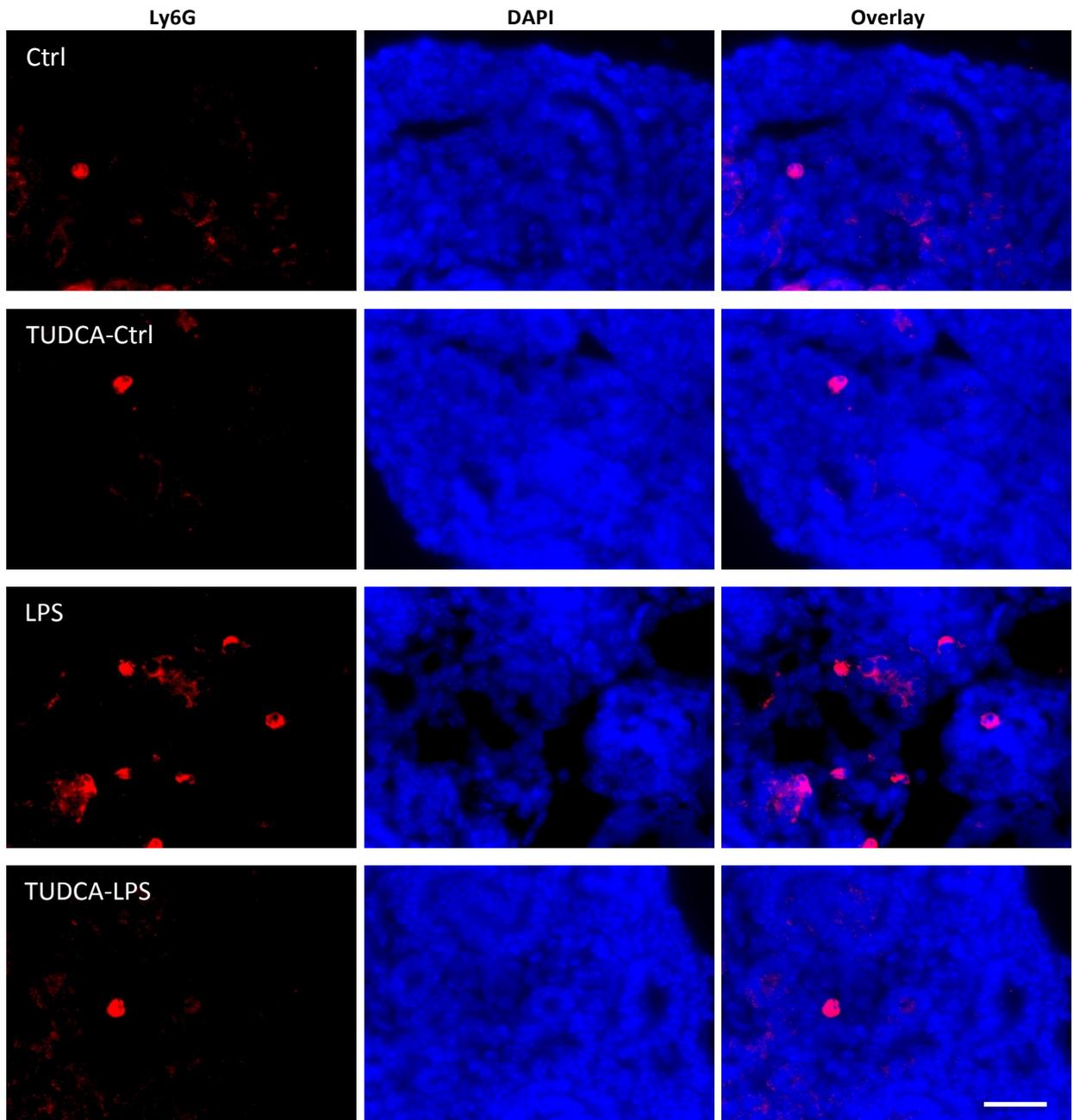
Die Leukozyteninfiltration sollte im Weiteren durch histologische Untersuchungen verschiedener Organe untermauert werden.

#### 5.2.2.2. Leukozyteninfiltration in verschiedene fetale Organe

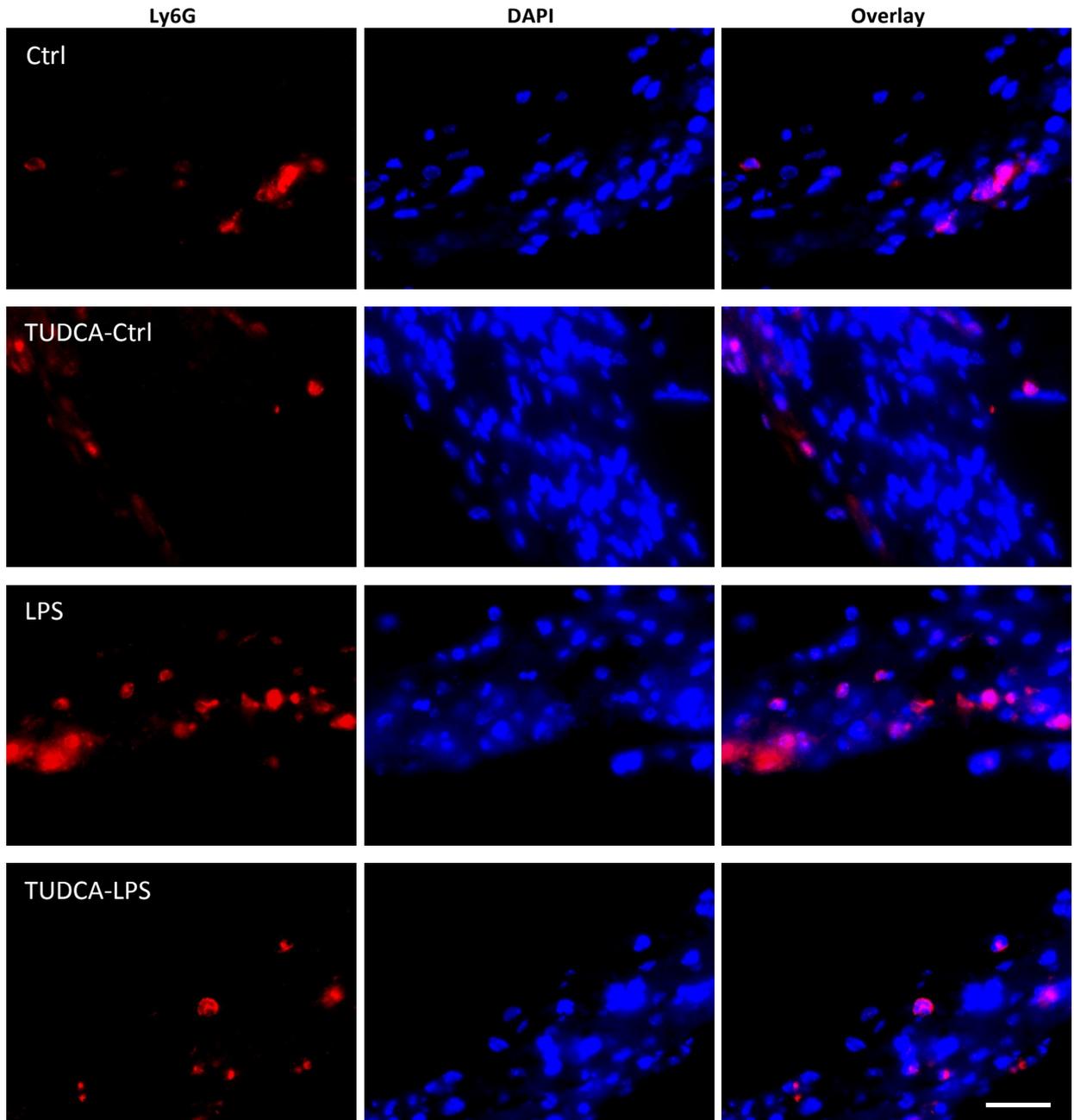
Im dritten Schritt der Leukozytenrekrutierungs-Kaskade erfolgt die Transmigration der Neutrophilen Granulozyten aus der Mikrovaskulatur in das umliegende Gewebe. Mit Hilfe der histologischen Schnitte der fetalen Lunge und Niere sowie der Plazenta der einzelnen Entwicklungsstadien (E14 – E18) sollte die Anzahl der infiltrierten Leukozyten und somit der Grad der Inflammation bestimmt werden. In den Abbildungen 14 – 16 sind repräsentative Immunfluoreszenzbilder entsprechender Organe dargestellt.



**Abbildung 14** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder von infiltrierten Neutrophilen Granulozyten in der fetalen Lunge (E17) nach der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von Ly6G und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 15** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder von infiltrierten Neutrophilen Granulozyten in der fetalen Niere (E17) nach der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von Ly6G und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25  $\mu$ m.



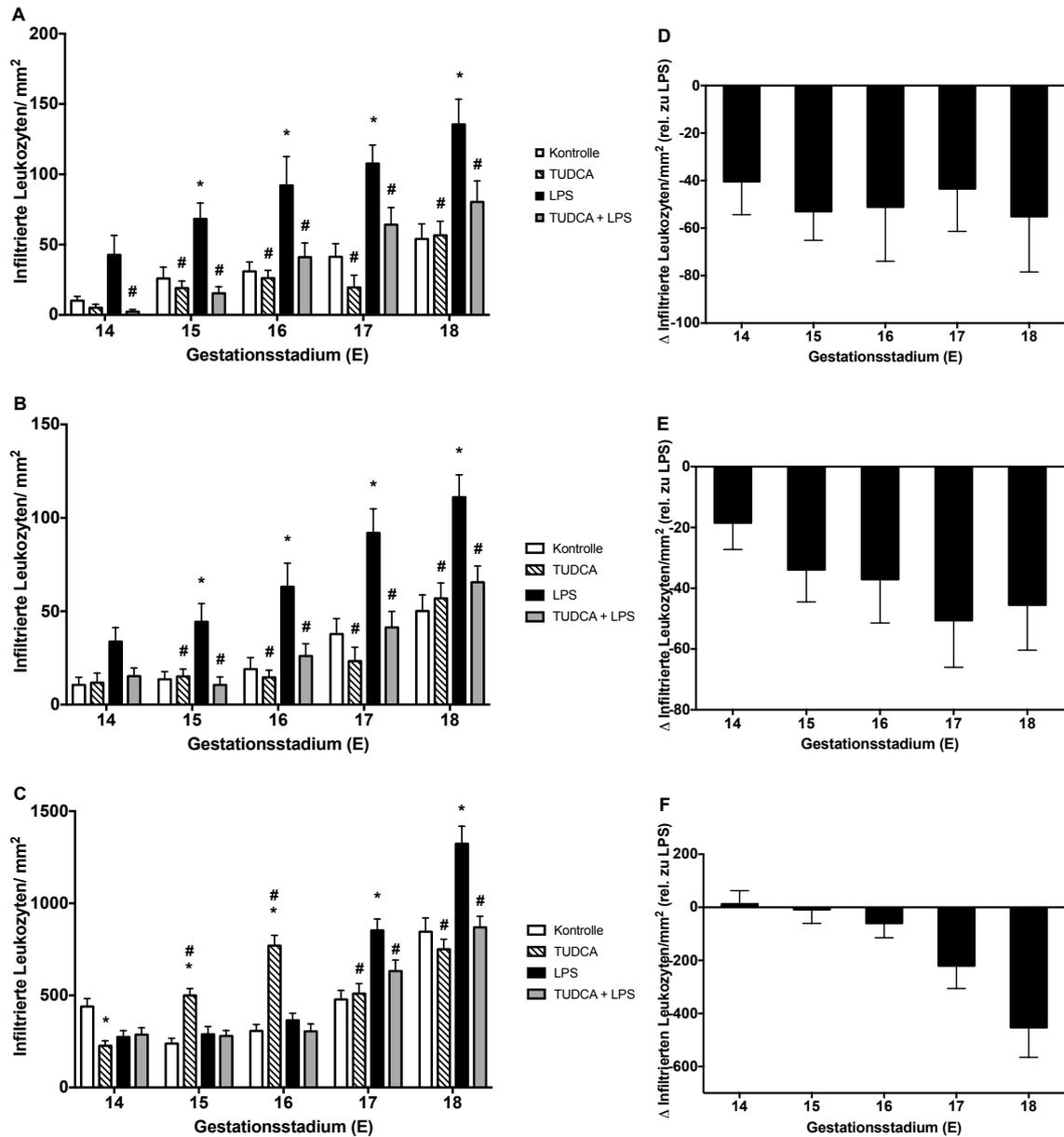
**Abbildung 16** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder von infiltrierten Neutrophilen Granulozyten im Chorion (E17) nach der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von Ly6G und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25  $\mu$ m.

---

In den drei Organen lässt sich bei allen Gruppen ein genereller Anstieg der Anzahl an infiltrierten Leukozyten im Verlauf der Gestation erkennen. Abbildung 17 A zeigt, dass nach der LPS-Behandlung die höchsten Infiltrationswerte in der fetalen Lunge vorlagen im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen. Bei drei der fünf Entwicklungsstadien (E15, E17, E18) zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Infiltration nach der LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle (Anstieg um 151 % – 323 %). Durch die zusätzliche TUDCA-Gabe wurde die durch LPS-induzierte Transmigration in die fetale Lunge gesenkt. Dieser Effekt lag zwischen -40 bis -55 infiltrierten Leukozyten/mm<sup>2</sup> (eine Reduktion von 40 % bis 95 %) und war in allen Entwicklungsstufen signifikant (Abbildung 17 D). Die Werte nach der TUDCA/LPS-Behandlung sowie die nach der alleinigen TUDCA-Gabe lagen in demselben Bereich wie die Werte der Kontrollen und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Die Analyse der Leukozyteninfiltration in die Niere zeigte, dass ab E15 eine signifikante Erhöhung durch die LPS-Stimulation zwischen 121 % – 231 % erfolgte (Abbildung 17 B). Durch die zusätzliche TUDCA-Gabe erfolgte von E15 – E18 eine signifikante Reduzierung der Anzahl an eingewanderten Neutrophilen im Vergleich zur LPS-Behandlung (zwischen -19 bis -51 infiltrierten Leukozyten/mm<sup>2</sup>), somit eine Reduktion von durchschnittlich 41 % – 76 % (Abbildung 17 E). Auch in der Niere erfolgte nach der Behandlung mit TUDCA alleine keine signifikante Zunahme der Leukozyteninfiltration.

Im Chorion war zwischen den Gestationsstadien E14 und E16 kein gravierender Anstieg bei der Infiltration der Leukozyten in allen Behandlungsgruppen zu erkennen (Abbildung 17 C). Ab E-Stadium 17 erfolgte eine signifikante Erhöhung der Anzahl an Neutrophilen nach einer LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle (Anstieg um 178 % und 156 %) sowie eine signifikante Herabsenkung zwischen -9 und -454 infiltrierte Leukozyten/mm<sup>2</sup> durch das zusätzliche TUDCA zur LPS-Gabe (Abbildung 17 F). Bei E14 sind die Werte der Kontrolle im Vergleich zu denen der anderen Gruppen leicht erhöht gewesen und bei E15 und E16 die der TUDCA-Kontrolle.



**Abbildung 17** Anzahl der infiltrierten Neutrophilen Granulozyten in die **A) fetale Lunge, B) fetale Niere, C) Chorion**. Darstellung der Anzahl an Ly6G-positiven Zellen (A – C) und der durchschnittliche Unterschied zwischen der LPS- und TUDCA/LPS-Behandlung (D – F). Die Werte aus unabhängigen Experimenten von 3 – 4 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt (N (Feten)= 3 – 5; n (Bilder) = 40 – 100). Die Signifikanz wurde mittels Two-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle und #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

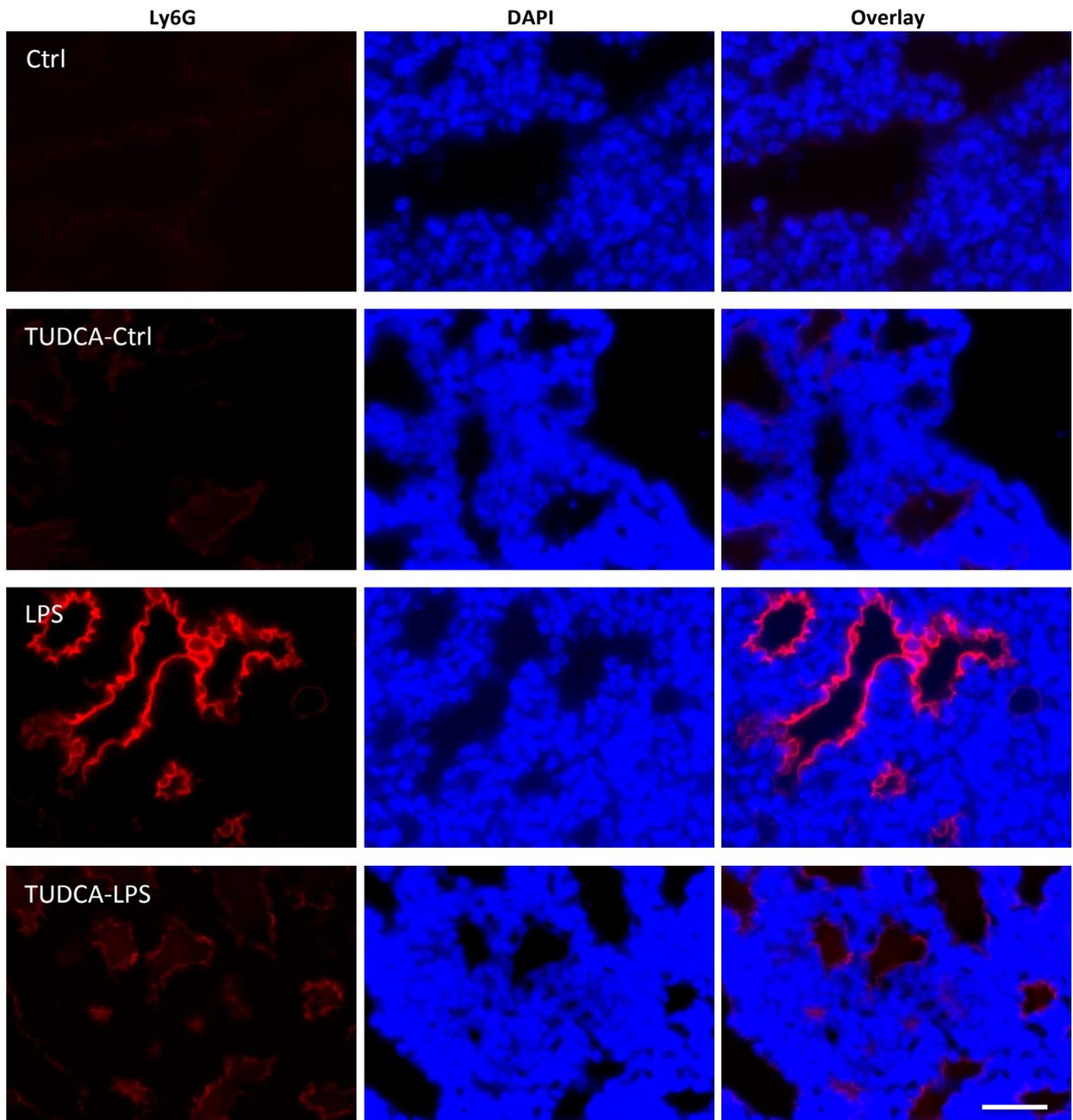
Durch die histologischen Untersuchungen der fetalen Niere und Lunge sowie des Chorions konnte die Leukozyteninfiltration und somit der letzte Schritt der Leukozytenrekrutierung analysiert werden. Generell wurde hierbei ersichtlich, dass sich in der Regel die Anzahl der infiltrierten Neutrophilen im Verlauf der Gestation erhöht. Dies zeigte sich in allen Organen und nach allen Behandlungen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sich die Anzahl der infiltrierten Leukozyten in den jeweiligen Organen stark unterschied. In der Niere waren die geringsten Werte und im Chorion die höchsten Werte zu erkennen.

Nachdem gezeigt wurde, dass in jedem der drei Organe ab einer gewissen Entwicklungsstufe eine signifikante Zunahme der Infiltration von Neutrophilen nach der LPS-Stimulation erfolgte, die durch TUDCA effektiv gesenkt werden konnte, sollte nun der Grad der Inflammation in diesen Organen festgestellt werden.

### 5.2.3. *Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)* als Inflammationsmarker in fetalem und maternalem Gewebe

#### Fetale ICAM-1-Expression im Gewebe

Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 lässt Rückschlüsse auf die Inflammation zu. In Abbildung 18 sind repräsentative Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge dargestellt.



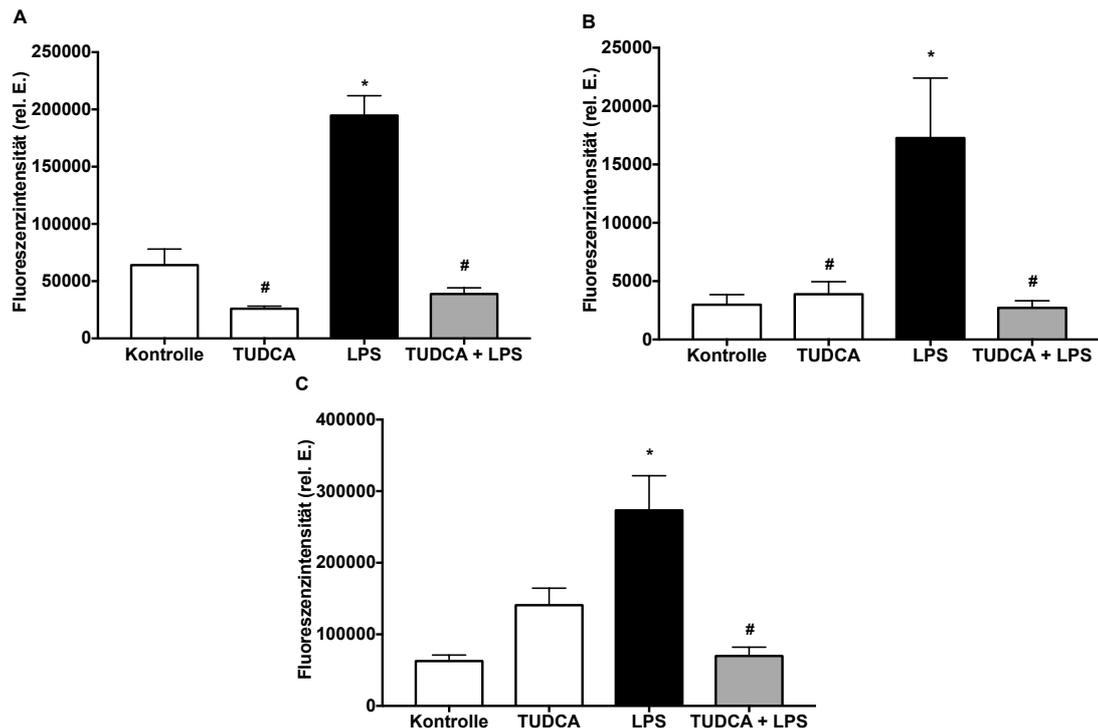
**Abbildung 18** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von ICAM-1 (E17) nach der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von ICAM-1 und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25 µm.

---

Im fetalen Lungengewebe (E17) erfolgte nach der LPS-Stimulation eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensitätswerte von ICAM-1 im Vergleich zu den Kontrollen von 64.0945 rel. E. auf 194.733 rel. E., die durch die zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS signifikant auf 38.807 rel. E. unter das Kontrollniveau abgesenkt wurde. Die TUDCA-Kontrolle wies einen Wert von 25.835 rel. E. auf, der ebenfalls niedriger als der Kontrollwert war. (Abbildung 19 A).

In der fetalen Niere zeigte sich ein ähnliches Bild allerdings mit deutlich niedrigeren Werten (Abbildung 19 B). Der Basiswert lag bei 2.985 rel. E. und wurde signifikant durch die LPS-Gabe auf 17.267 rel. E. stimuliert. Wie auch bei der fetalen Lunge konnte bei den Proben der Niere durch die zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS eine signifikante Reduzierung der ICAM-1-Fluoreszenzintensitätswerte um mehr als 80 % auf 2.717 rel. E. festgestellt werden. Die Fluoreszenzintensitätswerte nach alleiniger TUDCA-Gabe lagen bei 3.882 rel. E. ungefähr auf dem Kontrollniveau.

Im Chorion stieg die Fluoreszenzintensität von ICAM-1 durch die LPS-Gabe von 62.644 rel. E. (Kontrolle) signifikant auf einen Wert von 273.215 rel. E. an (Abbildung 19 C). Nach der TUDCA/LPS-Gabe nahm die Fluoreszenzintensität von 273.215 rel. E. auf 69.868 rel. E. signifikant um 84 % ab und befand sich damit in demselben Bereich wie das Kontrollniveau und die TUDCA-Kontrolle mit 51.325 rel. E..

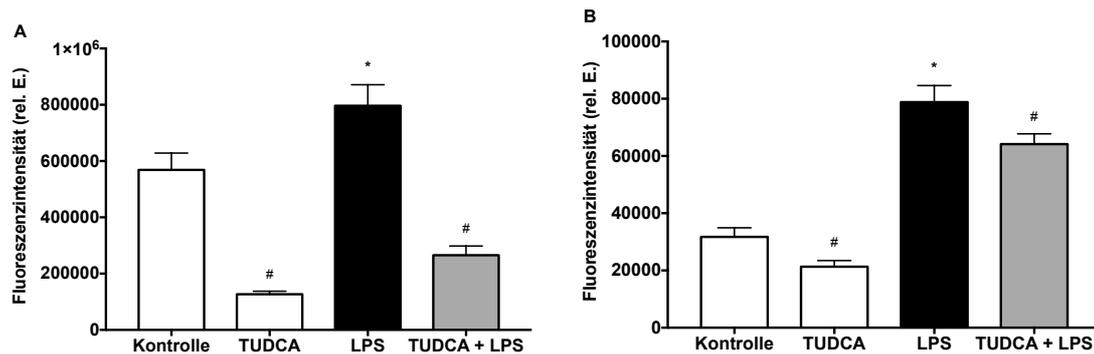


**Abbildung 19 Fetale ICAM-1-Fluoreszenzintensitäten in A) der Lunge, B) der Niere und C) dem Chorion.** Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von ICAM-1 und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Feten)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

### Maternale ICAM-1-Expression im Gewebe

Bei den Lungenschnitten der schwangeren Mäuse lag ein Basiskontrollwert von 568.843 rel. E. vor (Abbildung 20 A), der durch die LPS-Behandlung signifikant auf 796.733 rel. E. erhöht wurde. Die Fluoreszenzintensität des Inflammationsmarkers ICAM-1 konnte in der maternalen Lunge signifikant durch die zusätzliche TUDCA-Gabe auf 265.751 rel. E. reduziert werden. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Gewebsschnitte der TUDCA-Kontrolle lag unter dem Kontrollniveau bei 126.979 rel. E..

In den maternalen Gewebsschnitten der Niere (Abbildung 20 B) war eine deutliche Hochregulation von ICAM-1 nach der LPS-Behandlung im Vergleich zur Kontrollsituation von 31.724 rel. E. auf 78.798 rel. E. festzustellen. Auch in der Niere wurde durch die zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS eine signifikante Senkung der Fluoreszenzintensitätswerte von ICAM-1 von 78.798 rel. E. auf 64.136 rel. E. erlangt. Die Werte der TUDCA-Kontrolle befanden sich unter dem Kontrollniveau bei 21.307 rel. E..



**Abbildung 20 Maternale ICAM-1-Fluoreszenzintensitäten in A) der Lunge und B) der Niere.** Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von ICAM-1 und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Maus)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

Die immunhistochemischen Analysen von ICAM-1 dienten der Einordnung zu einem Gesamtbild des Grades der Inflammation bei einer schwangeren Maus und deren Feten. Durch eine LPS-Stimulation erfolgte im Feten eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität von ICAM-1. In der Lunge um das 3-fache, im Chorion um das 4-fache und am stärksten in der Niere um das 6-fache (Abbildung 21 A). Bei den maternalen Proben war die Stimulation in beiden Organen nicht so stark wie in den fetalen Proben (Lunge um das 1,4-fache; Niere um das 2,5-fache). Der stimulierte Zustand konnte in jedem Organ bei den Schwangeren sowie auch den Feten durch eine zusätzliche TUDCA-Gabe reduziert werden (Abbildung 21 B), meist sogar unter bzw. auf das Kontrollniveau. Auch hier war die TUDCA-induzierte ICAM-1 Downregulation in fetalen Organen ausgeprägter (74 – 84 %) als in den maternalen Organen (19 – 67 %).

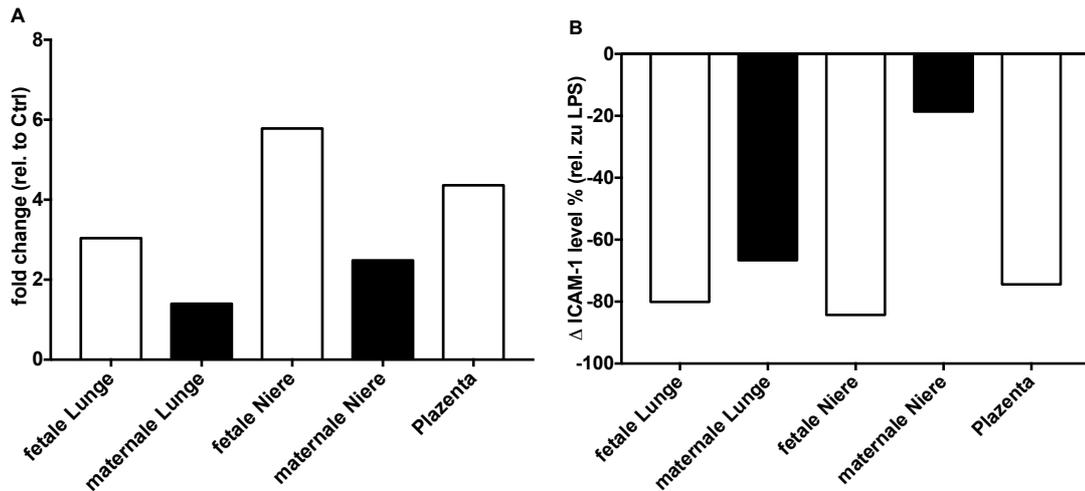
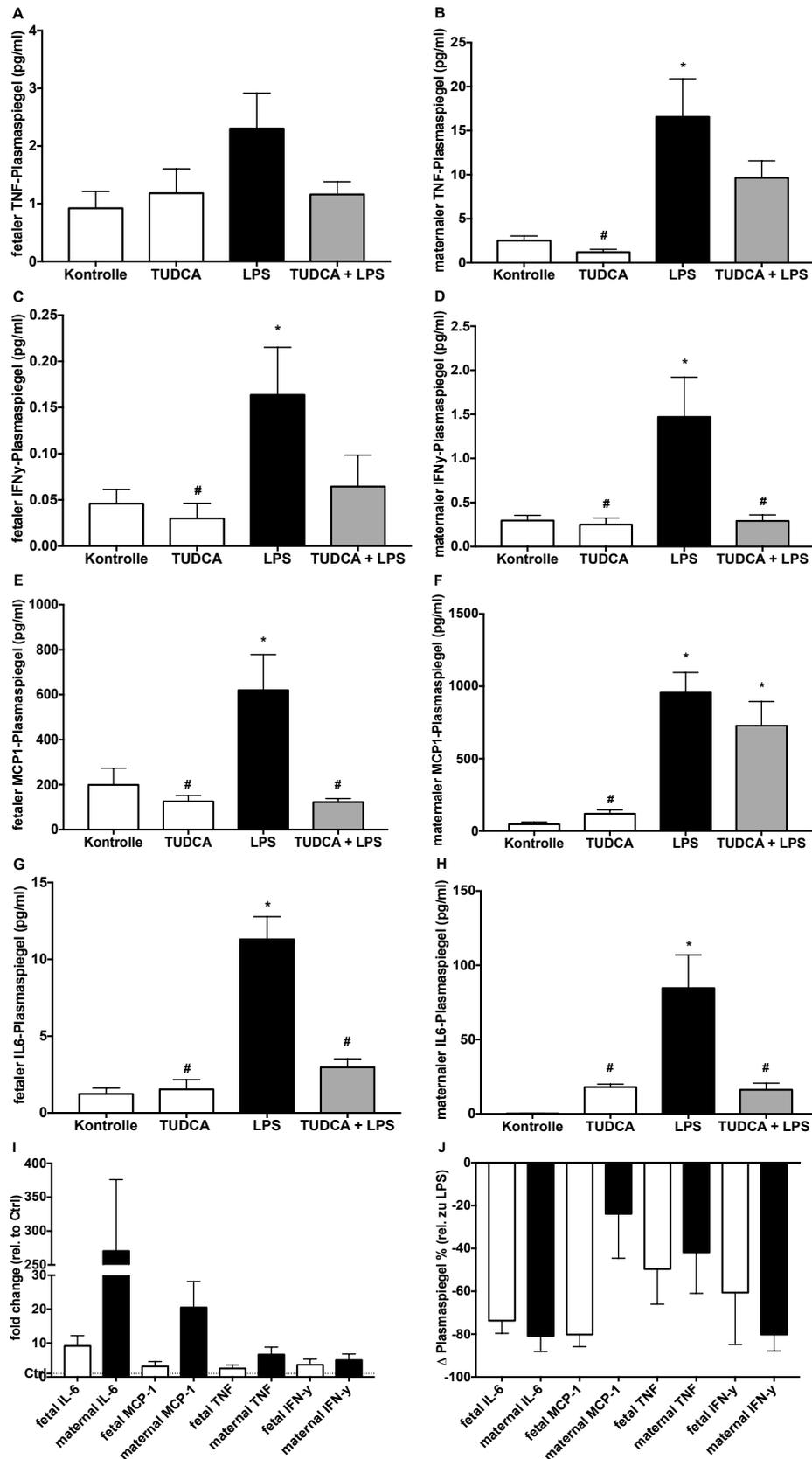


Abbildung 21 ICAM-1-Fluoreszenzintensitäten als A) *fold change* (LPS relativiert auf die Kontrolle) und B) die Reduktion durch TUDCA (TUDCA/LPS relativiert auf LPS) in maternalen sowie fetalen Proben.

Nachdem die Inflammation nach einer LPS-Stimulation im fetalen sowie maternalen Gewebe festgestellt werden konnte, sollte nun in Kapitel 5.2.4 die Inflammation anhand des Zytokinspiegels weiter untersucht werden.

#### 5.2.4. Plasmakonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine

Im Folgenden sind die fetalen sowie maternalen Plasmakonzentrationen von TNF, IFN- $\gamma$ , MCP-1 und IL-6 dargestellt (Abbildung 22 A – H), welche in sehr unterschiedlichen Größenordnungen gemessen wurden und differenziert stimulierbar sind. Alle Zytokine konnten bei den untersuchten Tieren durch eine LPS-Gabe stimuliert werden, jedoch war deren Grad unterschiedlich. Bei den maternalen Proben zeigte sich bei allen Zytokinen eine signifikante Erhöhung der Plasmaspiegel nach der LPS-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Interferon  $\gamma$  war am wenigsten stimulierbar (um das 5-fache), darauf folgten aufsteigend TNF (um das 7-fache), MCP-1 (um das 21-fache) und IL-6 (um das 271-fache). Bei den Feten hingegen war TNF am wenigsten stimulierbar (um das 3-fache), darauf folgten aufsteigend MCP-1 (um das 3-fache), IFN- $\gamma$  (um das 4-fache) und IL-6 (um das 9-fache) (Abbildung 22 I). TUDCA war in der Lage alle LPS-induzierten Zytokinspiegel im Feten (-50 % bis zu -80 %) sowie in der schwangeren Maus (-24 % bis zu -81 %) zu senken (Abbildung 22 J). Diese Reduzierung war bei den verschiedenen Zytokinen unterschiedlich stark ausgeprägt (maternal absteigend: IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, MCP-1; fetal absteigend: MCP-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF). Die durch TUDCA induzierte Suppression war zwischen fetalen und maternalen Zytokinspiegeln vergleichbar, abgesehen von MCP-1, welches fetal deutlich stärker reduziert gemessen wurde. In vielen Fällen wurde durch die Reduzierung sogar das Basisniveau der Kontrolle erreicht. Die TUDCA-Kontrollen zeigten in der Regel keine Veränderung zum Kontrollniveau. Generell zeigte sich, dass die fetalen Plasmaproben in der Regel geringere Zytokinwerte aufwiesen und nicht so stark stimulierbar waren.



**Abbildung 22** Fetaler sowie maternaler Zytokin-Plasmaspiegel (A – H), fold change (I) sowie die Reduktion durch TUDCA (J). Darstellung der Mittelwerte + SEM aus einer durchflusszytometrischen Analyse mittels *mouse inflammation kit* von BD aus unabhängigen Experimenten von 7 – 20 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle und #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

---

Nachdem zuerst die systemische Inflammation in Bezug auf das fetale *Outcome* (Kapitel 5.2.1) und die Inflammation auf zellulärer Ebene *in vivo* im fetalen Organismus (Kapitel 5.2.2-5.2.4) untersucht worden sind, sollen nun in den darauffolgenden Kapiteln die pro-inflammatorischen Stimuli auf verschiedene Zelltypen (ohne zusätzliche Interaktionen mit anderen Zelltypen) isoliert betrachtet werden.

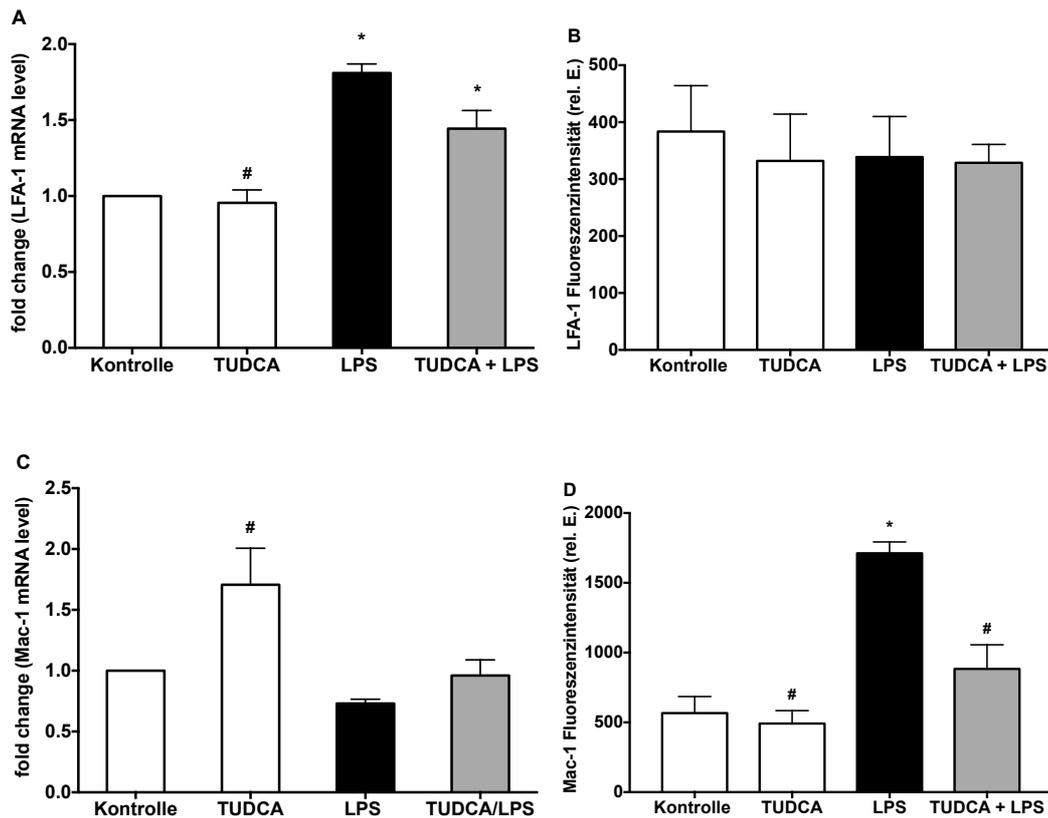
### **5.2.5. Expression verschiedener Inflammationsmarker auf Neutrophilen Granulozyten**

Es sollte nun der Grad der Inflammation sowie der mögliche anti-inflammatorische Effekt von TUDCA auf verschiedene Oberflächenproteine (LFA-1 & Mac-1) auf einem einzelnen Zelltypen, dem Neutrophilen Granulozyten, auf mRNA-Ebene mittels *real-time* qPCR sowie auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie festgestellt werden. Die isolierte Betrachtung der Inflammation der Neutrophilen Granulozyten sollte klären, ob diese ggf. direkt oder indirekt involviert sind.

Nach der Inkubation mit LPS zeigte sich eine 1,8-fache, signifikante Erhöhung der Expression von LFA-1 auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 23 A). Durch die TUDCA/LPS-Gabe (1,4-fach zur Kontrolle) erfolgte keine relevante Reduktion im Vergleich zu der LPS-behandelten Gruppe. Die Werte der TUDCA-Kontrolle lagen in demselben Bereich wie die der Kontrolle. Auf der Proteinebene zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Abbildung 23 B).

Die Analyse des zweiten Integrins Macrophage-1 antigen (Abbildung 23 C), ein weiteres zelluläres Adhäsionsmolekül, ergab bei den Blutproben adulter Mäuse keine signifikante Abnahme der mRNA-Expression nach der LPS-Stimulation (auf das 0,73-fache). Die Expressionswerte nach der TUDCA/LPS-Gabe befanden sich ungefähr auf dem Level der Kontrolle (das 0,96-fache). Die alleinige TUDCA-Behandlung verursachte eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Mac-1-Expression im Vergleich zur Kontrolle.

Hingegen war die Mac-1-Proteinexpression auf Neutrophilen Granulozyten signifikant unterschiedlich zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 23 D). Die robuste LPS-getriggerte Mac-1-Expression auf Neutrophilen Granulozyten konnte durch die zusätzliche Gabe von TUDCA deutlich herabreguliert werden.



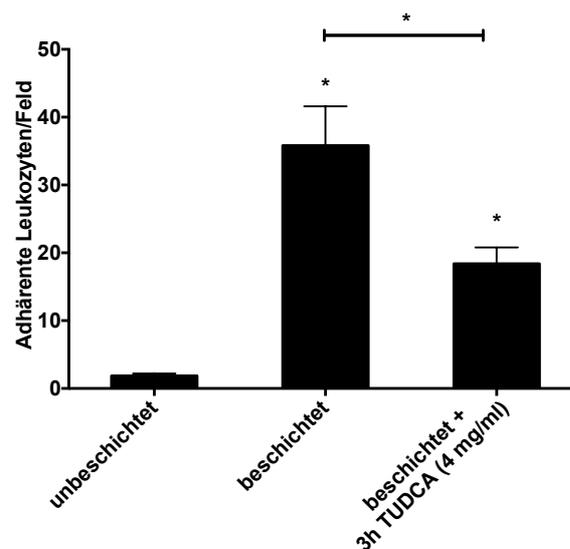
**Abbildung 23 LFA-1 sowie Mac-1-Expression von primären Neutrophilen Granulozyten.** Der Aktivierungszustand der Neutrophilen sollte auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR (A & C) bzw. auf Proteinebene (B & D) mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Die Werte aus  $n = 3 - 5$  unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt und die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \*p vs. Kontrolle, #p vs. LPS mit  $< 0,05$  dargestellt.

Während die LFA-1-Proteinexpression und die Mac-1-Integrin-mRNA durch die Behandlung mit LPS und/oder TUDCA nicht relevant alteriert war, konnte LPS die Proteinexpression von Mac-1 sowie die mRNA-Expression von LFA-1 auf Neutrophilen signifikant steigern, was durch die zusätzliche TUDCA-Behandlung tendenziell oder sogar signifikant unterbunden wurde.

### 5.2.6. Leukozytenrekrutierung der Neutrophilen Granulozyten *in vitro*

Hierbei sollte überprüft werden, ob der in der IVM festgestellte anti-inflammatorische Effekt durch TUDCA durch den Neutrophilen Granulozyten vermittelt wird. Dazu wurden primäre Neutrophile aus dem Knochenmark der Maus isoliert und in den sich anschließenden Flusskammerversuchen das Adhäsionsverhalten untersucht. Da das Endothel in diesem Versuchsaufbau synthetisch und somit statisch ist, kann eine Interaktion ausgeschlossen werden; mögliche festgestellte Effekte sind also ausschließlich auf die Neutrophilen Granulozyten zurückzuführen.

Eine nicht beschichtete Flusskammerkapillare (ohne Adhäsionsmoleküle) diente in diesem Versuch als Kontrolle. Die hier adhärenen Zellen stellen die unspezifischen Bindungen zwischen den Granulozyten und der Kammer dar. Der Unterschied der Anzahl an adhärenen Neutrophilen der nicht beschichteten und der (mit P-Selektin, ICAM-1 und KC) beschichteten Kammer war signifikant (Abbildung 24). Die aufbereiteten Neutrophilen Granulozyten adhärten in der beschichteten Flusskammer 20-fach so häufig wie in der Kontrollkammer. Durch eine vorherige (nach der Aufbereitung der Granulozyten) dreistündige Inkubation mit TUDCA (4 mg/ml) konnte eine signifikante Senkung der Anzahl an adhärenen Neutrophilen erreicht werden. Somit konnte die Adhäsion durch die Behandlung um 49 % (von 36 auf 18 adhärenente Zellen/Feld) gesenkt werden.



**Abbildung 24** Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten *in vitro* in der Flusskammer. Darstellung der Anzahl von adhärenen primären Neutrophilen aus dem Knochenmark der Maus aus  $n = 5$  unabhängigen Experimenten als Mittelwerte + SEM. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \*  $p < 0,05$  dargestellt.

---

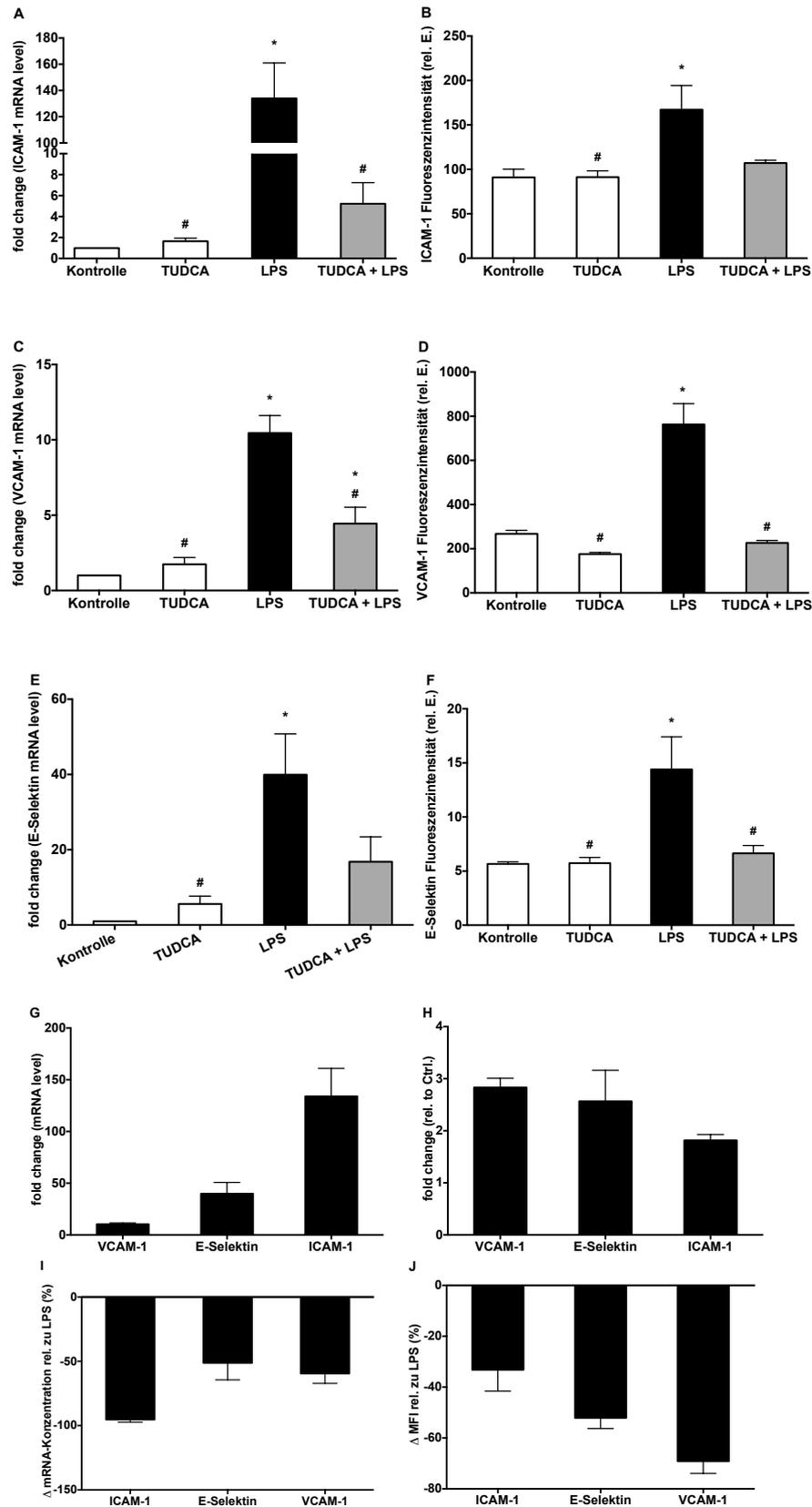
### **5.2.7. Expression verschiedener Inflammationsmarker auf Endothelzellen (MAECs)**

Nachdem in beiden vorherigen Kapiteln die Neutrophilen Granulozyten separat betrachtet wurden, erfolgte in diesem Kapitel die alleinige Betrachtung von Endothelzellen, um beurteilen zu können von welchen Zelltypen der festgestellte pro- (durch LPS) sowie anti-inflammatorische Effekt (durch TUDCA) ausgeht. Hierfür wurden Maus Aorta Endothelzellen (MAECs) verwendet, da diese aus der Vaskulatur des Zielorganismus stammen und daher *in vivo* bei der Leukozytenrekrutierung in den IVM-Versuchen sehr wichtig sind.

#### **5.2.7.1. Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen**

Der Grad der Inflammation sollte zuerst anhand von diversen Inflammationsmarkern festgestellt werden (Adhäsionsmoleküle: ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin). Die Expression der drei Oberflächenmoleküle der MAECs wurde nach den verschiedenen Behandlungen anhand einer qPCR sowie Durchflusszytometrie ermittelt und lieferten dann Anhaltspunkte, um den Grad der Inflammation zu beurteilen.

Es zeigte sich bei allen drei Adhäsionsmolekülen eine Hochregulation der mRNA-Expression (zwischen 10- bis 134-fach) sowie der Protein-Expression (zwischen 2- bis 3-fach) nach der Inkubation mit LPS im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 25 A-H). Durch die zusätzliche Gabe von TUDCA zum LPS ließ sich der Stimulationseffekt zum großen Teil umkehren (Abbildung 25 I-J). Die Expression war nach der TUDCA/LPS-Behandlung auf der mRNA-Ebene (zwischen -51 % – -95 %) sowie der Proteinebene (zwischen -33 % – -69 %) bei allen Molekülen signifikant niedriger als nach der alleinigen LPS-Behandlung – bis auf E-Selektin auf der mRNA-Ebene. Eine alleinige TUDCA-Gabe ergab keine signifikante Erhöhung.



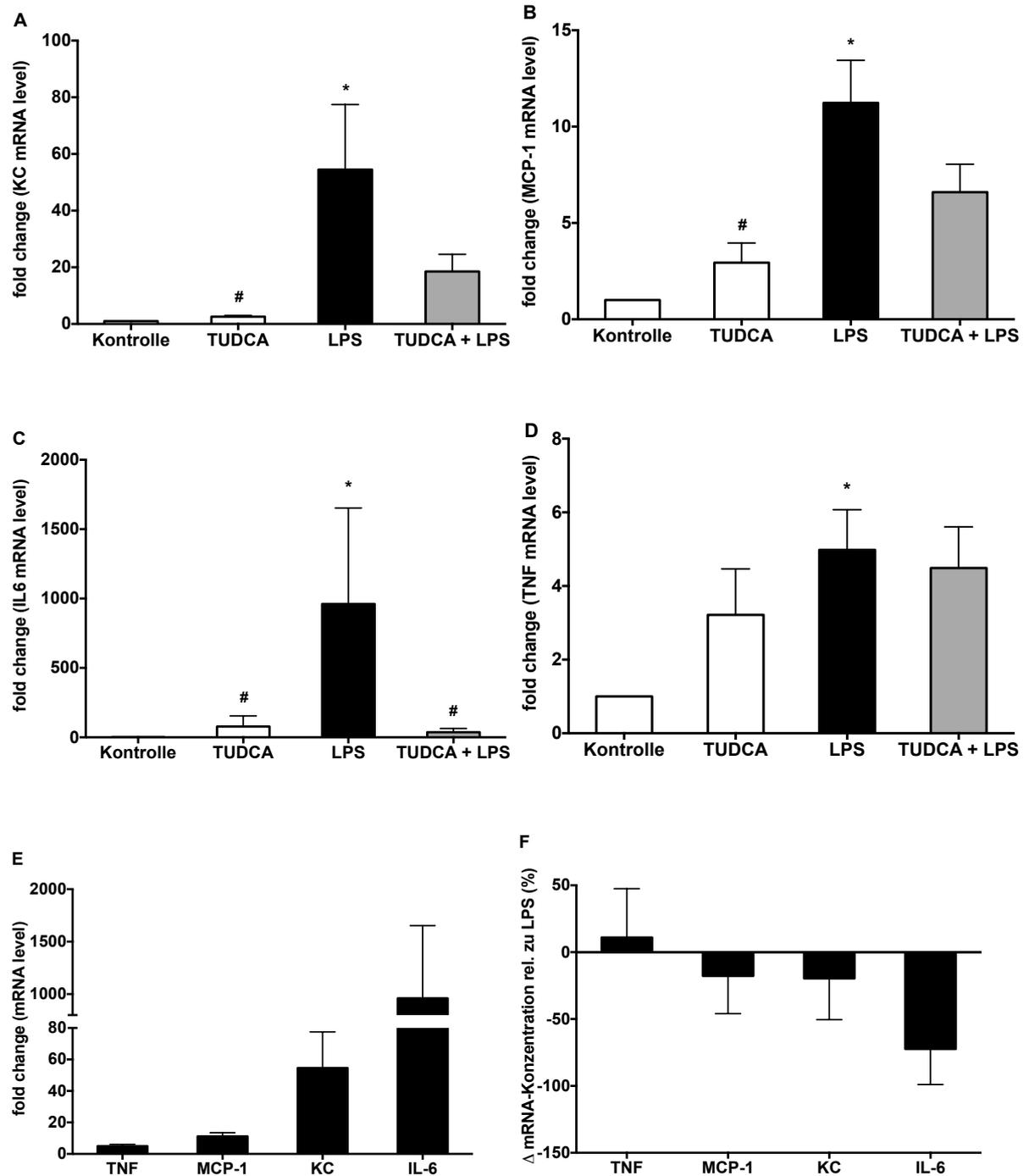
**Abbildung 25 Expression der Adhäsionsmoleküle von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs).** Dargestellt ist die Expression von ICAM-1, VCAM-1 sowie E-Selektin auf mRNA- (A, C, E) und Proteinebene (B, D, F), als fold change (LPS zur Kontrolle; G & H) sowie die Reduktion durch die TUDCA-Gabe (TUDCA/LPS zu LPS; I & J) auf der mRNA- (G & I) und der Proteinebene (H & J). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \*p vs. Kontrolle #p vs. LPS mit < 0,05 dargestellt.

---

### 5.2.7.2. Zytokine der Endothelzellen

Auch bei den MAECs wurden vier Zytokine (KC, MCP-1, IL-6, TNF) auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qPCR als Anzeiger des Inflammationsgrades untersucht (Abbildung 26 A – F).

Durch die LPS-Behandlung zeigte sich bei KC, MCP-1 und IL-6 eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle, die durch eine zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS bei IL-6 signifikant reduziert werden konnte. Alle getesteten Zytokine waren durch LPS stimulierbar, dies jedoch unterschiedlich stark. TNF ließ sich im Vergleich am wenigstens stark hochregulieren (5-fach), darauf folgten MCP-1 (11-fach), KC (55-fach) und am stärksten ließ sich IL-6 (961-fach) stimulieren. Durch die TUDCA/LPS-Behandlung war in den meisten Fällen (außer bei TNF) eine niedrigere mRNA-Expression festzustellen. Nach der Behandlung mit TUDCA/LPS war die TNF-Expression im Durchschnitt um 11 % erhöht. Eine Reduktion der IL-6-mRNA-Expression erfolgte um 73 %, bei KC und MCP-1 um 20 % und 18 %. Durch die alleinige TUDCA-Gabe erfolgte keine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 26** Zytokin-Expression von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs) auf mRNA-Ebene(A-D), als fold change E) und die Reduktion durch die zusätzliche TUDCA-Gabe F). Die A) KC-, B) MCP-1-, C) IL-6- und D) TNF-Expression wurde als Mittelwerte + SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \*p vs. Kontrolle und #p vs. LPS mit < 0,05 dargestellt.

### 5.3. Molekularer Mechanismus von TUDCA

Nachdem in diversen Versuchsreihen und auf unterschiedlichen Ebenen untersucht wurde, ob TUDCA einen anti-inflammatorischen Effekt hat, sollte nun in diesem Kapitel herausgefunden werden, über welchen Signalweg dieser Effekt reguliert wird.

#### 5.3.1. ER-Stress (*unfolded protein response* (UPR))

Im Endoplasmatischen Retikulum werden Proteine synthetisiert. Wenn diese fehl- oder ungefaltet sind, kann ER-Stress entstehen, der wiederum eine Inflammation auslösen und unterhalten kann. Es wurden diverse Schlüsselmoleküle aus der UPR-Kaskade (verschiedene Rezeptoren, ein wichtiges Chaperon, diverse Transkriptionsfaktoren) ausgesucht und in der vorliegenden Arbeit die Expression dieser ER-Stress-Marker mittels verschiedener Methoden auf molekularer Ebene untersucht, um zu testen ob TUDCA als ER-Stresshemmer über diesen Signalweg fungiert und so einen anti-inflammatorischen Effekt auslöst.

Zur Erforschung des ER-Stresses wurden im Folgenden die Rezeptoren IRE1 $\alpha$ , PERK und ATF6, sowie das Chaperon BiP und die Transkriptionsfaktoren ATF4, XBP1, CHOP und Casp12 in den Fokus genommen (vgl. Abbildung 41). Im Folgenden sind die immunhistochemischen Ergebnisse aufgeführt.

##### 5.3.1.1. Untersuchungen von *Inositol-requiring enzyme 1 alpha* (IRE1 $\alpha$ )

IRE1 $\alpha$  ist ein Rezeptor, der bei der Signalübertragung vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Nukleus eine wichtige Rolle spielt und in der Membran des ER's sitzt. Im Falle von ER-Stress und der daraus resultierenden **U**nfolded **P**rotein **R**esponse (UPR), wird IRE1 $\alpha$  mit als Erstes in der Kaskade aktiviert und wurde daher hier als Erstes analysiert. Um die Expression von IRE1 $\alpha$  *in vivo* zu analysieren, wurden immunhistologische Untersuchungen von fetalen Lungen, Nieren und Plazenten sowie maternalen Lungen und Nieren angefertigt und mit Hilfe eines Antikörpers gegen IRE1 $\alpha$  angefärbt. Im Anhang in Abbildung A7 sind diesbezüglich repräsentative Bilder dargestellt.

---

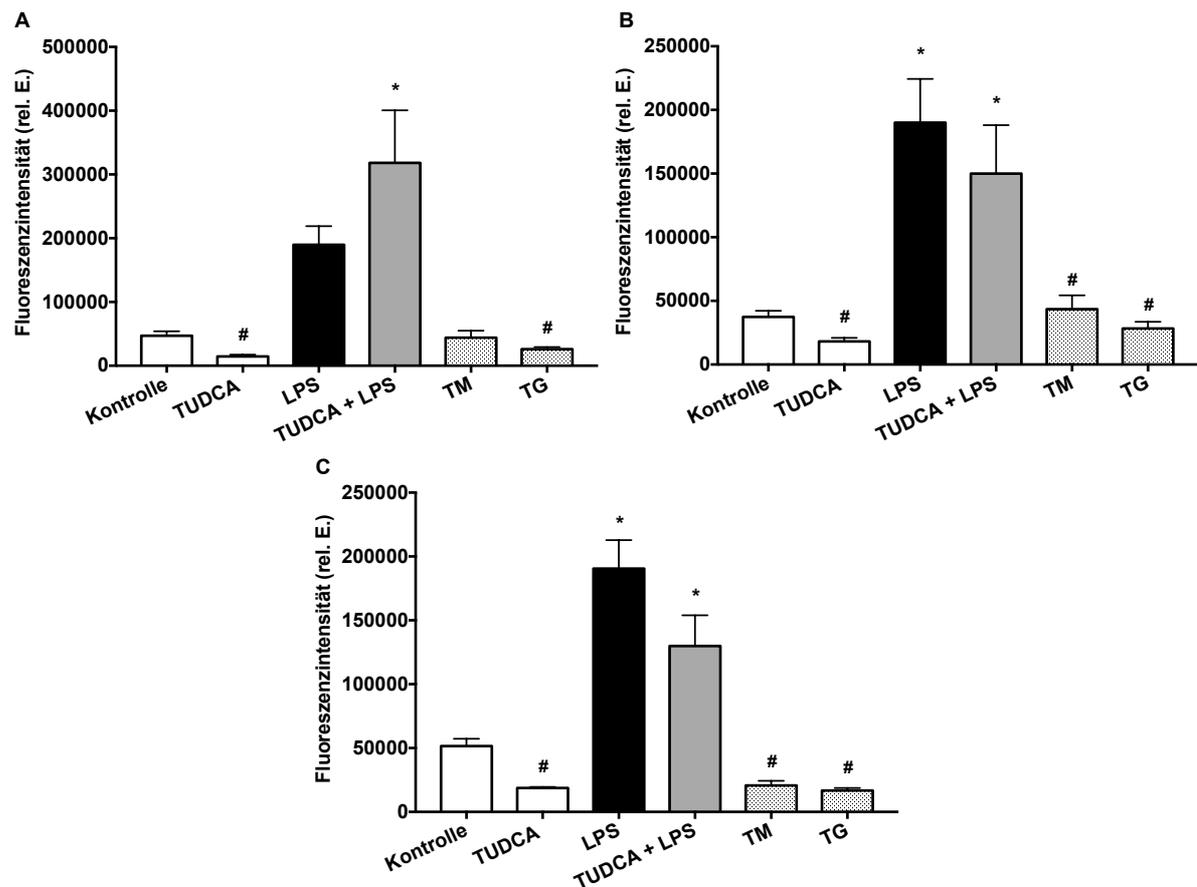
### **Fetale Lunge, Niere, Chorion**

Im fetalen Lungengewebe war zu erkennen, dass die IRE1 $\alpha$ -Expression nach einer LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle um das Vierfache angestiegen war und auch signifikant höher war als die Werte der TUDCA-Kontrolle (Abbildung 27 A). Durch eine zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS wurde die Fluoreszenzintensität nicht signifikant verändert.

Ein vergleichbares Bild bezüglich der IRE1 $\alpha$ -Expression zeigte sich bei den Nierenpräparaten (Abbildung 27 B). Nach der LPS-Stimulation erfolgte eine erheblich stärkere Zunahme, um das Fünffache der Fluoreszenzintensität, im Vergleich zur Kontrolle. Nach der TUDCA/LPS-Behandlung zeigte sich ein Trend, aber keine signifikante Reduktion der Werte.

Auch im Chorion zeigten sich bei der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von IRE1 $\alpha$  ähnliche Ergebnisse nach den verschiedenen Behandlungen (Abbildung 27 C). Die Basis-Expression der Kontrolle konnte durch die LPS-Stimulation signifikant um mehr als das Dreifache gesteigert werden. Nach der zum LPS zusätzlichen TUDCA-Behandlung war eine geringfügig niedrigere Expression im Vergleich zur LPS-Behandlung zu erkennen.

Bei allen drei Organen gab es keine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch die alleinige Gabe von TUDCA sowie durch die Behandlung mit den ER-Stressinduktoren Tunicamycin (TM) und Thapsigargin (TG).



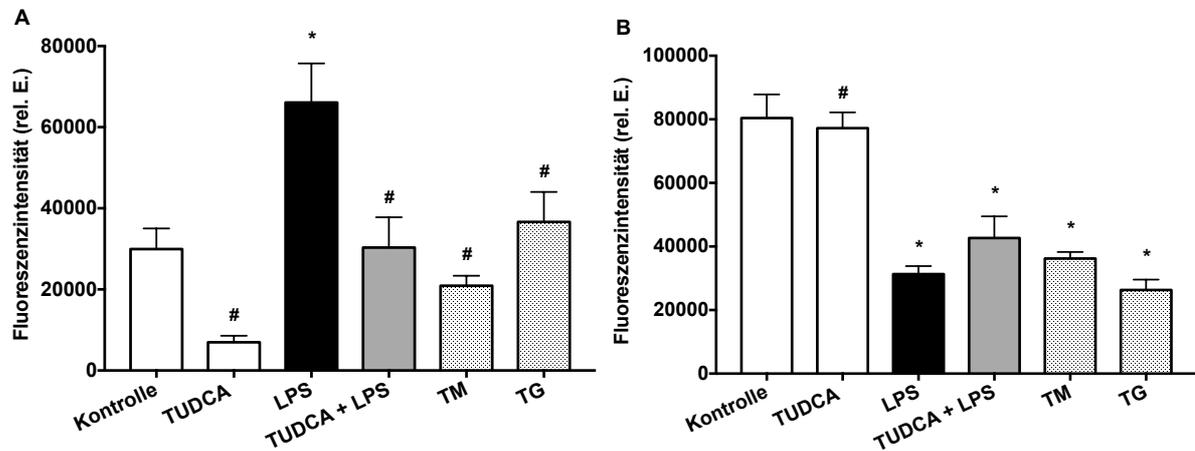
**Abbildung 27** *Inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1α)*-Fluoreszenzintensitäten in **A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion**. Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von IRE1α und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Feten)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

### Maternale Lunge, Niere

In der Lunge der adulten, schwangeren Mäuse führte die LPS-Behandlung zur signifikanten IRE1α-Hochregulation in etwa um das Doppelte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 28 A). Die IRE1α-Expression nach der TUDCA/LPS-Behandlung war signifikant niedriger als die nach der LPS-Behandlung und ungefähr auf dem Niveau der Kontrolle.

Nach der IHC-Färbung der renalen Schnitte der schwangeren Mäuse hingegen zeigte sich ein anderes Bild (Abbildung 28 B). Hierbei wiesen die allgemeine Kontrolle sowie die TUDCA-Kontrolle die höchsten Fluoreszenzwerte auf, die nach der LPS-Behandlung signifikant um das Dreifache niedriger waren. Die Behandlung mit TUDCA/LPS ergab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur LPS-Behandlung.

In beiden maternalen Organen gab es durch die alleinige TUDCA-Behandlung sowie nach der Applikation der ER-Stressinduktoren Tunicamycin und Thapsigargin keine signifikante Hochregulation im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 28** *Inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1α)*-Fluoreszenzintensitäten in **A)** der maternalen Lunge und in **B)** der maternalen Niere. Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von IRE1α und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Maus)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

Bei der fetalen Lunge, Niere, dem Chorion und der maternalen Lunge ließ sich eine Stimulation der IRE1α-Expression durch die LPS-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle beobachten. Durch die zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS zeigte sich nur bei der maternalen Lunge eine signifikante Senkung der Fluoreszenzintensitätswerte im Vergleich zur LPS-Behandlung (um 54 %). Bei der fetalen Niere (um 21 %) und dem Chorion (um 32 %) war ebenfalls ein Trend zur Reduktion zu erkennen. Die Expressionswerte der TUDCA-Kontrolle sowie die der ER-Stressinduktoren Tunicamycin und Thapsigargin befanden sich immer auf einem niedrigen Niveau unter bzw. auf Höhe der Kontrolle.

### 5.3.1.2. Untersuchungen des Chaperons *Binding immunoglobulin Protein (BiP)*

Im Verlauf der Proteinsynthese im ER spielt das Chaperon BiP eine sehr wichtige Rolle bei der Faltung der Proteine. Nach Auftreten von fehlgefalteten Proteinen im ER, löst sich BiP von den membranständigen Rezeptoren des ER's und bindet an diese fehlgefalteten Proteine. Durch das Ablösen des Chaperons startet die UPR-Signalkaskade. Die Expression

des Chaperons lässt Rückschlüsse auf den Grad der Inflammation zu, also ob ER-Stress vorhanden ist. In Abbildung A8 sind diesbezüglich repräsentative Bilder dargestellt.

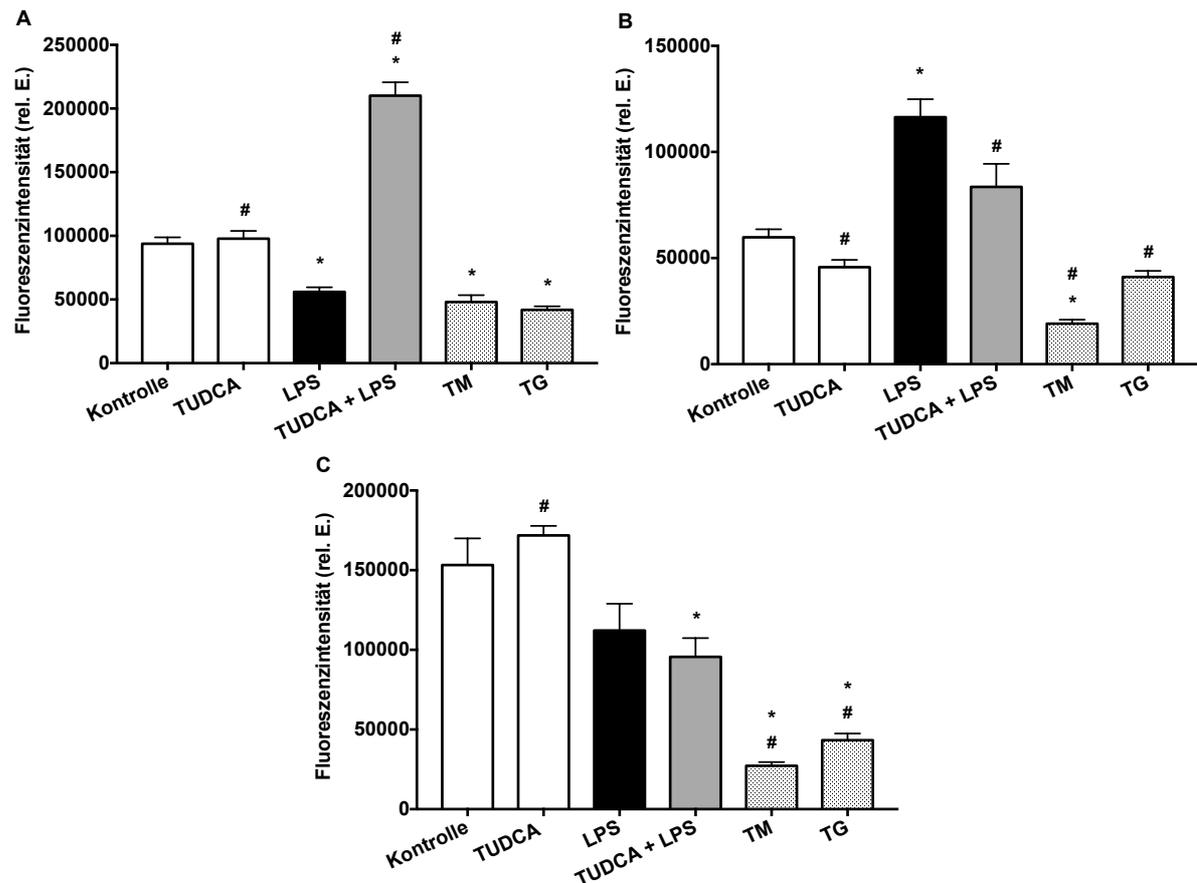
### **Fetale Lunge, Niere, Chorion**

Bei den immunhistologischen Auswertungen der fetalen Lungenschnitte (Abbildung 29 A) ergab sich, dass die Expression von BiP nach der TUDCA/LPS-Behandlung am höchsten war und die der Kontrolle sowie TUDCA-Kontrolle signifikant niedriger. Nach der LPS-Stimulation wurde eine signifikant niedrigere Expression als im Basiszustand detektiert (1,7-fach weniger). Die Fluoreszenzintensitäten nach der Behandlung mit den beiden ER-Stressinduktoren TM und TG waren am geringsten.

Bei der fetalen Niere hingegen konnte der Basiswert der BiP-Expression signifikant durch eine LPS-Applikation erhöht werden (um das 1,9-fache). Nach einer zum LPS zusätzlichen TUDCA-Behandlung war der Wert signifikant niedriger (Abbildung 29 B).

Die Basis-Expressionswerte im Chorion (Abbildung 29 C) waren im Vergleich zu den anderen Behandlungen am höchsten. Die Fluoreszenzintensitäten nach einer LPS- sowie TUDCA/LPS-Behandlung waren (um das 1,4-fache & 1,6-fache) niedriger als die der Kontrolle und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

In keinem Gewebe wurde eine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität durch die alleinige TUDCA-Gabe im Vergleich zur Kontrolle detektiert. Ebenfalls wurde in keinem Organ die Fluoreszenzintensität durch die ER-Stressinduktoren Tunicamycin und Thapsigargin signifikant hochreguliert.

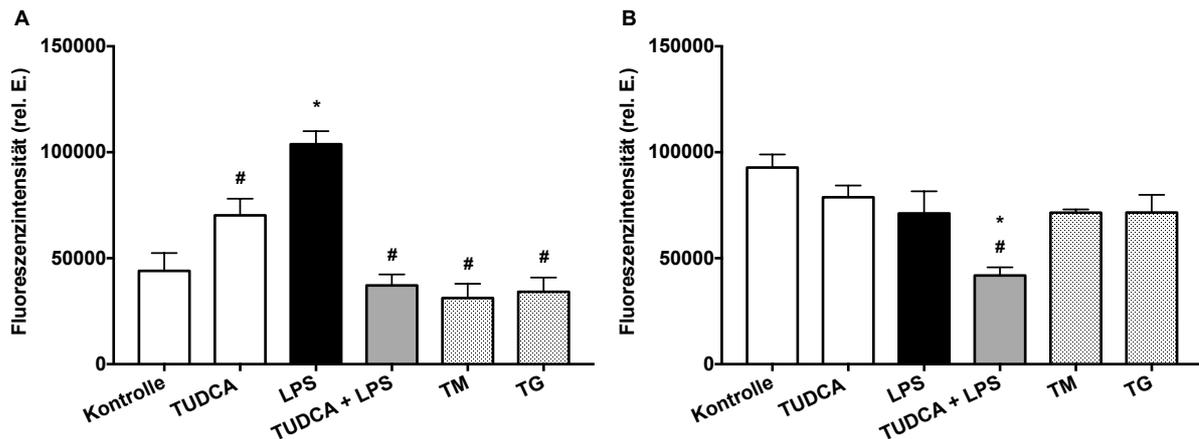


**Abbildung 29** *Binding immunoglobulin Protein (BiP)*-Fluoreszenzintensitäten in **A)** der fetalen Lunge, **B)** der fetalen Niere und **C)** dem Chorion. Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von BiP und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Feten)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

### Maternale Lunge, Niere

Die immunhistochemisch bestimmte Proteinexpression von BiP in den Lungenschnitten (Abbildung 30 A) der schwangeren Mäuse, waren nach der LPS-Behandlung signifikant um das 2,4-fache höher im Vergleich zu allen anderen Behandlungen. Die Expressionen der Kontrollgruppe und der TUDCA-Kontrolle waren signifikant geringer als nach der LPS-Stimulation. Die Fluoreszenzintensitätswerte der TUDCA/LPS-, der Thapsigargin- sowie der Tunicamycin-Gruppe waren am geringsten und somit signifikant niedriger als nach der LPS-Behandlung.

Bei den maternalen Nierenschnitten (Abbildung 30 B) zeigte die Kontrollgruppe die höchsten Expressionswerte. Die anderen Behandlungen lagen in demselben Bereich; ausschließlich nach der TUDCA/LPS-Behandlung, bei der die geringsten Werte vorlagen, war ein signifikanter Unterschied zu erkennen (2,2-fach reduziert im Vergleich zur Kontrolle).



**Abbildung 30** *Binding immunoglobulin Protein (BiP)*-Fluoreszenzintensitäten in **A** der maternalen Lunge und in **B** der maternalen Niere. Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von BiP und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Maus)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

Es zeigte sich nur bei den fetalen Nieren- und den maternalen Lungenschnitten eine signifikante Stimulation durch die LPS- und eine signifikante Reduktion durch die TUDCA/LPS-Gabe in Bezug auf die BiP-Expression. In den maternalen Lungenpräparaten erfolgte die stärkste Reduktion durch die zusätzliche TUDCA-Gabe zum LPS (um 64 %) im Vergleich zu den maternalen Nierenschnitten (um 42 %) und den fetalen Nierenschnitten (um 28 %) sowie den Plazentaschnitten (um 15 %). Nur in den fetalen Lungenanalysen konnte keine Reduktion durch die zusätzliche TUDCA-Gabe detektiert werden. Die Werte der TUDCA-Kontrollen befanden sich in einem ähnlichen Bereich wie die der Kontrollen und auch die der ER-Stressinduktoren.

### 5.3.1.3. Untersuchungen des *Activating transcription factor 4 (ATF4)*

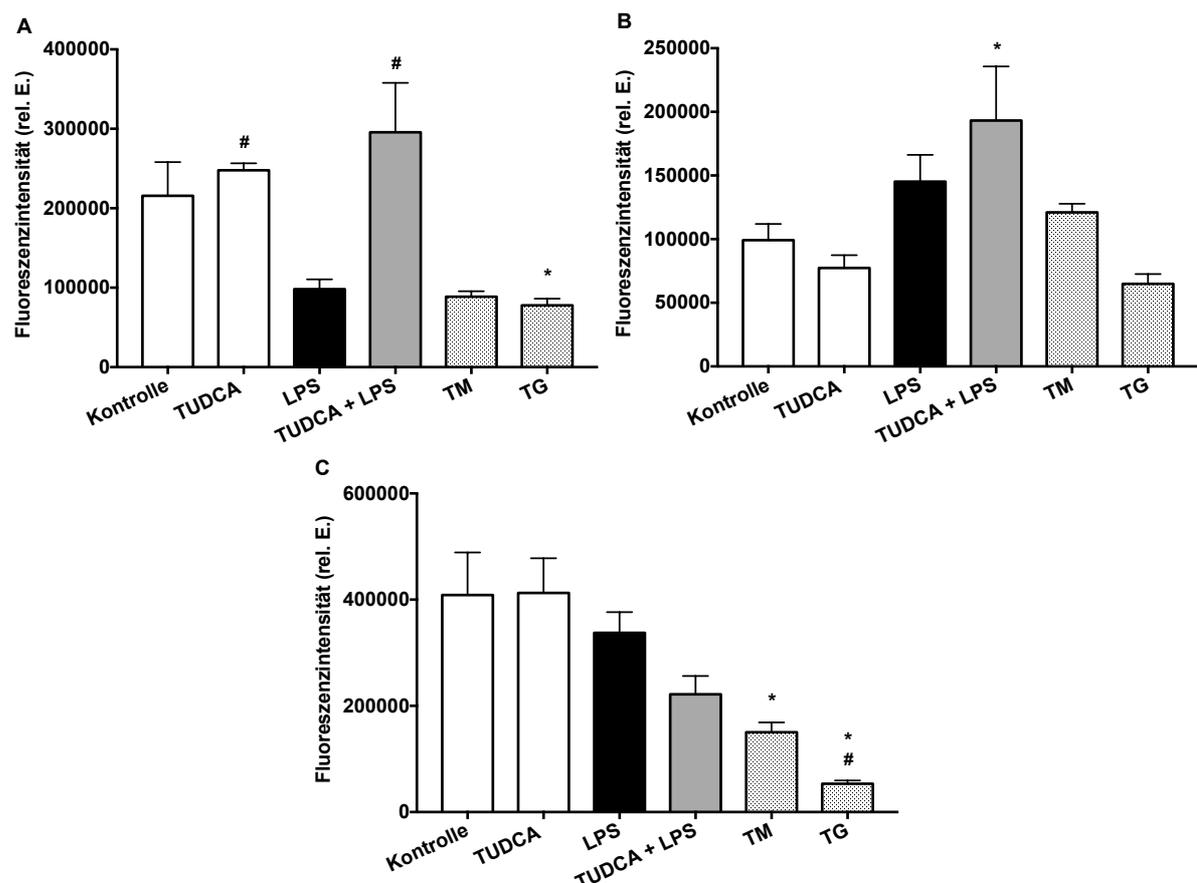
Transkriptionsfaktoren übernehmen bei der mRNA-Synthese eine wichtige Aufgabe als Regulatoren. ATF4 ist unter anderem für die Induktion von CHOP zuständig und wurde *in vivo* anhand von immunhistologischen Untersuchungen von fetalen Lungen, Nieren und Plazenten sowie maternalen Lungen und Nieren analysiert. In Abbildung A9 sind diesbezüglich repräsentative Bilder dargestellt.

### Fetale Lunge, Niere, Chorion

Die immunhistochemischen Analysen der fetalen Lunge zeigten den höchsten Wert nach der TUDCA/LPS-Behandlung (um das 1,4-fache erhöht), der sich in einem ähnlichen Bereich befand, wie die Werte der beiden Kontrollen (Abbildung 31 A). Nach der Behandlung mit LPS, Tunicamycin und Thapsigargin lagen die geringsten Werte vor.

Bei der fetalen Niere dagegen ist eine leichte Erhöhung (um das 1,5-fache) der ATF4-Expression nach der LPS-Stimulation zu erkennen gewesen. Nach der zusätzlichen TUDCA-Gabe zum LPS gab es keine Reduzierung, eher eine weitere Erhöhung. Die Fluoreszenzintensitätswerte von ATF4 lagen nach der Tunicamycin- und Thapsigargin-Behandlung im Bereich der Kontrollen (Abbildung 31 B).

Im Chorion wiesen die Proben der Kontrollen die höchsten ATF4-Expressionen auf (Abbildung 31 C), danach folgten die LPS- und TUDCA/LPS-Behandelten sowie die mit den ER-Stressinduktoren behandelten Tiere.

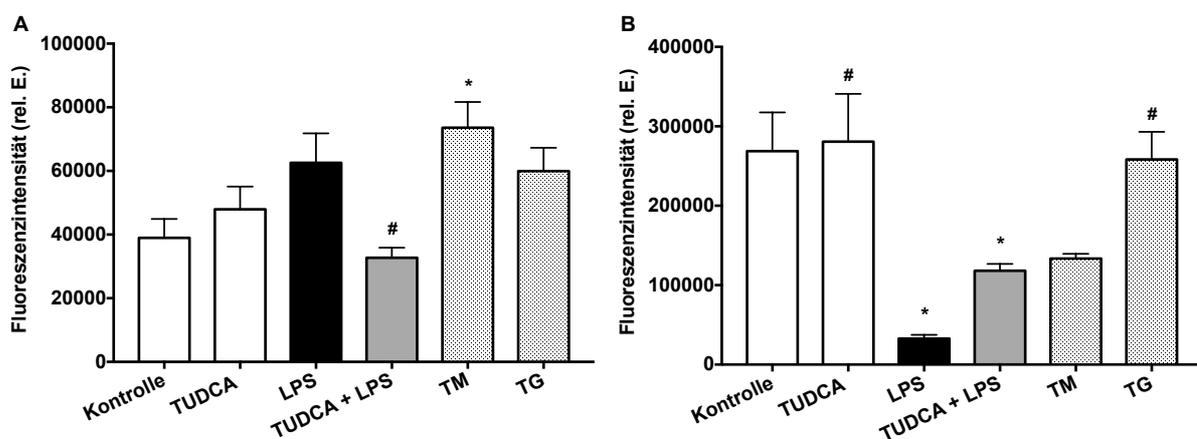


**Abbildung 31 Activating transcription factor 4 (ATF4)-Fluoreszenzintensitäten in A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion.** Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von ATF4 und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Feten)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

### Maternale Lunge, Niere

Bei der adulten Lunge war nach der immunhistochemischen Färbung zu erkennen (Abbildung 32 A), dass das stärkste Signal nach der TM-Behandlung vorlag. Eine geringere Stimulation erfolgte nach der LPS-Behandlung (1,6-fach erhöht), die allerdings nicht signifikant höher war als die Intensitäten der Kontrollen. Durch die zum LPS zusätzlichen TUDCA-Gabe erfolgte eine signifikante Reduzierung (um das 1,9-fache) im Vergleich zur alleinigen LPS-Gabe.

Bei der maternalen Niere zeigte sich bei ATF4 ein ähnliches Muster wie schon bei den anderen Molekülen (Abbildung 32 B). Die Fluoreszenzintensitätswerte der Kontrolle sowie der TUDCA-Kontrolle waren die Höchsten und die der LPS-Behandlung die Niedrigsten (8,2-fach niedriger im Vergleich zur Kontrolle), die somit niedriger als nach der Behandlung mit TUDCA/LPS waren. Nach der TM- und der TG-Behandlung lag ebenfalls keine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Kontrolle vor.



**Abbildung 32** *Activating transcription factor 4 (ATF4)*-Fluoreszenzintensitäten in A) der maternalen Lunge und in B) der maternalen Niere. Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von ATF4 und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Maus)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

Weder bei den fetalen noch den maternalen immunhistologischen Analysen der ATF4-Expression zeigte sich eine signifikante Erhöhung durch die Behandlung mit LPS oder eine Senkung durch die Zugabe von TUDCA/LPS. Einen Trend zur Reduktion durch eine TUDCA-Gabe gab es sogar nur bei zwei von fünf Organen (maternale Lunge: um 48 %; Chorion: um 34 %).

#### **5.3.1.4. Untersuchungen von *X-box binding Protein 1 (XBP1)***

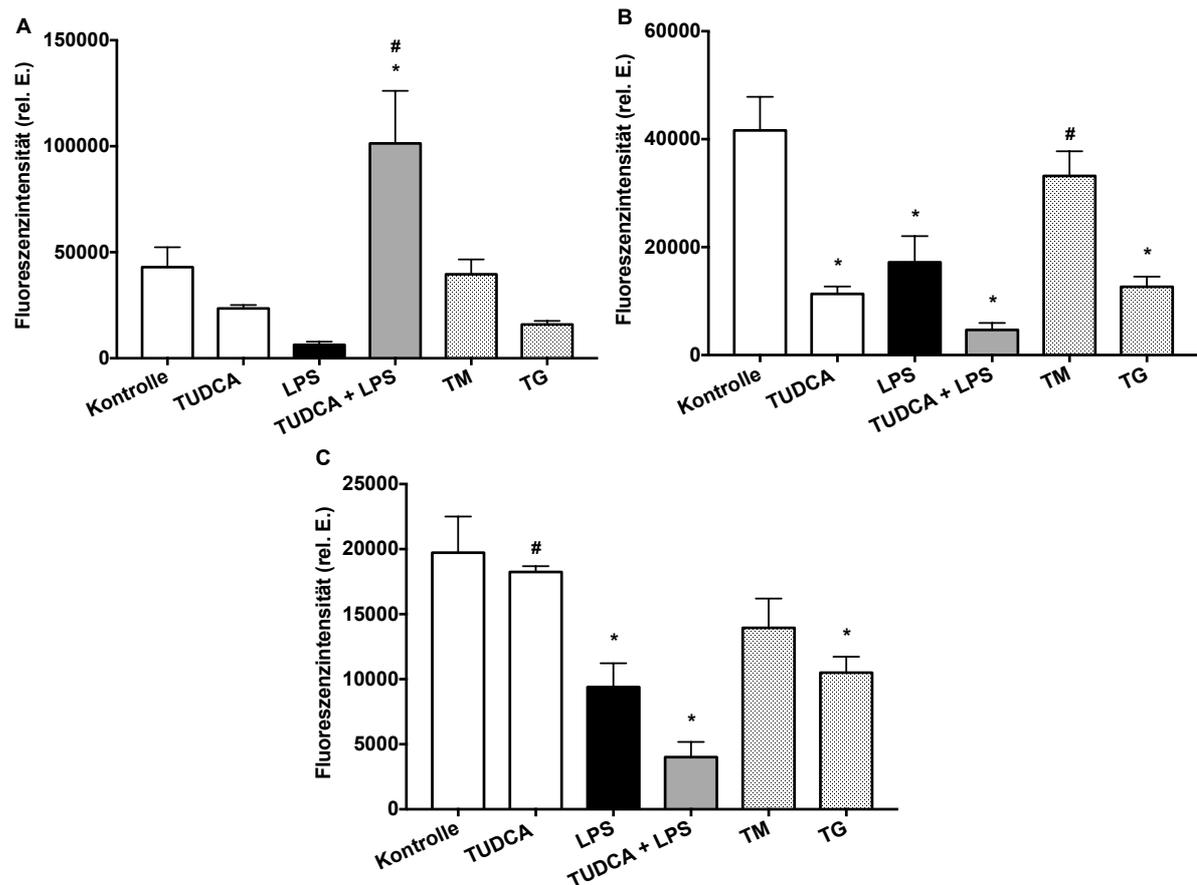
Das *X-box binding Protein 1 (XBP-1)* ist ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor innerhalb der Signalkaskade bzgl. des ER-Stresses und wurde aus diesem Grund ebenfalls betrachtet. Auch hierbei wurde die Expression in diesem Falle von XBP1 in der fetalen Lunge, Niere und im Chorion sowie der maternalen Lunge und Niere immunhistologisch untersucht. In Abbildung A10 sind diesbezüglich repräsentative Bilder dargestellt.

##### **Fetale Lunge, Niere, Chorion**

In Abbildung 33 A ist bei den Fluoreszenzwerten der fetalen Lunge zu erkennen, dass nach einer LPS-Stimulation die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitätswerte im Vergleich zur Kontrolle (um das 6,7-fache) gesenkt wurden und dadurch auch niedriger als die der TUDCA-Kontrolle waren. Nach der TUDCA/LPS-Behandlung erhöhten sie sich signifikant im Vergleich zur Kontrolle und zur LPS-Behandlung.

In der fetalen Niere (Abbildung 33 B) zeigten die histologischen Untersuchungen von XBP1, dass die Kontrollwerte am höchsten und die nach der LPS-Behandlung signifikant (um das 2,4-fache) niedriger waren. Der niedrigste Wert lag nach der TUDCA/LPS-Behandlung vor, der sogar niedriger als der von der TUDCA-Kontrolle war.

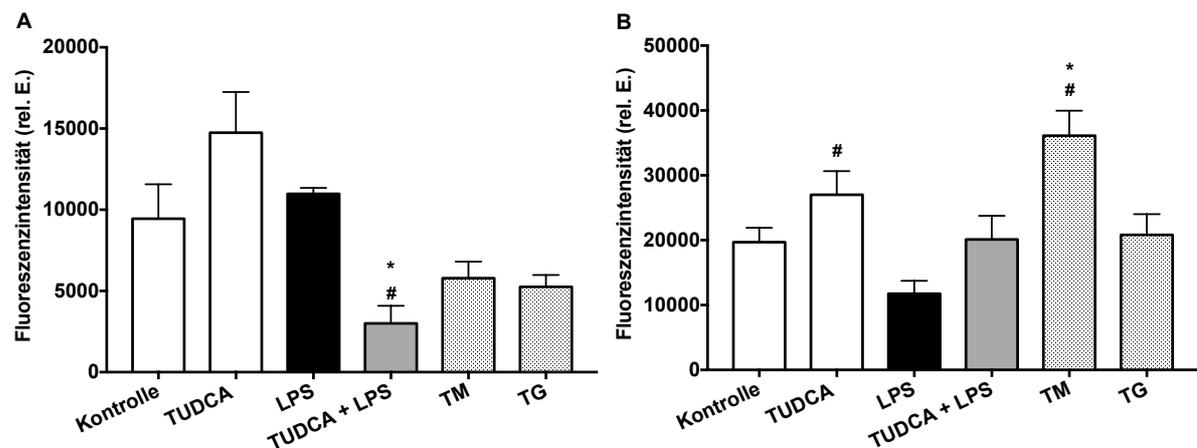
Die XBP1-Expression im Chorion ist in Abbildung 33 C dargestellt. Bei den Kontrollen traten mit Abstand die höchsten Fluoreszenzintensitäten auf, die nach der LPS-Behandlung signifikant niedriger waren (um das 2,1-fache). Die Intensitäten nach der TUDCA/LPS-, TM- sowie TG-Applikation unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Werte nach der Tunicamycin- sowie Thapsigargin-Behandlung überstiegen in keinem Organ die der Kontrolle.



**Abbildung 33 X-box binding Protein 1 (XBP1)-Fluoreszenzintensitäten in A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion.** Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von XBP1 und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Feten)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

### Maternale Lunge, Niere

In der maternalen Lunge waren die Werte der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollen ebenfalls sehr hoch. Nach der LPS-Stimulation lagen nur minimal höhere Werte (1,2-fach) vor als bei der allgemeinen Kontrollgruppe (Abbildung 34 A). Hingegen nach der Applikation von TUDCA/LPS zeigten sich signifikant niedrigere Fluoreszenzintensitäten. Die Behandlungen mit den beiden ER-Stressinduktoren wiesen ebenfalls niedrigere Werte auf. Die Untersuchung der adulten Nierenschnitte ergab nach der Tunicamycin-Behandlung die höchsten Intensitätswerte (1,8-fach erhöht im Vergleich zur Kontrolle), die signifikant höher als die der Kontrolle und der LPS-Behandlung waren (Abbildung 34 B). Die TUDCA-Kontrolle wies ebenfalls signifikant höhere XBP1-Intensitätswerte als die LPS-Behandlung auf. Die Werte der TUDCA/LPS- sowie der TG-Behandlung unterschieden sich nicht signifikant und befanden sich in einem ähnlichen Bereich wie die der Kontrolle.



**Abbildung 34** *X-box binding Protein 1 (XBP1)*-Fluoreszenzintensitäten in **A** der maternalen Lunge und in **B** der maternalen Niere. Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von XBP1 und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Maus)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

Nach den immunhistologischen Analysen von XBP-1 zeigte sich weder bei den fetalen noch den maternalen Proben eine signifikante Erhöhung durch die LPS-Behandlung. Im Gegenteil, die Fluoreszenzintensitätswerte nach der LPS-Applikation waren meist niedriger als die der Kontrolle. Eine signifikante Reduktion durch die zusätzliche TUDCA-Applikation zum LPS gab es nur bei der maternalen Lunge (um 73 %). Bei der fetalen Niere (um 73 %) und dem Chorion (um 57 %) gab es einen Trend zur Reduktion der Werte durch TUDCA.

### 5.3.1.5. Untersuchungen von *CCAAT/enhancer-binding-protein homologous protein (CHOP)*

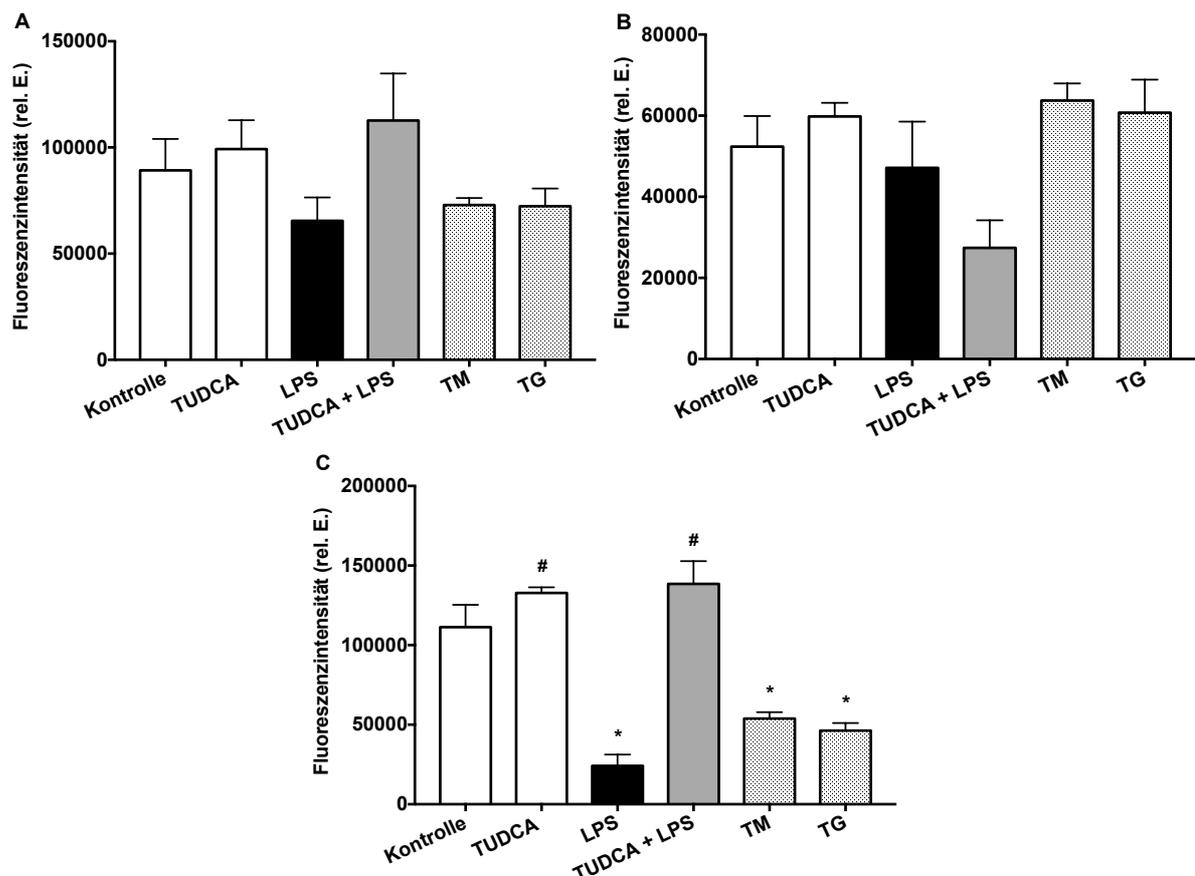
CHOP ist ein sich am Ende der Signalkaskade des ER-Stresses befindendes Molekül, das als Transkriptionsfaktor bei aussichtsloser Regulation des ER-Stresses aktiviert wird und schlussendlich für die Apoptose der Zelle sorgt. Um die Expression von CHOP nach den verschiedenen *in vivo*-Behandlungen zu analysieren, wurden ebenfalls immunhistologische Untersuchungen von fetalen sowie maternalen Organen durchgeführt. In Abbildung A11 sind diesbezüglich repräsentative Bilder dargestellt.

### Fetale Lunge, Niere, Chorion

In der fetalen Lunge waren insgesamt nur sehr geringe nicht signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen bezüglich der CHOP-Expression zu erkennen (Abbildung 35 A).

Renale Fluoreszenzintensitäten von CHOP im Feten zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 35 B).

Bei den Gewebsschnitten der Plazenta (im Bereich des Chorions) hingegen zeigten die Fluoreszenzintensitäten der Kontrollen im Durchschnitt signifikant höhere Werte als die nach der LPS-Behandlung (4,6-fach reduziert). Eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur LPS-Behandlung erfolgte durch die TUDCA/LPS-Gabe. Die CHOP-Expression nach der TM- sowie TG-Behandlung befand sich in etwa demselben Bereich und war signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe (Abbildung 35 C).

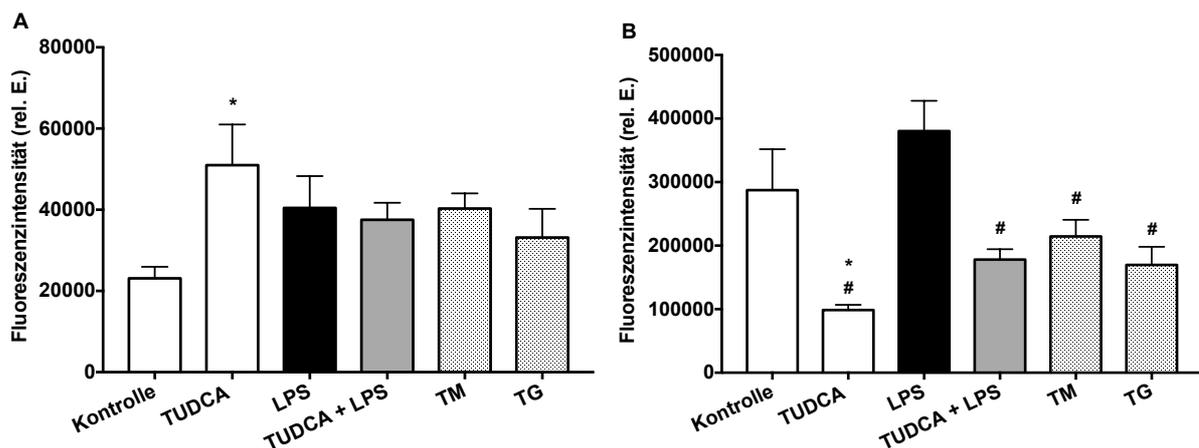


**Abbildung 35** CCAAT/-enhancer-binding-protein homologous protein (CHOP)-Fluoreszenzintensitäten in A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion. Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von CHOP und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Feten)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

### Maternale Lunge, Niere

In Abbildung 36 A ist zu erkennen, dass die maternalen Lungenschnitte die höchsten Fluoreszenzwerte nach der alleinigen TUDCA-Behandlung im Vergleich zu den geringsten Werten der Kontrollgruppe aufwiesen (2,2-fach erhöht). Expressionen der LPS-, TUDCA/LPS-, TM- sowie TG-Behandelten lagen alle etwa in einem Bereich und unterschieden sich nicht signifikant.

Bei der Analyse der Niere hingegen (Abbildung 36 B) wies die Kontrollgruppe eine minimal niedrigere Expression als die der LPS-Behandelten auf (1,3-fach erhöht). Die Werte der TUDCA/LPS-Gruppe lagen signifikant niedriger, wie auch die der TUDCA-, TG- und TM-Behandlung.



**Abbildung 36** CCAAT/-enhancer-binding-protein homologous protein (CHOP)-Fluoreszenzintensitäten in **A)** der maternalen Lunge und in **B)** der maternalen Niere. Die Werte aus unabhängigen immunhistochemischen Analysen von CHOP und anschließender Bestimmung der Fluoreszenzintensitätswerte mittels ImageJ von jeweils 3 schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E17) sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (N (Maus)= 3; n (Bilder) = 30). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle; #p vs. LPS < 0,05 dargestellt.

Nur bei den maternalen Lungen- und Nierenpräparaten zeigte sich der Trend, dass durch LPS eine Stimulation der CHOP-Expression auf Proteinebene stattfand. Insgesamt gab es keine signifikante Erhöhung nach der LPS-Gabe. Eine signifikante Reduktion durch TUDCA gab es ausschließlich bei der maternalen Niere (um 53 %). Einen Trend zur Reduktion lag ebenfalls bei der maternalen Lunge (um 7 %) und der fetalen Niere (um 42 %) vor.

---

### 5.3.1.6. Ergebniszusammenfassung zur Rolle von ausgewählten ER-Stressmolekülen im Projekt

Die Expressionsanalyse der Moleküle aus den drei gewählten Gruppen (Rezeptoren, Chaperone, Transkriptionsfaktoren) der UPR-Signalkaskade, die durch den ER-Stress ausgelöst wird, ergab keine konsistente Hochregulation durch LPS und keine konsistente Blockade einer LPS-bedingten Stimulation durch TUDCA. In einigen Versuchen gab es den Trend, dass die Werte nach der LPS-Behandlung anstiegen und nach der TUDCA/LPS-Behandlung niedriger waren. Aber in den meisten Fällen war die Expression bei den Kontrollen und der TUDCA/LPS-Gruppe recht hoch. Die Ergebnisse der ER-Stress-Expressionsanalysen der fetalen Proben unterschieden sich häufig von denen der Schwangeren, ein klares Muster war jedoch nicht zu erkennen. Obgleich nicht immer konsistent, waren die immunhistochemischen Expressionsanalysen im Vergleich zu den anderen Expressionsanalysen (s. Anhang) noch am aussagekräftigsten. So zeigten die mittels Western Blot erlangten Ergebnisse bzgl. der Proteinexpression (fetale Lunge & Leber) bei keinem der ausgewählten Moleküle eine signifikante Hochregulation durch LPS (Abbildung A12). Bei IRE1 $\alpha$ , BiP und XBP1 gab es lediglich einen Trend zur Steigerung der Expression. Ebenfalls sind *in vitro* auf mRNA-Ebene (MAECs) keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse detektiert worden, daher sind diese Ergebnisse im Anhang dargestellt (Abbildung A13).

### 5.3.2. Weitere Signalwege

Es wurden nun weitere mögliche TUDCA-induzierte anti-inflammatorische Signalwege in den Fokus genommen, wie der oxidative Stress und der TNF-Signalweg. Weiterhin wurde die Expression des TGR5-Rezeptors, der den MAP-Kinase-Signalweg aktiviert, mittels Analysen von MAECs auf der mRNA-Ebene untersucht.

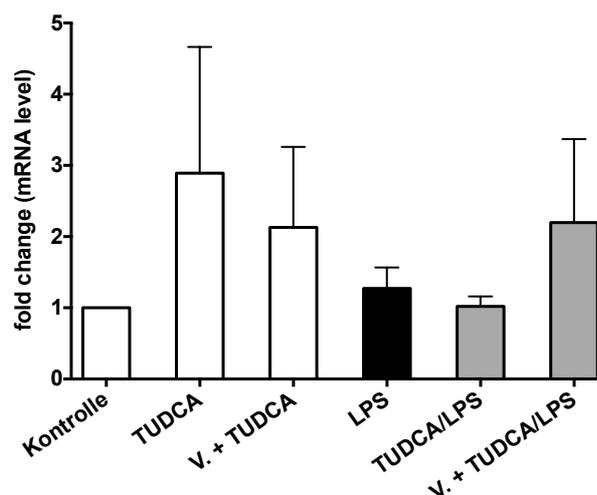
Die Analysen von p47(phox) bzgl. des oxidativen Stresses und TRAF2 bzgl. des TNF-Signalwegs ergaben auf mRNA-Ebene keine signifikanten Änderungen nach den Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle und sind daher im Anhang dargestellt (Abbildung A14). Da diese Ergebnisse nicht zielführend waren, wurde auf weitere Untersuchungen mittels verschiedener Methoden dieser Marker verzichtet und der TGR5-Signalweg in den Fokus genommen.

### **Takeda G Protein-Coupled Rezeptor 5 (TGR5) – MAP-Kinase-Signalweg**

TGR5 oder auch *G protein-coupled bile acid receptor 1* (GPBAR1) ist ein membranständiger Rezeptor, der Gallensäuren direkt binden und den MAP-Kinase-Signalweg aktivieren kann. Es sollte daher überprüft werden, ob die natürlich vorkommende Gallensäure TUDCA einen Effekt auf die Expression dieses Rezeptors auslöst. Aus diesem Grund wurde die Expression bei den beiden für dieses Projekt bedeutenden Zelltypen (MAECs und Neutrophile Granulozyten) untersucht.

#### **5.3.2.1. TGR5-mRNA-Expression von MAECs (*in vitro*)**

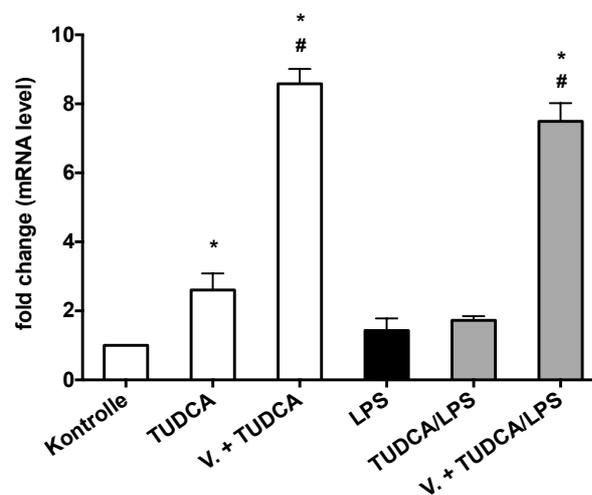
Die Regulation des TGR5-Rezeptors, an den TUDCA direkt binden kann, wurde *in vitro* an kultivierten Endothelzellen untersucht (Abbildung 37). Nach der LPS-Stimulation ergab sich nur eine geringfügige Erhöhung der TGR5-Expressionswerte in MAECs um das 1,3-fache im Vergleich zur Kontrolle. Nach der TUDCA/LPS-Behandlung fand keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle statt. Allerdings erfolgte nach alleiniger Gabe von TUDCA eine Erhöhung der Expression um das Dreifache. Ein Trend zu einer verstärkten Expression ließ sich auch nach den beiden Vorbehandlungen (V.) mit TUDCA erkennen (2,1-fach bzw. 2,2-fach). Allerdings zeigte sich in den Endothelzellen nur ein Trend zu erhöhten Werten und keine signifikanten Veränderungen.



**Abbildung 37 TGR5-Expression von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs) auf mRNA-Ebene.** Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM aus  $n = 6$  unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \* $p$  vs. Kontrolle und # $p$  vs. LPS  $< 0,05$  dargestellt.

### 5.3.2.2. TGR5-mRNA-Expression der Neutrophilen Granulozyten (*in vitro*)

Die gleiche Versuchsreihe wurde analog mit frisch isolierten, primären Neutrophilen Granulozyten aus der Maus durchgeführt (Abbildung 38). Durch die LPS-Applikation stieg die TGR5-mRNA-Expression nur geringfügig an (um das 1,4-fache), ebenso wie nach der TUDCA/LPS-Behandlung (1,7-fach). Allerdings kam es durch die alleinige TUDCA-Gabe zu einer 2,6-fachen, signifikanten Erhöhung der TGR5-Expression. Bei den beiden TUDCA vorbehandelten Gruppen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Hochregulation der TGR5-Expression (um das 7,5- und 8,6-fache), verglichen zu der Kontrolle und der LPS-Behandlung.



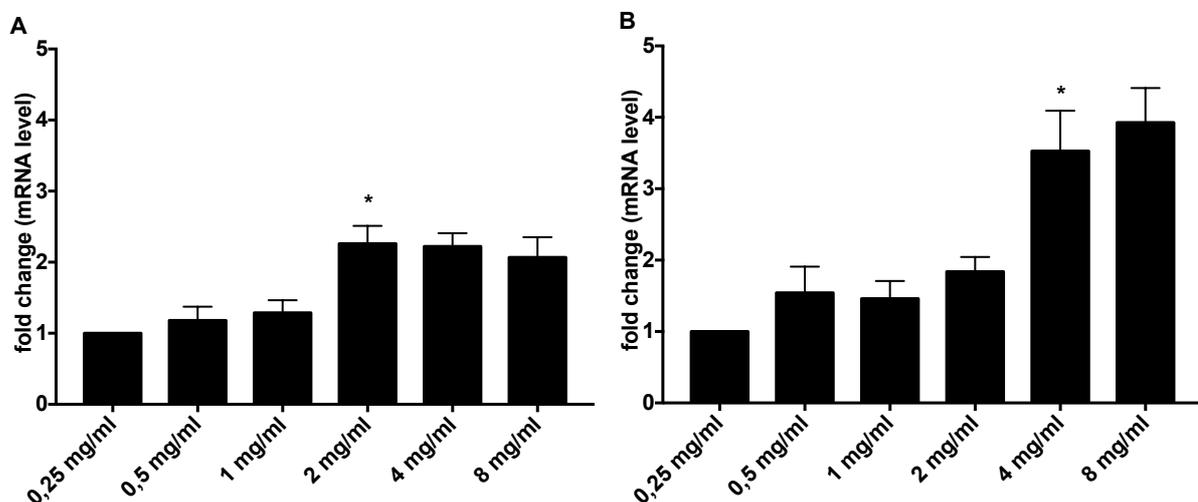
**Abbildung 38 TGR5-Expression von primären Neutrophilen Granulozyten auf mRNA-Ebene.** Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM aus  $n = 3$  unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \* $p$  vs. Kontrolle und # $p$  vs. LPS  $< 0,05$  dargestellt.

Die mRNA-Expressionen des TUDCA-Rezeptors TGR5 auf den MAECs sowie auf den Neutrophilen Granulozyten ließen sich durch LPS offenbar nicht beeinflussen bzw. regulieren. Hingegen durch die Behandlungen mit TUDCA, ob alleine oder besonders nach einer Vorbehandlung, wurde eine verstärkte Expression hervorgerufen.

### 5.3.2.3. TUDCA-abhängige TGR5-mRNA-Expression in MAECs

Aufgrund des potentiellen Einflusses der TUDCA-Applikation auf die TGR5-mRNA-Expression, wurde ein Titrationsversuch *in vitro* durchgeführt. Zusätzlich wurde der Versuch mit einer weiteren TUDCA-Vorbehandlung (30 min) vor dem Versuch durchgeführt. Mit Hilfe dieser Versuche konnte nun verifiziert werden, ob die Expression des TGR5-Rezeptors von der vorherrschenden TUDCA-Konzentration und/oder von der Inkubationszeit abhängt bzw. beeinflusst werden kann. Bei dem Versuch ohne TUDCA-Vorbehandlung ließ sich eine Erhöhung der TGR5-mRNA-Konzentration (bis 2 mg/ml) mit steigender TUDCA-Konzentration feststellen (Abbildung 39 A).

Derselbe Kinetik-Versuch wurde nun mit einer zusätzlichen TUDCA-Vorbehandlung durchgeführt (Abbildung 39 B). Auch bei diesem Versuch zeigte sich die gleiche Abhängigkeit zwischen der gegebenen TUDCA-Konzentration und der gemessenen TGR5-Expression. Die niedrigste mRNA-Expression war auch hier bei der niedrigsten TUDCA-Konzentration zu detektieren. Die stärkste Hochregulation war bei der höchsten TUDCA-Konzentration von 8 mg/ml festzustellen (4-fach).



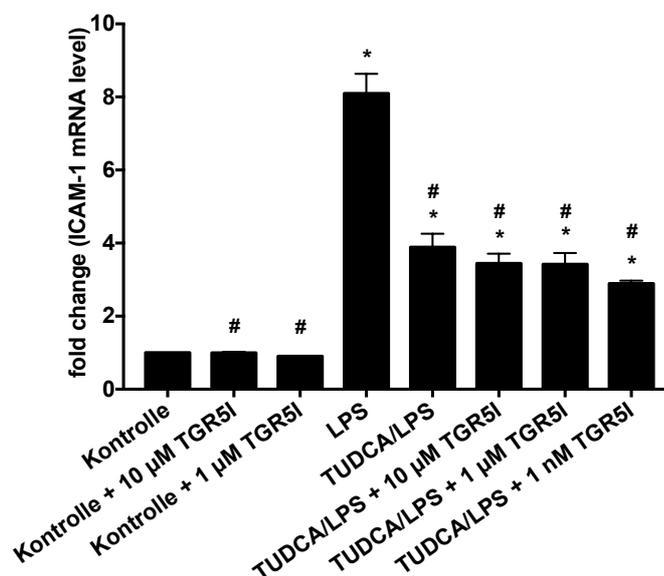
**Abbildung 39** TGR5-Expression von MAECs bei verschiedenen TUDCA-Konzentrationen auf mRNA-Ebene. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM nach einer einmaligen TUDCA-Applikation A) und einer zweimaligen TUDCA-Applikation B) von n = 4 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \* $p < 0,05$  zum Vorwert dargestellt.

### 5.3.2.4. TGR5-Inhibitor

In einem nächsten Schritt sollte durch den Einsatz eines TGR5-Inhibitors geprüft werden, ob der anti-inflammatorische Effekt von TUDCA über den TGR5-Rezeptor vermittelt wird. Dazu

wurde in dem zuvor etablierten *in vitro*-Versuch mit den murinen aortalen Endothelzellen der TGR5-Inhibitor (TGR5I) in drei Konzentrationsstufen getestet (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 1 nM). Als Maßstab für den anti-inflammatorischen Effekt wurde die Expression des Inflammationsmarkers ICAM-1 verwendet (Abbildung 40). Als Kontrolle wurde ausschließlich der Inhibitor zu den Zellen gegeben. Verglichen mit den Zellen, die keinerlei Behandlung erfahren haben, zeigte sich keine Veränderung des Phänotyps sowie der mRNA-Expression von ICAM-1 (0,99- und 0,9-fach). Nach der LPS-Behandlung zeigte sich ein pro-inflammatorischer Effekt, die mRNA-Konzentration von ICAM-1 stieg um das 8,1-fache. Diese Stimulation konnte in diesem Versuch durch die zusätzliche TUDCA-Gabe signifikant reduziert werden (3,9-fach).

Bei einer weiteren Behandlung wurde zur TUDCA/LPS-Behandlung der Inhibitor dazugegeben. Bei allen drei Konzentrationsstufen des Inhibitors ist keine signifikante Veränderung im Vergleich zu der reinen TUDCA/LPS-Behandlung zu erkennen gewesen (3,4-fach; 3,4-fach; 2,9-fach), das heißt der anti-inflammatorische Effekt durch die TUDCA/LPS-Behandlung war auch hier trotz des Inhibitors noch zu erkennen.



**Abbildung 40 Auswirkungen des TGR5-Inhibitors auf die ICAM-1-Expression von MAECs auf mRNA-Ebene.** Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \* $p$  vs. Kontrolle und # $p$  vs. LPS  $< 0,05$  dargestellt.

### **5.3.3. Zusammenfassung molekularer Mechanismus**

Die Untersuchungen der Signalwege (ER-Stress, oxidativer Stress, TNF-Signalweg) waren nicht eindeutig zielführend, vielmehr zeigte sich, dass diese Wege mit den ausgewählten Markern in diesem Projekt nicht von großer Bedeutung bzgl. der Substanzen LPS und TUDCA sein könnten.

Hingegen zeigten sich bei der Analyse des TGR5-Rezeptors die ersten Hinweise auf eine Veränderung durch die TUDCA-Behandlung. Die Versuche mit den verschiedenen TUDCA-Konzentrationen haben signifikant einen Zusammenhang zwischen der TGR5-mRNA-Konzentration und den verwendeten TUDCA-Konzentrationen gezeigt. Durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit TUDCA konnte eine etwas stärkere Hochregulation der TGR5-Expression ausgelöst werden. Der getestete Inhibitor konnte jedoch den anti-inflammatorischen Effekt von TUDCA bei keiner der getesteten Konzentrationen blockieren.

## 6. Diskussion

Ein vordergründiges Ziel dieser Arbeit war, die anti-inflammatorischen Eigenschaften von TUDCA im Mausmodell für die Amnioninfektion auf verschiedenen Ebenen zu untersuchen und vermittelnde molekulare Mechanismen aufzuklären.

Die Plazentagängigkeit von TUDCA sollte analysiert werden, um zu klären ob TUDCA maternale oder zusätzlich auch fetale Wirkmechanismen bedienen kann. Das verabreichte TUDCA ließ sich sowohl in den Muttertieren als auch im Feten in ähnlicher Konzentration nachweisen. Dies deutet auf eine Plazentagängigkeit hin und stimmt mit den Analysen von Hagenbuch *et al.* überein, die *in vivo* die Plazentagängigkeit von TUDCA mittels spezifischer Transporter über die Plazentaschranke nachwies [74, 75].

Anhand der TUDCA-Titrationsversuche konnte das Wirkspektrum dieser Substanz analysiert werden. In der Regel war ein stärkerer anti-inflammatorischer Effekt ab einer TUDCA-Konzentration von 2 mg/ml zu erkennen. Die niedrigsten Expressionslevel der Inflammationsmarker traten bei den höchsten TUDCA-Konzentrationen (4 – 8 mg/ml) auf. Anhand dieser Experimente wurde eindeutig, dass der positive anti-inflammatorische Effekt von TUDCA von dessen Konzentration abhängt. Die Studien von Vandewynckel *et al.* machten anhand der metabolischen Aktivität von HepG2-Zellen ebenfalls die konzentrationsabhängigen Effekte TUDCA's deutlich [76]. Für die weiteren *in vitro*-Versuche wurde die Konzentration von 2 mg/ml ausgewählt und verwendet. Auf Grundlage dieser Versuchsreihe wurde auch die Toxizität von TUDCA beurteilt. Anhand der subjektiven Beurteilung der morphologischen Zellbeschaffenheit der MAECs zeigten sich keinerlei Anzeichen auf toxische Effekte von TUDCA. Nach Herstellerangaben wurde eine akute orale Toxizität (LD50) erst bei > 5000 mg/kg bei einer Ratte detektiert [77]. Auch Carubbi *et al.* beschrieben bei HepG2-Zellen keine toxischen Effekte nach einer TUDCA-Applikation. Dies liegt unter anderem daran, dass TUDCA eine sehr polare, hydrophile Substanz mit einem hohen CMC (*critical micellar concentration*)-Wert ist, und somit moderat detergent und nicht lytisch wirkt [78-80].

## 6.1. Inflammation

Im Amnioninfektionsmodell konnte eine fetale Inflammation über die maternale intraperitoneale Injektion von LPS ausgelöst werden. Die fetale Inflammation spiegelte sich auch im reduzierten fetalen *Outcome* wider. In Übereinstimmung mit vorangehenden Arbeiten [81, 82] war die fetale Mortalität und Frühgeburtenrate nach einer LPS-Gabe sehr deutlich und signifikant gegenüber der Spontanmortalität und Frühgeburtslichkeit bei Mäusen in der Spätschwangerschaft erhöht [7].

Obgleich die meisten klinischen Sepsisfälle durch gram-positive Bakterien bedingt sind, ließ sich dies anhand von Bakterienzellwandbestandteilen (LTA & PepG von *S. aureus*) nicht im Amnioninfektionsmodell abbilden. Nachdem durch die maternale Gabe der gram-positiven Bakterienbestandteile Peptidoglykan und LTA von *S. aureus* [83, 84] keine nachweisbare fetale Inflammation induziert werden konnte, erwies sich LPS des gram-negativen Bakteriums *E. coli* als ein wirkungsvolles pro-inflammatorisches Stimulanz im Amnioninfektionsmodell. Aufgrund der Erkenntnis, dass verschiedene LPS-Chargen unterschiedlich starke Entzündungsreaktionen bei derselben Substanzmenge auslösten, wurde nun zusätzlich zur Konzentrationsangabe in mg/kg die Endotoxinunit (EU) ermittelt und angegeben. Gram-negative Bakterien wie *E. coli* haben einen grundsätzlich anderen Aufbau der Zellwand und wirken über andere Signalwege (TLR4) im Vergleich zu gram-positiven Erregern (TLR2), wodurch sie in diesem Projekt offenbar effizienter einen pro-inflammatorischen Effekt in der schwangeren Maus sowie deren Feten auslösen konnten [85]. Die Studien von Hessle *et al.* und Yipp *et al.* unterstützen diese Hypothese [86, 87]. Hessle *et al.* zeigte beispielsweise an humanen Monozyten, dass hierbei LPS dieselbe pro-inflammatorische Antwort wie die Äquivalenzdosis gram-negativer Bakterien erzeugte, wohingegen LTA oder Peptidoglykan eine geringere pro-inflammatorische Immunantwort als die Äquivalenzdosis gram-positiver Bakterien induzierte. Aufgrund der Tatsache, dass Viren und Hefen eine eher geringe Rolle in der klinischen Praxis bei Inflammationszuständen in der Fetalzeit spielen, sind diesbezüglich nur wenige Daten vorhanden [88]. Aufgrund dieser Befunde und Gegebenheiten beschränkt sich die vorliegende Arbeit auf die Applikation von gram-negativen Zellwandbestandteilen von *E. coli*.

Generell werden 40 % aller Frühgeburten mit intrauterinen Infektionen in Verbindung gebracht, dessen Folgen hauptsächlich in der Neonatalzeit auftreten, aber auch bis hin ins

Erwachsenenalter andauern können [88]. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse diese Inflammationszustände in der Fetalzeit zu erforschen und falls möglich zu behandeln. Der pro-inflammatorische Effekt der maternalen LPS-Injektion konnte in dieser Arbeit ebenfalls durch die Analyse der fetalen Leukozytenrekutierung belegt werden. So war eine signifikante Erhöhung der Anzahl an adhärenenten Neutrophilen Granulozyten nach der LPS-Applikation im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Diese Methode bzgl. der Analyse der fetalen Leukozytenrekutierung *in vivo* wurde von Sperandio *et al.* adaptiert [23]. Bei der Studie wurde allerdings ein pro-inflammatorischer Stimulus mit einer fMLP-Superfusion des fetalen Dottersacks ausgelöst, der zu einer fetalen Leukozytenrekutierung mit einem ähnlichen Ausmaß wie in der vorliegenden Studie führte. Der Effekt einer maternalen Inflammation mit Induktion der fetalen Leukozytenrekutierung ist bisher noch nicht intravitalmikroskopisch untersucht worden und daher ein Novum mit einem hohen potentiellen Erkenntnisgewinn.

Bezüglich des Wirkmechanismus von LPS wurde in vorherigen Studien durch die Analyse von fetalem Plasma gezeigt, dass LPS hauptsächlich in der maternalen Zirkulation verbleibt und nur in geringen Spuren oder gar nicht über die Plazenta in die fetale Zirkulation übergeht [81, 89]. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht. Die Autoren postulierten, dass die fetale Inflammation hauptsächlich durch maternale Zytokine und pro-inflammatorische Mediatoren ausgelöst wird, die durch passieren der Plazenta die Leukozytenrekutierung und die Organinfiltration im Feten auslösen [81, 90].

Das in diesem Projekt genutzte Amnioninfektionsmodell erwies sich als standardisiert und reproduzierbar. Die Variation bzgl. des pro-inflammatorischen Effekts bei den einzelnen Feten innerhalb eines Wurfes stellte sich als relativ gering dar. Größere Schwankungen sind hingegen nach intrauteriner LPS-Injektion beschrieben [91].

Ohne LPS-Stimulation fand sich eine Basisrate rollender Leukozyten, da einige Leukozyten stets prophylaktisch zur Detektion von Erregern am Endothel patrouillieren [92]. Außerdem erfolgte durch die mikrochirurgischen Eingriffe während des Versuchs eine traumatische Stimulation [93]. Die relativierte Anzahl an rollenden Leukozyten als *Rolling Flux Fraction* ist ebenfalls im Anhang dargestellt, weicht allerdings nicht entscheidend von der anderen Darstellungsform ab (Abbildung A15).

Die Gesamtanzahl an fließenden Neutrophilen kann sich durch die verschiedenen Behandlungen verändern, da die Leukopoese durch eine Inflammation stimuliert wird und

---

zusätzliche Leukozyten aus dem Knochenmark rekrutiert werden [94]. In der vorliegenden Arbeit war dies allerdings zu vernachlässigen.

Nach der LPS-Behandlung nahm die Leukozytenadhäsion zu, während das Leukozytenrollen abnahm. Dieser umgekehrte proportionale Effekt kann durch die geringere Anzahl an zirkulierenden Leukozyten nach einer starken Adhäsion und Extravasation erklärt werden. Aufgrund der vermehrten und beschleunigten Adhäsion wurden bei der LPS-Gruppe weniger Roller detektiert. Nach einer fMLP-Superfusion des Cremastermuskels der Maus zeigten sich vergleichbare Ergebnisse; nach der Superfusion nahm die Anzahl der Roller im Vergleich zur Kontrolle ab [95]. Andere Studien zeigten nach der LPS-Stimulation neben einer erhöhten Adhäsion ebenfalls eine Erhöhung des Leukozytenrollens z. B. im Mesenterium der Ratte [96], in postkapillaren Venolen im Gehirn [97] oder auch im Cremastermuskel von Mäusen [98, 99].

Der nächste Schritt der Leukozytenrekrutierung – die Transmigration – wurde ebenfalls durch die pro-inflammatorische LPS-Stimulation erhöht. Die Analysen der infiltrierten Leukozyten mittels Immunhistologie zeigten in der fetalen Lunge, Niere sowie der Plazenta im Bereich des Chorions nach der LPS-Behandlung eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle. Im Chorion entsprach die Anzahl an infiltrierten Neutrophilen nicht dem eher linearen Anstieg im Verlauf der Gestation, der bei den anderen Organen zu sehen war und erwartet wurde. In diesem Organ war auffällig, dass die Leukozyteninfiltration im Stadium E14 der Kontrolle signifikant höher war als bei den anderen Behandlungsgruppen. Dies könnte durch die primordiale Blutbildung in der Plazenta zu begründen sein [100]. Durch die LPS-Stimulation werden die Leukozyten vermehrt ausgeschüttet und wandern in die Blutgefäße aus, sodass die Leukozytenzahl in der Plazenta in der LPS-Gruppe geringer ist als in der Kontrolle.

Vergleichbare Ergebnisse der Infiltration erzielten diverse Arbeitsgruppen auch bei anderen Spezies nach einer LPS-Applikation in den verschiedenen Organen. Galinsky *et al.* beschrieben beispielsweise die klinische Relevanz bzgl. einer erhöhten Leukozyteninfiltration in der Niere, da sich hierbei die Anzahl von Nephrons im fetalen Schaf reduzierte [101]. Eine erhöhte LPS-Exposition während der Schwangerschaft kann auch ursächlich für eine Hypertonie [102] und ein verändertes renales dopaminerges System sein [103]. Auch die übermäßige Infiltration von Neutrophilen in die Lunge kann Spätfolgen haben, beispielsweise eine Bronchopulmonale Dysplasie [104]. Die in dieser Arbeit detektierte

---

erhöhte Infiltrationsrate in die Plazenta kann unter anderem zu Durchblutungsstörung sowie oxidativen/nitrosativen Stress und im Endeffekt zu einem gestörten fetalen Wachstum sowie zu einer Präeklampsie führen [105] und ist daher ebenfalls von hoher klinischer Relevanz.

Die Auswirkungen der maternalen Inflammation auf die Feten variierten im Verlauf der Gestation. Grundsätzlich stieg die Anzahl an rollenden, adhätierenden sowie infiltrierte Neutrophilen Granulozyten und auch die Überlebensrate im Verlauf der Gestation von E14 zu E18 signifikant an. Diese Erkenntnisse stimmen mit denen von Naik *et al.* und Buschmann *et al.* überein [28, 47]. Das Immunsystem ist bei Mausfeten am 14. Entwicklungstag noch unreif. Da die Expression der Adhäsionsmoleküle sehr gering ist, besteht kaum das Vermögen der Neutrophilen am Endothel zu binden und zu rollen bzw. zu adhätieren [22, 23, 28, 47, 106-108]. Integrine und deren Liganden wie z. B. PSGL-1 sowie Mac-1, LFA-1 und L-Selektin werden erst im Verlauf der Gestation exprimiert, wodurch die Leukozytenrekrutierung ausreift und somit das Immunsystem am Ende der Gestation besser reagieren kann [20, 22, 107]. Die höhere Stimulierbarkeit sowie Regulierbarkeit im Stadium E18 macht offensichtlich, dass eine relevante Antwort des angeborenen Immunsystems sich erst später in der Gestation ab E16 – E17 entwickelt [22, 81]. So war auch in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Unterschied in der Plazenta erst ab E17 zu detektieren. Als ebenfalls gestationsabhängig zeigte sich die Anzahl an unvollendeten Geburten, die im höheren Gestationsstadium, vermutlich aufgrund der hormonellen Geburtsbereitschaft des Körpers, abnahm.

Weitere Analysen bezüglich des Inflammationsgrades wurden im fetalen Gestationsstadium E17 und mit maternalen Proben vertieft. Hierbei war ebenfalls die mangelnde fetale Expression von Adhäsionsmolekülen (in diesem Fall von ICAM-1) im Vergleich zum Erwachsenenalter zu erkennen. Die beobachtete pro-inflammatorische Stimulation der ICAM-1-Expression durch LPS deckt sich mit bisherigen Studien [109-111]. In diesem Entwicklungsstadium 17 wurden zudem Zytokine als Marker und Mediatoren von Entzündungsvorgängen untersucht [81, 112]. Die Analyse von Plasmazytokinspiegeln belegt die fetale Downregulation pro-inflammatorischer Zytokine im Vergleich zur adulten Maus und unterstützt die Hypothese der fetalen Immunreifung.

In Übereinstimmung mit Salminen *et al.* konnte eine Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine nach der LPS-Stimulation dokumentiert werden. Im Vergleich zu den maternalen

---

Zytokinprofilen waren die fetalen Basiszytokinlevel geringer und weniger durch LPS stimulierbar [81].

## 6.2. Die anti-inflammatorisch wirkende Substanz TUDCA

Im stabil etablierten Maus-Amnioninfektionsmodell wurde die natürlich vorkommende Gallensäure – die Tauroursodeoxycholsäure – auf ihre anti-inflammatorische Wirkung in vielen Facetten der fetalen Entzündung getestet.

Da bisher keine *in vivo*-Studien bzgl. der fetalen Leukozytenrekrutierung nach einer TUDCA-Applikation vorlagen, lag der Fokus des vorliegenden Projektes auf dem *in vivo*-Ansatz. Es konnte eine fetale anti-inflammatorische Wirkung von TUDCA im LPS-Amnioninfektionsmodell beobachtet werden, vor allem in Form der herabgesetzten intrauterinen Sterblichkeit, Frühgeburtlichkeit und der reduzierten Leukozytenrekrutierung. Ein signifikanter Unterschied war erst in der späteren Phase der Gestation zu erkennen, da die Regulierbarkeit eines pro-inflammatorischen Stimulus erst ab einer gewissen Ausreifung der fetalen Immunantwort möglich ist [22].

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde ersichtlich, dass der anti-inflammatorische Effekt von TUDCA offensichtlich durch die schwangere Maus auf den Feten übertragen wurde und alle Anzeichen einer Inflammation gelindert werden konnten. Während TUDCA die LPS-induzierte Sterblichkeit sowie die Frühgeburtenrate signifikant senkte, war die LPS-induzierte Leukozytenrekrutierung bis auf das Kontrollniveau blockiert. Die Anzahl der adhärenenten sowie der infiltrierten Leukozyten konnte auf bzw. sogar unter das Kontrollniveau gesenkt werden. Die Anzahl der rollenden Leukozyten war wie bei der Kontrolle höher als bei der LPS-behandelten Gruppe. Daher lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der Effekt von TUDCA in der Kaskade der Leukozytenrekrutierung erst nach dem Rollen einsetzt. Dadurch, dass TUDCA die Leukozytenadhäsion blockiert, wird die nachfolgende Leukozyteninfiltration und Inflammation verhindert.

Aus vorherigen Publikationen ist bekannt, dass die hydrophile Gallensäure protektive Effekte in verschiedenen Krankheits- und Tiermodellen aufweist. Meist lagen diese im Bereich von neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder der Huntington-Krankheit, aber auch im Bereich von Netzhauterkrankungen, Schlaganfall, Herz-Kreislaufkrankungen, Adipositas, Diabetes, Kolitis, Atherosklerose, pulmonaler Hypertonie, biliärer Zirrhose und akuter Nierenschädigung [66, 113-119]. Ebenfalls soll TUDCA auch die Blastozysten-Bildung

---

positiv beeinflussen können [120, 121]. Diese Effekte wurden meist mit der zytoprotektiven sowie der anti-apoptotischen Wirkung von TUDCA erklärt [65, 78, 122, 123]. Häufig wurde die TUDCA-Wirkung als Konsequenz der Funktion als ER-Stresshemmer durch die Wirkung als chemisches Chaperon auf die Proteinfaltung beschrieben [66, 70, 124]. Insgesamt gibt es jedoch keine vergleichbaren Studien bzgl. der Leukozytenrekrutierung *in vivo* – speziell nicht im Feten. Santoro *et al.* konnten lediglich *in vitro* zeigen, dass die unkonjugierte Gallensäure UDCA die Chemotaxis von Neutrophilen in neonatalen sowie adulten PMN's nach einem fMLP-Stimulus reduzieren kann [125].

Eine weitere Erkenntnis aus dieser Arbeit ist, dass TUDCA keine negativen und toxischen Effekte aufwies. Durch die alleinige TUDCA-Applikation lag keine signifikante Änderung der Anzahl an Frühgeburten, intrauterinem Tod, adhärennten sowie infiltrierten Neutrophilen vor und die alleinige TUDCA-Behandlung wirkte sich offensichtlich nicht negativ auf den Schwangerschaftsverlauf aus. Interessanterweise gab es nach der alleinigen TUDCA-Gabe weniger Frühgeburten als in der Kontrollgruppe. Dies wirft die Frage auf, ob TUDCA sogar protektiv gegen Frühgeburten ohne Amnioninfektionssyndrom helfen könnte. Zhang *et al.* fanden neue bisher unbekannte genetische Assoziationen in Bezug auf Frühgeburten [126]. Daher wäre es sehr interessant zu wissen wie sich TUDCA in Bezug auf die drei identifizierten Genloci auswirken würde. Weitere Hinweise diesbezüglich beschrieben auch Lin *et al.*, die den Einfluss von TUDCA auf Embryos *in vitro* mit anschließender Implantation in eine Amme untersuchten. Lin *et al.* beschrieben, dass die Implantationsrate und die Anzahl an lebenden Mausbabys bei der TUDCA-behandelten Gruppe signifikant erhöht war im Vergleich zur Kontrollgruppe [127]. Diverse Publikationen bestätigten die Erkenntnis, dass TUDCA nicht toxisch ist und beschrieben sie als hydrophile, positiv wirkende Substanz [80]. In dieser Arbeit war ausschließlich die Anzahl an infiltrierten Leukozyten in der Plazenta nach der alleinigen TUDCA-Applikation im Stadium E15 – 16 signifikant höher, dies könnte mit der ebenfalls erhöhten Anzahl an rollenden Leukozyten in diesem Stadium in Verbindung gebracht werden. Eine biologische Erklärung liegt dafür nicht vor, zumal die Leukozytenadhäsion unbeeinflusst blieb. Denkbar ist ein Fehler in der Auszählung der Leukozyten.

Als Reaktion auf die LPS-Applikation werden als erstes Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch die Endotoxine aktiviert. Bei Lipopolysacchariden sind es hauptsächlich Rezeptoren der Familie der Transmembranrezeptoren namens *Toll like receptors* – in diesem

---

Fall TLR4. Die Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade sorgt unter anderem für die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren wie beispielsweise diverser Zytokine wie z. B. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder Interferone [128]. Durch die LPS-Applikation werden ebenfalls Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 hochreguliert [129], da durch Zytokine die Expression von Adhäsionsmolekülen induziert wird [130]. Diese Studien unterstützen die bereits erwähnten Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit bzgl. der Effekte der LPS-Applikation.

Der anti-inflammatorische Effekt von TUDCA konnte anhand der immunhistochemischen Analysen von ICAM-1 in verschiedenen Organen auch in dieser Untersuchung reproduzierbar aufgezeigt werden. Die anti-inflammatorischen Wirkmechanismen von TUDCA scheinen sich daher auch auf die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 regulierend auszuwirken. Die Gallensäure war in der Lage die fetalen und maternalen Plasmaspiegel der pro-inflammatorischen Zytokine TNF, IFN $\gamma$ , MCP-1 und IL-6 in der LPS-induzierten Inflammation zu senken. Durch diese Studie wurde evident, dass der anti-inflammatorische Effekt von TUDCA sogar auf der Ebene der Zytokine im Fetus nachweisbar ist. Die Zytokin-Expression wurde herunterreguliert, wodurch weniger Adhäsionsmoleküle exprimiert wurden und schlussendlich weniger Neutrophile Granulozyten adhären können.

Bei der Untersuchung zellulärer und molekularer Mechanismen wurde der Schwerpunkt auf zwei Zelltypen gelegt, die bei der Leukozytenrekrutierungskaskade eine wichtige Rolle spielen – die Neutrophilen Granulozyten sowie die Endothelzellen. Zuerst fand die Analyse der Neutrophilen Granulozyten auf mRNA- sowie Proteinebene statt, da diese auch bei der Intravitalmikroskopie und anderen Versuchen im Fokus standen.

Anhand von leukozytären Oberflächenproteinen wie den Integrinen LFA-1 und Mac-1 kann der Grad der Inflammation dargestellt werden, da eine gewisse Korrelation zwischen beidem besteht [131]. Diese Moleküle sind u. a. auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert und spielen aufgrund der Funktion als zelluläre Adhäsionsmoleküle bei der Leukozytenrekrutierung eine wichtige Rolle [14]. Es stellte sich allerdings als schwierig heraus die Inflammation anhand von isolierten Neutrophilen *in vitro* darzustellen. Es gelang auf der Proteinebene eine signifikant höhere Mac-1-Expression und auf der mRNA-Ebene eine signifikant höhere LFA-1-Expression nach der LPS-Applikation nachzuweisen. Eine signifikante TUDCA bezogene Reduktion ließ sich nur bei der LPS-induzierten Expression des Integrinproteins Mac-1 feststellen. Möglicherweise blieb die Integrin-RNA und Proteinexpression in Neutrophilen Granulozyten in den meisten Fällen kaum beeinflusst, da

die Zellen durch die lange Isolationsprozedur überstimuliert waren und/oder eine zu lange Inkubationszeit mit LPS vorlag, sodass der zeitliche Rahmen des Effekts verpasst wurde, da LFA-1 und Mac-1 relativ schnell aktiviert werden können [131, 132].

Die Analyse des Adhäsionsverhaltens der primären Neutrophilen Granulozyten aus der Maus in einem *in vitro*-Flusskammerversuch sollte Aufschluss darüber geben, ob TUDCA direkt auf Neutrophile wirken kann. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Endothel synthetisch und somit statisch ist. Daher kann dessen Interaktion ausgeschlossen werden und die festgestellten Effekte sind ausschließlich auf die Neutrophilen Granulozyten selbst zurückzuführen [28]. Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass TUDCA in der Lage war die Anzahl an adhärenenten Zellen zu senken. Offensichtlich wirkte TUDCA direkt auf die Neutrophilen und ihr Adhäsionsverhalten. Bemerkenswert bei diesen Ergebnissen war, dass TUDCA die Anzahl an adhärenenten Neutrophilen Granulozyten in einem unstimulierten Zustand (Basisadhäsion) signifikant senken konnte. Dies deutet auf einen Einfluss von TUDCA auf die neutrophile Hintergrundinflammation hin.

Die *in vitro*-Methode der Mikroflusskammer ist weit verbreitet [22, 23, 28, 33, 133]. Da es ein *in vitro*-Ansatz ist und die Zellen aus dem Knochenmark der adulten Maus stammten und nicht mit LPS stimuliert wurden, ist der Versuch jedoch nicht mit den bisherigen *in vivo*-Daten aus der Intravitalmikroskopie vergleichbar. Nichtsdestotrotz, liefert er Hinweise auf die vermittelnde Rolle von Neutrophilen Granulozyten in der Kaskade TUDCA-induzierter anti-inflammatorischer Effekte. Aufgrund der oben genannten Unterschiede im Versuchsansatz (adulte Probe *in vitro*) ist ein sicherer Rückschluss für die fetalen Verhältnisse nicht möglich.

Murine aortale Endothelzellen (MAECs) wurden verwendet, um die endotheliale Seite der Leukozytenrekrutierung mechanistisch genauer zu beleuchten. Hierbei wurde analysiert, ob die Endothelzellen an den pro- sowie anti-inflammatorischen Effekten durch LPS und TUDCA direkt beteiligt sind.

Die Expression aller getesteten Oberflächenproteine der Endothelzellen waren durch eine LPS-Applikation induzierbar und durch eine zusätzliche TUDCA-Gabe reduzierbar. Es war bereits bekannt, dass durch eine *in vitro*-LPS-Stimulation die Expression der endothelialen Marker erhöht wird, da diese bei der Immunabwehr eine Rolle spielen [134, 135]. Die Studien von Madjdpour *et al.* unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit [136]. Sie beschrieben, dass die Expression von ICAM-1 in alveolaren Epithelzellen in der Ratte nach

---

einer LPS-Stimulation zunahm. Ebenfalls in humanen neonatalen dermalen lymphatischen mikrovaskulären Endothelzellen zeigten Sawa *et al.*, dass durch eine LPS-Stimulation die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) sowie Zytokinen (IL-6, IL-8) zunahm [111]. Auch durch eine TNF $\alpha$ -Stimulation nahm die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 oder VCAM-1 in HUVEC's zu [137].

In dieser Arbeit wurden nun neue Erkenntnisse bzgl. des Wirkspektrums von TUDCA auf die MAECs deutlich gemacht. Es zeigte sich bei den meisten ausgewählten Inflammationsmarkern eine Reduzierung der Expression und somit eine anti-inflammatorische Wirkung von TUDCA direkt auf die Endothelzellen. Der Grad der Stimulierbarkeit durch LPS der einzelnen Zytokine war unterschiedlich stark und dementsprechend auch der Grad der Reduzierung durch TUDCA. Die Höhe der Expression der verschiedenen Zytokine sollte nicht miteinander verglichen werden. Es sollte ausschließlich aufgezeigt werden, ob erstens ein pro-inflammatorischer Stimulus durch LPS in den Endothelzellen erfolgt ist; dies wurde bestätigt. Zweitens, ob TUDCA einen Effekt auf Endothelzellen hat und durch eine anti-inflammatorische Wirkweise die Expression senken kann; dies wurde ebenfalls bestätigt. So wurde deutlich, dass TUDCA ein Fortschreiten der Inflammation in diesen Zellen verhindern kann. Aufgrund des Erkenntnisgewinns bzgl. der Ergebnisse von TUDCA, lässt sich dies mit keinen bisher publizierten Ergebnissen vergleichen.

Bei den Zytokinen IL-6, MCP-1 und IFN- $\gamma$  lag eine signifikante Erhöhung der Expression durch LPS vor, jedoch nicht bei TNF. Die Regulation von TNF war in diesem Versuch bei den Endothelzellen entgegen der Erwartung nicht gut abbildbar. Durch LPS erfolgte keine starke Hochregulation und durch TUDCA entsprechend keine starke Reduzierung. TUDCA hatte bei den Zytokinen ein größeres Potential wirken zu können, die durch LPS stärker hochreguliert wurden. Die alleinige TUDCA-Gabe scheint die Expression der Moleküle kaum beeinflusst zu haben und lag oft im Bereich der Kontrolle.

Von jedem Zytokin müsste individuell der beste Zeitpunkt in Bezug auf die Expressionsänderung und auf die Halbwertszeit gefunden werden, um den inflammatorischen Effekt besser abbilden zu können [138, 139]. Außerdem ist der zeitliche Ablauf der Signalwege, bis es zur Regulation der Molekülexpression kommt, unterschiedlich [140, 141]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den MAECs eine LPS-induzierte Inflammation durch TUDCA hemmbar war.

## 6.3. Molekularer Mechanismus

### 6.3.1. ER-Stress und ER-Stress-Hemmung

Nachdem in multimodalen Versuchsansätzen gezeigt wurde, dass TUDCA offensichtlich eine anti-inflammatorische Wirkung besitzt und eine LPS-induzierte Inflammation im Feten sowie der Muttermaus lindern kann, sollte der vermittelnde molekulare Mechanismus aufgeklärt werden.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Stress des Endoplasmatischen Retikulums eine Inflammation auslösen und unterhalten kann [142-144]. ER-Stress kann durch die Synthese von nicht oder fehlgefalteten Proteinen im ER entstehen, wodurch die UPR-Kaskade ausgelöst werden kann [145]. Wenn der ER-Stress nicht behoben wird, kommt es im Verlauf der UPR-Kaskade über komplexe Mechanismen zur Aktivierung pro-inflammatorischer Gene [146]. Im Endeffekt kann dies zu schwerwiegenden gesundheitlichen Problemen wie beispielsweise kardiovaskulären Krankheiten führen [147]. Es gibt neue wissenschaftliche Ansätze die Proteinfaltung durch chemische Chaperone wie z. B. TUDCA zu stabilisieren, um so den ER-Stress zu hemmen [142]. Die zugrunde liegende Hypothese war daher, dass durch die Applikation von TUDCA der ER-Stress gehemmt wird und so die Inflammation indirekt gelindert werden kann.

Hinweise für LPS-induzierten ER-Stress ergaben sich im Forschungsprojekt in der maternalen Lunge durch vermehrte Expression des Rezeptors IRE1 $\alpha$  und des Chaperons BiP, eine Beobachtung die durch TUDCA hemmbar war. Ein ähnliches Muster war in der fetalen Niere zu beobachten, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Die beiden Moleküle BiP und IRE1 $\alpha$  stehen am Anfang der UPR-Kaskade. Im Fall von ER-Stress löst sich das Chaperon BiP von den drei ER-Stresssensoren IRE1 $\alpha$ , PERK und ATF6 und bindet anschließend an den nicht gefalteten Proteinen (Abbildung 41). Durch das Ablösen von BiP werden die drei im ER membranständigen Rezeptoren aktiviert und die UPR-Kaskade wird initiiert. Über die drei Hauptwege wird über diverse Transkriptionsfaktoren wie unter anderem ATF4, XBP1, Casp12 und CHOP über Nf $\kappa$ B eine pro-inflammatorische Immunlage vermittelt. In dieser Arbeit wurden stellvertretend für die UPR-Kaskade ausgewählte Schlüsselmoleküle untersucht (Abbildung 41: rot umkreiste Moleküle).

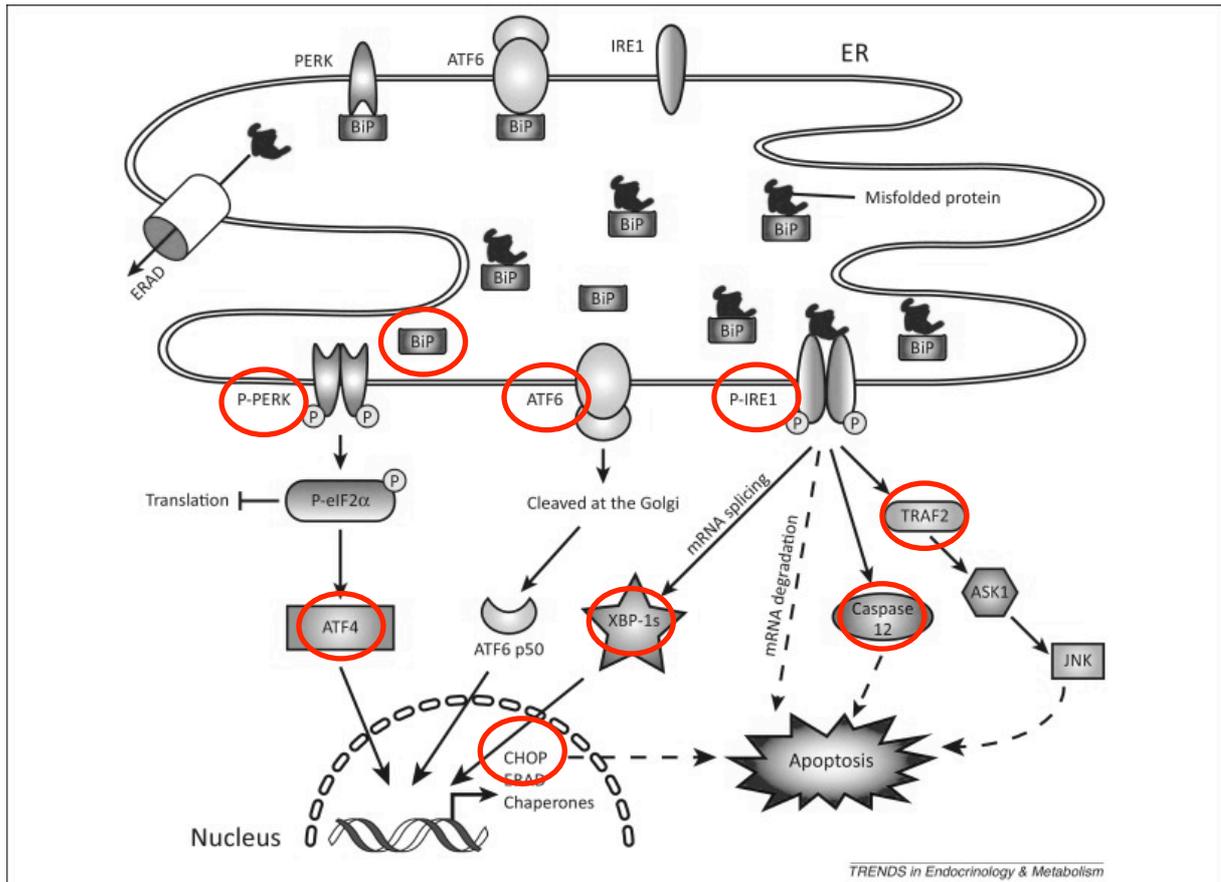


Abbildung 41 ER-Stress: UPR-Kaskade mit den verwendeten ER-Stressmolekülen (nach Biden *et al.*, 2014 [148]).

In der Summe ergab die Abklärung des ER-Stress-Pathways im Feten weder eine konsistente und durchgehend eindeutige LPS-induzierte Hochregulation der ER-Stress-Moleküle, noch eine eindeutige Hemmung durch TUDCA.

Allerdings erwies sich die Expression der Kontrollen und der TUDCA/LPS-Gruppe oftmals als recht hoch. Die ER-Stress-Analysen fielen im Western Blot und der qPCR meist ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen aus. Eine Erklärung für die fehlenden Signifikanzen könnten die hohen Standardabweichungen z. B. aufgrund geringer Fallzahlen oder starker Schwankungen der Versuchsbedingungen sein. Bemerkenswerterweise war eine leicht erhöhte, aber nicht signifikante Änderung der Expression nach einer TUDCA-Behandlung zu erkennen. Daher stellt sich die Frage, ob TUDCA konträr der Erwartungen nicht den ER-Stress im Feten senkt sondern stattdessen ihn möglicherweise erhöht.

Die Ergebnisse zeigten nicht die erwartete Stimulation durch LPS oder durch die ER-Stressinduktoren. Ebenfalls wiesen die Ergebnisse der Western Blots häufig keine

---

signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen auf. Bei der Analyse von BiP und XBP1 war ein Trend zu erkennen, dass die Proteinexpression nach der LPS-Behandlung höher war und durch die zusätzliche TUDCA-Behandlung gesenkt wurde. Bei allen anderen ER-Stress-Molekülen war dieses Muster nicht zu beobachten, was nicht den Erwartungen auf der Basis vorangehender Untersuchungen entspricht [149, 150].

Die immunhistochemischen Analysen zeigten im Vergleich zu Western Blot und qPCR die schlüssigeren und konsistenteren Expressionsmuster. Hierbei war bei den ER-Stress-Molekülen jeweils ein spezifischer organabhängiger Trend zu erkennen, der beim Feten anders ausfiel als bei der Muttermaus. In Übereinstimmung mit der Literatur induzierte LPS die IRE1 $\alpha$ - und BiP-Expression. Die übrigen ER-Stress-Marker ATF4, XBP1, Casp12 und CHOP hingegen befanden sich auf dem Kontrollniveau. Daher lässt sich vermuten, dass bei diesem gewählten Untersuchungszeitpunkt (nach der IVM) die Signalkaskade noch an ihrem Anfang stand und noch keine gravierenden Auswirkungen auf die Expression der nachfolgenden Transkriptionsfaktoren ATF4, XBP1, Casp12 und CHOP festgestellt werden konnten, die sich zeitlich später in der Kaskade befinden. Eine weitere Schwierigkeit bzgl. der Analyse von CHOP ist laut Haataja *et al.*, dass viele kommerziell erhältliche Antikörper gegen CHOP einer Evaluation bzgl. ihrer Spezifität nicht standhalten [151].

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass LPS organabhängig ER-Stress im Amnioninfektionsmodell induzieren kann. Im Erwachsenenalter beschreibt die große Mehrheit der Publikationen LPS als ER-Stressinduktor [149, 152]. Beispielsweise konnte in der Lunge der adulten Maus nach der LPS-Stimulation eine Erhöhung der Expression von diversen ER-Stressmarkern wie BiP und CHOP nachgewiesen werden [150, 153]. Die 2,7- bis 3,7-fache Erhöhung von BiP sowie die 2,1- bis 3,7-fache Erhöhung von CHOP in der adulten Lunge der Maus ist vergleichbar zu den Ergebnissen der Muttermaus aus der vorliegenden Arbeit [150]. Ein Literaturvergleich der fetalen Daten aus dem Amnioninfektionsmodell ist allerdings mangels fetaler *in vivo*-Studien schwierig.

In der vorliegenden Arbeit war eine schlüssige und konsistente Hemmung des LPS-induzierten fetalen ER-Stresses durch TUDCA nicht festzustellen. Da eine *in vivo* TUDCA-Behandlung in der Fetalzeit kaum beschrieben ist, fällt eine Diskussion im Kontext vorangehender Arbeiten schwer. Es gibt viele *in vitro*-Studien und wenige *in vivo*-Studien, die beschreiben dass TUDCA einen positiven Effekt auf den ER-Stress hat. Die Gallensäure wurde *in vivo* viel in Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen getestet, aber auch bei

Diabetes, Atherosklerose oder Kolitis [66, 113-115]. *In vitro*-Studien bzgl. Schweine-Embryos zeigten, dass TUDCA einen positiven Effekt auf die Entwicklung durch Linderung des ER-Stresses und somit der Apoptose hat [154]. Ebenfalls konnte in humanen Plazentaprobe eine Senkung des ER-Stresses durch TUDCA erreicht werden [155, 156]. Sigurdsson *et al.* konnten in einem *in vitro*-Modell mit fetalen Hepatozyten der Maus darlegen, dass Gallensäuren die Protein-Aggregation und somit den ER-Stress lindern können [157].

Zur Klärung der Rolle des Apoptose-induzierenden Transkriptionsfaktors CHOP [158] im Amnioninfektionsmodell, sollte das Überleben von CHOP-Knockout-Mäusen analysiert werden. Interessanterweise waren in diesem Modell die fetalen Überlebenswahrscheinlichkeiten von Wildtyp- (WT) und CHOP-Knockout-Mäusen nach einer LPS-Applikation gleich (Abbildung A16). Zunächst deutet dies darauf hin, dass CHOP in der LPS-induzierten Inflammation zumindest in Hinsicht auf das Überleben keine Rolle spielt. Da ER-Stress auch CHOP-unabhängig vermittelt werden kann, könnten in der CHOP-Knockout-Maus andere Kompensationsmechanismen für ER-Stress existieren. Es ist bereits gut etabliert, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in und aus dem ER eine Vielzahl zellulärer Mechanismen und Signaltransduktionswege reguliert, die in Hinsicht auf eine Stressantwort sowie die Modulation der Transkription eine große Rolle spielen. Beispielsweise kann die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER eine Vielzahl von Signalmechanismen auslösen, die hauptsächlich die Apoptose durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten mitochondrialen Weg des Zelltods fördern. Ebenfalls spielen die Moleküle Bax und Bak sowie das Chaperon Calreticulin eine große Rolle bzgl. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Daher lässt sich zusammenfassend sagen, dass Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamiken eine große Rolle bzgl. mancher ER-Stress-assoziierten Mechanismen des Zelltods spielen können [159]. Kang *et al.* wiesen in ihren Studien nach, dass die ER-Stress-induzierte Apoptose durch den MEKK1-Signalweg unabhängig von der UPR-Kaskade erfolgte [160]. Eine weitere UPR-unabhängige Signalkaskade als Antwort auf den ER-Stress wurde von Varadarajan *et al.* beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Reorganisation der ER-Membranen, die sich in einem gestörten ER-Transport und -Funktion äußert und im Zelltod endet [161]. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass es durchaus nach erfolgtem ER-Stress Apoptose-induzierende Mechanismen unabhängig der UPR-Kaskade und unabhängig von CHOP geben kann. Außerdem zeigten Woo *et al.*, dass ein langanhaltender durch LPS induzierter ER-Stress dazu führen kann, dass die Expression von CHOP sowie die Apoptose supprimiert wird. Sie beschrieben dies in Makrophagen der Milz, in renalen Zellen sowie in

---

Hepatozyten [162]. Dieser Zustand könnte in dem vorliegenden Modell durch die zweifache Gabe von LPS ebenfalls eingetreten sein, wodurch es keinen Unterschied bei der Überlebensrate zwischen den WT- und CHOP-Knockout-Mäusen gab. Dass heterozygote Nachkommen die Aussagekraft der Versuchsergebnisse stören, ist durch Knockout-Inzuchtverpaarung quasi ausgeschlossen.

Zur Klärung der Frage inwiefern im fetalen Organismus überhaupt ein relevanter ER-Stress ausgelöst werden kann, wurden die wirkungsvollen ER-Stress-Induktoren Tunicamycin (TM) und Thapsigargin (TG) eingesetzt [163-168]. Während in adulten und neugeborenen Mäusen in Leber, Niere und Gehirn eine Hochregulation der ER-Stressmarker wie ATF6, XBP1, CHOP und BiP durch TM und/oder TG beschrieben ist [169-171], lagen Vorarbeiten, die einen Einsatz in der Fetalzeit beschreiben, nicht vor. Im Amnioninfektionsmodell ließ sich durch TM sowie TG ein fetaler ER-Stress nicht zuverlässig und einheitlich auslösen. Dies könnte unter anderem an falschen TM-/TG-Konzentrationen oder an ungeeigneten Analysezeitpunkten liegen. Ein weiterer Grund könnte eine fehlende Plazentagängigkeit von TM und TG sein, die nicht bekannt war. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Substanzen ihre Wirkung nur über den maternalen ER-Stress auf den Feten entfalten konnten. Die ER-Stress-Regulation durch die ER-Stressinduktoren scheint im vorliegenden Modell stark organ- und methodenspezifisch zu sein; dies wird durch folgende Arbeiten unterstützt. So beschrieben beispielsweise Kim *et al.* einen Effekt von LPS auf die Expression von CHOP in murinen Lungen [150]. Hingegen zeigte die Studie von Woo *et al.*, dass eine Hochregulation der CHOP-Expression u. a. in der Milz, Niere und Leber von adulten Mäusen sowie in Makrophagen- und Fibroblasten-Zelllinien durch LPS-induzierten anhaltenden ER-Stress nicht stattfand. Dies konnte durch einen *knockout* von TLR4 sowie durch einen *knockout* von TRIF aufgehoben werden, sodass wieder eine Hochregulation stattfand [162]. Ebenfalls stellte diese Arbeitsgruppe dar, dass die Translation von ATF4 durch LPS gehemmt ist, somit nicht stattfindet und diese Effekte durch die Hemmung von PERK nicht stattfanden. Hingegen beschrieben Nakayama *et al.* gegenteilige Ergebnisse; nach ihnen wird ebenfalls die PERK-Expression in murinen Makrophagen durch LPS gehemmt [172]. Insgesamt sind sehr unterschiedliche und auch widersprüchliche Angaben bzgl. der Effekte von LPS als ER-Stressinduktor in der Literatur zu finden. Möglicherweise hängt es aber auch von den verwendeten Modellorganismen und den jeweiligen Zelltypen bzw. den ausgewählten Organen ab.

---

Für die Moleküle IRE1 $\alpha$ , ATF6, XBP1 und BiP zeigten Woo *et al.* sowie Nakayama *et al.*, dass eine Induktion durch die LPS-Stimulation vorhanden war. Für die Moleküle IRE1 $\alpha$  und BiP war auch wie bereits beschrieben dieser Trend in den Ergebnissen dieser Arbeit zu sehen. Nakayama *et al.* fanden heraus, dass speziell die Konzentration von XBP1s stark zeitabhängig ist und möglicherweise daher zu dem Zeitpunkt der Organentnahme im Modell des Amnioninfektionssyndroms in dieser Arbeit nicht signifikant hochreguliert war. In den bereits erwähnten Studien erwiesen sich Tunicamycin und Thapsigargin *in vivo* in adulten Mäusen als wirkungsvolle ER-Stressinduktoren [150, 172]. In diesem Zusammenhang muss erneut besonders betont werden, dass sich fast alle ER-Stress-Studien auf *in vitro*-Versuche oder auf adulte Mäuse beziehen und daher kein Vergleich möglich ist.

Jedoch die Arbeitsgruppe um Kawakami *et al.* führten *in vivo*-Versuche mit schwangeren Mäusen durch, wodurch ein Vergleich möglich war. Hierbei stellte sich heraus, dass Tunicamycin in der schwangeren Maus seine Wirkung zeigte und sich auf die Größe und das Gewicht der Plazenta sowie der Feten auswirkte. In dieser Studie erhöhte sich die CHOP- sowie BiP-Expression in der maternalen Leber, allerdings nicht in der fetalen Leber [173]. Dieses Ergebnis wird durch die in dieser Arbeit gefunden Erkenntnisse gestützt.

Denkbar ist schließlich auch, dass ER-Stress im Feten nicht durch die klassischen Mechanismen auslösbar ist oder sogar in gewisser Weise physiologisch sein könnte. Dafür spricht, dass LPS organabhängig fetale ER-Stressmoleküle herunterregulieren kann, während die protektive TUDCA-Behandlung den ER-Stress hochregulieren kann. Die Folge wäre, dass TUDCA eine Stabilisierung bzw. ER-Balance herbeigeführt und sich so der ER-Stress positiv auswirkt hat. Beispielsweise beschrieben Gu *et al.*, dass eine niedrige Tunicamycin-Dosis und damit herbeigeführter ER-Stress sich positiv auf die Dezidualisierung auswirkte. In niedrigen Konzentrationen im Pikogramm-Bereich hat TM *in vitro* positive Auswirkungen auf die Proliferation von Stromazellen. Dieser positive Effekt ist konzentrations- und zeitabhängig, denn bei einer zu hohen Dosis und einer zu langen Inkubationszeit kehrt sich der Effekt ins Negative um und TM wirkt sich hemmend auf die Zellproliferation aus [174].

Auch bei der Atherosklerose können sich niedrige TM-Konzentrationen positiv auswirken. Ma *et al.* stellten hierbei eine höhere Autophagie-Aktivität, eine reduzierte Fett-Aufnahme und Akkumulation sowie Zellapoptose fest. Dies zeigte sich anhand von reduzierten Plaque-Arealen und nekrotischen Bereichen. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass eine geringe Dosis an TM atherosklerotische Plaques durch die Erhöhung der Autophagie mit Hilfe des AKT-TSC-

---

mTOR Signalwegs stabilisiert [175]. Aus diesen Studien lässt sich schließen, dass sich chronischer ER-Stress negativ auswirkt, jedoch milder, zeitlich begrenzter ER-Stress positive Effekte haben kann. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer wurden positive Effekte durch einen Amyloid  $\beta$ -induzierten ER-Stress gefunden. Wu *et al.* stellten fest, dass die Phosphorylierung von PERK und somit der ER-Stress die MiR-200c-Expression erhöhte, die wiederum protektiv in Bezug auf neuronale Proliferation und Überleben wirkt [176]. In einer weiteren Studie bzgl. neurodegenerativer Erkrankungen wurde gezeigt, dass TM positive Effekte haben kann. Bei Alzheimer, Parkinson sowie MS spielt die Akkumulation von Eisen im Gehirn eine negative Rolle. Healy *et al.* fanden heraus, dass die Exposition von TM im Gehirn der Ratte dazu führte, dass die UPR aktiviert wurde, die eine Überfrachtung von Eisen verhinderte und möglicherweise gegen die toxischen Effekte von Eisen auf die Oligodendrozyten und Mikroglia entgegenwirken konnte [177].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bereits in diversen *in vivo*-Studien positive Effekte von TUDCA auf verschiedene Erkrankungen (z. B. Adipositas, Diabetes, Kolitis, Atherosklerose) aufgezeigt wurden [66, 113-115] und TUDCA bereits für ausgewählte Erkrankungen (z. B. bei Gallensteinen) als Medikament eingesetzt wird [65]. Die meisten Erkenntnisse bzgl. der Wirkweise von TUDCA stammen bisher aus *in vitro*-Studien oder Studien mit adulten Mäusen. Diese zeigten allerdings, dass die Linderung des ER-Stresses ein vielversprechender Ansatz ist, um diverse Inflammationszustände in der Fetalzeit zu lindern [152, 178, 179]. Die neu gewonnenen Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit könnten darauf hinweisen, dass auch im Amnioninfektionsmodell eine Verbesserung des fetalen Inflammationszustandes durch die ER-Stress-Linderung erlangt werden kann. Aufgrund der nicht eindeutigen Datenlage bzgl. der Linderung des ER-Stresses im Feten, wurden auch weitere Signalwege analysiert.

### **6.3.2. Alternative Mechanismen und TGR5-Signalweg**

Neben dem ER-Stress sind im Folgenden alternative TUDCA-Signalwege untersucht worden. Im besonderen Fokus standen der oxidative Stress und der TNF-Signalweg. Diesbezügliche Untersuchungen ergaben allerdings im Amnioninfektionsmodell keine richtungsweisenden Befunde. Sie scheinen daher die TUDCA-induzierten protektiven Effekte im Feten in diesem Modell nicht zu vermitteln.

---

Daraufhin wurde der TGR5- (Takeda-G-protein-receptor-5) / GPBAR1 (G protein-coupled bile acid receptor 1)-Rezeptor in den Fokus genommen. TGR5 ist ein membranständiger Rezeptor, der in verschiedenen Zelltypen vorkommt [180] und an den Gallensäuren wie z. B. TUDCA direkt binden können [181, 182]. TGR5 spielt auch eine große Rolle in Endothelzellen und somit auch bei der Leukozytenrekrutierung und Inflammation [183]. So beschrieben beispielsweise Kida *et al.* eine reduzierte Adhäsion von Monozyten in vaskulären Endothelzellen [184]. Eine Aktivierung dieses Zelloberflächenrezeptors induziert die Produktion von intrazellulärem cAMP und Calcium, daran schließt sich die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs und anschließend die Internalisierung des Rezeptors an [181, 182]. In diversen Studien wurde deutlich, dass über diesen Rezeptor ein anti-inflammatorischer Effekt vermittelt werden kann [181] und dieser Signalweg sich ebenfalls positiv bei gastrointestinalen Schädigungen [185], Kolitis [186, 187] sowie Stoffwechselerkrankungen wie z. B. Typ 2-Diabetes auswirkt, indem die Sekretion von GLP-1 aus den L-Zellen des Pankreas durch Aktivierung des TGR5-Rezeptors stimuliert wird [188]. Die Verabreichung eines TGR5-Agonisten verbesserte die metabolische Homöostase sowie die Glukosetoleranz bei fettreich gefütterten Mäusen [189] und sorgte für eine Reduktion der Zytokinspiegel in Makrophagen [190, 191]. TGR5 wurde daraufhin mit den immunmodulatorischen Eigenschaften von Gallensäuren in Verbindung gebracht und in diesem Zusammenhang analysiert.

In dieser Arbeit war TUDCA konzentrationsabhängig in der Lage die TGR5-mRNA in Neutrophilen Granulozyten signifikant und in MAECs zumindest tendenziell zu erhöhen. Yanguas-Casás *et al.* stellten in Mikrogliazellen der Ratte ebenfalls fest, dass durch eine alleinige TUDCA-Applikation die TGR5-Expression erhöht wurde [192]. Möglicherweise gibt es durch die TUDCA-Applikation ein positives Feedback und es wird die Expression des Rezeptors gesteigert. Die Erhöhung der mRNA-Konzentration würde für diese Hypothese sprechen. Allerdings finden sich bisher keine Hinweise in der Literatur bzgl. eines selbstregulierenden Feedback-Mechanismus von TGR5. Wan & Sheng beschrieben, dass der nukleare Rezeptor FXR beispielsweise die Expression des TGR5-Gens im Darm der Maus induzieren kann. FXR und TGR5 sind co-exprimiert in enteroendokrinen L-Zellen und die FXR-Aktivierung veranlasst die TGR5-stimulierte Sekretion von GLP-1. Da die Expression des TGR5-Gens durch FXR transkriptionell reguliert wird, vermuten Wan & Sheng dass die Methylierung und Acetylierung wahrscheinlich die TGR5-Aktivität beeinflussen kann [193].

Außerdem beschrieben Chiang *et al.*, dass die Gallensäure-Aktivierung von FXR- und TGR5-Signalwegen eine Inflammation in Makrophagen, im Darm und in Hepatozyten supprimieren kann. Dies soll durch die Inhibierung der Translokation von NfκB zum Nukleus und von pro-inflammatorischen Zytokinen funktionieren [194].

Die LPS-Induzierbarkeit der TGR5-Expression in Neutrophilen und Endothelzellen sowie der Einsatz eines spezifischen TGR5-Inhibitors sollte hier Klärung verschaffen. Die mRNA-Expressionen des TUDCA-Rezeptors TGR5 auf den MAECs sowie auf den Neutrophilen Granulozyten ließen sich in diesem Projekt durch LPS offenbar nicht beeinflussen bzw. regulieren. Zur Prüfung der Hypothese, dass TGR5 die anti-inflammatorischen TUDCA-Effekte während LPS-induzierter Entzündungen vermittelt, wurde der spezifische TGR5-Inhibitor SB756050 [195] eingesetzt. Da der Inhibitor die anti-inflammatorischen TUDCA-Effekte in diesem Projekt nicht aufheben konnte, wurde die Hypothese verworfen. Allerdings sollte angemerkt werden, dass in Ermangelung von Vorarbeiten keine Vorkenntnisse bezüglich Zeitpunkt und Konzentration vorlagen und nur wenige Versuchsreihen durchgeführt wurden. Ferner ist der Inhibitorversuch nur an einem Zelltypen mit einem Readoutparameter durchgeführt worden (ICAM-1 auf MAECs).

Die Studien von Su *et al.* unterstützen diese Erkenntnis, da sie herausfanden, dass in der Niere keine Hochregulation von TGR5 durch die LPS-Applikation vorhanden war [196]. Im Gegensatz dazu zeigten Yanguas-Casás *et al.* in Mikrogliazellen der Ratte, dass eine Hochregulation der TGR5-Expression durch eine LPS-Stimulation möglich ist. Sie wiesen es sowohl auf mRNA- als auch auf der Proteinebene nach. Yanguas-Casás *et al.* verwendeten andere Analyseparameter; sie inkubierten die Zellen eine Stunde mit TUDCA und 24 h mit LPS [192]. Neben der längeren Inkubationszeit mit LPS stellt ebenfalls der verwendete Zelltyp einen Unterschied zur vorliegenden Arbeit dar.

## 7. Schlussfolgerungen

Unter Nutzung des Amnioninfektionsmodells (AIS-Modell) mit maternaler intraperitonealer LPS-Applikation gelang es eine Inflammation ähnlich dem klinischen Bild eines *fetal inflammatory response syndrome* (FIRS) auszulösen. Ein FIRS kann in einer fetal verlaufenden Form der Sepsis des ungeborenen Kindes münden [197, 198]. Im AIS-Modell war es möglich mehrere Facetten der fetalen Entzündung zu untersuchen, das *Outcome* der Mausfeten (Überleben und Frühgeburtslichkeit), die Leukozytenrekrutierung unter *in vivo*-Bedingungen, bis hin zu histologischen und molekularen Parametern der Entzündungen. Nachdem das Modell etabliert war, konnte es als Testplattform für immunmodulierende Substanzen wie der Tauroursodeoxycholsäure genutzt werden.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigten auf, dass TUDCA plazentagängig ist und einen anti-inflammatorischen Effekt direkt im Feten auslösen kann. Dieser anti-inflammatorische Effekt spiegelte sich anhand einer verbesserten Überlebenschance, einer gesenkten Frühgeburtsrate, einer niedrigeren Anzahl an adhären und infiltrierte Neutrophilen und anhand einer reduzierten Expression von pro-inflammatorischen Markern im Gewebe sowie im Plasma wider. Die zwei wichtigsten Zelltypen in diesem Projekt – die Neutrophilen Granulozyten und die Endothelzellen – scheinen beide direkt auf die TUDCA-Applikation zu reagieren und den anti-inflammatorischen Effekt zu vermitteln.

Die erhobenen Basisinflammationsdaten bzgl. der pro-inflammatorischen Effekte der LPS-Stimulation stimmen mit den hauptsächlich mittels anderer Methoden erlangten bisherigen publizierten Daten überein. Ein Erkenntnisgewinn bestand in der Erforschung des anti-inflammatorischen Effekts von TUDCA in einem *in vivo*-Mausmodell, das einem klinischen Amnioninfektionsmodell sehr ähnelt.

Ogleich der molekulare Mechanismus nicht genau aufgeklärt werden konnte, gibt es Hinweise, dass in der schwangeren Maus TUDCA den ER-Stress lindern kann, sodass möglicherweise dadurch die fetale Inflammation gesenkt wird. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob ER-Stress im Feten ausgelöst wurde. Infolgedessen bleibt auch unklar, ob die protektiven Eigenschaften von TUDCA, die zu einer Senkung der Inflammation im Feten geführt haben, über die ER-Stresshemmung vermittelt wurden. Es ist möglich, dass im Feten nicht direkt eine Inflammation durch LPS ausgelöst wird, sondern ausschließlich indirekt

über maternale Zytokine. Ebenso ist es möglich, dass sich die Linderung des maternalen ER-Stresses positiv auf den Fetus auswirken kann.

Aus der Literatur ergeben sich Hinweise auf weitere TUDCA-Signalwege, die potentiell in das anti-inflammatorische Signalling involviert sein könnten wie z. B. der TGF $\beta$ -pathway, durch Aktivierung verschiedener Isoformen der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase Cs (PKCs) und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), oder aber durch Aktivierung der ERK1/2- und JNK1/2-pathways [199, 200]. So deuten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beispielsweise darauf hin, dass der TUDCA-Rezeptor TGR5 ein vielversprechender Kandidat in der Vermittlung der protektiven Eigenschaften von TUDCA ist.

Ferner könnten die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, dass dieses Modell in Zukunft herangezogen wird, um neue anti-entzündliche Substanzen *in vivo* zu testen.

## 8. Ausblick

Auf der Basis der nachgewiesenen anti-inflammatorischen Effekte von TUDCA im Amnioninfektionsmodell sollte unter Berücksichtigung der eingeschränkten Übertragbarkeit des Mausmodells auf den Menschen der Einsatz von TUDCA als Prophylaxe oder Therapie eines Amnioninfektionssyndroms diskutiert werden. Vorgeschaltete Studien an höheren Säugetieren sind zu diesem Zweck unerlässlich.

Zudem sind weitere Studien zur Wirksamkeit, Sicherheit und dem molekularen Wirkmechanismus von TUDCA erforderlich. Hierzu könnten beispielsweise die cAMP- oder NO-Produktion gemessen werden, da diese durch eine Bindung von TUDCA an den TGR5-Rezeptor ansteigen sollte. Sehr hilfreich wären Experimente mit einer Mauslinie, die einen *knockout* von TGR5 aufweist, sodass definitiv geklärt werden könnte, ob der anti-inflammatorische Effekt von TUDCA über diesen Rezeptor reguliert wird.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit der klinischen Praxis, sollten ferner zusätzliche Experimente mit anderen Bakterienstämmen und/oder intakten Bakterien bzw. anderen Applikationsrouten (z. B. vaginale Inokulation) durchgeführt werden. Schließlich sind mehrphasige klinische Studien erforderlich, bevor TUDCA Einzug in die klinische Praxis finden kann.

## 9. Wissenschaftliche Beiträge

Die Ergebnisse vorliegender Dissertation wurden zum Teil in folgenden Publikationen und wissenschaftlichen Vorträgen veröffentlicht:

### Publikationen

Karenberg, K., H. Hudalla, and D. Frommhold, *Leukocyte recruitment in preterm and term infants. Molecular and Cellular Pediatrics*, 2016. 3(35).

Hudalla, H., K. Karenberg, R. J. Kuon, J. Pöschl, R. Tschada, and D. Frommhold, *LPS-induced maternal inflammation promotes fetal leukocyte recruitment and prenatal organ infiltration in mice. Pediatric Research*, 2018. 84: p. 757 – 764.

Karenberg, K., H. Hudalla, J. Pöschl, and D. Frommhold, *The immunomodulatory effects of TUDCA in the fetal period*, in preparation.

### Wissenschaftliche Vorträge

*LPS-induced maternal inflammation promotes fetal leukocyte recruitment and death*, 39th Annual Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB); Peaks in Vascular Biology, 5. – 7. October 2017, Grainau / Garmisch-Partenkirchen, Germany.

## 10. Danksagung

Ich danke Prof. Pöschl, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe im Forschungslabor der Neonatologie forschen zu dürfen und meine Dissertation anzufertigen.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Frommhold bedanken, der mir dieses sehr spannende Thema zur Verfügung gestellt hat. Ich bedanke mich sehr für die Betreuung, den wissenschaftlichen Austausch und die Unterstützung während meiner gesamten Doktorandenzeit.

Bei PD Dr. Müller-Decker möchte ich mich besonders für die Betreuung als Erstgutachterin bedanken. Außerdem möchte ich mich bei ihr und Prof. Lemberg für den sehr konstruktiven wissenschaftlichen Austausch und die anregenden Diskussionen während der TAC-Meetings bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe Pöschl/Frommhold danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders danken möchte ich Hannes Hudalla für den guten wissenschaftlichen Austausch und Melitta Weissinger, die als gute Seele des Labors allen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Darüberhinaus möchte ich Raphaela, Simon, Maylis, Tanja, Judit, Silvia und Britta für die gemeinsame Zeit danken.

Des Weiteren möchte ich Dr. H. Gan-Schreier aus der Medizinischen Klinik danken für die Hilfe und Durchführung der Analyse der TUDCA-Plasmaspiegel. Auch der AG Prof. Pfister vom Deutschen Krebsforschungszentrum für den technischen Support und die Durchführung der Transkriptomanalyse, sowie Dr. Jan Koster vom Academic Medical Center Amsterdam für die Unterstützung bei der Auswertung. Außerdem danke ich Stella Nyamoya der AG Prof. Beyer von der Uniklinik RWTH Aachen sowie Shrey Kohli der AG Prof. Isermann der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die Bereitstellung der Knockout-Mäuse und Zelllinien.

Weiterhin möchte ich der AG Prof. Füllekrug sowie der AG Prof. Schäfer danken für die gute Nachbarschaft und die Mitbenutzung der Gerätschaften. Insbesondere möchte ich Tarik für die sehr guten wissenschaftlichen Diskussionen und den Austausch danken, der einen immer weitergebracht hat! Außerdem möchte ich Simon, Max, Susi, Anna, Julia, Juan, Gesa, Jana, Tanja, Maria, Ivana, Gzona und Julia danken für die unterhaltsame und dadurch angenehme Zeit!

Und am aller wichtigsten danke ich meiner Familie: meinen Eltern Martina und Armin, meinem Bruder Tassilo und meinem Freund Alex, dass ihr mich immer gestärkt habt und an mich geglaubt habt, für die Motivation, die Ablenkung, die Geduld und den emotionalen Beistand während der vielen Höhen und Tiefen während der gesamten Promotionszeit. Insbesondere danke ich meiner Mutter für den Beistand, die Diskussionen und die Korrekturarbeiten. Vielen Dank für den fortwährenden Zuspruch, die stetige Aufmunterung, Eure unermüdliche Unterstützung und Eurer Vertrauen in mich. Ihr habt mir jeden Tag aufs Neue die Kraft gegeben die Arbeit so wie sie vorliegt abschließen zu können.

## 11. Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation (WHO) *Preterm birth*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>, 2018 (abgerufen am 18.12.2018).
2. Cohen-Wolkowicz, M., et al., *Early and late onset sepsis in late preterm infants*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2009. **28**(12): p. 1052 – 1056.
3. Lawn, J.E., K. Wilczynska-Ketende, and S.N. Cousens, *Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000*. International Journal of Epidemiology, 2006. **35**(3): p. 706 – 718.
4. Stoll, B.J., et al., *Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network*. Pediatrics, 2010. **126**: p. 443 – 456.
5. Liu, L., et al., *Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals*. The Lancet, 2016. **388**(10063): p. 3027 – 3035.
6. Lawn, J.E., et al., *3.6 million neonatal deaths—what is progressing and what is not?* Seminars in Perinatology, 2010. **34**(6): p. 371 – 386.
7. Klebanoff, M.A. and S.A. Keim, *Epidemiology: the changing face of preterm birth*. Clinics in Perinatology, 2011. **38**(3): p. 339 – 350.
8. Schleußner, E., *The prevention, diagnosis and treatment of premature labor*. Deutsches Ärzteblatt International, 2013. **110**(13): p. 227 – 236.
9. Ananth, C.V. and A.M. Vintzileos, *Maternal-fetal conditions necessitating a medical intervention resulting in preterm birth*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2006. **195**(6): p. 1557 – 1563.
10. Downes, K.L., K.L. Grantz, and E.D. Shenassa, *Maternal, labor, delivery, and perinatal outcomes associated with placental abruption: A systematic review*. American Journal of Perinatology, 2017. **34**(10): p. 935 – 957.
11. Glass, H.C., et al., *Outcomes for extremely premature infants*. Anesthesia and Analgesia, 2015. **120**(6): p. 1337 – 1351.
12. Camacho-Gonzalez, A., P.W. Spearman, and B.J. Stoll, *Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis*. Pediatric Clinics of North America, 2013. **60**(2): p. 367 – 389.
13. Yakubenia, S., et al., *Leukocyte trafficking in a mouse model for leukocyte adhesion deficiency II/congenital disorder of glycosylation IIc*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1472 – 1481.
14. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(9): p. 678 – 689.
15. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition—three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. **67**: p. 1033 – 1036.
16. Strunk, T., et al., *Differential maturation of the innate immune response in human fetuses*. Pediatric Research, 2004. **56**(2): p. 219 – 226.
17. Moriguchi, N., et al., *Granulocyte functions and changes in ability with age in newborns; Report no. 1: Flow cytometric analysis of granulocyte functions in whole blood*. Pediatrics International, 2006. **48**(1): p. 17 – 21.
18. Rebuck, N., A. Gibson, and A. Finn, *Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leucocyte integrins but defective L-selectin*

- expression and shedding*. *Clinical & Experimental Immunology*, 1995. **101**(1): p. 183 – 189.
19. Surbek, D.V., et al., *Developmental changes in adhesion molecule expressions in umbilical cord blood CD34+ hematopoietic progenitor and stem cells*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2000. **183**(5): p. 1152 – 1157.
  20. Mariscalco, M.M., M.H. Tchamitchi, and C.W. Smith, *P-Selectin support of neonatal neutrophil adherence under flow: contribution of L-selectin, LFA-1, and ligand (s) for P-selectin*. *Blood*, 1998. **91**(12): p. 4776 – 4785.
  21. Smith, J.B. and K.M. Tabsh, *Fetal neutrophils and eosinophils express normal levels of L-selectin*. *Pediatric Research*, 1993. **34**(3): p. 253 – 257.
  22. Nussbaum, C., et al., *Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2013. **93**(2): p. 175 – 184.
  23. Sperandio, M., et al., *Ontogenetic regulation of leukocyte recruitment in mouse yolk sac vessels*. *Blood*, 2013. **121**(21): p. e118 – e128.
  24. Davies, J., et al., *The ontogeny of adhesion molecules expressed on the vascular endothelium of the developing human skin*. *Journal of Anatomy*, 1996. **189**(2): p. 373 – 382.
  25. Lorant, D.E., et al., *P-selectin expression by endothelial cells is decreased in neonatal rats and human premature infants*. *Blood*, 1999. **94**(2): p. 600 – 609.
  26. Tchamitchi, M.H., C.W. Smith, and M.M. Mariscalco, *Neonatal neutrophil interaction with P-selectin: contribution of P-selectin glycoprotein ligand-1 and sialic acid*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000. **67**(1): p. 73 – 80.
  27. Storm, S.W., M.M. Mariscalco, and M.F. Tosi, *Postnatal maturation of total cell content and up-regulated surface expression of Mac-1 (CD11b/CD18) in polymorphonuclear leukocytes of human infants*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2008. **84**(2): p. 477 – 479.
  28. Buschmann, K., et al., *RAGE controls leukocyte adhesion in preterm and term infants*. *BMC Immunology*, 2014. **15**(53).
  29. Karenberg, K., H. Hudalla, and D. Frommhold, *Leukocyte recruitment in preterm and term infants*. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 2016. **3**(35).
  30. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte migration into inflamed tissues*. *Immunity*, 2014. **41**(5): p. 694 – 707.
  31. Zarbock, A., et al., *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. *Blood*, 2011. **118**(26): p. 6743 – 6751.
  32. Sundd, P., M.K. Pospieszalska, and K. Ley, *Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings*. *Molecular Immunology*, 2013. **55**(1): p. 59 – 69.
  33. Frommhold, D., et al., *RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo*. *Blood*, 2010. **116**(5): p. 841 – 849.
  34. Dixit, N. and S.I. Simon, *Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest*. *Frontiers in Immunology*, 2012. **3**(188).
  35. Ley, K., *Arrest chemokines*. *Frontiers in Immunology*, 2014. **5**: p. 150.
  36. Zarbock, A. and K. Ley, *Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium*. *The American Journal of Pathology*, 2008. **172**(1): p. 1 – 7.
  37. Alon, R. and M.L. Dustin, *Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells*. *Immunity*, 2007. **26**(1): p. 17 – 27.

38. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(12): p. 2569 – 2575.
39. Shulman, Z., et al., *Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 384 – 396.
40. Muller, W.A., *Getting leukocytes to the site of inflammation*. Veterinary Pathology, 2013. **50**(1): p. 7 – 22.
41. Williams, M.R., et al., *Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium*. Trends in Immunology, 2011. **32**(10): p. 461 – 469.
42. Kunkel, E.J., J.L. Dunne, and K. Ley, *Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo*. The Journal of Immunology, 2000. **164**: p. 3301 – 3308.
43. Vestweber, D., *How leukocytes cross the vascular endothelium*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(11): p. 692 – 704.
44. Muller, W.A., *Mechanisms of leukocyte transendothelial migration*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2011. **6**: p. 323 – 344.
45. Carr, R., *Neutrophil production and function in newborn infants*. British Journal of Haematology, 2000. **110**(1): p. 18 – 28.
46. Koenig, J.M. and M.C. Yoder, *Learning to roll before you stop and drop*. Blood, 2013. **121**(21): p. 4252 – 4254.
47. Naik-Mathuria, B., et al., *Age-dependent recruitment of neutrophils by fetal endothelial cells: implications in scarless wound healing*. Journal of Pediatric Surgery, 2007. **42**(1): p. 166 – 171.
48. Olutoye, O.O., et al., *Neutrophil recruitment by fetal porcine endothelial cells: implications in scarless fetal wound healing*. Pediatric Research, 2005. **58**(6): p. 1290 – 1294.
49. Fox, S.E., et al., *The effects and comparative differences of neutrophil specific chemokines on neutrophil chemotaxis of the neonate*. Cytokine, 2005. **29**(3): p. 135 – 140.
50. Hidalgo, A. and P.S. Frenette, *Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow*. Blood, 2005. **105**(2): p. 567 – 575.
51. Buschmann, K., et al., *CXCL1-triggered interaction of LFA1 and ICAM1 control glucose-induced leukocyte recruitment during inflammation in vivo*. Mediators of Inflammation, 2012. **2012**.
52. Frommhold, D., et al., *Sialyltransferase ST3Gal-IV controls CXCR2-mediated firm leukocyte arrest during inflammation*. Journal of Experimental Medicine, 2008. **205**(6): p. 1435 – 1446.
53. Le Guyader, D., et al., *Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish*. Blood, 2008. **111**(1): p. 132 – 141.
54. Pase, L., C.J. Nowell, and G.J. Lieschke, *In vivo real-time visualization of leukocytes and intracellular hydrogen peroxide levels during a zebrafish acute inflammation assay*, in *Methods in Enzymology*. 2012, Elsevier. p. 135 – 156.
55. Georgiades, P., A. Ferguson-Smith, and G. Burton, *Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae*. Placenta, 2002. **23**(1): p. 3 – 19.

- 
56. Cox, B., et al., *Comparative systems biology of human and mouse as a tool to guide the modeling of human placental pathology*. *Molecular Systems Biology*, 2009. **5**(279).
  57. Carter, A.M., *Animal models of human placentation—a review*. *Placenta*, 2007. **21**: p. 41 – 47.
  58. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. *The Journal of Immunology*, 2004. **172**(5): p. 2731 – 2738.
  59. Hudalla, H., et al., *LPS-induced maternal inflammation promotes fetal leukocyte recruitment and prenatal organ infiltration in mice*. *Pediatric Research*, 2018. **84**: p. 757 – 764.
  60. Zhao, J., et al., *Hyper innate responses in neonates lead to increased morbidity and mortality after infection*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(21): p. 7528 – 7533.
  61. Tanaka, Y., et al., *The exacerbating roles of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the preventive effects of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) against pulmonary fibrosis in mice*. *Pharmacological Research*, 2015. **99**: p. 52 – 62.
  62. Solá, S., et al., *Plasma levels of ursodeoxycholic acid in black bears, *Ursus americanus*: seasonal changes*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2006. **143**(2): p. 204 – 208.
  63. García-Cañaveras, J.C., et al., *Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse and rat using an UPLC-MRM-MS-validated method*. *Journal of Lipid Research*, 2012. **53**: p. 2231 – 2241.
  64. Parry, G.J., et al., *Safety, tolerability, and cerebrospinal fluid penetration of ursodeoxycholic acid in patients with amyotrophic lateral sclerosis*. *Clinical Neuropharmacology*, 2010. **33**(1): p. 17 – 21.
  65. Osterath, B., *Ein bärenstarkes Heilmittel*. *Nachrichten aus der Chemie*, 2009. **57**(1): p. 24 – 26.
  66. Vang, S., et al., *The unexpected uses of urso-and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases*. *Global Advances in Health and Medicine*, 2014. **3**(3): p. 58 – 69.
  67. Gronbeck, K.R., et al., *Application of tauroursodeoxycholic acid for treatment of neurological and non-neurological diseases: is there a potential for treating traumatic brain injury?* *Neurocritical Care*, 2016. **25**(1): p. 153 – 166.
  68. Miller, S.D., et al., *Tauroursodeoxycholic acid inhibits apoptosis induced by Z alpha-1 antitrypsin via inhibition of Bad*. *Hepatology*, 2007. **46**(2): p. 496 – 503.
  69. Schoemaker, M.H., et al., *Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways*. *Hepatology*, 2004. **39**(6): p. 1563 – 1573.
  70. Thomas, C., et al., *Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008. **7**(8): p. 678 – 693.
  71. Yasuda, H., et al., *Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. **354**(1): p. 154 – 159.
  72. Chen, X., et al., *Characterization of chenodeoxycholic acid as an endogenous antagonist of the G-coupled formyl peptide receptors*. *Inflammation Research*, 2000. **49**(12): p. 744 – 755.

73. Faust, N., et al., *Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages*. *Blood*, 2000. **96**(2): p. 719 – 726.
74. Hagenbuch, B. and P.J. Meier, *The superfamily of organic anion transporting polypeptides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2003. **1609**(1): p. 1 – 18.
75. Marin, J.J., et al., *Molecular bases of the fetal liver–placenta–maternal liver excretory pathway for cholephilic compounds*. *Liver International*, 2008. **28**(4): p. 435 – 454.
76. Vandewynckel, Y.-P., et al., *Tauroursodeoxycholic acid dampens oncogenic apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress during hepatocarcinogen exposure*. *Oncotarget*, 2015. **6**(29): p. 28011 – 28025.
77. Calbiochem. *Sicherheitsdatenblatt Tauroursodeoxycholic Acid*. <http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Tauroursodeoxycholic-Acid-Sodium-Salt-CAS-14605-22-2-Calbiochem,EMD-BIO-580549>, 2003 (abgerufen am 04.04.2016).
78. Carubbi, F., et al., *Comparative cytotoxic and cytoprotective effects of taurohyodeoxycholic acid (THDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) in HepG2 cell line*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2002. **1580**(1): p. 31 – 39.
79. Roda, A., et al., *Taurohyodeoxycholic acid protects against taurochenodeoxycholic acid–induced cholestasis in the rat*. *Hepatology*, 1998. **27**(2): p. 520 – 525.
80. Schölmerich, J., et al., *Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties-studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles*. *Hepatology*, 1984. **4**(4): p. 661 – 666.
81. Salminen, A., et al., *Maternal endotoxin-induced preterm birth in mice: fetal responses in toll-like receptors, collectins, and cytokines*. *Pediatric Research*, 2008. **63**(3): p. 280 – 286.
82. Mussalli, G.M., et al., *Inflammatory cytokines in a murine model of infection-induced preterm labor: cause or effect?* *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 1999. **6**(4): p. 188 – 195.
83. Knapp, S., et al., *Lipoteichoic acid-induced lung inflammation depends on TLR2 and the concerted action of TLR4 and the platelet-activating factor receptor*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(5): p. 3478 – 3484.
84. Kumar, A. and A. Kumar, *Role of Staphylococcus aureus virulence factors in inducing inflammation and vascular permeability in a mouse model of bacterial endophthalmitis*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0128423.
85. Takeuchi, O., et al., *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. *Immunity*, 1999. **11**(4): p. 443 – 451.
86. Yipp, B.G., et al., *Profound differences in leukocyte-endothelial cell responses to lipopolysaccharide versus lipoteichoic acid*. *The Journal of Immunology*, 2002. **168**(9): p. 4650 – 4658.
87. Hesse, C.C., B. Andersson, and A.E. Wold, *Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes*. *Cytokine*, 2005. **30**(6): p. 311 – 318.
88. Agrawal, V. and E. Hirsch, *Intrauterine infection and preterm labor*. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 2012. **17**(1): p. 12 – 19.

89. Ashdown, H., et al., *The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia*. *Molecular Psychiatry*, 2006. **11**(1): p. 47 – 55.
90. Carpentier, P.A., A.L. Dingman, and T.D. Palmer, *Placental TNF- $\alpha$  signaling in illness-induced complications of pregnancy*. *The American Journal of Pathology*, 2011. **178**(6): p. 2802 – 2810.
91. Elovitz, M.A., et al., *Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury*. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2011. **29**(6): p. 663 – 671.
92. Muñoz, L.E., et al., *Missing in action—The meaning of cell death in tissue damage and inflammation*. *Immunological Reviews*, 2017. **280**(1): p. 26 – 40.
93. Frommhold, D., et al., *RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner*. *BMC Immunology*, 2011. **12**(56).
94. Furze, R.C. and S.M. Rankin, *Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow*. *Immunology*, 2008. **125**(3): p. 281 – 288.
95. Frommhold, D., et al., *Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo*. *BMC Immunology*, 2007. **8**(31).
96. Davenpeck, K.L., et al., *Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines*. *The Journal of Immunology*, 1998. **161**(12): p. 6861 – 6870.
97. Zhou, H., et al., *A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide*. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(11): p. 8103 – 8110.
98. McAvoy, E.F., et al., *The role of CD14 in neutrophil recruitment within the liver microcirculation during endotoxemia*. *The Journal of Immunology*, 2011. **186**(4): p. 2592 – 2601.
99. Andonegui, G., S.M. Goyert, and P. Kubes, *Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels*. *The Journal of Immunology*, 2002. **169**(4): p. 2111 – 2119.
100. Laird, D.J., U.H. von Andrian, and A.J. Wagers, *Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 612 – 630.
101. Galinsky, R., et al., *Effect of intra-amniotic lipopolysaccharide on nephron number in preterm fetal sheep*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2011. **301**(2): p. F280 – F285.
102. Wang, J., et al., *Prenatal exposure to lipopolysaccharide alters renal DNA methyltransferase expression in rat offspring*. *PloS One*, 2017. **12**(1): p. e0169206.
103. Wang, X., et al., *Prenatal lipopolysaccharide exposure results in dysfunction of the renal dopamine D1 receptor in offspring*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014. **76**: p. 242 – 250.
104. Lal, C.V. and N. Ambalavanan, *Biomarkers, early diagnosis, and clinical predictors of BPD*. *Clinics in Perinatology*, 2015. **42**(4): p. 739 – 754.
105. Cotechini, T., et al., *Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia*. *Journal of Experimental Medicine*, 2014. **211**(1): p. 165 – 179.
106. Nussbaum, C. and M. Sperandio, *Innate immune cell recruitment in the fetus and neonate*. *Journal of Reproductive Immunology*, 2011. **90**(1): p. 74 – 81.

107. McEvoy, L.T., H. Zakem-Cloud, and M.F. Tosi, *Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age*. Blood, 1996. **87**(9): p. 3929 – 3933.
108. Mariscalco, M.M., et al., *Mechanisms of decreased leukocyte localization in the developing host*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2002. **282**(2): p. H636 – H644.
109. Kim, E.-A., et al., *2-Cyclopropylimino-3-methyl-1, 3-thiazoline hydrochloride alters lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokines and neuronal morphology in mouse fetal brain*. Neuropharmacology, 2016. **102**: p. 32 – 41.
110. Wong, D. and K. Dorovini-Zis, *Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide*. Journal of Neuroimmunology, 1992. **39**(1): p. 11 – 21.
111. Sawa, Y., et al., *LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2008. **56**(2): p. 97 – 109.
112. Ueland, T., et al., *Inflammatory cytokines as biomarkers in heart failure*. Clinica Chimica Acta, 2015. **443**: p. 71 – 77.
113. Özcan, U., et al., *Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1137 – 1140.
114. Erbay, E., et al., *Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis*. Nature Medicine, 2009. **15**(12): p. 1383 – 1391.
115. Cao, S.S., et al., *The unfolded protein response and chemical chaperones reduce protein misfolding and colitis in mice*. Gastroenterology, 2013. **144**(5): p. 989 – 1000.
116. Dromparis, P., et al., *Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension*. Circulation, 2013. **127**: p. 115 – 125.
117. Da-Silva, W.S., et al., *The chemical chaperones tauroursodeoxycholic and 4-phenylbutyric acid accelerate thyroid hormone activation and energy expenditure*. FEBS Letters, 2011. **585**(3): p. 539 – 544.
118. Invernizzi, P., et al., *Differences in the metabolism and disposition of ursodeoxycholic acid and of its taurine-conjugated species in patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 320 – 327.
119. Setchell, K., et al., *Metabolism of orally administered tauroursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis*. Gut, 1996. **38**(3): p. 439 – 446.
120. Li, X.-X., et al., *Tauroursodeoxycholic acid enhances the development of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes and evaporatively dried spermatozoa*. Scientific Reports, 2017. **7**(1).
121. Lin, T., et al., *Tauroursodeoxycholic acid improves pre-implantation development of porcine SCNT embryo by endoplasmic reticulum stress inhibition*. Reproductive Biology, 2016. **16**(4): p. 269 – 278.
122. Rodrigues, C.M., et al., *Tauroursodeoxycholate increases rat liver ursodeoxycholate levels and limits lithocholate formation better than ursodeoxycholate*. Gastroenterology, 1995. **109**(2): p. 564 – 572.
123. Xie, Q., et al., *Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation*. Hepatology, 2002. **36**(3): p. 592 – 601.
124. Cortez, L. and V. Sim, *The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases*. Prion, 2014. **8**(2): p. 197 – 202.

125. Santoro, P., et al., *Unconjugated bile acids modulate adult and neonatal neutrophil chemotaxis induced in vitro by N-formyl-met-leu-phe-peptide*. Pediatric Research, 2002. **51**(3): p. 392 – 396.
126. Zhang, G., et al., *Genetic associations with gestational duration and spontaneous preterm birth*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(12): p. 1156 – 1167.
127. Lin, T., et al., *Tauroursodeoxycholic acid improves the implantation and live-birth rates of mouse embryos*. Reproductive Biology, 2015. **15**(2): p. 101 – 105.
128. Dauphinee, S.M. and A. Karsan, *Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells*. Laboratory Investigation, 2006. **86**(1): p. 9 – 22.
129. Lush, C.W., G. Cepinkas, and P.R. Kvietys, *LPS tolerance in human endothelial cells: reduced PMN adhesion, E-selectin expression, and NF- $\kappa$ B mobilization*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2000. **278**(3): p. H853 – H861.
130. Storck, M., et al. *Zytokinfreisetzung und Expression von Adhäsionsmolekülen bei experimenteller xenogener ex-vivo Nierenperfusion*. in Beger H.G. (eds) *Chirurgisches Forum '94. Langenbecks Archiv für Chirurgie (Vereinigt mit Bruns' Beiträge für Klinische Chirurgie)*. 1994. Springer, Berlin, Heidelberg.
131. Fan, S.-t. and T.S. Edgington, *Integrin regulation of leukocyte inflammatory functions. CD11b/CD18 enhancement of the tumor necrosis factor-alpha responses of monocytes*. The Journal of Immunology, 1993. **150**(7): p. 2972 – 2980.
132. Chigaev, A., et al., *Real-time analysis of the inside-out regulation of lymphocyte function-associated antigen-1 revealed similarities and differences with very late antigen-4*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(23): p. 20375 – 20386.
133. Rossaint, J., et al., *Acute loss of renal function attenuates slow leukocyte rolling and transmigration by interfering with intracellular signaling*. Kidney International, 2011. **80**(5): p. 493 – 503.
134. Nilsen, E., et al., *Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine*. Gut, 1998. **42**(5): p. 635 – 642.
135. Makó, V., et al., *Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and LPS*. Cytometry Part A, 2010. **77**(10): p. 962 – 970.
136. Madjdpour, C., et al., *Lipopolysaccharide induces functional ICAM-1 expression in rat alveolar epithelial cells in vitro*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2000. **278**(3): p. L572 – L579.
137. Honghui, C., et al., *Cytokine-induced cell surface expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells In vitro*. Journal of Tongji Medical University, 2001. **21**(1): p. 68 – 71.
138. Zhou, X., et al., *Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research*. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2010. **13**(5): p. 541 – 547.
139. Aziz, N., et al., *Stability of cytokines, chemokines and soluble activation markers in unprocessed blood stored under different conditions*. Cytokine, 2016. **84**: p. 17 – 24.
140. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2014. **1843**(11): p. 2563 – 2582.
141. Braun, D.A., M. Fribourg, and S.C. Sealfon, *Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(5): p. 2986 – 2993.

142. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *Chapter Twenty Identification and Characterization of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis In Vivo*. *Methods in Enzymology*, 2008. **442**: p. 395 – 419.
143. Zhang, K., et al., *Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response*. *Cell*, 2006. **124**(3): p. 587 – 599.
144. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 455 – 462.
145. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response A stress signaling pathway critical for health and disease*. *Neurology*, 2006. **66**(1): p. S102 – S109.
146. Oyadomari, S. and M. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*. *Cell Death and Differentiation*, 2004. **11**(4): p. 381 – 389.
147. Minamino, T., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease*. *Circulation Research*, 2010. **107**(9): p. 1071 – 1082.
148. Biden, T.J., et al., *Lipotoxic endoplasmic reticulum stress,  $\beta$  cell failure, and type 2 diabetes mellitus*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2014. **25**(8): p. 389 – 398.
149. Kim, S., et al., *Endoplasmic reticulum stress–induced IRE1 $\alpha$  activation mediates cross-talk of GSK-3 $\beta$  and XBP-1 to regulate inflammatory cytokine production*. *The Journal of Immunology*, 2015. **194**: p. 4498 – 4506.
150. Kim, H.J., et al., *Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway*. *Scientific Reports*, 2013. **3**(1142).
151. Haataja, L., et al., *Many commercially available antibodies for detection of CHOP expression as a marker of endoplasmic reticulum stress fail specificity evaluation*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2008. **51**(2 – 3): p. 105 – 107.
152. Guzel, E., et al., *Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. **18**(792).
153. Chaudhari, N., et al., *A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014. **8**(213).
154. Kim, J.S., et al., *Tauroursodeoxycholic acid enhances the pre-implantation embryo development by reducing apoptosis in pigs*. *Reproduction in Domestic Animals*, 2012. **47**(5): p. 791 – 798.
155. Yung, H.-w., et al., *Placental endoplasmic reticulum stress in gestational diabetes: the potential for therapeutic intervention with chemical chaperones and antioxidants*. *Diabetologia*, 2016. **59**(10): p. 2240 – 2250.
156. Wong, M.K., A.C. Holloway, and D.B. Hardy, *Nicotine directly induces endoplasmic reticulum stress response in rat placental trophoblast giant cells*. *Toxicological Sciences*, 2016. **151**(1): p. 23 – 34.
157. Sigurdsson, V., et al., *Bile acids protect expanding hematopoietic stem cells from unfolded protein stress in fetal liver*. *Cell Stem Cell*, 2016. **18**(4): p. 522 – 532.
158. Li, Y., et al., *New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2014. **46**(8): p. 629 – 640.
159. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2013. **1833**(12): p. 3460 – 3470.
160. Kang, M.-J., J. Chung, and H.D. Ryoo, *CDK5 and MEKK1 mediate pro-apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model*. *Nature Cell Biology*, 2012. **14**(4): p. 409 – 415.

161. Varadarajan, S., et al., *A novel cellular stress response characterised by a rapid reorganisation of membranes of the endoplasmic reticulum*. *Cell Death and Differentiation*, 2012. **19**(12): p. 1896 – 1907.
162. Woo, C.W., et al., *Adaptive suppression of the ATF4–CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling*. *Nature Cell Biology*, 2009. **11**(12): p. 1473 – 1480.
163. Osowski, C.M. and F. Urano, *Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system*. *Methods in Enzymology*, 2011. **490**: p. 71 – 92.
164. Iwawaki, T., et al., *A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress*. *Nature Medicine*, 2004. **10**(1): p. 98 – 102.
165. Obukuro, K., et al., *Nitric oxide mediates selective degeneration of hypothalamic orexin neurons through dysfunction of protein disulfide isomerase*. *Journal of Neuroscience*, 2013. **33**(31): p. 12557 – 12568.
166. Cawley, K., et al., *Assays for detecting the unfolded protein response*, in *Methods in Enzymology*. 2011, Elsevier. p. 31 – 51.
167. Fougelle, F. and B. Fromenty, *Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity*. *Pharmacology Research & Perspectives*, 2016. **4**(1): p. e00211.
168. Samali, A., et al., *Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response*. *International Journal of Cell Biology*, 2010. **2010**.
169. Wang, H., et al., *Tunicamycin-induced unfolded protein response in the developing mouse brain*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015. **283**(3): p. 157 – 167.
170. Abdullahi, A., et al., *Modeling Acute ER Stress in vivo and in vitro*. *Shock (Augusta, Ga.)*, 2017. **47**(4): p. 506 – 513.
171. Lhoták, Š., et al., *ER stress contributes to renal proximal tubule injury by increasing SREBP-2-mediated lipid accumulation and apoptotic cell death*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2012. **303**(2): p. F266 – F278.
172. Nakayama, Y., et al., *Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway*. *The Journal of Biochemistry*, 2010. **147**(4): p. 471 – 483.
173. Kawakami, T., et al., *Prolonged endoplasmic reticulum stress alters placental morphology and causes low birth weight*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014. **275**(2): p. 134 – 144.
174. Gu, X.-W., et al., *Endoplasmic reticulum stress in mouse decidua during early pregnancy*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016. **434**: p. 48 – 56.
175. Ma, M., et al., *Low dose tunicamycin enhances atherosclerotic plaque stability by inducing autophagy*. *Biochemical Pharmacology*, 2016. **100**: p. 51 – 60.
176. Wu, Q., et al., *The protective role of microRNA-200c in Alzheimer's disease pathologies is induced by beta amyloid-triggered endoplasmic reticulum stress*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2016. **9**(140).
177. Healy, S., J. McMahon, and U. FitzGerald, *UPR Induction Prevents Iron Accumulation and Oligodendrocyte Loss in ex vivo Cultured Hippocampal Slices*. *Frontiers in Neuroscience*, 2018. **12**(969).
178. Michalak, M. and M.C. Gye, *Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos*. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 2015. **42**(1): p. 1 – 7.
179. Yung, H.w., et al., *Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction*. *The Journal of Pathology*, 2012. **228**(4): p. 554 – 564.

180. Perino, A. and K. Schoonjans, *TGR5 and immunometabolism: insights from physiology and pharmacology*. Trends in Pharmacological Sciences, 2015. **36**(12): p. 847 – 857.
181. Duboc, H., Y. Taché, and A.F. Hofmann, *The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application*. Digestive and Liver Disease, 2014. **46**(4): p. 302 – 312.
182. Guo, C., W.-D. Chen, and Y.-D. Wang, *TGR5, not only a metabolic regulator*. Frontiers in Physiology, 2016. **7**(646).
183. Pols, T.W., *TGR5 in inflammation and cardiovascular disease*. Biochemical Society Transactions, 2014. **42**: p. 244 – 249.
184. Kida, T., et al., *Bile Acid Receptor TGR5 Agonism Induces NO Production and Reduces Monocyte Adhesion in Vascular Endothelial Cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2013. **33**(7): p. 1663 – 1669.
185. Cipriani, S., et al., *Activation of the bile acid receptor GPBAR1 protects against gastrointestinal injury caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs and aspirin in mice*. British Journal of Pharmacology, 2013. **168**(1): p. 225 – 237.
186. Cipriani, S., et al., *The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis*. PloS One, 2011. **6**(10): p. e25637.
187. Biagioli, M., et al., *The bile acid receptor GPBAR1 regulates the M1/M2 phenotype of intestinal macrophages and activation of GPBAR1 rescues mice from murine colitis*. The Journal of Immunology, 2017. **199**: p. 718 – 733.
188. Katsuma, S., A. Hirasawa, and G. Tsujimoto, *Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **329**(1): p. 386 – 390.
189. Sato, H., et al., *Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea**. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **362**(4): p. 793 – 798.
190. Kawamata, Y., et al., *A G protein-coupled receptor responsive to bile acids*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(11): p. 9435 – 9440.
191. Högenauer, K., et al., *G-protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1, TGR5) agonists reduce the production of proinflammatory cytokines and stabilize the alternative macrophage phenotype*. Journal of Medicinal Chemistry, 2014. **57**(24): p. 10343 – 10354.
192. Yanguas-Casás, N., et al., *TUDCA: An Agonist of the Bile Acid Receptor GPBAR1/TGR5 With Anti-Inflammatory Effects in Microglial Cells*. Journal of Cellular Physiology, 2017. **232**(8): p. 2231 – 2245.
193. Sheng, L. and Y.-J.Y. Wan, *Regulation of bile acid receptor activity*. Liver Research, 2018. **xxx**: p. 1 – 6.
194. Chiang, J.Y., *Bile acid metabolism and signaling*. Comprehensive Physiology, 2013. **3**(3): p. 1191 – 1212.
195. Hodge, R.J., et al., *Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamic effects of a selective TGR5 agonist, SB-756050, in type 2 diabetes*. Clinical Pharmacology in Drug Development, 2013. **2**(3): p. 213 – 222.
196. Su, J., et al., *The G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) protects against renal inflammation and renal cancer cell proliferation and migration through antagonizing NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways*. Oncotarget, 2017. **8**(33): p. 54378 – 54387.

197. Gotsch, F., et al., *The fetal inflammatory response syndrome*. Clinical Obstetrics and Gynecology, 2007. **50**(3): p. 652 – 683.
198. Hofer, N., et al., *The fetal inflammatory response syndrome is a risk factor for morbidity in preterm neonates*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2013. **209**(6): p. 542. e1 – 542. e11.
199. Yanguas-Casás, N., et al., *TGF $\beta$  contributes to the anti-inflammatory effects of tauroursodeoxycholic acid on an animal model of acute neuroinflammation*. Molecular Neurobiology, 2017. **54**(9): p. 6737 – 6749.
200. Anwer, M.S., *Intracellular signaling by bile acids*. Journal of Bio-science, 2012. **20**: p. 1 – 23.

## 12. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Leukozytenrekrutierungskaskade.....	3
Abbildung 2 Struktur der Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) .....	11
Abbildung 3 Darstellung der Wirkungsorte von TUDCA.....	13
Abbildung 4 Intravitalmikroskopischer Arbeitsplatz. ....	32
Abbildung 5 Ablauf und Vorbereitung der Intravitalversuche. ....	33
Abbildung 6 Auswertung der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten.....	35
Abbildung 7 Überprüfung der Primer aus der <i>real-time</i> qPCR.....	42
Abbildung 8 Maternaler sowie fetaler UDCA- und TUDCA-Plasmaspiegel.....	49
Abbildung 9 Intrauterines fetales Überleben.....	52
Abbildung 10 Frühgeburtenrate.....	53
Abbildung 11 Anzahl an rollenden Neutrophilen Granulozyten in fetalen Dottersackgefäßen.....	55
Abbildung 12 Anzahl an adhärennten Neutrophilen Granulozyten in fetalen Dottersackgefäßen.....	56
Abbildung 13 Veränderung der Anzahl der adhärennten Neutrophilen Granulozyten .....	57
Abbildung 14 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder von infiltrierten Neutrophilen Granulozyten in der fetalen Lunge .....	58
Abbildung 15 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder von infiltrierten Neutrophilen Granulozyten in der fetalen Niere .....	59
Abbildung 16 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder von infiltrierten Neutrophilen Granulozyten im Chorion.....	60
Abbildung 17 Anzahl der infiltrierten Neutrophilen Granulozyten.....	62
Abbildung 18 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von ICAM-1 .....	64
Abbildung 19 Fetale ICAM-1-Fluoreszenzintensitäten.....	66
Abbildung 20 Maternale ICAM-1-Fluoreszenzintensitäten.....	67
Abbildung 21 ICAM-1-Fluoreszenzintensitäten.....	68
Abbildung 22 Fetaler sowie maternaler Zytokin-Plasmaspiegel .....	70
Abbildung 23 LFA-1 sowie Mac-1-Expression von primären Neutrophilen Granulozyten. ....	72
Abbildung 24 Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> in der Flusskammer. ....	73

---

Abbildung 25 Expression der Adhäsionsmoleküle von Maus-Aorta-Endothelzellen .....	75
Abbildung 26 Zytokin-Expression von Maus-Aorta-Endothelzellen .....	77
Abbildung 27 <i>Inositol-requiring enzyme 1 alpha</i> (IRE1 $\alpha$ )-Fluoreszenzintensitäten in A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion.....	80
Abbildung 28 <i>Inositol-requiring enzyme 1 alpha</i> (IRE1 $\alpha$ )-Fluoreszenzintensitäten in A) der maternalen Lunge und in B) der maternalen Niere. ....	81
Abbildung 29 <i>Binding immunoglobulin Protein</i> (BiP)-Fluoreszenzintensitäten in A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion. ....	83
Abbildung 30 <i>Binding immunoglobulin Protein</i> (BiP)-Fluoreszenzintensitäten in A) der maternalen Lunge und in B) der maternalen Niere. ....	84
Abbildung 31 <i>Activating transcription factor 4</i> (ATF4)-Fluoreszenzintensitäten in A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion. ....	85
Abbildung 32 <i>Activating transcription factor 4</i> (ATF4)-Fluoreszenzintensitäten in A) der maternalen Lunge und in B) der maternalen Niere. ....	86
Abbildung 33 <i>X-box binding Protein 1</i> (XBP1)-Fluoreszenzintensitäten in A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion. ....	88
Abbildung 34 <i>X-box binding Protein 1</i> (XBP1)-Fluoreszenzintensitäten in A) der maternalen Lunge und in B) der maternalen Niere. ....	89
Abbildung 35 <i>CCAAT/-enhancer-binding-protein homologous protein</i> (CHOP)-Fluoreszenzintensitäten in A) der fetalen Lunge, B) der fetalen Niere und C) dem Chorion.....	90
Abbildung 36 <i>CCAAT/-enhancer-binding-protein homologous protein</i> (CHOP)-Fluoreszenzintensitäten in A) der maternalen Lunge und in B) der maternalen Niere.....	91
Abbildung 37 TGR5-Expression von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs) auf mRNA-Ebene. ....	93
Abbildung 38 TGR5-Expression von primären Neutrophilen Granulozyten auf mRNA-Ebene. ....	94
Abbildung 39 TGR5-Expression von MAECs bei verschiedenen TUDCA-Konzentrationen auf mRNA-Ebene.....	95
Abbildung 40 Auswirkungen des TGR5-Inhibitors auf die ICAM-1-Expression von MAECs auf mRNA-Ebene.....	96

---

Abbildung 41 ER-Stress: UPR-Kaskade mit den verwendeten ER-Stressmolekülen (nach Biden <i>et al.</i> , 2014 [148]).	109
Abbildung A 1 Überlebensstudie mit Lipoteichonsäure des gram-positiven Bakteriums <i>S. aureus</i> .	145
Abbildung A 2 Überlebensstudie mit Peptidoglykan des gram-positiven Bakteriums <i>S. aureus</i> .	145
Abbildung A 3 Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin von MAECs bei verschiedenen TUDCA-Konzentrationen.	146
Abbildung A 4 Anzahl der nicht vollendeten Geburten der Überlebensstudie.	147
Abbildung A 5 Anzahl der Feten aus der Überlebensstudie.	147
Abbildung A 6 Gewichtsveränderung der schwangeren Mäuse	148
Abbildung A 7 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von IRE1 $\alpha$	150
Abbildung A 8 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von BiP.	151
Abbildung A 9 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von ATF4.	152
Abbildung A 10 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von XBP1.	153
Abbildung A 11 Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von CHOP.	154
Abbildung A 12 Proteinexpression von ER-Stressmarkern.	155
Abbildung A 13 mRNA-Expression der ER-Stressmarker von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs).	156
Abbildung A 14 mRNA-Expression von p47(phox) A) und TRAF2 B) von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs).	157
Abbildung A 15 Rolling Flux Fraction (%)	157
Abbildung A 16 Intrauterines fetales Überleben A) sowie Frühgeburtenrate B) von CHOP <sup>-/-</sup> -Mäusen.	158

---

### 13. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Adhäsionsmoleküle, deren Liganden und Funktionen .....	5
Tabelle 2 Veränderung der Expression in der fetalen Entwicklung.....	8
Tabelle 3 Verwendete Laborgeräte.....	16
Tabelle 4 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 5 Verwendete Chemikalien & Reagenzien.....	19
Tabelle 6 Verwendete Kits .....	22
Tabelle 7 Verwendete Software.....	22
Tabelle 8 Verwendete Antikörper .....	23
Tabelle 9 Verwendete rekombinante Proteine.....	24
Tabelle 10 Verwendete Zelllinien.....	24
Tabelle 11 Verwendete Primer .....	25
Tabelle 12 Verwendete Puffer und Lösungen .....	26
Tabelle 13 Verwendetes qPCR-Programm .....	42
Tabelle 14 Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE .....	46
Tabelle A 1 Hämodynamische Parameter der Intravitalversuche.....	149

## 14. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
°C	Grad Celsius
<i>A. carotis</i>	<i>Arteria carotis</i>
ANOVA	Analysis of variance
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	Activating transcription factor
BAD	Bcl-2 antagonist of cell death
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BiP	Binding immunoglobulin protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Casp	Caspase
CBA	Cytometric bead array
CCD-Kamera	Charge-coupled-device Kamera
CD99L2	CD99 antigen-like protein 2
cDNA	Complementary DNA
CHOP	CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein
CMC	critical micellar concentration
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein
cRNA	Coding RNA
CRP	C reaktives Protein
Ct	Cycle threshold
CTCF	Corrected Total Cell Fluorescence
Cy5	Cyanine 5

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dkfz	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E-Selektin	Endothel-Selektin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E13	Entwicklungstag 13
E260	Extinktion bei 260 nm
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced GFP
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
ESL-1	E-selectin ligand 1
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i>
EU	Endotoxinunit
FCS	Fetales Kälberserum
FELASA	Federation for Laboratory Animal Science Associations
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine
FPR	Formyl Peptide Receptor
FXR	Farnesoid X Receptor
g	Gramm
g	Gravitationskraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
GPCR	G-protein-coupled-receptor
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High performance liquid chromatography
i. p.	intraperitoneal
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRE1 $\alpha$	Inositol-requiring enzyme 1 alpha
IVM	Intravitalmikroskopie
JAM	Junctional adhesion molecule
KC (CXCL1)	Keratinocyte chemoattractant
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
L-Selektin	Lymphozyten-Selektin
LAL	Limulus-Amöbozyten-Test
LD50	Letale Dosis
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
lys	Lysozym M Genlocus
Mac-1	Macrophage antigen 1
MAECs	Murine aortale Endothelzellen
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

---

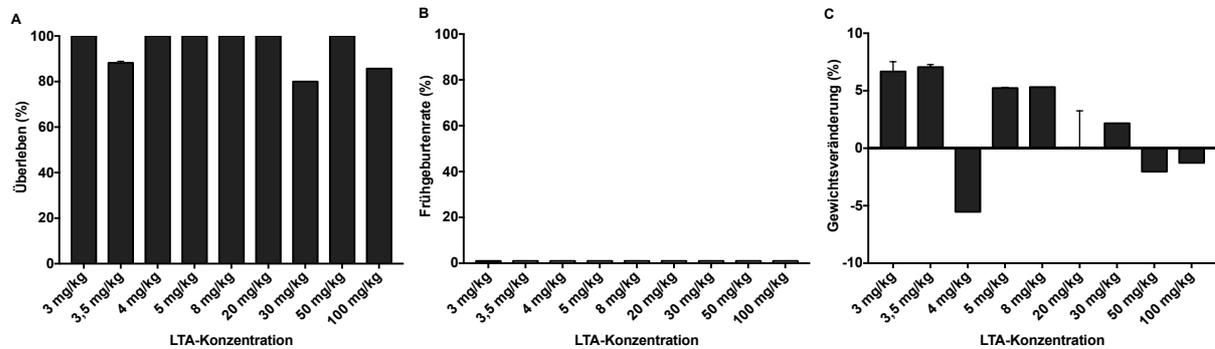
<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl
n. s.	Nicht signifikant
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren
Nfκb	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NUP133	Nucleoporin 133
o. Ä.	oder Ähnliches
P-Selektin	Platelet (Thrombozyten)-Selektin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PepG	Peptidoglykan
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PMN	Polymorphonuclear cells

---

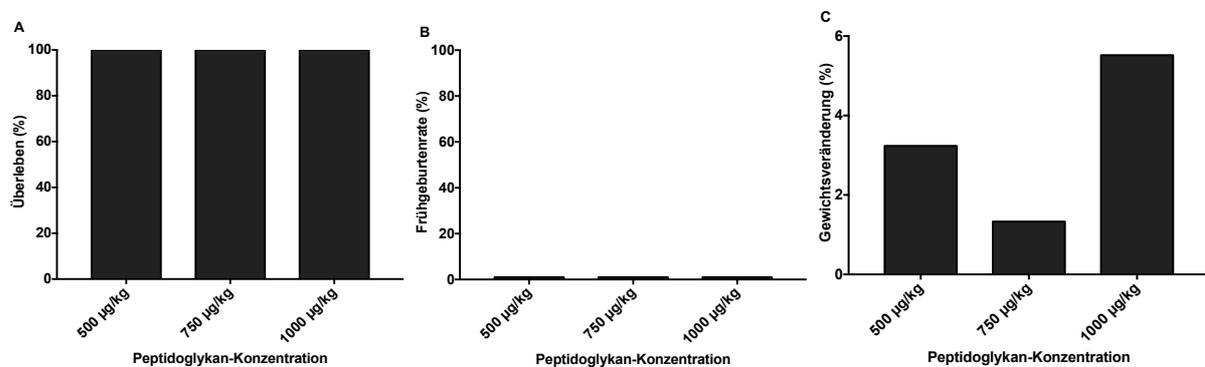
<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
rel. E.	relative Einheit
RIPA buffer	Radioimmunoprecipitation buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPL19	Ribosomal protein L 19
rpm	Rounds per minute
RPS9	Ribosomal protein S9
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Real-time</i> qPCR
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Dodecylsulfate-Na-salt
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
SPF-Haltung	Spezifisch-Pathogenfreie Haltung
SWS	Schwangerschaftswochen
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	TRIS buffered saline-Tween
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
TEM	Transendothelial cell migration
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Thapsigargin
TGR5	Takeda-G-Protein-Receptor-5
TGR5I	TGR5-Inhibitor
TLR4	Toll-like-receptor 4
TM	Tunicamycin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
Trif	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon $\beta$
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
u. a.	unter anderem

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
UDCA	Ursodeoxycholsäure
UPR	Unfolded protein response
V	Volt
V. TUDCA	Vorbehandlung TUDCA
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
vgl.	vergleiche
VLA4	Very late antigen 4
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
XBP1	X-box binding protein 1
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

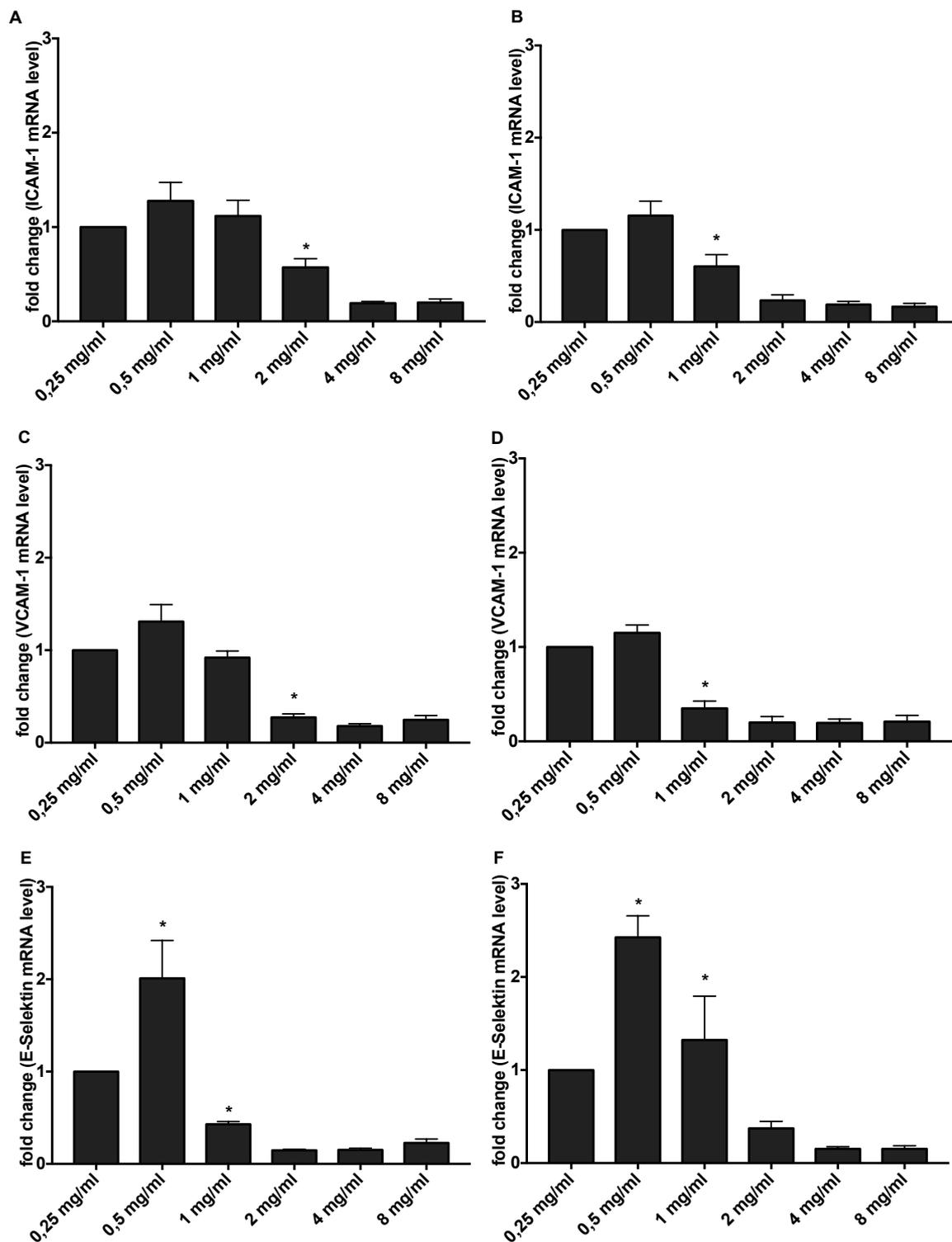
## 15. Anhang



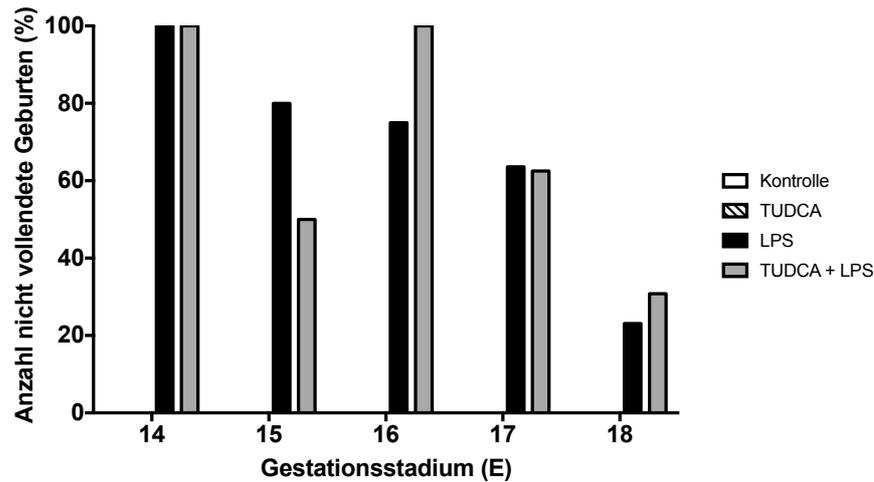
**Abbildung A 1 Überlebensstudie mit Lipoteichonsäure des gram-positiven Bakteriums *S. aureus*.** Bei schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen wurden neun verschiedene Konzentrationen von LTA (3 – 100 mg/kg KGW) i. p. 1–2 Mäusen pro Konzentration injiziert und nach 16 h mittels Intravitalmikroskopie A) die Überlebensrate der Feten (E15/16), B) die Frühgeburtenrate und C) die Gewichtsveränderung der schwangeren Mäuse erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 1 – 2 getesteten schwangeren Mäusen pro Konzentration. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \*p < 0,05 dargestellt.



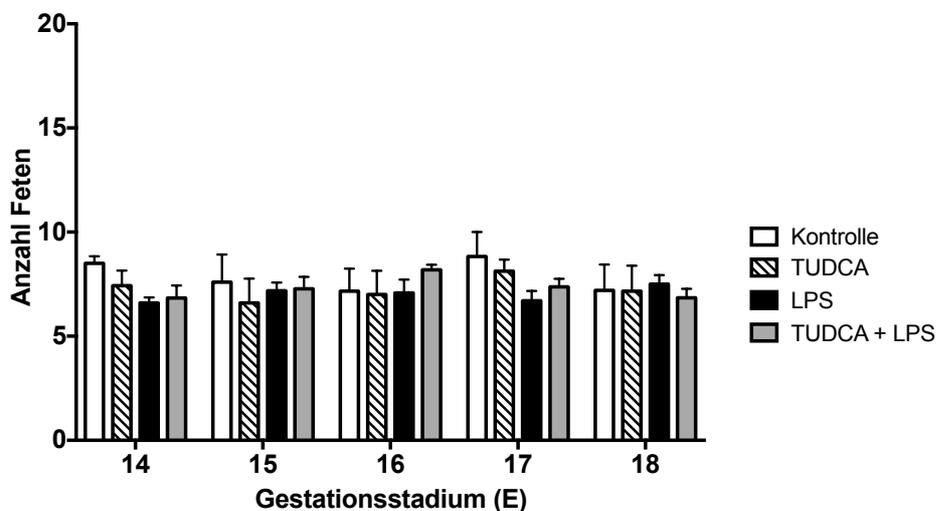
**Abbildung A 2 Überlebensstudie mit Peptidoglykan des gram-positiven Bakteriums *S. aureus*.** Bei schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen wurden drei verschiedene Konzentrationen von PepG (500 µg/kg KGW; 750 µg/kg KGW; 1000 µg/kg KGW) i. p. injiziert und nach 16 h mittels Intravitalmikroskopie: A) die Überlebensrate der Feten (E15/16), B) die Frühgeburtenrate und C) die Gewichtsveränderung der schwangeren Maus erhoben. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 1 getesteten schwangeren Mäusen pro Konzentration. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \*p < 0,05 dargestellt.



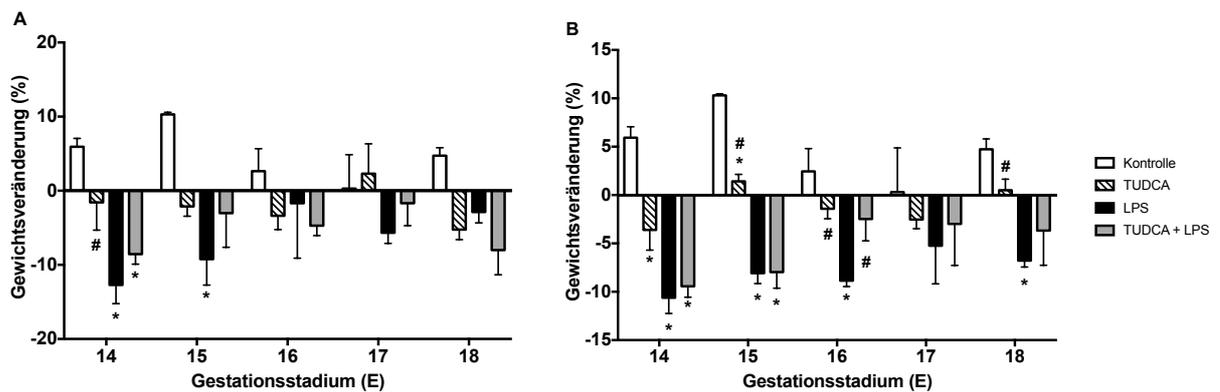
**Abbildung A 3** Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin von MAECs bei verschiedenen TUDCA-Konzentrationen. Der Aktivierungszustand der Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs) sollte auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR nach dreistündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS und einer unterschiedlichen TUDCA-Konzentration (0,25 – 8 mg/ml) analysiert werden. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 4 unabhängigen Experimenten nach einer einmaligen TUDCA-Applikation A) oder nach zwei TUDCA-Applikationen B). Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \* $p < 0,05$  zum Vorwert dargestellt.



**Abbildung A 4 Anzahl der nicht vollendeten Geburten der Überlebensstudie.** Bei schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) wurde 2x NaCl (Kontrolle); 3x 1000 mg/kg TUDCA; 2x 1 mg/kg LPS; 3x 1000 mg/kg TUDCA & LPS 2x 1 mg/kg i. p. 28 h, 20 h und 4 h vor Versuchsende injiziert. Nach der Behandlung wurden die Mäuse mit einer Kamera überwacht und potentielle Frühgeburten detektiert. Dargestellt ist die Anzahl von Geburten, bei denen zum Versuchsende Feten extra- sowie intrauterin vorlagen. Die Werte aus unabhängigen Experimenten sind als Rate in Prozent von n = 5 – 17 schwangeren Mäusen pro Gestationsstadium dargestellt.



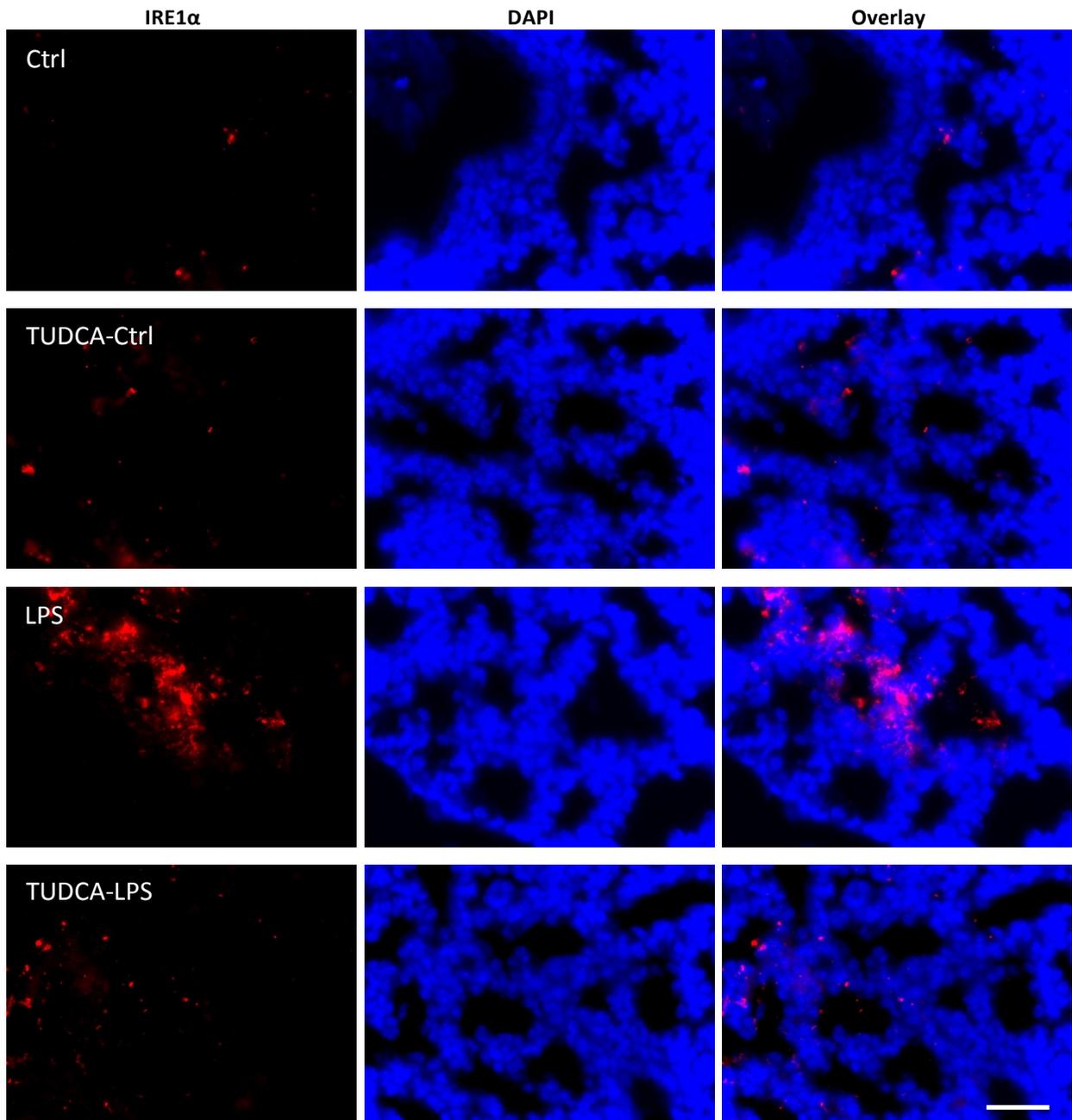
**Abbildung A 5 Anzahl der Feten aus der Überlebensstudie.** Bei schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) wurde 2x NaCl (Kontrolle); 3x 1000 mg/kg TUDCA; 2x 1 mg/kg LPS; 3x 1000 mg/kg TUDCA & LPS 2x 1 mg/kg i. p. 28 h, 20 h und 4 h vor Versuchsende injiziert. Dargestellt ist die Anzahl von Feten pro schwangere Maus. Die Werte aus n = 5 – 17 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Two-Way-Anova ermittelt und mit \*p < 0,05 dargestellt.



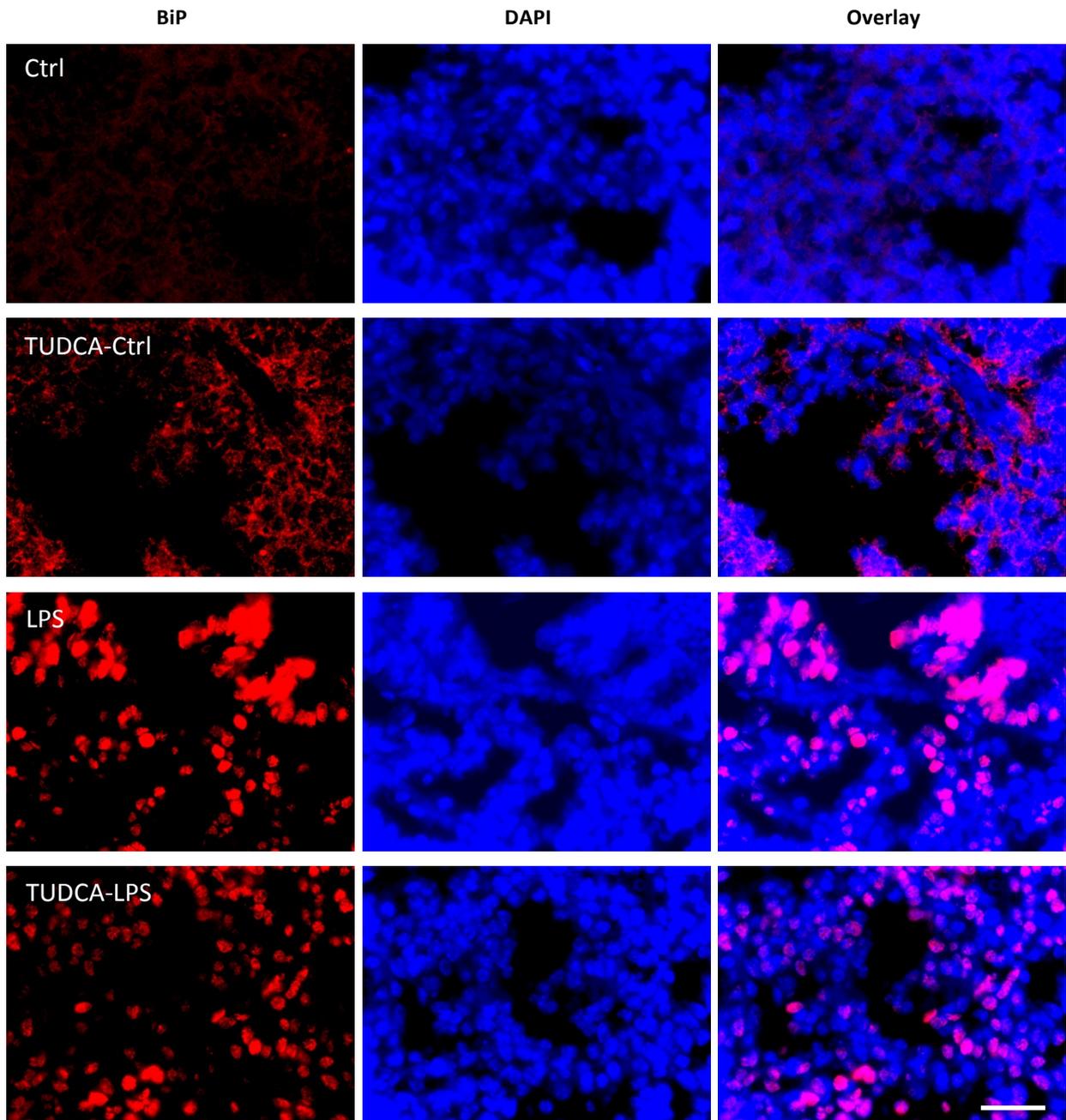
**Abbildung A 6 Gewichtsveränderung der schwangeren Mäuse nach der Überlebensstudie A) und dem Intravitalversuch B).** Bei schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) wurde 2x NaCl (Kontrolle); 3x 1000 mg/kg TUDCA; 2x 1 mg/kg LPS; 3x 1000 mg/kg TUDCA & LPS 2x 1 mg/kg A) bzw. 3x 500 mg/kg TUDCA; 2x 0,25 mg/kg LPS; 3x 500 mg/kg TUDCA & LPS 2x 0,25 mg/kg B) i. p. 28 h, 20 h und 4 h vor Versuchsende injiziert. Das Gewicht der schwangeren Mäuse wurde vor sowie nach dem Versuch bestimmt und die Differenz als Mittelwerte + SEM mit n = 5 – 17 schwangeren Mäusen pro Gestationsstadium dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Two-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle #p vs. TUDCA < 0,05 dargestellt.

Tabelle A 1 Hämodynamische Parameter der Intravitalversuche

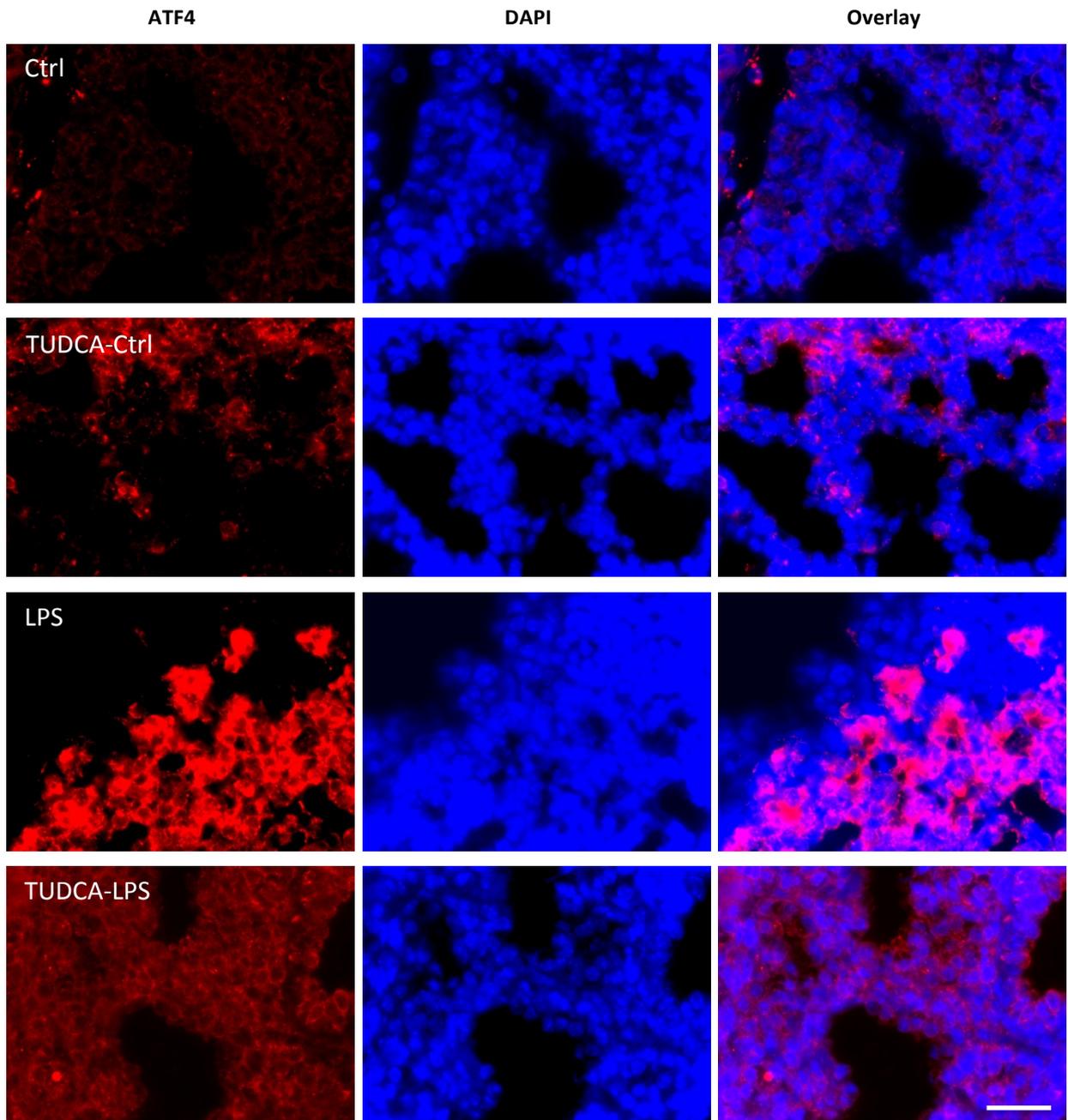
<i>Behandlung/GA</i>	<i>Gefäßdurchmesser (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>Flussgeschwindigkeit (<math>\mu\text{m/s}</math>)</i>	<i>Scherrate (<math>\text{s}^{-1}</math>)</i>
<u>Kontrolle (2 x NaCl)</u>			
E14	69 ± 2	1094 ± 64	397 ± 25
E15	67 ± 2	1109 ± 73	313 ± 18
E16	60 ± 2	952 ± 46	402 ± 19
E17	61 ± 2	900 ± 41	437 ± 22
E18	67 ± 3	966 ± 65	409 ± 31
<u>LPS (2x 0,25 mg/kg)</u>			
E14	76 ± 3	918 ± 59	323 ± 16
E15	68 ± 3	954 ± 56	318 ± 22
E16	62 ± 3	933 ± 74	382 ± 28
E17	69 ± 3	924 ± 58	371 ± 33
E18	77 ± 3	912 ± 73	301 ± 34
<u>TUDCA (3x 500 mg/kg) + LPS (2x 0,25 mg/kg)</u>			
E14	77 ± 4	1197 ± 140	390 ± 42
E15	71 ± 3	1130 ± 69	397 ± 33
E16	68 ± 3	1122 ± 109	369 ± 34
E17	71 ± 6	1088 ± 112	349 ± 41
E18	71 ± 6	843 ± 83	335 ± 48
<u>TUDCA (3x 500 mg/kg)</u>			
E14	66 ± 6	1104 ± 121	471 ± 42
E15	65 ± 5	1139 ± 122	440 ± 54
E16	59 ± 5	1207 ± 143	434 ± 40
E17	65 ± 5	867 ± 66	345 ± 29
E18	67 ± 6	1238 ± 227	404 ± 63
	n. s.	n. s.	n. s.



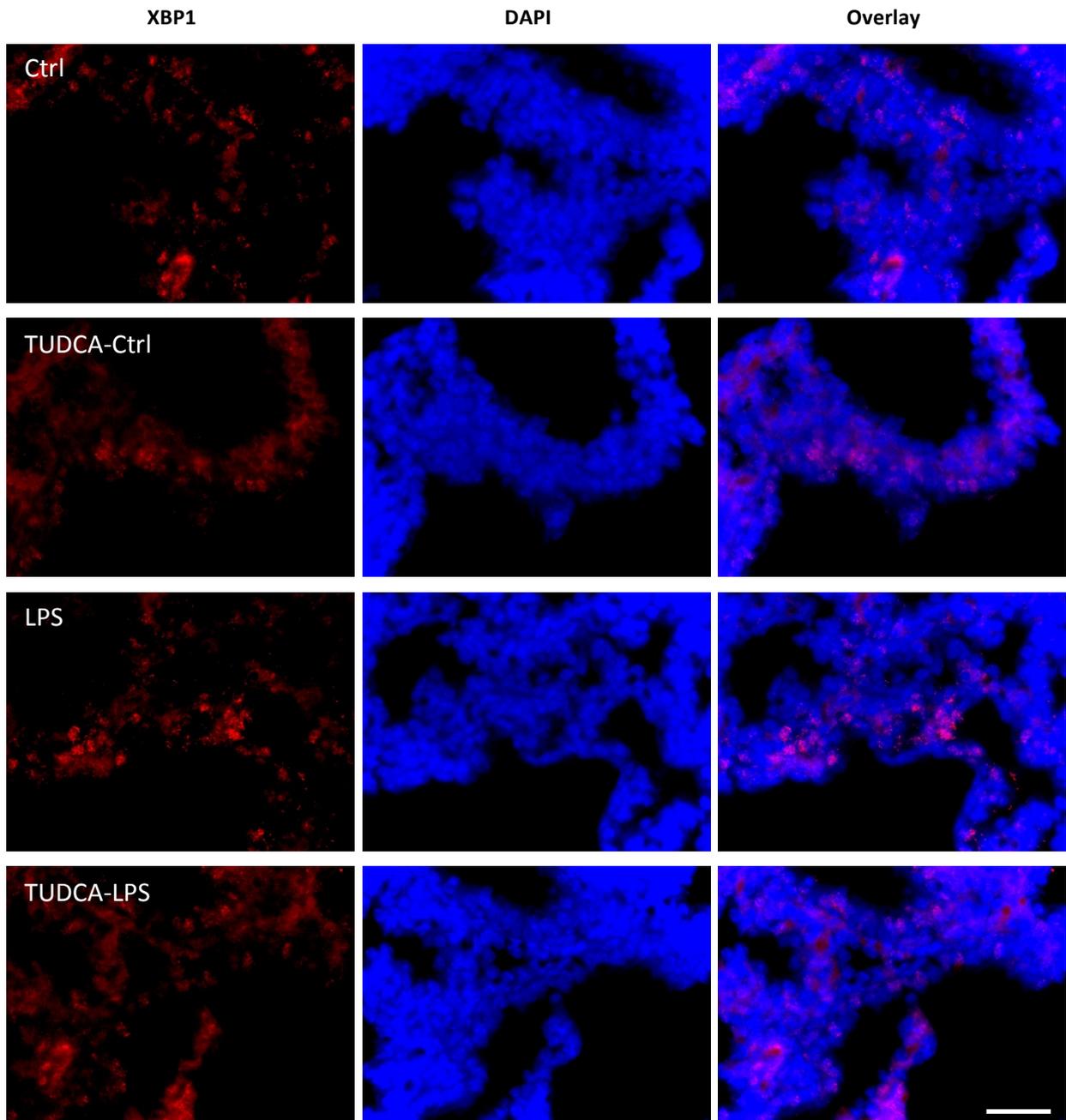
**Abbildung A 7** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von IRE1 $\alpha$  (E17) nach der Behandlung mit 2x NaCl (Kontrolle); 3x 500 mg/kg TUDCA; 2x 0,25 mg/kg LPS; 3x 500 mg/kg TUDCA & 2x 0,25 mg/kg LPS i. p. 28 h und/oder 20 h und 4 h vor der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von IRE1 $\alpha$  und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25  $\mu$ m.



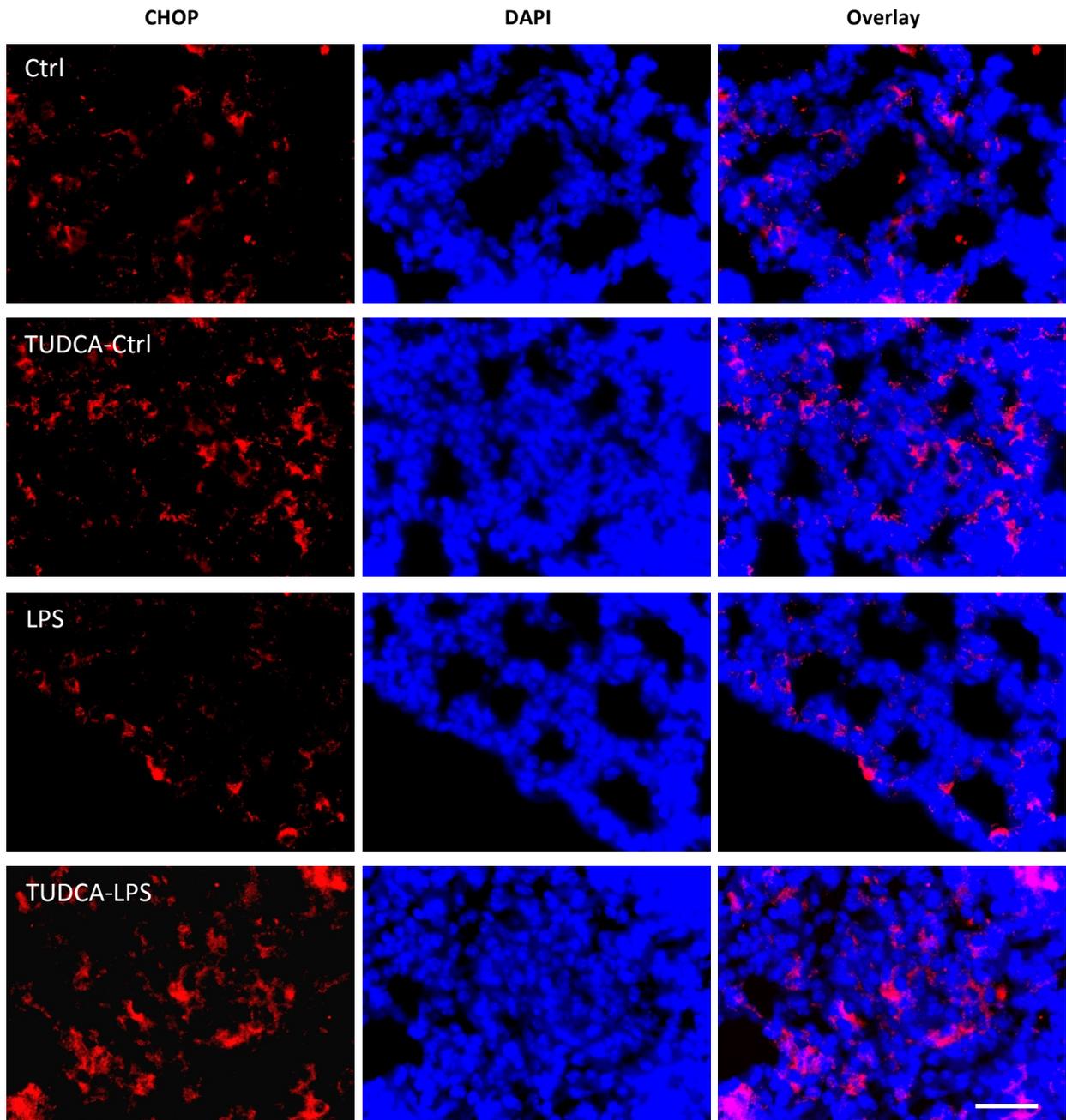
**Abbildung A 8** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von BiP (E17) nach der Behandlung mit 2x NaCl (Kontrolle); 3x 500 mg/kg TUDCA; 2x 0,25 mg/kg LPS; 3x 500 mg/kg TUDCA & 2x 0,25 mg/kg LPS i. p. 28 h und/oder 20 h und 4 h vor der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von BiP und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25  $\mu$ m.



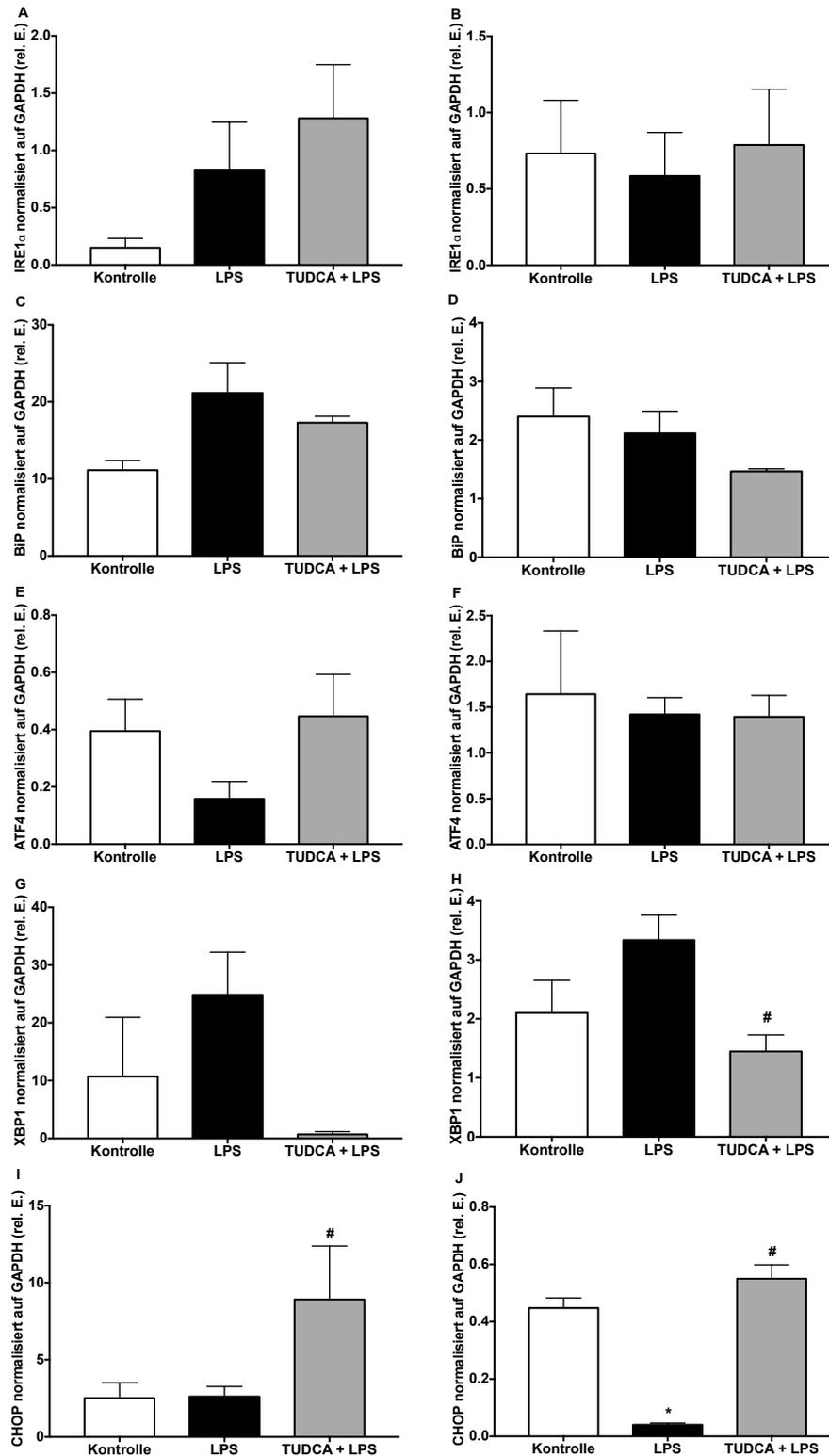
**Abbildung A 9** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von ATF4 (E17) nach der Behandlung mit 2x NaCl (Kontrolle); 3x 500 mg/kg TUDCA; 2x 0,25 mg/kg LPS; 3x 500 mg/kg TUDCA & 2x 0,25 mg/kg LPS i. p. 28 h und/oder 20 h und 4 h vor der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von ATF4 und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25 µm.



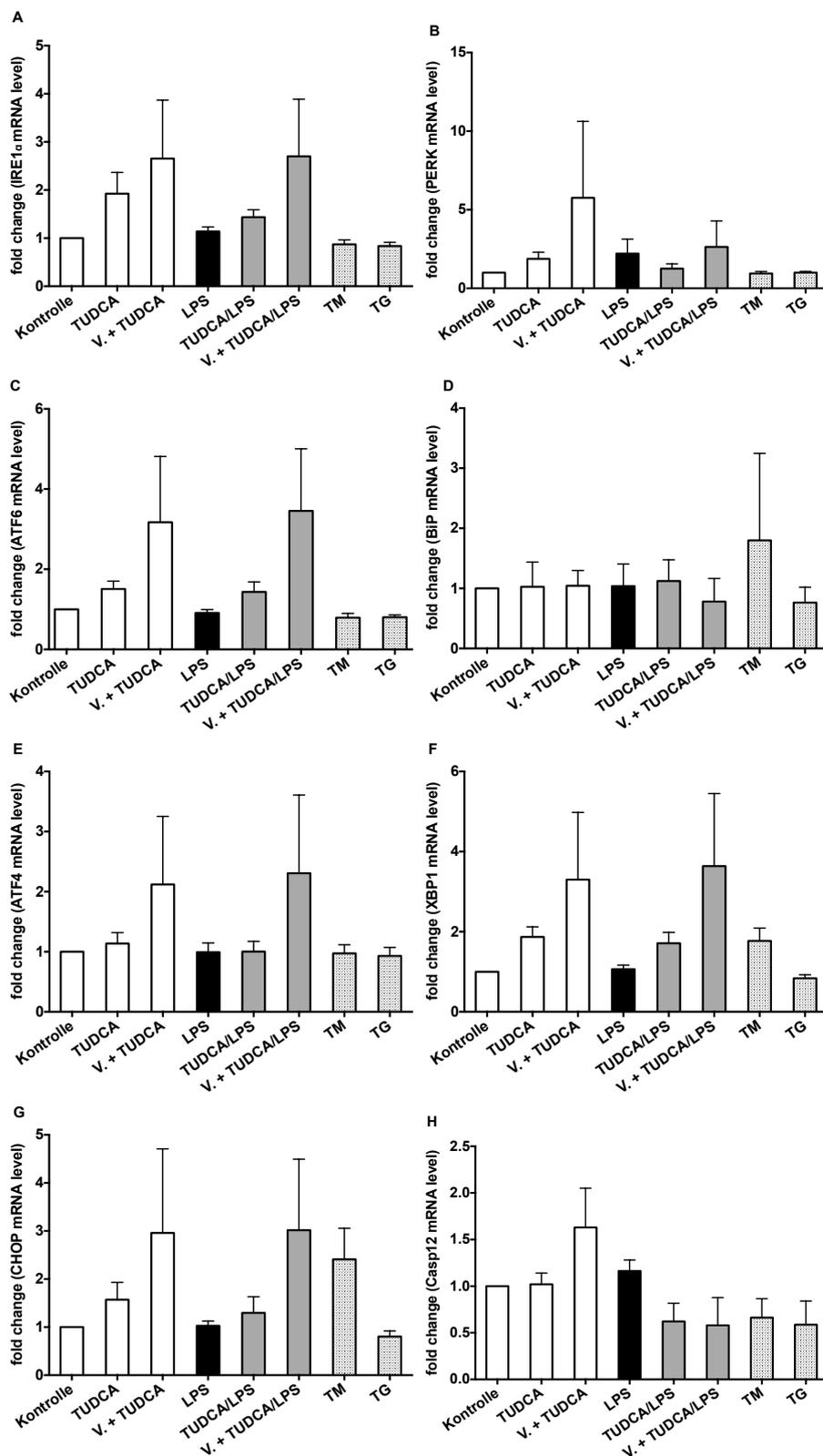
**Abbildung A 10** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von XBP1 (E17) nach der Behandlung mit 2x NaCl (Kontrolle); 3x 500 mg/kg TUDCA; 2x 0,25 mg/kg LPS; 3x 500 mg/kg TUDCA & 2x 0,25 mg/kg LPS i. p. 28 h und/oder 20 h und 4 h vor der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von XBP1 und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25  $\mu$ m.



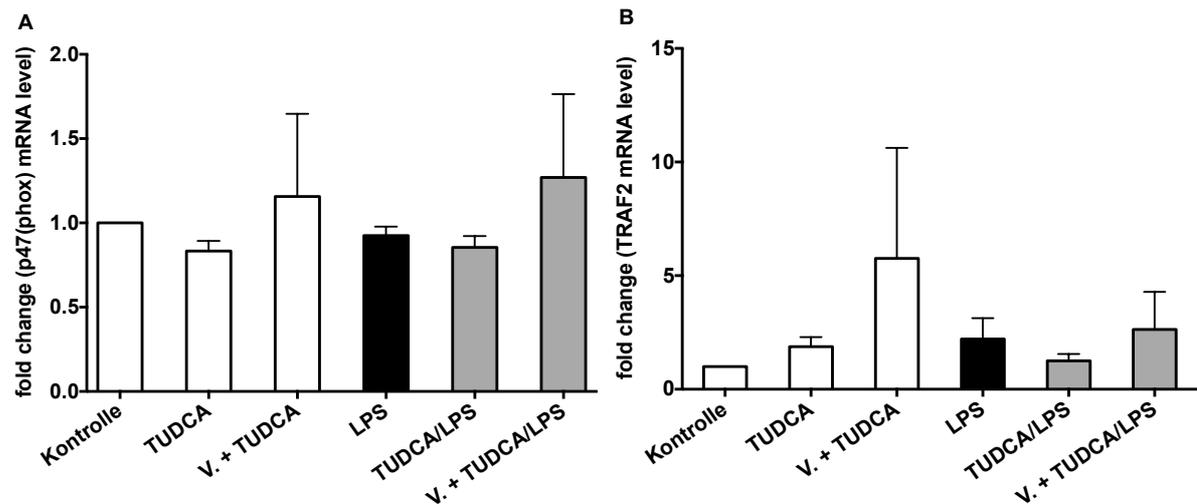
**Abbildung A 11** Darstellung repräsentativer Immunfluoreszenzbilder der fetalen Lunge nach der Anfärbung von CHOP (E17) nach der Behandlung mit 2x NaCl (Kontrolle); 3x 500 mg/kg TUDCA; 2x 0,25 mg/kg LPS; 3x 500 mg/kg TUDCA & 2x 0,25 mg/kg LPS i. p. 28 h und/oder 20 h und 4 h vor der Intravitalmikroskopie. Anschließend erfolgte nach der Organentnahme eine immunhistologische Anfärbung von CHOP und den Zellkernen mittels DAPI. Maßstab 25  $\mu$ m.



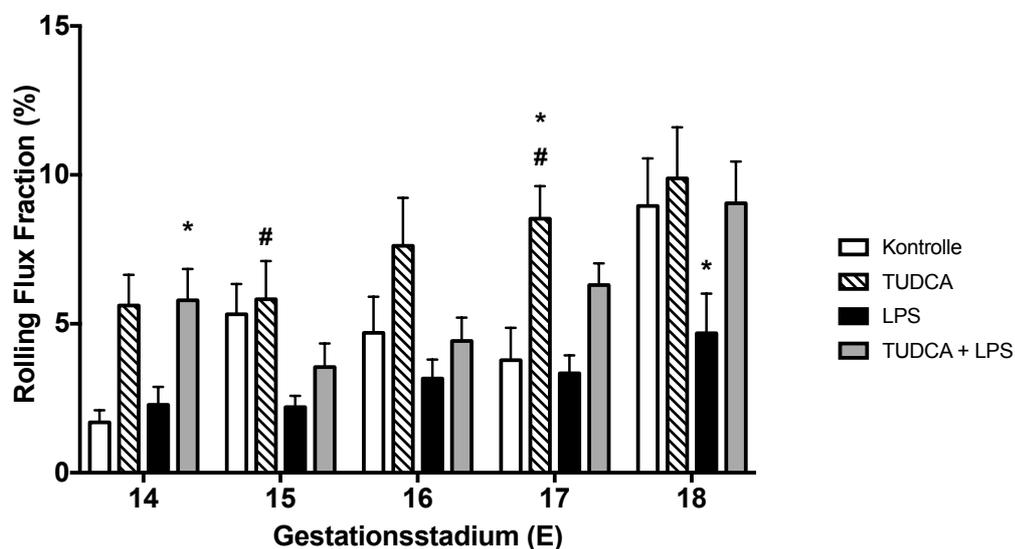
**Abbildung A 12 Proteinexpression von ER-Stressmarkern in der fetalen Leber (Spalte 1) und in der fetalen Lunge (Spalte 2).** Bei schwangeren C57BL/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (E16/17) wurde 2x NaCl (Kontrolle); 2x 0,25 mg/kg LPS; 3x 500 mg/kg TUDCA & LPS 2x 0,25 mg/kg i. p. 28 h und/oder 20 h und 4 h vor der Intravitalmikroskopie injiziert. Nach dem Versuch wurden die fetalen Organe entnommen und mittels Western Blot die Proteinexpression von IRE1 $\alpha$ , BiP, ATF4, XBP1 und CHOP analysiert. Die Werte aus 3 – 6 unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt und als \* $p < 0,05$  dargestellt.



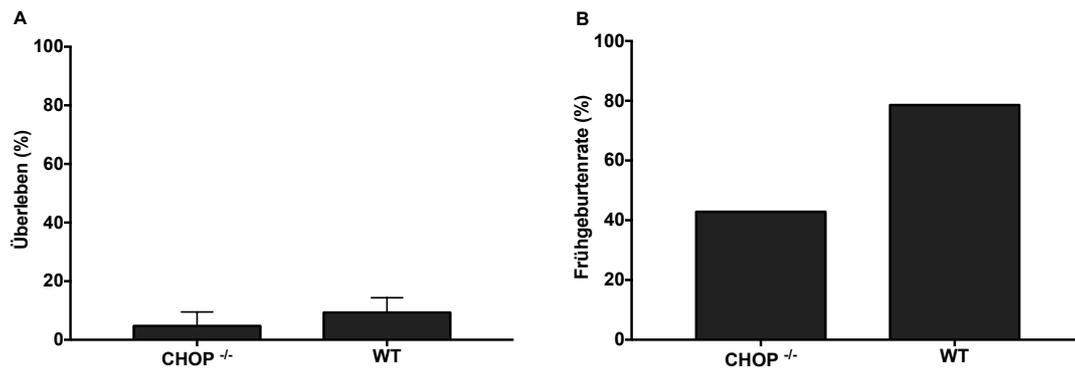
**Abbildung A 13 mRNA-Expression der ER-Stressmarker von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs).** Dargestellt ist die Expression von IRE1 $\alpha$ , PERK, ATF6, BiP, ATF4, XBP1, CHOP und Casp12. Der Aktivierungszustand der MAECs wurde nach dreistündiger Inkubation (Kontrolle (PBS); TUDCA (2 mg/ml); Vorbehandlung TUDCA (2x 2 mg/ml); LPS (100 ng/ml); TUDCA (2 mg/ml) + LPS (100 ng/ml); Vorbehandlung TUDCA (2x 2 mg/ml) + LPS (100 ng/ml); Tunicamycin (5  $\mu$ g/ml); Thapsigargin (5  $\mu$ g/ml)) mittels RT-qPCR analysiert und als Mittelwerte + SEM von n = 3 – 5 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt p < 0,05.



**Abbildung A 14 mRNA-Expression von p47(phox) A) und TRAF2 B) von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAECs).** Der Aktivierungszustand der MAECs wurde nach dreistündiger Inkubation (Kontrolle (PBS); TUDCA (2 mg/ml); Vorbehandlung TUDCA (2x 2 mg/ml); LPS (100 ng/ml); TUDCA (2 mg/ml) + LPS (100 ng/ml); Vorbehandlung TUDCA (2x 2 mg/ml) + LPS (100 ng/ml); Tunicamycin (5 µg/ml); Thapsigargin (5 µg/ml)) mittels RT-qPCR analysiert und als Mittelwerte + SEM von n = 3 – 5 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-Anova ermittelt  $p < 0,05$ .



**Abbildung A 15 Rolling Flux Fraction (%).** Bei schwangeren C57Bl/6-TgN(EGFP-Ly)-Tgr-Mäusen (Gestationsstadium E13 – 17) wurde 2x NaCl (Kontrolle); 3x 500 mg/kg TUDCA; 2x 0,25 mg/kg LPS; 3x 500 mg/kg TUDCA & LPS 2x 0,25 mg/kg i. p. 28 h, 20 h und 4 h vor Versuchsende injiziert. Die Anzahl an rollenden Neutrophilen Granulozyten wurde auf die Gesamtanzahl der freifließenden Leukozyten normiert und als Mittelwerte + SEM mit n = 5 – 17 schwangeren Mäusen pro Gestationsstadium dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Two-Way-Anova ermittelt und mit \*p vs. Kontrolle #p vs. TUDCA  $< 0,05$  dargestellt.



**Abbildung A 16 Intrauterines fetales Überleben A) sowie Frühgeburtenrate B) von CHOP<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Bei schwangeren CHOP<sup>-/-</sup>-(B6.129S(Cg)-Ddit3tm2.1Dron/J)-Mäusen und WT-Mäusen (Gestationsstadium E16/17) wurde 2x 1 mg/kg LPS i. p. 28 h, 20 h und 4 h vor Versuchsende injiziert. Das intrauterine fetale Überleben zum Versuchsende wurde als Mittelwerte + SEM mit n = 7 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels t-test mit \*p < 0,05 ermittelt.