

# Charakterisierung der Relevanz der MK2 für die Akut-Phase-Reaktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
**Maximilian Johannes Hahnel**  
aus München

Düsseldorf, Juli 2015

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. Dieter Häussinger

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Johannes G. Bode  
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2015

# Veröffentlichungen

Veröffentlichungen von Auszügen aus dieser Arbeit:

1. In Originalarbeiten

Ehrling C, Böhmer O, **Hahnel MJ**, Thomas M, Zanger UM, Gaestel M, Knoefel WT, Schulte Am Esch J, Häussinger D, Bode JG. Oncostatin M regulates SOCS3 mRNA stability via the MEK-ERK1/2-pathway independent of p38MAPK/MK2.

In Vorbereitung befindliche Arbeit, in der Auszüge aus dieser Arbeit veröffentlicht werden:

**Hahnel MJ**, Metzendorf C, Missing L, Wolf S, Thomas M, Zanger UM, Muckenthaler M, Häussinger D, Bode JG. LPS induced acute phase protein synthesis occurs almost independent on MK2-dependent cytokines.

2. In Posterbeiträgen

**Hahnel MJ**, Böhmer O, Kulawik A, Braun S, Drasdo D, Pfaff M, Klingmüller U, Häussinger D, Bode JG. Molecular mechanisms of the hepatic acute phase response and the impact of liver regeneration and inflammation on nitrogen metabolism. *Virtual Liver Retreat, Hünfeld 2011*

**Hahnel MJ**, Thomas M, Zanger U, Häussinger D, Bode JG. Influence of the MK2 on the LPS induced Acute Phase Response. *1. International Conference of Collaborative Research Center SFB 974 „Liver Damage and Regeneration“, 2013*

3. In Vorträgen

**Hahnel MJ**, Braun S. LPS Induced Inflammatory Response of the Liver - Identifying Critical Feedback and Feedforward Loops Across the Scales *Virtual Liver Retreat, Hünfeld 2012*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>viii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Akut-Phase-Reaktion . . . . .	1
1.2 Regulation der hepatischen Akut-Phase Reaktion . . . . .	5
1.2.1 Hauptregulatoren der hepatischen Akut-Phase Reaktion . . . . .	5
1.2.2 Transkriptionelle Regulation der Expression von Akut-Phase Proteinen . . . . .	7
1.2.3 MK2/3 abhängige Regulation der Akut-Phase-Reaktion . . . . .	9
1.3 Zielsetzung . . . . .	11
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Material . . . . .	12
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien . . . . .	12
2.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien . . . . .	12
2.1.3 Komplettlösungen und Kits . . . . .	13
2.1.4 Spezielle Materialien, Geräte und Software . . . . .	13
2.1.5 Antikörper . . . . .	14
2.1.6 Primer . . . . .	15
2.1.7 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien . . . . .	15
2.1.8 Versuchstiere und Tierhaltung . . . . .	19
2.2 Methoden . . . . .	20
2.2.1 Zellbiologische Arbeiten und Versuche am lebenden Tier . . . . .	20
2.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten . . . . .	23
2.2.3 Molekularbiologische Arbeiten . . . . .	27
2.2.4 Statistische Auswertung . . . . .	29

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1 Einfluss der MK2 auf die LPS induzierte Expression von Entzündungsmediatoren in der Leber . . . . .	32
3.1.1 MK2 reguliert in der Leber die LPS induzierte Expression der IL-6 Typ Zytokine IL-6, LIF und OSM sowie die basale Expression des OSMR. . . . .	32
3.1.2 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte intrahepatische STAT3 Aktivierung . . . . .	36
3.1.3 MK2 reguliert in der Leber die LPS induzierte Expression der IL-1 Typ Zytokine IL-1-beta, IL-1-alpha und IL-33, hat aber systemisch keinen Einfluss auf die IL-1-beta Serum Proteinkonzentration. . . . .	38
3.1.4 MK2 ist für die Expression von TNF-alpha in der Leber essenziell und reguliert die Expression von LTB und TNFRSF1. . . . .	40
3.1.5 MK2 und MK3 haben unterschiedliche Funktionen in der Regulation der LPS induzierten Interferon Expression. . . . .	44
3.1.6 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von CSF-1, reguliert aber transkriptionell die Expression des CSF-1 Rezeptors . . . . .	46
3.1.7 MK2 ist essenziell für die LPS induzierte Expression von IL-10 und SOCS3 in der Leber. . . . .	49
3.1.8 MK2 reguliert in der Leber die LPS induzierte Expression von Chemokinen der CCL Familie 2, 3, 7, 8 und 11. . . . .	51
3.1.9 MK2 beeinflusst basal die CXCL-10 Serum Proteinkonzentration sowie die intrahepatische, LPS induzierte Expression von CXCL-2, CXCL3 und CXCL-12. . . . .	55
3.2 Einfluss der MK2 auf die LPS induzierte Expression von Akutphase Proteinen in der Leber . . . . .	61
3.2.1 MK2 hat Einfluss auf die Kinetik der LPS induzierten Expression von CD14 und beeinflusst die Expression des LPS Bindeproteins nicht. . . . .	61
3.2.2 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Orosomucoid. . . . .	62
3.2.3 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Serum Amyloid A 1-3 und Serum Amyloid P. . . . .	63
3.2.4 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Fibrinogenen. . . . .	65
3.2.5 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Haptoglobin und Hemopexin. . . . .	65

*Inhaltsverzeichnis*

3.2.6	MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression der Komponenten des Komplementsystems C3 und C4b reguliert aber basal die Expression von C4b. . . . .	68
3.2.7	MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von CRP. . . . .	68
3.2.8	MK2 beeinflusst die alpha-2-Makroglobulin Synthese auf transkriptioneller Ebene, aber nicht auf Ebene der Serum Proteinkonzentration. . . . .	70
3.2.9	MK2 und MK3 haben in der LPS induzierten Hepcidin Expression in der Leber unterschiedlichen Einfluss . . . . .	71
3.3	Einfluss der MK2 auf die Regulation der Hepcidin Expression . . . . .	75
3.3.1	MK2 beeinflusst die Expression von BMP4 im Kontext einer LPS induzierten Entzündungsantwort. . . . .	75
3.3.2	MK2 und MK3 beeinflussen die Expression der für die Hepcidin Expression inhibitorischen Erythrokinen TWSG1 und GDF15. . . . .	76
3.3.3	MK2 beeinflusst die LPS induzierte Hepcidin Expression durch einen intrazellulären Mechanismus in Hepatozyten. . . . .	77
3.3.4	MK2 beeinflusst die LPS induzierte Regulation von SMAD4 und des Inhibitor der DNA Bindung 1 (ID1) . . . . .	79
3.3.5	MK2 beeinflusst nicht die Regulation von HFE und Matripase-2 während der LPS induzierten APR . . . . .	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>94</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

# Abbildungsverzeichnis

3.1	MK2 ist essenziell für die LPS induzierte Expression von IL-6 in der Leber und reguliert systemisch die Serum Proteinkonzentration von IL-6. . . . .	34
3.2	MK2 ist essenziell für den ungehemmten LPS induzierten Anstieg der LIF Serum Proteinkonzentration. . . . .	35
3.3	MK2 beeinflusst die LPS induzierte OSM Expression in der Leber. . . . .	36
3.4	MK2 beeinflusst basal die Expression von OSMR, hat aber keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von gp130 in der Leber. . . . .	37
3.5	Normale STAT3 Aktivierung in Lebergewebe LPS behandelter MK2 <sup>-/-</sup> und MK2/3 <sup>-/-</sup> Tiere. . . . .	38
3.6	MK2 reguliert transkriptionell die Expression von IL-1 $\beta$ in der Leber, hat aber keinen Einfluss auf die systemische Serum Proteinkonzentration. . . . .	41
3.7	MK2 reguliert transkriptionell die Expression von IL-1 $\alpha$ und IL-33 in der Leber. . . . .	42
3.8	MK2 ist für die Expression von TNF $\alpha$ auf Ebene der Serum Proteinkonzentration essenziell. . . . .	43
3.9	MK2 beeinflusst die LPS induzierte LTB Expression in der Leber. . . . .	43
3.10	MK2 beeinflusst die Kinetik der LPS induzierten TNFRSF1A Expression in der Leber. . . . .	44
3.11	MK2 und MK3 haben unterschiedlichen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von IFN $\beta$ und IFN $\gamma$ <i>in vivo</i> . . . . .	45
3.12	MK2 reguliert basal die Expression von IFN $\alpha$ R1 und steuert die LPS induzierte Expression von IFN $\alpha$ R2. . . . .	46
3.13	MK2 hat keinen Einfluss auf die Expression von CSF-1, reguliert aber die LPS induzierte Herabsetzung der CSF-1R Transkriptlevel. . . . .	48
3.14	MK2 und MK3 sind essenziell für die LPS induzierte IL-10 Expression. . . . .	50
3.15	MK2 hat einen moderaten Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von IL-19 in der Leber nach LPS Behandlung. . . . .	50
3.16	MK2 ist entscheidend an der LPS induzierten Expression von SOCS3 beteiligt. . . . .	51

## Abbildungsverzeichnis

3.17	MK2 ist essenziell für die LPS induzierte Expression von CCL-2 und CCL-3, nicht aber für CCL-5. . . . .	53
3.18	MK2 beeinflusst in der Leber die LPS induzierte Expression der Mitglieder der CCL Chemokin Familie 4, 7, 8, 9 und 11. . . . .	56
3.19	MK2 hat systemisch auf die Expression von CCL-4 und CCL-11 auf Ebene der Serum Proteinkonzentration keinen Einfluss. . . . .	57
3.20	MK2 ist für die LPS induzierte Expression von CXCL-2 essenziell und reguliert basal die Expression von CXCL-10. . . . .	59
3.21	MK2 beeinflusst die LPS induzierte Expression von CXCL-3 und CXCL-12 in der Leber. . . . .	60
3.22	MK2 beeinflusst die Kinetik der LPS induzierten CD14 Expression in der Leber und hat keinen Einfluss auf die LBP Expression. . . . .	62
3.23	MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte ORM1 Expression. . . . .	63
3.24	MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von SAP, SAA2 und SAA3. . . . .	64
3.25	MK2 und MK3 haben keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Fibrinogen. . . . .	66
3.26	MK2 hat keinen signifikanten Einfluss auf die LPS induzierte Expression von HP und HPX. . . . .	67
3.27	MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von C3 und C4b beeinflusst aber basal die Expression von C4b. . . . .	69
3.28	MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von CRP. . . . .	70
3.29	MK2 ist für die LPS induzierte Expression von $\alpha$ 2M in der Leber essenziell, beeinflusst aber nicht die erreichten Serum Proteinkonzentration. . . . .	72
3.30	MK2 und MK3 haben für die Expression von Hepcidin in der Leber nach LPS Stimulation unterschiedliche Funktionen. . . . .	73
3.31	MK2 und MK3 haben unterschiedliche Einflüsse auf die Regulation der Serum Eisenkonzentration. . . . .	74
3.32	MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Herabregulation von FPN in der Leber. . . . .	74
3.33	MK2 beeinflusst die Expression der SMAD1/5/8 Aktivatoren BMP4 und INHBB in unterschiedlicher Weise. . . . .	75
3.34	MK2 hat keinen Einfluss auf die Expression von TGF $\beta$ im Kontext der LPS induzierten APR. . . . .	76
3.35	MK2 und MK3 beeinflussen die Expression der Erythrokinine TWSG1 und GDF15 in der LPS induzierten hepatischen APR. . . . .	77
3.36	TNF $\alpha$ und IL-6 sind in konditioniertem Medium LPS behandelter MK2 <sup>-/-</sup> Makrophagen erniedrigt. . . . .	78

## Abbildungsverzeichnis

3.37 MK2 beeinflusst die Hecpidin Expression während der APR intrahepatozellulär. . . . .	79
3.38 MK2 beeinflusst die Expression von ID1 im Kontext der LPS induzierten APR . . . . .	79
3.39 MK2 beeinflusst im Verlauf der APR die Expression von SMAD4 aber nicht SMAD7 in der Leber. . . . .	80
3.40 MK2 beeinflusst nicht die intrahepatische HFE Expression im Rahmen der LPS induzierten APR. . . . .	81
3.41 MK2 hat auf die Expression von TMPRSS6 während der LPS induzierten APR keinen Einfluss. . . . .	81

# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete allgemeine Chemikalien und Reagenzien. . . . .	12
2.2	Verwendete Zellkulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur. . . . .	12
2.3	Verwendete Komplettlösungen und Kits. . . . .	13
2.4	Verwendete spezielle Materialien, Geräte und Software. . . . .	13
2.5	Liste der verwendeten Primärantikörper. . . . .	14
2.6	Liste der verwendeten Sekundärantikörper. . . . .	15
2.7	Liste der verwendeten Primer für die RT-qPCR. . . . .	15
2.8	Zusammensetzung des Narkosemittels zur Sedation der Mäuse. . . . .	15
2.9	Zusammensetzung des Hanks-Puffer für die Präparation primärer muriner Hepatozyten. . . . .	16
2.10	Zusammensetzung des Puffers zur Anperfusion der Leber bei der Präparation primärer muriner Hepatozyten. . . . .	16
2.11	Zusammensetzung des Puffers zur Verdauung der Extrazellulären Matrix der Leber bei der Präparation primärer muriner Hepatozyten. . . . .	16
2.12	Zusammensetzung des Puffers zur Aufreinigung primärer muriner Hepatozyten mittels MACS. . . . .	16
2.13	Zusammensetzung des Adhäsionsmediums für primäre murine Hepatozyten. . . . .	17
2.14	Zusammensetzung des Hungermediums für primäre murine Hepatozyten. . . . .	17
2.15	Zusammensetzung des Kultur- und Differenzierungsmediums für BMDM. . . . .	17
2.16	Zusammensetzung des Lysepuffers für die Herstellung von Proteinlysaten. . . . .	17
2.17	Zusammensetzung des Ladepuffers für Westernblot (2x). . . . .	18
2.18	Zusammensetzung des 10x Elektrophoresepuffers für Proteinauftrennung im PAA-Gel. . . . .	18
2.19	Zusammensetzung des Blottingpuffers (10x). . . . .	18
2.20	Zusammensetzung des gebrauchsfertigen Blottingpuffers. . . . .	19
2.21	Zusammensetzung der Tris gepufferten Salzlösung. . . . .	19
2.22	Zusammensetzung der Waschpuffers für Westernblot Membrane. . . . .	19
2.23	Zusammensetzung des PAA Sammelgels (5%, 15ml). . . . .	24
2.24	Zusammensetzung des PAA Sammelgels (10%, 30ml). . . . .	25
2.25	Amplifikationsprogramm der RT-qPCR im ViiA7 Realtime PCR System. . . . .	28

*Tabellenverzeichnis*

3.1	Liste der Analyte, deren LPS abhängige Regulation und deren MK2 Abhängigkeit in der vorliegenden Arbeit auf Transkript- und Proteinebene untersucht wurde. . . . .	30
3.2	Liste der Analyte, deren LPS abhängige Regulation und deren MK2 Abhängigkeit in der vorliegenden Arbeit auf Ebene der Transkripte untersucht wurde. . . . .	31

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
$\alpha$ 2M	alpha-2-Makroglobulin
Abk.	Abkürzung
APP	Akut-Phase-Protein
APR	Akut-Phase-Reaktion
APRE	Akut-Phase Responsives Element
APRF	Akut-Phase Responsiver Faktor
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Adenylat-Uridylat reiches Element
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BSA	Bovine serum albumin (Rinderalbumin)
CCL	Chemokin (C-C Motiv) Ligand
CD14	<i>Cluster of Differentiation</i> 14, Differenzierungsmarker CD14
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
DAMP	Gefahren (eng. <i>Danger</i> ) assoziierte molekulare Muster (eng. <i>Pattern</i> )
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-di-amin-tetra-essigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FG	Fibrinogen
FCS	Fötales Rinderkälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
gp130	Glycoproein 130, Signalvermittelnde Untereinheit des IL-6 Typ Rezeptors
h	Stunde
HAMP	Hepcidin Gen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HP	Haptoglobin
HRP	Meerrettichperoxidase <i>Horseradish peroxidase</i>
HSF-1	Heat-Shock Faktor
IFN	Interferon
IG	Immunglobulin

## Tabellenverzeichnis

IL	Interleukin
IP	Intraperitoneal
IRF3	Interferon Regulierender Faktor 3
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
LBP	LPS bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic cell separation
Min.	Minute
n. B.	nach Bedarf
ORM-1	Orosomucoid-1, <i>alpha-1 Acid Glycoprotein</i>
PAA	Polyacrylamid
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster (eng. <i>Pattern</i> )
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PRR	Pathogen erkennender Rezeptor (eng. <i>Pathogen recognition receptor</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P
SDHA	Succinat Dehydrogenase Komplex Untereinheit A
sec.	Sekunde
SH2	Src Homologie Domäne
STAT3	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3
TLR	Toll-like Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TTP	Tristetraprolin

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Akut-Phase-Reaktion

Noxen wie Infektionen, Gewebeschäden oder Tumore lösen im Organismus eine akute Entzündung aus, die durch eine Abfolge schneller und unspezifischer inflammatorischer Reaktionen gekennzeichnet ist. Im Verlauf der Entzündung kommt es zu Veränderungen der Gewebshomöostase und des lokalen Blutflusses, zur Aktivierung und Migration von Immunzellen im Bereich des Stimulus und zur Sekretion von Zytokinen und Entzündungsmediatoren [1]. Diese Veränderungen werden sowohl räumlich, als auch zeitlich in engen Grenzen reguliert und im Normalfall nach Beseitigung von Pathogenen und Zellresten wieder auf das Normalmaß heruntergefahren. Dabei laufen zunächst lokale Prozesse ab. Gewebsmakrophagen und andere immunkompetente Zellen erkennen den Stimulus anhand bestimmter molekularer Muster, die mit dem Stimulus auftreten. Man unterscheidet dabei Gefahren/Schaden-assoziierte (*danger/damage associated molecular pattern*, DAMPs) und Pathogen-assoziierte (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) molekulare Muster [2]. Bei DAMPs handelt es sich meist um körpereigene Moleküle, die normalerweise nicht extrazellulär vorliegen oder zugänglich sind. Darunter sind beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP), Desoxyribonukleinsäuren (DNA), Heat-shock-Proteine oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die durch geschädigte Zellen freigesetzt werden. PAMPs sind mit Pathogenen in den Organismus gelangende Moleküle, wie das mit gramnegativen Bakterien assoziierte Lipopolysaccharid (LPS), Teichonsäure, die mit grampositiven Bakterien assoziiert ist, einzelsträngige DNA oder doppelsträngige RNA. Diese Muster werden von gewebständigen Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen durch Toll-like Rezeptoren (TLR) und andere Rezeptoren (pathogen recognition receptors, PRR) erkannt. Dadurch werden diese Zellen aktiviert und die Entzündungsantwort ausgelöst [2].

Die aktivierten Immunzellen sezernieren in der Folge eine Fülle an primären und sekundären Botenstoffen, durch die die Entzündungsantwort gesteuert wird. So sind diese Zellen die Hauptquellen unter anderem für die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1). Diese Zytokine dienen der Verstärkung der Immunantwort durch die Aktivierung von Gewebszellen wie Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten oder Parenchymzellen, die dadurch ihrerseits zur Sezernie-

## 1 Einleitung

rung inflammatorischer Mediatoren angeregt werden [3, 4]. Diese sekundären Mediatoren bewirken beispielsweise Gefäßveränderungen, die den Übertritt von Leukozyten aus dem Blut in das geschädigte Gewebe erleichtern. Prostaglandine aus Immunzellen und Fibroblasten [5–7], Stickoxid aus Makrophagen und Endothelzellen [8] und Histamin aus Mastzellen [9] bewirken dabei eine Dilatation der Gefäße. Durch die damit verbundene Erhöhung des Zeitvolumens, steigt automatisch die Zahl der Leukozyten an, die mit der Zirkulation an die betroffene Stelle gelangen. Leukotriene aus Makrophagen und Histamin aus Mastzellen erhöhen zudem die Permeabilität der Gefäßwand und erleichtern so die Extravasation von Leukozyten und Plasmaproteinen in das geschädigte Gewebe [10–12]. Zusätzlich werden durch  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  lokal Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen verstärkt exprimiert, was eine Anheftung und darauf folgend ein aktives Einwandern von Leukozyten in das Gewebe weiter erleichtert [13]. Für die gerichtete Migration von Leukozyten sind außerdem chemotaktisch aktive Substanzen wie Chemokine der CCL und CXCL Familie von entscheidender Bedeutung. Diese bewirken die Einwanderung von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen und Granulozyten in den Bereich der Läsion [14–17]. Durch Phagozytose beseitigen diese Immunzellen fremde Partikel und Zellreste und damit den Entzündungsreiz. Zusätzlich kommt es durch Antigenprozessierung und -präsentation durch immunkompetente Zellen zur Aktivierung von T- und B-Zellen und damit der spezifischen adaptiven Immunantwort mit der Bildung von Antikörpern. Diese können dann die Immunantwort verstärken, verlängern oder erneut aktivieren. Durch diese Vielzahl an beteiligten Zelltypen, die sich gegenseitig in ihrer Aktivität mit zahlreichen positiven Regulationsmechanismen verstärken, ist eine schnelle Reaktion des Organismus auf einen Stress induzierenden Reiz möglich [17].

Kann die Integrität des Gewebes durch die bisher beschriebenen lokalen Entzündungsprozesse nicht wieder hergestellt beziehungsweise der Stimulus dadurch nicht beseitigt werden, kommt es in der Folge zu einer Ausweitung der Entzündungsantwort mit systemischem Charakter. Dies äußert sich in Allgemeinsymptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit und Appetitlosigkeit, welche die Aktivierung der neuroendokrinen Achse markieren, von verschiedenen Zytokinen wie  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  [18] ausgelöst werden und direkten Einfluss auf die Bekämpfung des Stimulus nehmen [1, 19]. Ein weiteres Charakteristikum einer systemischen Entzündungsantwort ist außerdem eine qualitative und quantitative Modifikation des Plasmaproteoms. Proteine, deren Serumkonzentration sich im Verlauf der systemischen Entzündungsantwort um mehr als 25% ihrer Ursprungskonzentration ändert, werden als Akut-Phase-Proteine (APP) bezeichnet [20]. Bei den APP handelt es sich um eine Reihe von Proteinen, die hauptsächlich in den Parenchymzellen der Leber synthetisiert werden. Deshalb wird diese humorale Reaktion des Organismus auf entzündungsauslösende Faktoren auch als hepatische Akut-Phase-Reaktion (APR) bezeich-

## 1 Einleitung

net [1]. Den verschiedenen APP kommen in der APR unterschiedliche Funktionen zu. Darunter sind wichtige Effektoren der angeborenen Immunität wie lösliche (soluble) PRR (sPRR), C-reaktives Protein (CRP) und Komponenten des Komplementsystems wie C3 und C4b. Es handelt sich dabei um Proteine, die PAMPs erkennen und so an Pathogene binden können um diese für phagozytierende Zellen zu opsonisieren, das Pathogen durch mikrobiozidale Effekte direkt zu zerstören oder das Komplementsystem zu aktivieren und damit zur Zerstörung und Phagozytose von Pathogenen beizutragen [21–24]. Auch das LPS bindende Protein (LBP) und der als APP beschriebene LPS Co-Rezeptor CD14 [25] helfen bei der Erkennung von Pathogenen, indem LBP an das LPS gramnegativer Bakterien bindet und CD14 diesen Komplex mit hoher Affinität zum TLR-4 führt und das Pathogen so für die Zelle kenntlich macht [26]. Serum Amyloid A (SAA) greift in die APR ein, indem es in unterschiedlichen Zelltypen die Expression der IL-1 Typ Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-33 induziert und so zur Verstärkung der Immunantwort beiträgt [27, 28]. Andere APPs wie das alpha-2-Makroglobulin ( $\alpha$ 2M) verhindern durch ihre Eigenschaften als Proteinaseinhibitor eine übermäßige Gewebeschädigung durch bakterielle oder körpereigene Proteasen, die zur Regulierung der Gerinnungskaskade oder während der Bekämpfung von Pathogenen durch phagozytierende Zellen freigesetzt werden [29]. Daneben wurde beispielsweise für Orosomucoid-1/*alpha-1 Acid Glycoprotein* (ORM-1) in einer aktuellen Studie eine immunmodulierende Funktion beschrieben, indem es Makrophagen alternativ aktiviert und so zur Verlagerung der Immunantwort von rein pro-inflammatorischen Mechanismen hin zu reparatur-assoziierten Vorgängen beitragen könnte [30]. Viele der in der APR freigesetzten APPs erfüllen mehr als eine Funktion. Fibrinogen zum Beispiel verhindert als wichtiger Faktor der Blutgerinnung einerseits fortschreitenden Blutverlust und das Eindringen weiterer Pathogene. Andererseits bindet es aber auch Wachstumsfaktoren und Zytokine wie IL-1 $\beta$  und erhöht so lokal deren Konzentration. Dadurch wird einerseits die Rekrutierung von Leukozyten unterstützt, andererseits werden aber auch Reparaturmechanismen initiiert, was wiederum einer Invasion von Pathogenen entgegenwirkt [31, 32]. Auch Hepsidin ist ein Beispiel für ein multifunktionales APP. Einerseits ist Hepsidin ein zentraler Faktor in der Regulation der Eisenhomöostase und kann durch die Restriktion von verfügbarem Eisen das Pathogenwachstum indirekt einschränken [33–35]. Andererseits hat dieses APP aber auch direkte und indirekte mikrobiozidale Eigenschaften [36, 37].

Neben ihrer Bedeutung für die Regulation der adaptiven Immunität und hierbei insbesondere ihrer Relevanz für die Toleranzinduktion [38], kommt damit der Leber und hierbei vor allem dem Hepatozyten als zentraler Syntheseort für die APPs auch eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunität zu. Hierbei übernehmen APPs sowohl eine Rolle als Effektormoleküle der angeborenen Immunität als auch als Regulatoren der systemischen Entzündungsreaktion. Die zentrale Stellung der Leber in der Regula-

## 1 Einleitung

tion der APR wird ferner durch die Tatsache unterstrichen, dass sie den größten Pool gewebeständiger Makrophagen im Organismus beherbergt [39]. Für die generalisierte Wirkung der APR ist jedoch die Summe der Funktionen aller APPs von Bedeutung. Wie wichtig die hepatische APR als Einheit für die systemische Entzündungsantwort ist, konnte in einigen Studien mit *Knock-out* (KO) Tieren überzeugend dargestellt werden. So führt eine Deletion des signalvermittelnden Rezeptors für IL-6-Familien Zytokine gp130 in Hepatozyten zu einer beeinträchtigten APP Synthese in einem Modell polymikrobieller Sepsis [40]. Mäuse mit dieser Deletion zeigen zwar in der Beseitigung der Pathogene keine Beeinträchtigung, jedoch eine erhöhte Sterblichkeitsrate. Dies wurde auf eine verminderte Mobilisierung von myeloiden Suppressorzellen zurückgeführt, die im Verlauf der APR anti-inflammatorische Effekte vermitteln und die in diesem Modell zumindest teilweise durch SAA und das Chemokin der CXC Familie CXCL-1 rekrutiert werden. Die Unterbindung der *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) 3 vermittelten gp130 Signalkaskade verhindert die Synthese dieser Proteine und damit die Mobilisierung myeloider Suppressorzellen. Dieser Phänotyp konnte durch die Behandlung der Tiere mit rekombinatnem SAA und CXCL-1 in Teilen aufgehoben werden. Auch eine vorangegangene Arbeit konnte die Bedeutung der STAT3 vermittelten Signaltransduktion in Hepatozyten für die Regulation der systemischen Entzündungsantwort zeigen [41]. Eine Hepatozyten-spezifische Deletion von STAT3 führte auch hier in einem Sepsis-Modell zu verminderter APP Synthese und trotz vergleichbarer Pathogenlast zu einer überschießenden systemischen APR mit stark erhöhten Konzentrationen an Zytokinen im Blut und einer erhöhten Sterblichkeitsrate der genetisch veränderten Mäuse. Diese Studie belegt, dass der Transkriptionsfaktor STAT3 im Hepatozyten unter anderem entscheidend daran beteiligt ist, die APR innerhalb enger Grenzen zu kontrollieren und eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Nicht zuletzt konnte die zentrale Rolle der Leber in der systemischen Entzündungsantwort und deren Regulation über STAT3 und den *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B) im Hepatozyten in einer kürzlich erschienenen Studie weiter untermauert werden [42]. Die gleichzeitige Deletion von STAT3 und der NF $\kappa$ B Untereinheit p65 (RelA) im Hepatozyten führte hier unabhängig vom Stimulus zu einem Ausbleiben der hepatischen APR. Dies führte bei einer Pneumokokken-Pneumonie zu einer erhöhten Sterblichkeit der Tiere und einer verstärkten Dissemination der Bakterien. Dies wurde von den Autoren auf die Beeinträchtigung der akuten Opsonophagozytose durch Makrophagen in den Tieren mit konditionaler Defizienz an NF $\kappa$ B und STAT3 zurückgeführt. Diese Arbeiten belegen eindrucksvoll die Bedeutung der hepatischen APR für die Regulation der systemischen Entzündungsantwort sowohl durch inflammatorische Reize, die eine lokale Eingrenzung der Entzündung unterstützen, zum anderen durch anti-inflammatorische Wirkungen, die eine Gewebeschädigung durch überschießende Immunreaktionen verhindern sollen.

## 1.2 Regulation der hepatischen Akut-Phase Reaktion

### 1.2.1 Hauptregulatoren der hepatischen Akut-Phase Reaktion

Wie bereits dargestellt, sind Hepatozyten die wichtigste Quelle für APP während einer APR. Damit kommt der Leber eine zentrale Funktion in der unmittelbaren Abwehrreaktion des Organismus gegen inflammatorische Reize zu, indem eine Infektion über weite Distanzen hinweg im Körper mit Hilfe leberstämmiger Effektoren lokal eingegrenzt, der Stimulus bekämpft und die Integrität des Gewebes wieder hergestellt wird [42]. Um diese Aufgabe übernehmen zu können und die dafür notwendigen regulatorischen Signale zu orchestrieren, sind wirksame Mediatoren unverzichtbar, durch die die Synthese der benötigten APP gesteuert wird. *In vivo* Versuche, bei denen die APR ganz oder teilweise verhindert wird, belegen, wie wichtig eine enge Regulation der Expression von APPs für das Überleben des Organismus ist [40–42]. Der Ablauf der APR ist dabei sowohl von der betrachteten Spezies, als auch vom Stimulus abhängig. Während CRP beispielsweise beim Menschen als eins der wichtigsten APPs gilt, ist dieses Protein in der Maus im Verlauf der APR viel schwächer induziert, was auf Unterschiede in der Promotorsequenz in den verschiedenen Spezies zurückgeführt werden kann [43]. Die Stimulusabhängigkeit zeigt sich besonders deutlich in Versuchen mit IL-6 defizienten Tieren. Werden diese Tiere mit Terpentin behandelt, ist die Expression wichtiger APPs wie ORM1, Haptoglobin (HP) oder SAA stark beeinträchtigt. Dieser Einfluss von IL-6 auf den Verlauf der APR ist dabei weniger stark ausgeprägt, wenn statt Terpentin LPS als Stimulus verwendet wird [44, 45]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in IL-1 $\beta$  defizienten Tieren erzielt, was darauf zurückgeführt wurde, dass IL-1 $\beta$  in der Terpentin induzierten Entzündung zur Produktion von IL-6 essenziell ist [46]. Um eine derart differenzierte Regulation der APR gewährleisten zu können, ist ein komplexer Regelkreis mit unterschiedlichen Regulationsmechanismen erforderlich. Entsprechend lang ist die Liste der Mediatoren, die bei der Regulation der Expression von APPs eine Rolle spielen. Dabei scheinen die Vertreter der IL-1-Familie Il-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-33 [47], die IL-6-Zytokin Familie mit IL-6, LIF, IL-11 und Onkostatin M (OSM) [45, 47–49] sowie TNF $\alpha$  die wichtigsten Regulatoren zu sein [50, 51]. Es konnten darüber hinaus aber auch Proliferations- und Differenzierungsfaktoren und weitere Entzündungsmediatoren identifiziert werden, die in die Regulation der APP-Synthese eingreifen. *Epidermal Growth Factor* (EGF) [52], Interferone [53, 54] oder Chemokine wie CXCL-8 [55] sind Beispiele für solche Faktoren.

Diese Vielzahl unterschiedlicher Mediatoren der hepatischen APR beeinflussen sich in ihrer Expression gegenseitig. So ist, wie bereits beschrieben, IL-1 $\beta$  ein essenzieller Induktor der IL-6 Synthese nach Behandlung mit Terpentin in Mäusen [46] und IL-6 wiederum inhibiert die Expression von TNF $\alpha$  und anderen pro-inflammatorischen Mediatoren [56].

## 1 Einleitung

Nicht zuletzt werden im Verlauf der APR zu deren Eindämmung anti-inflammatorische Mediatoren ausgeschüttet, durch die die Expression pro-inflammatorischer Zytokine herabreguliert wird. Der wichtigste Vertreter unter diesen anti-inflammatorischen Zytokinen ist IL-10, das insbesondere über die Induktion einer lang anhaltenden STAT3 Aktivierung anti-inflammatorische Signale in Makrophagen vermittelt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen, die ihre Signale in der Zelle über die Aktivierung von STAT3 weiterleiten, ist IL-10 insensitiv gegenüber dem endogenen Inhibitor der STAT Signaltransduktion *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)3 [57, 58].

Daneben sind die inflammatorischen Mediatoren auch in ihrer Signalwirkung voneinander abhängig und beeinflussen sich gegenseitig. Für die Expression von Hepsidin [39], CRP [59] und SAA [60] konnte beispielsweise gezeigt werden, dass für die maximale Induktion dieser Gene sowohl IL-6 als auch IL-1 $\beta$  benötigt werden, wohingegen die Anwesenheit nur eines dieser Zytokine nur eine moderate Expression dieser APPs auslöst. Andererseits wurden für  $\alpha$ 2M [61] und  $\gamma$ -Fibrinogen (FG $\gamma$ ) [39, 62] Mechanismen beschrieben, nach denen die IL-1 $\beta$  vermittelte Aktivierung von NF $\kappa$ B die IL-6 induzierte Expression dieser Gene im Entzündungsgeschehen hemmt. Diesen Ergebnissen entsprechend gilt IL-6 als Hauptinduktor der APP Synthese [63], dessen Signalwirkung durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimulusabhängig moduliert wird [46, 51, 64]. Die Wirkung dieser Zytokine scheint im Kontext einer LPS induzierten APR jedoch redundant, da das Fehlen eines dieser Zytokine nur geringen Einfluss auf die APP Synthese hat, wohingegen die kombinierte Defizienz von IL-6 und IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  bzw. deren Rezeptoren zu einer drastischen Reduktion der APP Expression führt [45, 46, 51]. Diese Feinregulation der APR wird wie bereits erwähnt noch durch eine Vielzahl von anderen Faktoren weiter differenziert, sodass heute davon ausgegangen wird, dass die APR nicht durch einen oder wenige Faktoren reguliert wird, sondern durch ein Expressionsmuster unterschiedlicher Faktoren, die durch gegenseitige additive, synergistische oder inhibitorische Effekte in der Regulation der APR kollaborieren [39]. Diese Sichtweise wird durch eine Reihe von *in vivo* Versuchen gestützt, die nahe legen, dass nicht ein einzelner Faktor, sondern eine Vielzahl unterschiedlicher Mediatoren die APR regulieren, wobei die Zytokine der IL-6 und IL-1 Familien die Hauptregulatoren darstellen [46, 51, 64].

Entsprechend der Vielzahl an Faktoren, die auf die Expression der APPs Einfluss nehmen, spielen auch viele Rezeptoren und Signalkaskaden für die Regulation der APR eine Rolle. Neben den Rezeptoren der IL-6-Zytokin Familie und deren gemeinsamen Signaltransduktor gp130 [40], sowie den Rezeptoren für IL-1 $\beta$  [65] und TNF $\alpha$  [50] sind in diesem Zusammenhang beispielsweise der EGF-Rezeptor (EGFR) [66], der Ashwell-Morell Rezeptor (AMR) [67] oder der Interferon (IFN) $\gamma$  Rezeptor [68] von Bedeutung. Diese lösen nach der Bindung ihrer Liganden diverse Signalkaskaden aus, die in der Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren münden, welche mit der Regulation der

APR in Zusammenhang gebracht worden sind. Neben den Mitgliedern der (STAT) [69] Familie und NF $\kappa$ B [70] wurden Familienmitglieder der *CCAAT/Enhancer Binding Protein* (C/EBP) [70] Familie, der *Hepatic Nuclear Factor* (HNF) Protein Familie [71] und der SMAD-Familie [72] identifiziert. Dennoch weisen Versuche mit defizienter STAT3 und/oder NF $\kappa$ B Signalvermittlung darauf hin, dass diese Faktoren und deren Zusammenspiel für die Regulation der APR von herausragender Bedeutung sind [42].

### 1.2.2 Transkriptionelle Regulation der Expression von Akut-Phase Proteinen

Obwohl für einzelne APPs wie SAA [73] oder Ferritin [74] neben der transkriptionellen auch post-transkriptionelle Möglichkeiten der Regulation beschrieben wurden, spielt die Induktion der entsprechenden Gene durch Transkriptionsfaktoren die wichtigste Rolle in der Kontrolle der APP-Synthese [39]. Den Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF $\kappa$ B kommt dabei eine zentrale Rolle in der Kontrolle von APP-Genen zu. Dies konnte durch die gleichzeitige Hepatozyten-spezifische Defizienz dieser Faktoren eindrucksvoll belegt werden [42]. Neben der Induktion der Genexpression für die meisten APPs konnte in einer aktuellen Studie außerdem eine Rolle von STAT3 in der Expression von Genen beschrieben werden, die für die Sekretion von Proteinen aus der Zelle von entscheidender Bedeutung sind [75]. In der Leber *S. pneumoniae* infizierter Mäuse kommt es demnach vermittelt über STAT3 zu einer erhöhten Expression von Mitgliedern der zellulären Sekretionsmaschinerie, was dazu beitragen könnte, dass die während der APR induzierten APP effizient in das Blut abgegeben werden können. Diese neue Funktion von STAT3 unterstreicht erneut die umfassende Bedeutung von STAT3 für die hepatische APR.

Die Entdeckung von STAT3 als Transkriptionsfaktor steht in engem Zusammenhang mit der Erforschung der Signalvermittlung in der Regulation der hepatischen APR. Als IL-6 induzierbares DNA-Bindeprotein identifiziert, das spezifisch an sogenannte *acute phase response elements* (APREs) (später STAT-Responsive Elemente) in den regulatorischen Bereichen vieler APPs bindet, wurde dieser Faktor zunächst als *Acute Phase Response Factor* (APRF) bezeichnet [76]. So wurde beschrieben, dass die Aktivierung von STAT3 durch eine direkte Proteininteraktion mit dem IL6-Rezeptorkomplex gp130 und einer rezeptorassoziierten Januskinase (JAK) mit einer darauf folgenden Phosphorylierung von STAT3 an Tyrosin 705 vermittelt wird [77, 78]. Diese Phosphorylierung führt dann zu einer Dimerisierung von STAT-Molekülen über eine Interaktion der Src Homologie Domäne (SH2) [79] und in der Folge zu einer Translokation in den Zellkern, wo die aktivierten STAT-Dimere an die Promotorregionen der entsprechenden Zielgene binden und deren Transkription initiieren [80]. Im Laufe der Zeit wurden weitere Rezeptoren (z.B. IFNR, EGFR, IL-22 Rezeptor), andere Kinasen (z. B. JAKs [81, 82], Rezeptor Tyrosin

## 1 Einleitung

Kinasen (RTKs) [83]) sowie weitere Signalmoleküle (z. B. andere Mitglieder der IL-6 Zytokin Familie [69, 84], IL-22, IL-19, IL-20 [85], EGF [86], IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  [87], IL-10 [88]) identifiziert, die zur Aktivierung von STAT3 führen. Auch die Zahl der Gene mit APRES, die vorwiegend zu den hauptsächlich IL-6 regulierten APPs gehören, wird stetig länger. So wurde neben den Fibrinogenen,  $\alpha$ 2M und ORM-1 identifiziert, für die STAT3 der Hauptregulator ist [76]. Zudem wurde STAT3 im Zusammenhang mit der Regulation der Gene für Serum Amyloid P (SAP), CRP [89], SAA [90], Haptoglobin [91] und Hepsidin [92, 93] diskutiert. Die Rolle von STAT3 in der Regulation der APP Synthese wird in Studien mit STAT3 defizienten Mäusen besonders evident. Werden diese Tiere mit LPS behandelt um eine APR auszulösen, fehlt die Induktion der Gene, die für SAP, SAA1 sowie  $\alpha$  und  $\gamma$ -Fibrinogen kodieren nahezu vollständig und auch die Expression von HP und ORM1 ist durch die Gendeletion von STAT3 beeinträchtigt [94].

Die Bindung an APRES ist jedoch nicht die einzigen Möglichkeit, wie STAT3 auf die Expression verschiedener Gene Einfluss nehmen kann. So wurde die STAT3-Abhängigkeit von Genen beschrieben, die während der APR exprimiert werden, die keine APRES in ihrer Promotorsequenz haben [94, 95]. Beispielsweise wird die Expression von CRP durch einen Promotorkomplex mit c-Fos, HNF1 $\alpha$  und STAT3 initiiert und rekrutiert außerdem weitere Transkriptionsfaktoren wie APE1 [95, 96]. Auch die Expression von SAA1 ist wie beschrieben STAT3 abhängig, weist aber ebenso wie CRP keine APRE in der Promotorregion auf [94, 97]. Für dieses Gen wurde ein Regulationsmechanismus beschrieben, bei dem STAT3 und NF $\kappa$ B nach ihrer Aktivierung einen Komplex bilden. NF $\kappa$ B bindet dann an die NF $\kappa$ B Konsensussequenz im Promotorbereich und ermöglicht es STAT3, eine Sequenz in der Promotorregion von SAA1 zu binden, die von der normalen Konsensussequenz verschieden ist, und so die Transkription im Komplex mit NF $\kappa$ B zu initiieren [90, 98]. Auch für die maximale Induktion der Expression von Haptoglobin spielt die Interaktion von STAT3 und NF $\kappa$ B eine entscheidende Rolle [99]. Diese Komplexbildung zwischen STAT3 und NF $\kappa$ B könnte die synergistischen Effekte von IL-1 $\beta$  und IL-6 erklären, die sich für die entsprechenden Zielgene ergeben.

Daneben können aber auch inhibitorische Effekte von IL-1 $\beta$  auf die IL-6 vermittelte APP Expression über diese Wechselwirkung der Signalmoleküle entstehen. Beispielsweise wurde für die Expression von  $\alpha$ 2M beschrieben, dass der Komplex aus STAT3 mit der p65 Untereinheit von NF $\kappa$ B an das APRE in der Promotorregion binden kann, wodurch möglicherweise der inhibitorische Effekt von IL-1 $\beta$  über IL-6 bei der  $\alpha$ 2M Expression vermittelt wird [100]. Konsistent dazu wird der Komplex dieser Signalmoleküle durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder die Co-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-6 durch einen I $\kappa$ B $\alpha$  abhängigen Mechanismus in humanen Hepatozyten initiiert [90]. Gleichzeitig führt die Sequestrierung von STAT3 im Komplex mit NF $\kappa$ B aber auch dazu, dass der Pool an verfügbarem STAT3 für die aktivierende Kinase kleiner wird. Dies erklärt möglicherwei-

se die beobachtete verminderte späte STAT3 Aktivierung in IL-1 $\beta$ /IL-6 co-stimulierten humanen Hepatozyten [62].

Neben NF $\kappa$ B nimmt auch die p38<sup>MAPK</sup> Einfluss auf die Regulation der STAT3 vermittelten APP Genexpression [101]. So wurde gezeigt, dass nach Aktivierung der MK2 durch die p38<sup>MAPK</sup> diese die signaltransduzierende Untereinheit des IL-6 Zytokin Familien Rezeptors gp130 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt dann zur Internalisierung und Degradation der gp130 Untereinheit. Dies könnte zu einer Begrenzung der APP Genexpression führen, da die Signaltransduktion über diesen Rezeptor für die STAT3 Aktivierung ein zentraler Faktor ist [102].

Dieses komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen in der Regulation der APP Genexpression beteiligten Signaltransduktionswege und den an diesen beteiligten Molekülen, eröffnen die Möglichkeit einer differenzierten Feinregulation der Kinetik und Stärke der Expression von APPs.

### 1.2.3 MK2/3 abhängige Regulation der Akut-Phase-Reaktion

Der p38<sup>MAPK</sup> Signalweg spielt in der Regulation der APR eine herausragende Rolle für die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine. Die Aktivierung des LPS Rezeptors TLR-4 führt dabei zu einer MAPK abhängigen Signaltransduktion über p38<sup>MAPK</sup> [103, 104] und mündet unter anderem in der Expression von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ . Entsprechend ist in der LPS induzierten APR durch die Inhibierung der p38<sup>MAPK</sup> die Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in Monozyten unterdrückt [105]. Studien mit MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren haben gezeigt, dass die MAPK aktivierten Proteinkinasen MK2 und MK3 die essenziellen Ziele der p38<sup>MAPK</sup> für die p38<sup>MAPK</sup> vermittelte LPS induzierte Zytokinsynthese darstellen [106, 107]. So zeigen MK2<sup>-/-</sup> Tiere eine erheblich reduzierte TNF $\alpha$  Synthese und erhöhte Resistenz gegenüber toxischen LPS Dosen [107], ein Effekt der in MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen noch weiter verstärkt wird. Die MK2 scheint dabei für viele Effekte die größere Rolle zu spielen, als die in Sequenz und Struktur sehr ähnliche MK3, was auf höhere Expressionslevel der MK2 in den meisten Zellen und Geweben zurückgeführt wurde [106]. Neben TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurden noch weitere Zytokine wie IL-6, IL-10 und IFN $\gamma$  identifiziert, die MK2 abhängig reguliert werden [107]. Die Mechanismen, über die diese Effekte vermittelt werden, sind vom betrachteten Gen abhängig und erstrecken sich sowohl über transkriptionelle als auch über translationelle Einflüsse. Der post-transkriptionelle Mechanismus wird dabei in verschiedenen Studien mit der MK2 abhängigen Phosphorylierung des Adenylat-Uridylat-reiche Elemente (ARE) RNA-bindenden Moleküls Tristetraprolin (TTP) diskutiert. TTP bindet an mRNA die AREs beinhalten und vermittelt deren Destabilisierung durch den Abbau des Poly-A-Schwanzes der betreffenden mRNA [108]. Dieser Mechanismus wurde für TNF $\alpha$  als

## 1 Einleitung

negative Rückkopplung beschrieben, mit der  $\text{TNF}\alpha$  TTP vermittelt die eigene Synthese inhibiert [109]. Die MK2 abhängige Phosphorylierung von TTP verhindert hingegen die Bindung von TTP an ARE-mRNAs und verhindert so deren Destabilisierung [110,111]. Neben  $\text{TNF}\alpha$  wurden noch weitere TTP Ziel mRNAs entdeckt, die für Zytokine wie IL-6 [112], IL-10 [113] und  $\text{IFN}\gamma$  [114] sowie für Chemokine wie CXCL-8 kodieren [115] und die in der APR MK2 abhängig reguliert werden.

Daneben scheint die MK2 für verschiedene Gene wie  $\text{TNF}\alpha$  außerdem auf translationeller Ebene die Expression zu beeinflussen. Dies äußert sich in Untersuchungen, die belegen, dass die  $\text{TNF}\alpha$  Proteinsynthese in  $\text{MK2}^{-/-}$  Tieren erheblich eingeschränkt ist, während die mRNA Level nur wenig differenziell reguliert werden [116]. Dieser Effekt konnte darauf zurückgeführt werden, dass der stabilisierende ARE bindende Faktor humanes Antigen R (HuR) und das destabilisierende TTP um dieselben Binderegionen ihrer Ziel RNAs konkurrieren [117]. Die Phosphorylierung von TTP setzt dessen Affinität für das ARE herab, sodass HuR eine größere Affinität für die RNA aufweist, TTP verdrängt und so die Translation der Ziel RNA initiieren kann [117].

Ein dritter Mechanismus der MK2 abhängigen Genexpression wurde für IL-1 $\beta$  beschrieben, indem die MK2 direkt auf Transkriptionsfaktoren und -repressoren wirkt. So ist ein MK2 Zielprotein der Heat-Shock Faktor 1 (HSF-1). Dieses Protein bindet unphosphoryliert an die Promotorregion von IL-1 $\beta$  und unterdrückt dadurch dessen Expression [118]. Diese Bindung wird durch die MK2 vermittelte Phosphorylierung des Proteins unterdrückt [119].

Für die der MK2 strukturell sehr nah verwandte MK3 werden zumeist zur MK2 redundante Einflüsse beschrieben, die wie bereits erwähnt, aufgrund der geringeren Expressionslevel weniger stark ausgeprägt sind [106]. Dagegen konnten für die Expression von  $\text{IFN}\beta$  entgegengesetzte Funktionen der beiden Kinasen MK2 und MK3 beschrieben werden [120]. Dabei ist die LPS induzierte  $\text{IFN}\beta$  Expression in aus Knochenmark differenzierten Makrophagen aus  $\text{MK2}^{-/-}$  Tieren im Vergleich zu Wildtyp Zellen stark reduziert. Diese Reduktion wird in  $\text{MK2/3}^{-/-}$  Zellen jedoch nicht verstärkt, sondern aufgehoben, sodass die MK2 in diesem System inhibitorische Effekte der MK3 auf die LPS induzierte  $\text{IFN}\beta$  Expression verhindert. Einerseits verhindert die MK3 eine effiziente Aktivierung des Interferon Regulatorischen Faktors 3 (IRF3), zum anderen verhindert es die adäquate Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in den Zellkern über die Stabilisierung von  $\text{I}\kappa\text{B}\beta$  [120].

Damit sind die Kinasen MK2 und MK3 potente Modulatoren der APR, indem sie einerseits die Expression einer Vielzahl von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen regulieren, zum anderen aber auch direkt in die  $\text{NF}\kappa\text{B}$  [120] und wie im vorigen Abschnitt beschrieben, die STAT3 [101] vermittelten Signalkaskaden eingreifen.

## 1.3 Zielsetzung

Die Leber beteiligt sich über die Expression von APPs in maßgeblicher Weise an der systemischen APR zur Abwehr von Pathogenen [42]. Lebermakrophagen stellen dabei die Hauptquelle für die Regulatoren der APP Expression wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren dar [121]. Die Zusammensetzung dieser Mediatoren hat dabei einen wesentlichen Einfluss auf das APP Profil, das in der Leber synthetisiert und freigesetzt wird [39]. Wie einleitend ausgeführt, kommt dem gegenwärtigen Stand der Literatur zur Folge den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  eine zentrale Rolle in der Regulation der Akutphase Protein Synthese zu. Weiterführende Arbeiten legen ferner nahe, dass auch andere Mitglieder der IL-6 Typ Zytokin Familie in die Regulation von Akutphase Proteinen involviert sind. [39]. Darüber hinaus belegen Untersuchungen an Tieren mit kombinierter Hepatozyten-spezifischer Deletion von NF $\kappa$ B und STAT3, dass diese beiden Faktoren von zentraler Bedeutung für die transkriptionelle Regulation der Expression dieser Proteine im Hepatozyten sind und dass die Deletion beider Transkriptionsfaktoren zu einem annähernd vollständigen Erliegen der Akutphase Protein Synthese führt [42]. In zahlreichen Untersuchungen ist belegt, dass die Aktivierung der Protein Kinase p38<sup>MAPK</sup> und der durch diese aktivierten Effektor Kinase MK2 für die Expression einer Vielzahl von Chemokinen und Zytokinen wie unter anderem auch TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 von zentraler Bedeutung ist. Die Annahme war daher naheliegend, dass die Synthese von Akut-Phase Proteinen in Abwesenheit der MK2 beeinträchtigt ist. Zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung dieser Überlegung wie auch die Identifizierung weiterer Mediatoren, deren Expression durch die Proteinkinasen MK2 bzw. MK3 *in vivo* reguliert wird. Basierend auf der im Zuge dieser Arbeiten gemachten Beobachtung, dass eine Aktivierung der MK2 auch Einfluss auf die Expression von Hepsidin hat, erfolgten weiterführende Arbeiten zur Untersuchung der Auswirkung der MK2 Deletion auf den Eisenstoffwechsel und den zugrundeliegenden Mechanismen.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2.1:** Verwendete allgemeine Chemikalien und Reagenzien.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz</b>
Acrylamid	Applichem	Darmstadt
Aprotinin	Sigma Aldrich Chemie	München
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva	Heidelberg
Benzamidin	Sigma Aldrich Chemie	München
BSA	PAA-Laboratories	Linz, Österreich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich Chemie	München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie	München
ECL Western Lightning	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
Ketavet	Pfizer	New York, USA
Leupeptin	Sigma Aldrich Chemie	München
MACS Rinsing Buffer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
NaCl (steril)	B. Braun	Melsungen
PBS	Biochrom	Berlin
Pefablock	Fluka	St. Gallen, Schweiz
Protein Standard	Biorad	München
Rompun	Bayer Healthcare	Leverkusen
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Darmstadt
TEMED	Sigma Aldrich Chemie	München
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie	München

Chemikalien, die nicht in diese Liste mit aufgenommen sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) oder Sigam Aldrich (München) im Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

### 2.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien

**Tabelle 2.2:** Verwendete Zellkulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz</b>
Collagen	Roche Diagnostics	Mannheim
Collagenase Typ I-A	Sigma Aldrich Chemie	München
DMEM	Biochrom	Berlin

**Tabelle 2.2** Fortsetzung.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz</b>
DMEM 10x	Sigma Aldrich Chemie	München
FCS	Biochrom, Gibco Life Technology	Berlin, Karlsruhe
Glutamin	Gibco Life Technology	Karlsruhe
LPS	Sigma Aldrich Chemie	München
mCSF-1	Peptotech	Hamburg
PBS	Biochrom	Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technology	Karlsruhe
Trypsin	CytoGen	Sinn
Williams Medium E	Biochrom	Berlin

### 2.1.3 Komplettlösungen und Kits

**Tabelle 2.3:** Verwendete Komplettlösungen und Kits.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz</b>
Anti CD11b Mico Bead Kit	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Schwerte
MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel	Merck Millipore	Schwalbach
MILLIPLEXMAP Mouse Acute Phase Magnetic Bead Panel 2	Millipore	Eschborn
PathScan Phospho STAT3 Sandwich ELISA	Cell Signaling Technology	Denver, USA
PathScan Total STAT3 Sandwich ELISA	Cell Signaling Technology	Denver, USA
Pre Amp Master Mix	Fluidigm Corporation	San Francisco, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN	Hilden
Reverse Transcription Master Mix	Fluidigm Corporation	San Francisco, USA
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	Hilden
Taqman Gene Expression Assay	Applied Biosystems	Darmstadt

### 2.1.4 Spezielle Materialien, Geräte und Software

**Tabelle 2.4:** Verwendete spezielle Materialien, Geräte und Software.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz</b>
Abboath	Venisystems, Hospira	München
Blottingkammer	Biorad	München
Brutschrank	Thermo Scientific	Schwerte
Biomark quantitative PCR Chip Plattform	Fluidigm Corporation	San Francisco, USA

**Tabelle 2.4** Fortsetzung.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz</b>
Elektrophoresekammer	Biometra, Biorad	Göttingen, München
Image Station	Kodak	Rochester, USA
IRON (SFBC) Bathophenanthrolin Kit	Biolabo	Maizy, Frankreich
Large Cell Separationssäulen	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Luminex 200	Millipore	Eschborn
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies	Darmstadt
Mikroskop	Zeiss	Jena
Milliplex Analyst 5.1 Software	Millipore	Eschborn
Multiskan plate reader	Thermo Scientific	Schwerte
Nanodrop	NanoDrop Technologies	Wilmington, USA
Nitrozellulosemembran	Millipore	Eschborn
OctoMACS Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
pH-Meter	WTW	Weilheim
Power Supply	Biometra, Biorad	Göttingen, München
QIAshredder Säulen	Qiagen	Hilden
Schlauchpumpe	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH	Wertheim-Mondfeld
Schüttler	Stuart	Staffordshire, England
Sterican-Kanülen 23G	B. Braun	Melsungen
Sterilfilter	Millipore	Eschborn
Thermoblock	Eppendorf	Hamburg
U.I.B.C Unsaturated Iron Binding Capacity Kit	Biolabo	Maizy, Frankreich
ViiA7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems	Darmstadt
Whatman Filterpapier	Whatman	Maidstone, England
xPotent 2.1 Software	Millipore	Eschborn
Zellschaber	BD Falcon	Heidelberg
Zellsieb 70	Greiner	Frickenhausen
Zentrifugen	Eppendorf	Hamburg

### 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 2.5:** Liste der verwendeten Primärantikörper.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz</b>
Kaninchen anti Maus STAT3	Cell Signaling Technology	Denver, USA
Kaninchen anti Maus phospho-STAT3	Cell Signaling Technology	Denver, USA
Maus anti Maus Gapdh	Meridian Life Science	Memphis, USA

**Tabelle 2.6:** Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Firma	Sitz
Kaninchen anti Maus IG, HRP	Dako	Hamburg
Ziege anti Kanninchen IG, HRP	Dako	Hamburg

### 2.1.6 Primer

Alle Primer wurden von der Firma MWG im 0,1 $\mu$ mol Maßstab hergestellt und HPLC gereinigt geliefert.

**Tabelle 2.7:** Liste der verwendeten Primer für die RT-qPCR.

Zielgen	Vorwärts Sequenz	Rückwärts Sequenz
$\alpha$ 2M	CCTCGGCTGAGGTAGAGATG	TGAGCCACTTCACAATGAGC
BMP4	CAATGGAGCCATTCCGTAGT	CATGATTCTTGGGAGCCAAT
CCL-9	GCCCAGATCACACATGCAAC	TGGCAGTTCACACCCTTCTC
F $\gamma$	TTCGGTAGTTTCTGCCAAC	TTTCAGCCCAGGAATAAGATG
FPN	TGTCAGCCTGCTGTTTGCAGGA	TCTTGCAGCAACTGTGTACCG
GDF15	GCTTCCAGGACCTGCTGAG	ACCCCAATCTCACCTCTGGA
Hamp	ATACCAATGCAGAAGAGAAGG	AACAGATACCACACTGGGAA
HFE2	TATGGGCCAGTCCCCTAGTC	ATCTTGCAGTGGGAGTGAGC
ID1	CTGGGAAAGACACTACCGCA	CTCTGGAGGCTGAAAGGTGG
IL-1 $\beta$	TCGCAGCAGCACATCAACAA	TGTCCTCATCCTGGAAGGTC
IL-6	GTTGCCTTCTTGGGACTGAT	CAGGTCTGTTGGGAGTGGTA
IL-33	CACTGCAGGAAAGTACAGCA	CTGAACTTTGCCGGGGAAATC
INHBB	TACGTGTGTCCAGAAGTGGC	TTCGCCTAGTGTGGGTCAAC
LBP	TTCAGAACTGTGAGCTGCGT	CGGACACCGATGGAAGAGTC
SDHA	TGGGGAGTGCCGTGGTGTCA	GTGCCGTCCCCTGTGCTGGT
SMAD4	GCAGATAGCTTCAGGGCCTC	CAGTCCAGGTGGTAGTGCTG
SMAD7	TGGATCAGCGTTTCGGTTGT	CACTATGAGCCTCTCAGCCG
SOCS3	GCTCCAAAAGCGAGTACCAGC	AGTAGAATCCGCTCTCCTGCAG
TMPRSS6	CCGAATATGAGGTGGACCCG	CCTGGCCTGGGTTACATAG
TNF $\alpha$	GCTGAGCTCAAACCCTGGTA	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
TWSG1	GAAGTCCCCTGCTGTAAGG	GAGGGTTGCACATACCGACA

### 2.1.7 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien

Falls nicht anders vermerkt, wurde für alle Puffer und Lösungen vollentsalztes Wasser (H<sub>2</sub>O) aus einer zentralen Ionenaustauscheranlage verwendet.

#### Narkosemittel

**Tabelle 2.8:** Zusammensetzung des Narkosemittels zur Sedation der Mäuse.

Menge	Konz.	Stoff
500 $\mu$ l		NaCl (0,9 %)
100 $\mu$ l	2 $\mu$ g/ $\mu$ l	Rompun
400 $\mu$ l	40 $\mu$ g/ $\mu$ l	Ketavet

### 2.1.7.1 Puffer für Hepatozytenpräparation

#### Hanks-Puffer

**Tabelle 2.9:** Zusammensetzung des Hanks-Puffer für die Präparation primärer muriner Hepatozyten.

Menge	Konz.	Stoff
1l		H <sub>2</sub> O
8g	137mM	NaCl
0,4g	5,4mM	KCl
3,57g	15mM	HEPES
0,06g	0,3mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O
0,06g	0,4mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,4, autoklaviert		

#### Puffer 1

**Tabelle 2.10:** Zusammensetzung des Puffers zur Anperfusion der Leber bei der Präparation primärer muriner Hepatozyten.

Menge	Konz.	Stoff
200ml		Hanks-Puffer
800µl	8µM	EGTA (2 mM)
2ml	0,01%	Glucose (0,1 %)

#### Puffer 2

**Tabelle 2.11:** Zusammensetzung des Puffers zur Verdauung der Extrazellulären Matrix der Leber bei der Präparation primärer muriner Hepatozyten.

Menge	Konz.	Stoff
100ml		Hanks-Puffer
1ml	50µM	CaCl <sub>2</sub> (5 mM)
1ml		0,01%Glucose (0,1 %)
30mg	≈40u/ml	Kollagenase
sterilfiltrieren		

#### MACS-Puffer

**Tabelle 2.12:** Zusammensetzung des Puffers zur Aufreinigung primärer muriner Hepatozyten mittels MACS.

Menge	Konz.	Stoff
1450ml		autoMACS Rinsing Solution
7,25g	0,5%	BSA
sterilfiltrieren		

### 2.1.7.2 Zellkulturmedien für Hepatozyten

#### Adhäsionsmedium

**Tabelle 2.13:** Zusammensetzung des Adhäsionsmediums für primäre murine Hepatozyten.

Menge	Konz.	Stoff
500ml		William's-Medium E
50ml	10%	FCS
500µl	1pM	Dexametason (1nM)
5ml	0,001%	Penizillin Streptomycin (1%)

#### Hungermedium

**Tabelle 2.14:** Zusammensetzung des Hungermediums für primäre murine Hepatozyten.

Menge	Konz.	Stoff
500ml		William's-Medium E
5ml	0,001%	Penizillin Streptomycin (1%)

### 2.1.7.3 Zellkulturmedium für aus Knochenmark differenzierten Makrophagen

#### Kultur- und Differenzierungsmedium

**Tabelle 2.15:** Zusammensetzung des Kultur- und Differenzierungsmediums für BMDM.

Menge	Konz.	Stoff
500ml		DMEM
50ml	10%	FCS
5ml	0,001%	Penicillin/Streptomycin (1%)
Zur Differenzierung ab Tag 1 nach Knochenmarkspräparation 0.1% mCSF-1 zugeben		

### 2.1.7.4 Puffer für Proteinlyse und Westernblot

#### Triton-Lysepuffer (TLP)

**Tabelle 2.16:** Zusammensetzung des Lysepuffers für die Herstellung von Proteinlysaten.

Menge	Konz.	Stoff
n. B.	136 mM	NaCl
n. B.	20 mM	Tris-HCl
n. B.	10 %	Glycerin
n. B.	2 mM	EDTA
n. B.	50 mM	β-Glycerophosphat
n. B.	20 mM	Na-Pyrophosphat
n. B.	0,2 mM	Pefablock

**Tabelle 2.16** Fortsetzung.

Menge	Konz.	Stoff
n. B.	5 µg/ml	Aprotinin
n. B.	5 µg/ml	Leupeptin
n. B.	4 mM	Benzamidin
n. B.	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
n. B.	1 %	Triton X 100
in H <sub>2</sub> O lösen, pH 7,4; vor Gebrauch 0,2 % SDS zugeben		

## 2x SDS Ladepuffer

**Tabelle 2.17:** Zusammensetzung des Ladepuffers für Westernblot (2x).

Menge	Konz.	Stoff
n. B.	0,2 %	Bromphenolblau
n. B.	20 %	Glycerin
n. B.	4 %	SDS
n. B.	100 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
in H <sub>2</sub> O lösen, vor Gebrauch 200 mM DTT zugeben		

## 10x Elektrophoresepuffer

**Tabelle 2.18:** Zusammensetzung des 10x Elektrophoresepuffers für Proteinauftrennung im PAA-Gel.

Menge	Konz.	Stoff
25 g		SDS
75,5 g		Tris
470 g		Glycin
Mit H <sub>2</sub> O auf 5l auffüllen und vor Gebrauch 1:10 verdünnen		

## 10x Blotting Puffer

**Tabelle 2.19:** Zusammensetzung des Blottingpuffers (10x).

Menge	Konz.	Stoff
15 g		SDS
145 g		Glycin
290 g		Tris
Mit H <sub>2</sub> O auf 5l auffüllen und lösen		

### 1x Blotting Puffer

**Tabelle 2.20:** Zusammensetzung des gebrauchsfertigen Blottingpuffers.

Menge	Konz.	Stoff
0,5l		10x Blotting Puffer (Tab. 2.19)
1l	20%	Methanol
3,5l		H <sub>2</sub> O

### 10x TBS

**Tabelle 2.21:** Zusammensetzung der Tris gepufferten Salzlösung.

Menge	Konz.	Stoff
120 g		Tris
435 g		NaCl
Mit H <sub>2</sub> O auf 5l auffüllen und lösen, pH 7,6		

### TBST/Waschpuffer

**Tabelle 2.22:** Zusammensetzung der Waschpuffers für Westernblot Membrane.

Menge	Konz.	Stoff
200ml		10x TBS (Tab. 2.21)
2ml	0,1%	Tween
Mit H <sub>2</sub> O auf 2l auffüllen		

## 2.1.8 Versuchstiere und Tierhaltung

Männliche MK2-defiziente (MK2<sup>-/-</sup>) sowie MK2- und MK3-defiziente (MK2/3<sup>-/-</sup>) Mäuse wurden von Prof. Gaestel (Medizinische Hochschule Hannover) zu Verfügung gestellt und in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gezüchtet. Männliche C57BL/6J Wildtyp-Mäuse wurden von der Firma Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) erworben oder als Wurfgeschwister aus den jeweiligen MK2<sup>-/-</sup> bzw. MK2/3<sup>-/-</sup> Stämmen bezogen.

Die Haltung und Zucht der Versuchstiere erfolgte unter spezifisch-pathogen-freien (SPF) Bedingungen in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf. Dort wurden die Tiere unter einem 12h Tag/Nacht-Zyklus bei 22°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser gehalten.

Die Tiere wurden i. d. R. im Alter von acht bis zwölf Wochen für den Versuch abgerufen. Alle Versuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW genehmigt. Die Versuchsdurchführung erfolgte unter strikter Einhaltung der gesetzlichen Vorgaben des Tierschutzgesetzes.

## 2.2 Methoden

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt und in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

### 2.2.1 Zellbiologische Arbeiten und Versuche am lebenden Tier

#### 2.2.1.1 Präparation primärer muriner Hepatozyten

Mäuse wurden durch intraperitoneale (IP) Injektion von 2,5 µl Narkosemittel (Tab. 2.8) pro g Körpergewicht (KG) (100 µg/g KG Ketamin, 5 µg/g KG Xylazin) narkotisiert. Die Sedationstiefe wurde durch Testen des Zwischenzehenreflexes überprüft. Erst nach Ausbleiben des Reflexes wurde im Protokoll weiter verfahren.

Nach Eröffnen des Bauchfells wurde die Pfortader freigelegt und mit einem Katheter (24G) kanüliert. Um eine Luftembolie während der Perfusion zu verhindern wurde erst perfundiert, nachdem der Katheter vollständig mit Blut gefüllt war. Um einen Druckanstieg in der Leber zu verhindern, wurde die Aorta vor Beginn der Perfusion durchtrennt, damit das Perfusat ablaufen konnte.

Die Leber wurde mit Puffer 1 (Tab. 2.10) anperfundiert (37°C, 8 ml/min) bis kein Blut mehr ausgespült wurde. Die blutleere Leber wurde dann mit Puffer 2 (Tab. 2.11) (37°C, 8 ml/min) weiter perfundiert bis die darin enthaltene Kollagenase die extrazelluläre Matrix (EZM) in der Leber so weit abgebaut hatte, dass diese zu schwellen begann.

Die Leber wurde aus dem Bauchraum entfernt und in 10 ml Adhäsionsmedium (Tab. 2.13) überführt. Die Leberkapsel wurde mit einer spitzen Pinzette verletzt und durch Schwenken der Leber in Adhäsionsmedium wurden die Zellen aus der Leber ausgeschwemmt. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb mit 70 µm Porenweite in ein 50 ml PE-Röhrchen überführt.

Die Zellen wurden dreimal bei 50 x g für 3 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Adhäsionsmedium resuspendiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer (Tab. 2.12) resuspendiert. Um myeloide Zellen zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit 100 µl CD11b Beads versetzt, durch Schwenken gemischt und 15 Min. bei 4°C im Kühlschrank inkubiert, um eine Bindung der Antikörper-gekoppelten Beads an das Epitop auf der Zelloberfläche myeloider Zellen zu gewährleisten. Bei der Passage durch eine MACS-Säule wurden die CD11b Bead gekoppelten myeloiden Zellen dann in der Säule zurückgehalten, während die Hepatozyten die Säule ungehindert passieren.

Die Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Adhäsionsmedium resuspendiert und die Zahl lebender Zellen wurde durch Vitalfärbung mit Trypanblau und Auszählen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 2.2.1.2 Knochenmarkspräparation und Gewinnung von Makrophagen

Murine Makrophagen wurden aus dem Knochenmark von Mäusen durch Behandlung mit murinem koloniestimulierendem Faktor (mCSF)-1 differenziert. Den Tieren wurden dazu die Hinterbeine am Hüftgelenk abgetrennt. Ober- und Unterschenkelknochen wurden frei präpariert und 5 Min. in 70% Ethanol desinfiziert. Das Ethanol wurde mit PBS abgewaschen und die Knochen in DMEM (1000 mg/l Glukose) transferiert. Die Enden der Knochen wurden mit einer Schere entfernt und das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Spritze (23G) und DMEM ausgespült.

Das Knochenmark wurde im DMEM resuspendiert und danach 10 Min. bei 4°C, 300 x g und geringer Beschleunigung und Bremswirkung zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium ohne mCSF-1 (Tab. 2.15) resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und über Nacht bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>) im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren des gesamten Mediums resuspendiert und anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert. Adhärente Zellen wurden verworfen.

Die pelletierten Zellen wurden in mit mCSF-1 supplementiertem Kulturmedium (Tab. 2.15) auf drei 15 cm Zellkulturschalen in je 20 ml Medium verteilt und anschließend zwei Tage im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Danach wurden je Zellkulturschale 20 ml frisches mCSF-1 supplementiertes Kulturmedium zugesetzt und erneut im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Tagen wurden erneut pro Zellkulturschale 10 ml mCSF-1 supplementiertes Kulturmedium zugesetzt. Nach einem weiteren Inkubationstag im Brutschrank wurden die Zellen dann für den Versuch vorbereitet.

7 Tage nach der Knochenmarkspräparation wurden dazu die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 15-30 Min. mit Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde die Ablösung der Zellen in regelmäßigen Abständen am Mikroskop überprüft. Sobald die Zellen sich abzulösen begannen, wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber von der Oberfläche geschabt und die Wirkung des Trypsin auf die Zellen mit Hilfe von Kulturmedium abgeschwächt. Die Zellsuspension wurde anschließend, wie oben beschrieben, zentrifugiert.

Anschließend wurde das Zellpellet in mit mCSF-1 supplementiertem Kulturmedium resuspendiert und die Zahl lebender Zellen mit Hilfe einer Vitalfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

### 2.2.1.3 Kultivierung primärer muriner Hepatozyten im Kollagen-Sandwich

Da primäre Hepatozyten in Kultur schnell dedifferenzieren, wurden die präparierten Zellen zwischen zwei Kollagenschichten im sogenannten Sandwich kultiviert [122]. 10 mg lyophilisiertes Kollagen wurde dafür in 9 ml 0.2% Essigsäure für 24h bei 4°C gelöst.

## 2 Material und Methoden

Nachdem das Kollagen vollständig gelöst vorlag, wurde 1 ml 10x DMEM zugesetzt und mit 0.2 M NaOH bis zum Farbumschlag titriert. Dieser Schritt muss auf Eis und je nach Bedarf im richtigen Volumen erfolgen, da das Kollagen schnell dickflüssig wird. Danach wurde in 6-Kavitäten-Zellkulturschalen je Kavität 350 µl der vorbereiteten Kollagenlösung pipettiert und mit einem Zellschaber gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt. Die Platten wurden dann 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert um das Kollagen auszuhärten. Primäre murine Hepatozyten (Abschnitt 2.2.1.1) wurden auf eine Zelldichte von 400.000 lebende Zellen / ml Adhäsionsmedium gebracht und mit je 2 ml pro Kavität ausgesät. Die Zellen wurden in den Platten für 3 h inkubiert, um eine Sedimentation und Anheftung der Zellen zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen 2 mal mit je 2 ml PBS (37°C) pro Kavität vorsichtig gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 350 µl frisch eingestellter Kollagenlösung überschichtet und erneut für 1 h im Brutschrank inkubiert. Sobald die obere Kollagenschicht ausgehärtet war, wurden die Zellen im Kollagen-Sandwich mit je 2 ml Hungermedium (Tab. 2.14) überschichtet und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die so vorbereiteten Zellen wurden dann in den Versuch genommen.

### 2.2.1.4 Stimulation primärer Hepatozyten mittels BMDM Überstandstransfer

Makrophagen (Abschnitt 2.2.1.2) wurden mCSF-1 supplementiertem Kulturmedium auf eine Zelldichte von 100.000 Zellen / ml Zellkulturmedium eingestellt. Je 2 ml dieser Zellsuspension wurden pro Kavität einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen 2 mal mit PBS (37°C) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml LPS versetztem DMEM (DMEM 1000 mg/l Glukose, 100 ng LPS / ml) überschichtet und 48 h im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde das Medium aus den Platten abgenommen, gemischt und sterilfiltriert. Zur Bestimmung von Entzündungsmediatoren mittels Luminex wurde je Behandlung 1 ml Medium abgenommen und bei -20°C gelagert.

Primäre Hepatozyten in Sandwichkultur (Abschnitte 2.2.1.1 und 2.2.1.3) wurden mit 2 ml des so konditionierten Makrophagen Mediums überschichtet und für 0, 2, 4, 6, 12 h inkubiert. Anschließend wurde der Versuch beendet und aus den Zellen RNA isoliert (Abschnitt 2.2.3.1).

### 2.2.1.5 Lipopolysaccharid Stimulation und Gewebegewinnung

Entsprechend der Masse der Maus wurde die benötigte Menge Lipopolysaccharid (LPS) (1, 0,5 oder 0,1 µg LPS pro g KG) in einem Endvolumen von 100 µl in 0,9 % NaCl verdünnt. Die LPS-Lösung wurde der Maus vollständig intraperitoneal (IP) injiziert. Für

jeden Zeitpunkt wurden Kontrolltiere generiert, denen zu Versuchsbeginn 100 µl 0,9% NaCl injiziert wurde. Für Nullkontrollen wurde Tieren ohne Injektion von NaCl oder LPS das entsprechende Gewebe entnommen. Die LPS-Injektionen erfolgten zwischen 8:30 und 9:30 Uhr morgens. Nach einer festgesetzten Zeitspanne wurde der Versuch beendet. Dafür wurde die Maus durch IP Injektion von 2,5 µl Narkosemittel pro g KG sediert.

Bei Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes wurde der Bauchraum eröffnet und die Aorta freigelegt. Mit einer 23G Kanüle und einer 1 ml Spritze wurde der Maus aus der Aorta so viel Blut abgenommen wie möglich. Das Blut wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 Min. bei RT geronnen. Durch zweimaliges Abzentrifugieren (10.000 x g, 10 Min., RT) der zellulären Bestandteile wurde das Serum als Überstand gewonnen. Dabei wurde das Serum nach jedem Zentrifugationsschritt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung des Serums erfolgte bei -20°C.

Nach der Entnahme des Blutes wurde die Pfortader mit einem Katheter kanüliert und die Leber mit kaltem PBS mit 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_4$  blutleer gespült. Die Aorta wurde dabei unterhalb des Zwerchfells aufgeschnitten, damit das Perfusat ablaufen konnte und sich der Druck in der Leber nicht erhöhte. Sobald kein Blut mehr ausgespült wurde, wurde die Perfusion beendet. Die Leber wurde aus dem Bauchraum entfernt und sofort mit einem Skalpel in die einzelnen Leberlappen (linkslateral, rechtslateral, Median und Caudatus) zerlegt. Aus dem rechtslateralen Leberlappen wurden zwei Stücke mit je ca. 30 mg abgeschnitten und in tarierte Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff konserviert. Diese Stücke dienten später der Gewinnung von Protein und RNA. Die einzelnen Leberlappen wurden separat in Kryogegefäßen sofort in flüssigem Stickstoff konserviert.

### 2.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten

#### 2.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Lebergewebe

Ein Stück Leber (Abschnitt 2.2.1.5) wurde an einer Analysenwaage abgewogen und in 10 µl Triton-Lysepuffer (Tab. 2.16) pro mg Lebergewebe mit Hilfe eines Handhomogenisators im 1,5 ml Reaktionsgefäß möglichst klein zerstoßen. Die Lebersuspension wurde 10 Min. auf Eis inkubiert und danach vollständig in eine QIAshredder-Säule überführt und zentrifugiert (16.200 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde mit einer Pipette in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Kits von Thermo Scientific durchgeführt. Dabei wird  $\text{Cu}^{2+}$  im alkalischen Milieu in Anwesenheit der Aminosäurereste

Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert. Reduziertes  $\text{Cu}^{1+}$  wird dann durch die im Testreagenz enthaltene Bicinchoninsäure komplexiert, was zu einem Farbumschlag von grün zu violett führt. Die Reaktion und die photometrische Messung erfolgen in einer 96-Loch Platte. Die Probe wurde dabei 1:10 in TLP verdünnt eingesetzt. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 200  $\mu\text{l}$  Testreagenz und 2  $\mu\text{l}$  verdünnte Probe je Kavität pipettiert. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe (BSA) bekannter Konzentration auf jeder Platte mitgeführt. Nachdem alle Proben mit Testreagenz versetzt waren, wurde die Platte 30 Min. bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert um die Reaktion ablaufen zu lassen. Die Intensität des Farbumschlag von grün nach violett wurde anschließend am Multiscan Plattenlesegerät bei 562 nm Wellenlänge gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über lineare Regression der Standardgeraden.

### 2.2.2.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der die in Proteinlysaten vorhandenen Proteine zunächst nach ihrer Größe aufgetrennt, dann an eine Membran fixiert und mittels Antikörperbindung und fotoaktiver Reaktion spezifisch identifiziert werden können.

Für die Größenauftrennung wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in vertikaler Führung durchgeführt. Dafür wurden 80  $\mu\text{g}$  der Probe (Abschnitte 2.2.2.1 und 2.2.2.2) im Verhältnis 1:1 mit 2x SDS Ladepuffer (Tab. 2.17) gemischt und 5 Min. bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgetragen und bei 230 V der Größe nach getrennt. Dabei durchliefen die Proteine zunächst ein Sammelgel (5%) (Tab. 2.23), wodurch die Probe auf eine schmale Bande komprimiert wird, bevor sie das Trenngel (10%) (Tab. 2.24) erreichten.

Die so aufgetrennten Proteine wurden danach mit Hilfe der „Semi-dry“ Blotting-Methode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde für 1,5 h ein Strom von 0,8 mA pro  $\text{cm}^2$  Membran angelegt. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden danach mit 5% Magermilchpulver blockiert (30 Min., RT). Die Bindung des Primärantikörpers (Tab. 2.5) erfolgte über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler. Nach der Inkubationszeit der Primärantikörperbindung wurde 3 mal je 10 Min. auf dem Schüttler mit TBST (Tab. 2.22) gewaschen. Danach wurde 1 h bei RT mit Sekundärantikörper (Tab. 2.6) geschüttelt. Ungebundener Sekundärantikörper wurde durch 3 maliges Waschen mit TBST von der Membran gewaschen. Die Detektion des mit HRP gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte mittels Western Lightning ECL Reagent digital an der Image Station.

**Tabelle 2.23:** Zusammensetzung des PAA Sammelgels (5%, 15ml).

Menge	Substanz
10,2 ml	$\text{H}_2\text{O}$
2,5ml	30% Bisacrylamid 29:1

**Tabelle 2.23:** Fortsetzung

Menge	Substanz
1,9ml	1 M Tris/HCl (pH 6,8)
0,15ml	10% SDS
0,15ml	10% APS
0,015ml	TMED

**Tabelle 2.24:** Zusammensetzung des PAA Sammelgels (10%, 30ml).

Menge	Substanz
11,8 ml	H <sub>2</sub> O
10ml	30% Bisacrylamid 29:1
7,6ml	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
0,3ml	10% SDS
0,3ml	10% APS
0,012ml	TMED

#### 2.2.2.4 ELISA

Ein weiteres antikörperbasiertes Nachweisverfahren von Proteinen ist der *enzyme linked immuno sorbant assay*. In dem hier angewandten Verfahren ist der Erstantikörper an die Wand einer 96-Kavitäten-Platte gebunden. Das im Lysat befindliche Protein wird von diesem Antikörper gebunden und verbleibt so in der Kavität, während ungebundene Proteine ausgewaschen werden. Über die Bindung eines zweiten enzymgekoppelten Antikörpers und die nachfolgende enzymatische Stoffumsetzung eines Substrates mit Farbumschlag kann so das Protein in der Probe nachgewiesen werden. Bei der Durchführung wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

#### 2.2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration von Entzündungsmediatoren und Akutphaseproteinen in Serum und Zellkulturüberständen

Die Messung der Proteinkonzentrationen von Entzündungsmediatoren und Akutphaseproteinen (APP) in Serum (Abschnitt 2.2.1.5) und Zellkulturüberständen (Abschnitt 2.2.1.4) wurde mit Hilfe der Multiplex-Technologie xMAP von Luminex Corp. durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Festphasen-basiertes ELISA Verfahren, bei dem das Protein an eine antikörpergeoppelte Mikrosphäre bindet, die durch einen Fluoreszenzfarbstoff identifizierbar ist. Das gebundene Protein wird dann durch Fluoreszenzfarbstoff

markierte Zweitantikörper gebunden. In einer auf Durchflusszytometrie basierenden Detektionseinheit wird dann jede Mikrosphäre einzeln mit Hilfe von Lasern detektiert. Die Wellenlänge des von der Sphäre emittierten Lichtes gibt dabei Aufschluss über die Art des gebundenen Analyten. Die Menge gebundener Analyte wird über die Fluoreszenzintensität im Spektrum des Zweitantikörpers ermittelt. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgt über die Mitführung einer Standardreihe für jeden Analyt. Durch das Kodieren einzelner Mikrosphären mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ist es möglich mehrere Analyte in einer Probe zu messen.

Die Probe wurde mit den Mikrosphären über Nacht bei 4°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### 2.2.2.6 Bestimmung der Eisenkonzentration und der Transferrinsättigung im Serum

Die Bestimmung der Eisenkonzentration erfolgte mit dem IRON (SFBC) Bathophenanthrolin Kit nach Herstellerangaben skaliert auf ein Volumen von 200 µl. Im Folgenden soll kurz das Testprinzip erklärt werden. Eisen liegt im Blut gebunden an Transferrin als  $\text{Fe}^{3+}$  vor. Um die Menge an Eisen mit Hilfe der SFBC Methode zu bestimmen, wird  $\text{Fe}^{3+}$  zunächst von Transferrin getrennt, indem das Protein durch Salzsäure und Trichloressigsäure denaturiert wird. Das freie Eisen wird dann mit Mercaptoessigsäure als Reduktionsmittel zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert.  $\text{Fe}^{2+}$  bildet daraufhin einen farbigen Komplex mit dem Chelator Bathophenanthrolin. Dieser Komplex kann dann photometrisch bei 535 nm Wellenlänge gemessen werden. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Standards bekannter Konzentration.

Um die Transferrinsättigung zu berechnen, wird zunächst die Menge an freien Bindestellen des Transferrins bestimmt. Dazu wurde das U.I.B.C Unsaturated Iron Binding Capacity Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet (skaliert auf ein Reaktionsvolumen von 200 µl). Das Testprinzip beruht darauf, dass der Probe zunächst eine definierte Menge an Eisen in Form von  $\text{Fe}^{3+}$  zugesetzt wird, das daraufhin an das im Serum enthaltene Transferrin bindet, bis dieses gesättigt ist. Durch Zugabe des Komplexbildners Ferene wird das überschüssige  $\text{Fe}^{3+}$  in alkalischem Milieu in einem farbigen Komplex gebunden, der bei 600 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt werden kann. Aus der Summe der Serum Eisenkonzentration und der freien Eisenbindekapazität ergibt sich dann die totale Eisenbindekapazität. Der Quotient aus Serum Eisenkonzentration und der totalen Eisenbindekapazität ergibt wiederum die Transferrinsättigung.

Da die Experimente nicht an einem Tag durchgeführt wurden, wurden die Ergebnisse gegen den Mittelwert zweier mitgeführter WT Nullkontrollen normalisiert.

Die Durchführung erfolgte am Molecular Medicine Partnership Unit (MMPU) in Heidel-

berg unter der federführenden Leitung von Dr. C. Metzendorf in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Muckenthaler sowie in der Experimentellen Hepatologie der Universität Düsseldorf.

### 2.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

#### 2.2.3.1 RNA-Extraktion und Quantifizierung

Zur Gewinnung von RNA aus Zellen und Gewebe wurde das RNEasy Mini Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben verwendet.

Lebergewebe wurde in 300 µl RLT-Puffer mit  $\beta$ -Merkaptoethanol zerstoßen. Nach der Passage über die QIAshredder-Säule wurde die RNA in 50 % Ethanol gefällt. Die genomische DNA wurde durch die *on column* DNase Verdauung abgebaut. Die Elution erfolgte in 100 µl RNase-freiem Wasser.

Hepatozyten wurden zusammen mit dem Kollagen der Sandwich Kultur abgeschabt und 10 Min. bei 4°C und 7000 x g zentrifugiert. Danach wurde das überstehende Medium abgenommen und die Zellen mit dem verbleibenden Kollagen in 700 µl RLT-Puffer ohne  $\beta$ -Merkaptoethanol homogenisiert. Die Elution erfolgte in 20 µl Wasser.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte am Nanodrop für weitere Analysen mittels RT-qPCR. Für die Messung mittels Fluidigm wurde die RNA im BMFZ an der Universität Düsseldorf im Bioanalyzer quantitativ und qualitativ untersucht. Für weitere Untersuchungen wurden nur RNA Qualitäten mit einer RNA Integritäts Nummer (RIN)  $\geq 6$  verwendet, die im Bioanalyzer zur Qualitätsbestimmung erhoben wird und das Verhältnis der 28S zur 18S rRNA wiedergibt.

#### 2.2.3.2 Reverse Transkription

Um die RNA (Abschnitt 2.2.3.1) weiter zu untersuchen, wurde daraus zunächst mit Hilfe des Quantitect Reverse Transcription Kits cDNA synthetisiert. Dafür wurde je 1 µg RNA pro Ansatz nach dem Protokoll des Herstellers umgeschrieben. Zur Qualitätsüberprüfung wurde ein Ansatz ohne reverse Transkriptase inkubiert und in der folgenden RT-qPCR mit analysiert (-RT). Nach der Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Inkubation bei 95°C für 5 Min. wurde die RNA mit 100 µl RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen 120 µl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.3.3 Realtime semiquantitative Polymerase Kettenreaktion

Die realtime semiquantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) ist ein Verfahren, bei dem DNA zyklisch vervielfältigt wird und das gleichzeitig die Quantifizierung dieser

## 2 Material und Methoden

DNA ermöglicht. In dieser Studie wurde die Fluoreszenzintensität des DNA interkalierenden Farbstoffes *SYBR Green* gemessen, die abhängig von der Menge des eingelagerten Farbstoffes und damit von der im Ansatz befindlichen DNA ist. Die Anregung des Farbstoffes bei 494 nm und die Messung des emittierten Lichtes bei 521 nm erfolgte im ViiA7 Real Time System. Die Reaktion wurde in MicroAmp Optical 96-Well Reactions Platten durchgeführt.

Für den Reaktionsansatz wurde zunächst für jede Probe 15 µl SYBR Green Master Mix und 11,6 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Aus dieser Mischung wurden dann für jedes zu bestimmende Gen 25,3 µl in vorbereitete 1,5 ml Reaktionsgefäße entsprechend der Anzahl der Proben pipettiert. Der Inhalt dieses Reaktionsgefäß wurde dann mit 1,4 µl der jeweiligen cDNA-Probe (Abschnitt 2.2.3.2) gemischt. Aus dieser Mischung wurden dann 23µl in die Reaktionsplatte pipettiert und dort mit 2 µl des jeweiligen Primerpaares (Tab. 2.7) gemischt.

Die Amplifikation der DNA erfolgte über ein standardisiertes Programm, das in Tabelle 2.25 wiedergegeben ist.

Zur Quantifizierung wurde die  $\Delta CT$  Methode angewandt. Dabei wird die Zyklenzahl bestimmt, die das Fluoreszenzsignal benötigt um eine bestimmte Intensität zu erreichen (in dieser Arbeit das 0,2 fache der Standardabweichung über der Basislinie). Die Zyklenzahl wird dann mit einem Referenzgen (hier Succinat Dehydrogenase Komplex Untereinheit A (SDHA)) ins Verhältnis gesetzt, um Ungenauigkeiten in der Versuchsdurchführung auszugleichen. Da mit jedem Zyklus die Zahl der im Ansatz befindlichen Kopienzahl des jeweiligen Gens verdoppelt wird, kann über die Potenzierung des  $\Delta CT$  zur Basis 2 ( $2^{-\Delta CT}$ ) das Verhältnis der Kopienzahl eines Gens in den unterschiedlichen Proben dargestellt werden.

**Tabelle 2.25:** Amplifikationsprogramm der RT-qPCR im ViiA7 Realtime PCR System.

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenzahl	Phase
95	600	1	Anfangsdenaturierung
95	15	40	Denaturierung
60	60		Annealing, Elongation
Schmelzkurvenanalyse			

### 2.2.3.4 Quantifizierung der Genexpression mittels Fluidigm qPCR

Das Prinzip der Fluidigm qPCR (*Fluidigm's Biomark high-throughput quantitative PCR chip platform*) folgt dem selben Prinzip der Vervielfältigung durch zyklische Polymerase Kettenreaktion und gleichzeitige Quantifizierung der im Ansatz befindlichen DNA. Die Quantifizierung erfolgt hier jedoch über Taqman-Sonden. Diese Sonden sind kurze DNA Sequenzen, die komplementär zu einem Teil der Zielsequenz sind und an einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und am anderen einen Quencher gebunden haben, der das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Während der Amplifikation wird die gebundene Sonde durch die Polymerase abgebaut, wodurch der Farbstoff freigesetzt wird und detektiert werden kann. Durch die Möglichkeit, verschiedene Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen zu markieren, ist es möglich in einer PCR mehrere Gene gleichzeitig zu untersuchen (multiplex PCR).

Die Analyse der Genexpression in Lebergewebe mittels Fluidigm qPCR wurde unter der federführenden Leitung von Dr. M. Thomas in der Arbeitsgruppe von Dr. U. Zanger am Dr. Margarete Fischer-Bosch - Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart durchgeführt.

### 2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte über das Open Source Programm R in der Version 2.15.0. unter der Verwendung einfaktorier ANOVA mit Boferroni post hoc Test. Die Ergebnisse wurden als signifikant eingestuft, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% betrug ( $p < 0.05$ ).

### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses der MK2 auf die LPS induzierte APP Synthese und die Identifizierung MK2 abhängiger Entzündungsmediatoren *in vivo*. Dazu wurden WT und MK2<sup>-/-</sup> Tiere unterschiedlich lange mit LPS behandelt und anschließend die Expression verschiedener Entzündungsmediatoren und APPs in der Leber und im Serum der Tiere untersucht. Die Tabellen 3.1 und 3.2 geben einen Überblick über die untersuchten Analyte und veranschaulichen dabei die LPS abhängige Regulation sowie den Einfluss der MK2.

**Tabelle 3.1:** Liste der Analyte, deren LPS abhängige Regulation und deren MK2 Abhängigkeit in der vorliegenden Arbeit auf Transkript- und Proteinebene untersucht wurde. LPS abhängige Regulation: ↑↑ stark induziert, ↑ induziert, ↓↓ stark supprimiert, ↓ supprimiert, Ø keine; Einfluss der MK2 Deletion auf die LPS verittelte Regulation: ++ stark verstärkt; + verstärkt; (+) schwach verstärkt; – stark verringert; - verringert; (-) schwach verringert; 0 kein Einfluss.

Gen	Transkriptebene		Proteinebene	
	LPS induzierte Regulation	Einfluss der MK2 Defizienz	LPS induzierte Regulation	Einfluss der MK2 Defizienz
α2M	↑↑	–	↑↑	0
APCS	↑↑	0	↑↑	0
CCL11	↑	-	↑	0
CCL5	↑	0	↑↑	0
CRP	↑↑	0	↑↑	0
CSF1	↑	0	↑	0
HP	↑	0	↑	0
IL-13	Ø	0	Ø	0
IL-1β	↑	–	↑	0
IL-2	Ø	0	Ø	0
CCL4	↑	-	↑	(-)
CXCL10	↑	0	↑	(-)
CCL2	↑	0	↑↑	–
CCL3	↑	-	↑↑	–
CXCL2	↑	-	↑	–
IFNβ	↑	0	↑	–
IFNγ	↑	0	↑	–
IL-10	↑	(-)	↑	–
IL-6	↑	-	↑↑	–
LIF	↑	0	↑↑	–
TNFα	↑	0	↑↑	–

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.2:** Liste der Analyte, deren LPS abhängige Regulation und deren MK2 Abhängigkeit in der vorliegenden Arbeit auf Ebene der Transkripte untersucht wurde. LPS abhängige Regulation:  $\uparrow\uparrow$  stark induziert,  $\uparrow$  induziert,  $\downarrow\downarrow$  stark supprimiert,  $\downarrow$  supprimiert,  $\emptyset$  keine; Einfluss der MK2 Deletion auf die LPS vermittelte Regulation:  $++$  stark verstärkt;  $+$  verstärkt;  $(+)$  schwach verstärkt;  $-$  stark verringert;  $-$  verringert;  $(-)$  schwach verringert;  $0$  kein Einfluss.

Gen	Transkriptebene		Gen	Transkriptebene	
	LPS induzierte Regulation	Einfluss der MK2 Defizienz		LPS induzierte Regulation	Einfluss der MK2 Defizienz
C3	$\uparrow$	0	Mrc1	$\downarrow$	0
C4b	$\uparrow$	0	Nrg1	$\uparrow$	0
CCR2	$\emptyset$	0	Orm1	$\uparrow$	0
CCR3	$\emptyset$	0	Osmr	$\uparrow$	0
CCR5	$\emptyset$	0	Pf4	$\emptyset$	0
CD69	$\uparrow$	0	Pglyrp1	$\emptyset$	0
CD86	$\uparrow$	0	Plat	$\emptyset$	0
Csf2	$\emptyset$	0	Plg	$\emptyset$	0
Cx3cl1	$\emptyset$	0	Saa1	$\uparrow$	0
CXCL1	$\uparrow$	0	Saa2	$\uparrow$	0
CXCL11	$\uparrow$	0	Saa3	$\uparrow$	0
CXCL5	$\uparrow$	0	Serpina11	$\emptyset$	0
CXCR1	$\emptyset$	0	Stmn4	$\emptyset$	0
CXCR2	$\uparrow$	0	Tgfb1	$\uparrow$	0
Egf	$\emptyset$	0	Tnfrsf1b	$\uparrow$	0
Egfr	$\emptyset$	0	Vegfa	$\emptyset$	0
Fga	$\uparrow\uparrow$	0	CCL7	$\uparrow$	-
Fgb	$\uparrow\uparrow$	0	CCL8	$\uparrow$	-
Fgg	$\uparrow\uparrow$	0	CXCL12	$\downarrow$	-
Hgf	$\downarrow$	0	INF $\alpha$ 2	$\uparrow$	-
Hpx	$\uparrow$	0	IL-10ra	$\uparrow$	-
INF $\alpha$ 1	$\emptyset$	0	IL-12a	$\uparrow$	-
INF $\alpha$ r1	$\uparrow$	0	IL-1a	$\uparrow$	-
IL-10rb	$\uparrow$	0	Ltb	$\uparrow$	-
IL-11	$\emptyset$	0	Osm	$\uparrow$	-
IL-12b	$\uparrow$	0	CXCL3	$\uparrow$	-
IL-17a	$\emptyset$	0	IL-33	$\uparrow$	-
IL-1rn	$\uparrow$	0	IL-19	$\uparrow$	(-)
IL-20ra	$\emptyset$	0	Serpina3g	$\uparrow$	(-)
IL-20rb	$\emptyset$	0	Tnfrsf1a	$\uparrow$	(-)
IL-28b	$\emptyset$	0	CCL9	$\uparrow$	(+)
IL-4	$\emptyset$	0	Serpina5	$\uparrow$	(+)
IL-6st	$\uparrow$	0	CD14	$\uparrow\uparrow$	+
Lbp	$\uparrow$	0	Csf1r	$\downarrow$	+
Lta	$\emptyset$	0	Hamp	$\uparrow$	+
Met	$\downarrow$	0			

Im folgenden werden die zentralen Ergebnisse dieser Studie eingehender beleuchtet.

### 3.1 Einfluss der MK2 auf die LPS induzierte Expression von Entzündungsmediatoren in der Leber

Die der p38<sup>MAPK</sup> nachgeschaltete MK2 wurde in einer Reihe von Studien als essenzielles intrazelluläres Molekül der entzündungsspezifischen Signaltransduktion beschrieben, das in verschiedenen Entzündungsmodellen ein zentraler Regulator verschiedener Entzündungsmediatoren wie IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ist [107,116,123–125]. Die Sezernierung dieser Mediatoren durch Lebermakrophagen gilt aufgrund der engen räumlichen Vergesellschaftung mit den, für die Expression der APP verantwortlichen Hepatozyten, als wesentliches Signal in der Orchestrierung der hepatischen APR [39]. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher den Einfluss der MK2 auf die intrahepatische Expression von Entzündungsmediatoren während einer LPS induzierten APR in ihrer zeitlichen Abfolge und der erreichten Expressionslevel zu charakterisieren.

#### 3.1.1 MK2 reguliert in der Leber die LPS induzierte Expression der IL-6 Typ Zytokine IL-6, LIF und OSM sowie die basale Expression des OSMR.

Es ist bekannt, dass IL-6 in verschiedenen Entzündungsmodellen *in vitro* und *in vivo* MK2 abhängig reguliert wird [107,116,123,124,126]. Um zu klären, ob diese Abhängigkeit für IL-6 und andere IL-6 Typ Zytokine auch in der Leber besteht, wurde die Expression dieser Zytokine intrahepatisch auf Transkriptlevel und systemisch auf Ebene der Serum Proteinkonzentration in Abhängigkeit der LPS Dosis in Wildtyp (WT) Mäusen und in MK2<sup>-/-</sup> sowie MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren untersucht.

Wie in Abb. 3.1A dargestellt, erfolgt die Induktion der Transkription von IL-6 nach der Stimulation mit LPS in allen Gruppen sehr schnell und erreicht im WT unabhängig von der LPS Dosis bereits nach 1h ihr Maximum. Nach 24h wird in allen Gruppen wieder die basale, niedrige Expressionsrate erreicht. Für Kontrolltiere konnte keine Induktion von IL-6 gemessen werden. Das Expressionslevel in behandelten Tieren ist zu frühen Zeitpunkten bis 4h sensitiv gegenüber der LPS Dosis und liegt in der Gruppe der niedrig dosiert behandelten WT Tiere bei etwa 50% der hoch dosiert behandelten Mäuse. Auch in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen sind die Transkriptlevel im frühen Verlauf der IL-6 Expression bis 2h stark vermindert. Das Maximum ist in diesen Mäusen bereits nach 0,5h erreicht und liegt etwa bei 30% des Wertes der gleich behandelten WT Mäuse (1  $\mu$ g LPS / g KGW). Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde RNA aus Leberlysaten der hoch dosiert behandelten WT Mäuse und der MK2<sup>-/-</sup> Mäuse mittels RT-qPCR mit IL-6 spezifischen

### 3 Ergebnisse

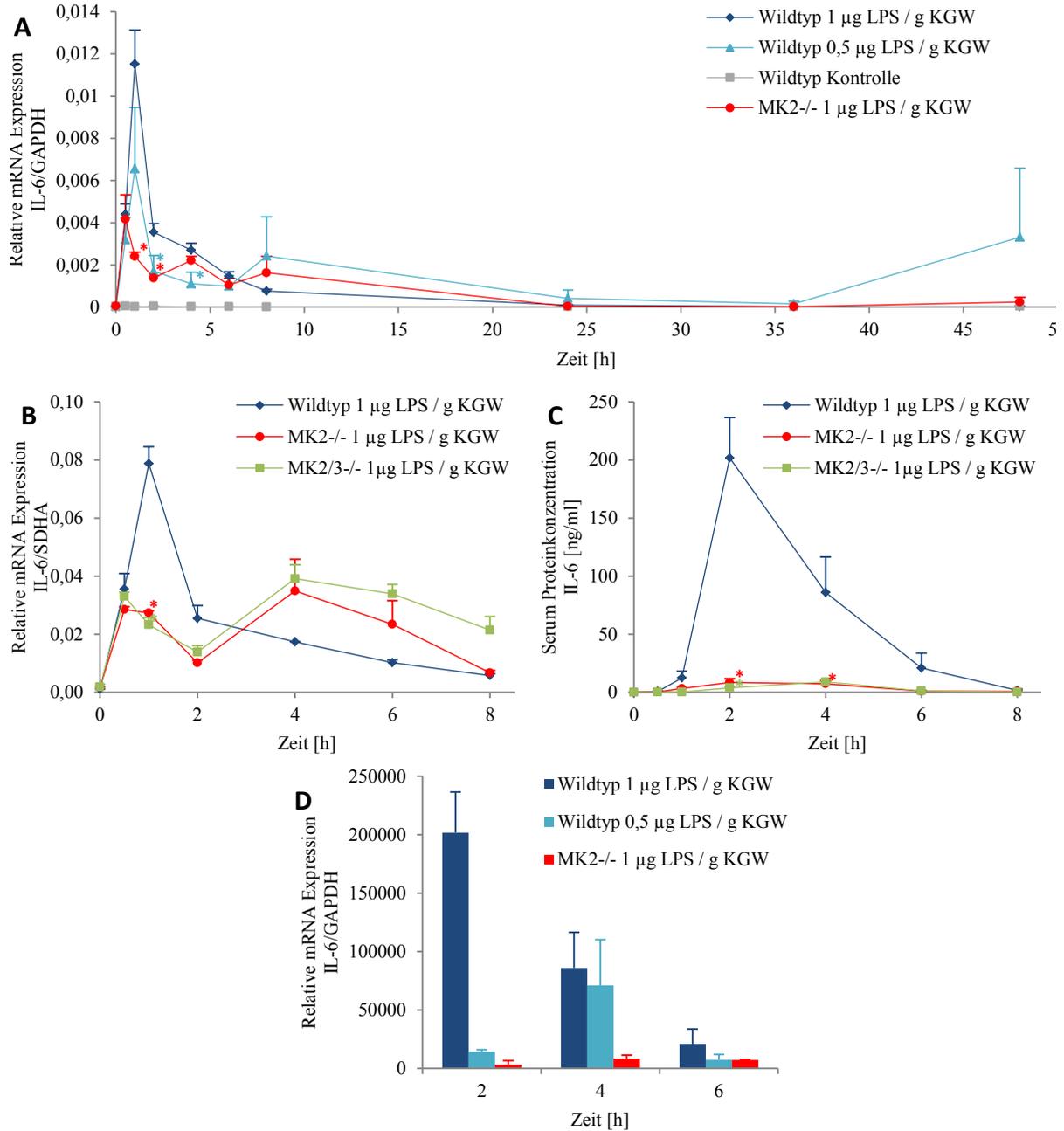
Primern analysiert. Zum Vergleich wurden MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse in diese Untersuchung mit aufgenommen, um den Einfluss der MK3 auf die residuale LPS induzierte IL-6 Expression in MK2<sup>-/-</sup> Tieren zu untersuchen (Abb. 3.1B). Die Ergebnisse aus der Fluidigm Analyse für WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse konnten in diesem Versuch bestätigt werden. Der Verlauf und die Expression von IL-6 in den Lebern von MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen ist vergleichbar mit den entsprechenden Werten in MK2<sup>-/-</sup> Tieren, sodass diese Daten darauf hinweisen, dass die verbleibende IL-6 Expression in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen unabhängig von der MK3 verläuft.

In der Serum Proteinkonzentration äußert sich der Einfluss der MK2 noch deutlicher (Abb. 3.1C). 2h nach der Stimulation erreicht die IL-6 Serum Proteinkonzentration in WT Tieren etwa 200 ng/ml. Danach fällt die Konzentration schnell wieder ab, liegt jedoch nach 8h noch in der Größenordnung von 1 ng/ml. Hingegen verläuft die Expression in niedrig dosiert behandelten WT Mäusen langsamer und schwächer, erreicht nach 4h aber das Niveau der hoch dosiert behandelten WT Mäuse (Abb. 3.1D). In MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren ist die Expression von IL-6 über den gesamten untersuchten Zeitraum stark eingeschränkt, sodass die Serum Proteinkonzentration in diesen Mäusen 9 ng/ml nicht überschreitet (Abb. 3.1C). Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass die beschriebene MK2 abhängige Regulation von IL-6 auch in der Leber während der LPS induzierten APR einen wichtigen Regulationsmechanismus darstellt.

Neben IL-6 spielt auch der Leukämie hemmende Faktor (*leukemia inhibitory factor*, LIF) als Mitglied der IL-6 Familie und als potenter Aktivator STAT3 abhängiger Signalübertragung eine Rolle in der hepatischen APR [127]. Um zu überprüfen, inwieweit die MK2 auch in die Expression von LIF involviert ist, wurde die Expression dieses IL-6 Typ Zytokins in der Leber und systemisch im Serum LPS behandelte Tiere untersucht (Abb. 3.2). Während in Kontrolltieren keine Änderung der LIF Expression gemessen werden kann, erreicht die Induktion von LIF in LPS behandelten Mäusen nach 1h ihr Maximum, fällt dann innerhalb von 3h stark ab und erreicht fast basale Transkriptlevel (Abb. 3.2A). Daran schließt sich eine zweite Welle der LIF Transkription an, die 6h nach LPS Behandlung ihr Maximum erreicht und bis 24h wieder abklingt. Diese Kinetik ist für alle drei Behandlungsgruppen gleichermaßen zu erkennen. Unterschiede im Verlauf der LIF Expression ergeben sich zwischen den Gruppen vor allem während der ersten Welle der Transkription, wo die Transkriptlevel in MK2<sup>-/-</sup> und niedrig dosiert behandelten WT Mäusen niedriger liegen. Diese Unterschiede erreichen jedoch keine statistische Signifikanz.

Obwohl auf Transkriptebeine nur geringfügige Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten sind, ist auf Proteinebene eine deutlich abgeschwächte Expression von LIF im Serum von MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren messbar (Abb. 3.2B). In WT Mäusen steigt die LIF Konzentration im Serum innerhalb von 6h nach Behandlung auf 500 pg/ml an,

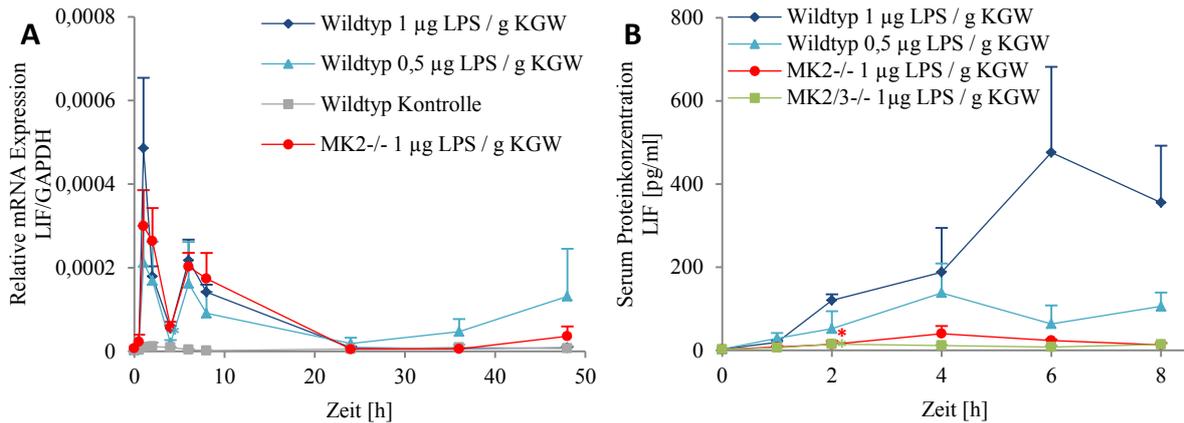
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1: MK2 ist essenziell für die LPS induzierte Expression von IL-6 in der Leber und reguliert systemisch die Serum Proteinkonzentration von IL-6.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A) Fluidigm qPCR und (B) RT-qPCR mit IL-6 spezifischen Primern analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM). (C, D) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n=1$  für MK2<sup>3-/-</sup> 4h,  $n=2$  für WT 0,5 µg LPS / g KGW 2h,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).

### 3 Ergebnisse



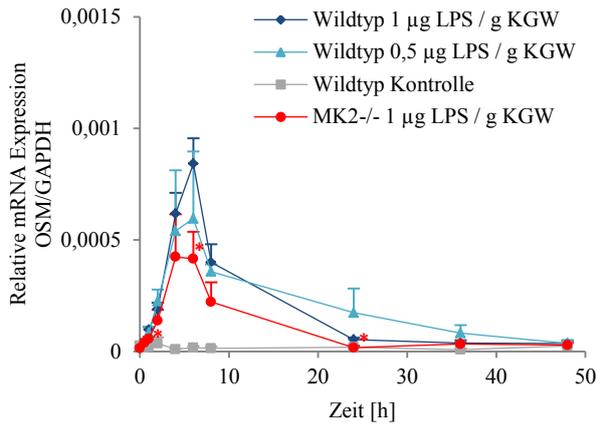
**Abbildung 3.2: MK2 ist essenziell für den ungehemmten LPS induzierten Anstieg der LIF Serum Proteinkonzentration.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. (A) Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM). (B) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n=2$  für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h, WT 0,5 µg LPS / g KGW,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).

fällt dann leicht ab und ist auch nach 8h noch auf hohem Niveau messbar. Diese hohen Konzentrationen werden in niedrig dosiert behandelten Tieren und in MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren nicht erreicht. Diese Daten lassen auf eine post transkriptionelle Regulation von LIF schließen, die MK2 abhängig reguliert wird, da sich die Unterschiede in der LIF Expression erst auf Proteinebene manifestieren.

Auch OSM wurde im Zusammenhang mit der Regulation der APR in verschiedenen Studien als wichtiger Mediator beschrieben [128–130]. Zudem konnte in Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe eine MK2 abhängige Regulation von OSM in Zellkultursystemen nachgewiesen werden [131], weshalb die Expression von OSM in der Leber nach LPS Stimulation auch Gegenstand dieser Arbeit war. Das OSM Transkriptlevel steigt in LPS behandelten Tieren über einen Zeitraum von 6h in der Leber an und erreicht dann ein Maximum. Danach fällt die Expression wieder ab und erreicht nach 24h das basale Expressionslevel. Das maximale Transkriptlevel ist in niedrig dosiert behandelten WT Mäusen vermindert, dieser Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. In MK2<sup>-/-</sup> Mäusen ist das OSM Transkriptlevel in der Leber bereits nach 2h signifikant reduziert und erreicht im Maximum nur die Hälfte der im WT gemessenen Werte.

In einer aktuellen Studie konnte ein Einfluss der MK2 auf die Expression des OSM Rezeptors (OSMR) in Zellkultursystemen nachgewiesen werden [131]. Um den Einfluss der MK2 auf die basale OSMR Expression zu untersuchen, wurde das Transkriptlevel in



**Abbildung 3.3: MK2 beeinflusst die LPS induzierte OSM Expression in der Leber.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ).

Leberlysaten unbehandelter Mäuse mittels Fluidigm qPCR analysiert (Abb. 3.4A). Diese Untersuchung zeigt, dass die Expression des OSMR in den Lebern von MK2<sup>-/-</sup> Tieren signifikant gegenüber WT Tieren erhöht ist. Dies deutet auf eine *in vivo* Relevanz der in der Zellkultur beobachteten MK2 abhängigen Regulation des OSMR hin.

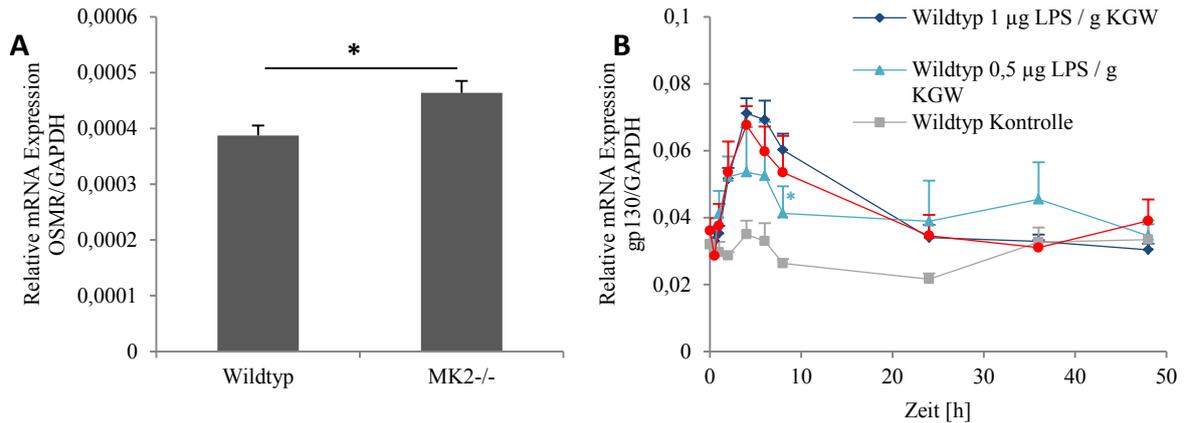
Neben OSMR konnte auch für die Rezeptoruntereinheit gp130, die für alle IL-6 Typ Zytokine zur Signaltransduktion genutzt wird, in Zellkulturexperimenten eine MK2 abhängige Regulation gezeigt werden [101]. Um zu untersuchen ob diese MK2 Abhängigkeit in der LPS induzierten APR intrahepatisch relevant ist, wurden die Transkriptlevel von gp130 in den Leberlysaten von LPS behandelten Mäusen analysiert (Abb. 3.4B). Die gp130 Expression wird durch LPS induziert und erreicht nach 4h ihr Maximum. Die Stärke der Expression ist dabei abhängig von der Konzentration, nicht aber vom Genotyp der Tiere. Dies deutet darauf hin, dass die MK2 für die Regulation der LPS induzierten gp130 Expression in der Leber auf transkriptioneller Ebene keinen Einfluss hat.

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass MK2 sowohl auf Ebene der Liganden, als auch auf Ebene der Rezeptoren Einfluss auf die IL-6 Typ Zytokin vermittelte Signaltransduktion nimmt, indem die maximale Expression der Familienmitglieder IL-6, LIF und OSM steuert und die Verfügbarkeit von OSMR begrenzt.

### 3.1.2 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte intrahepatische STAT3 Aktivierung

Die Familienmitglieder der IL-6 Zytokine sind potente Aktivatoren von STAT3 das für die Expression von APPs in der Leber eine herausragende Rolle spielt. Auch im Rahmen der Sepsis galten diese Zytokine lange Zeit als zentrale STAT3 Aktivatoren, weshalb dieser Transkriptionsfaktor zunächst als Akut-Phase responsives Element bezeichnet wurde. Um zu untersuchen, ob sich die verminderte Expression von IL-6 Typ Zytokinen in MK2<sup>-/-</sup> Tieren auch auf die STAT3 Phosphorylierung auswirkt wurde die Aktivie-

### 3 Ergebnisse



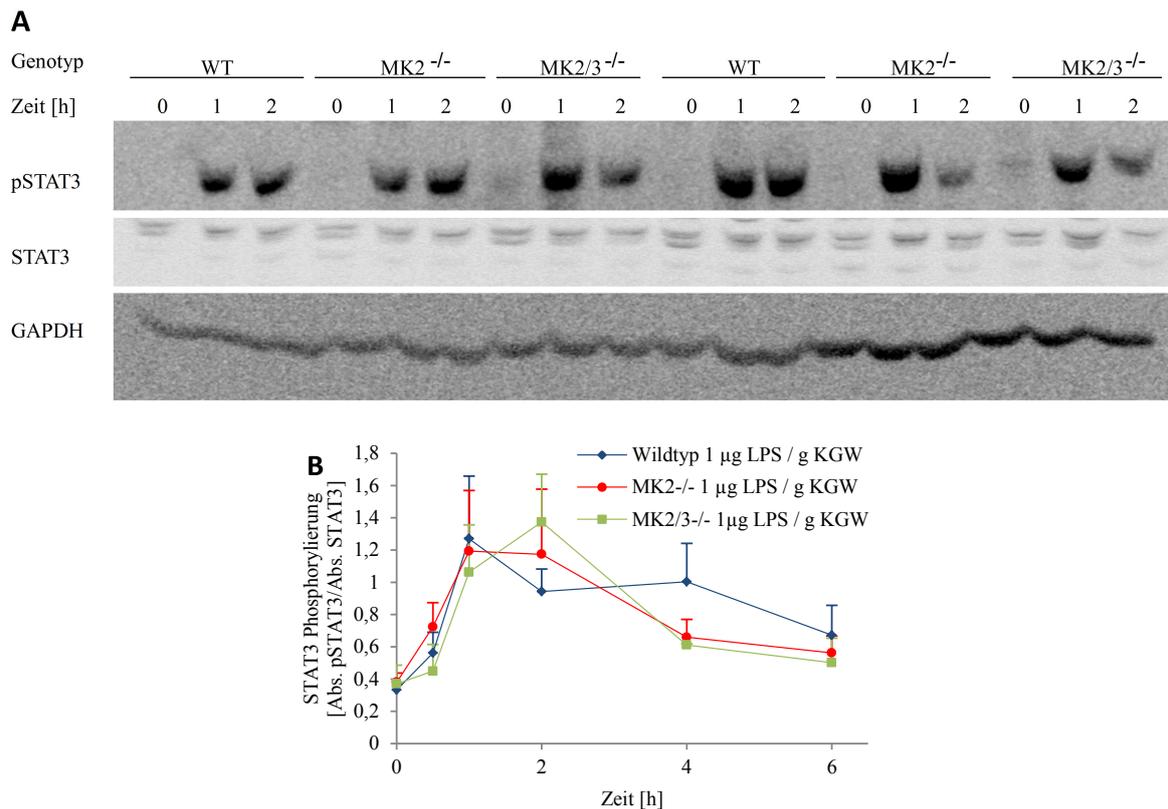
**Abbildung 3.4: MK2 beeinflusst basal die Expression von OSMR, hat aber keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von gp130 in der Leber.**

(A) Aus der Leber unbehandelter WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, RNA gewonnen und mittels Fluidigm qPCR analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm SEM$ ). (B) WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm SEM$ ).

zung von STAT3 in den Lebern LPS behandelte WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen bestimmt (Abb. 3.5).

Die Phosphorylierung von STAT3 nimmt in den Lebern LPS behandelte Tiere unabhängig vom Genotyp in gleicher Weise zu, erreicht nach 1h bis 2h ein für alle Gruppen vergleichbares Maximum und nimmt dann wieder ab, bleibt aber bis zum Ende des beobachteten Zeitraums von 6h erhöht (Abb. 3.5B). Die vergleichbaren Level der STAT3 Phosphorylierung zu den Zeitpunkten der maximalen Aktivierung bei 1h und 2h konnte im Westernblot bestätigt werden (Abb. 3.5A). Während es nach der Behandlung mit LPS zu einer gesteigerten Aktivierung von STAT3 in der Leber kommt, kann für das Gesamtniveau von STAT3 auf Proteinebene keine Veränderung gemessen werden (Abb. 3.5A).

Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass die STAT3 Aktivierung in MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren nicht differenziell reguliert ist und dass die verminderte Expression der IL-6 Typ Zytokine nicht in einer reduzierten Aktivierung von STAT3 resultiert.



**Abbildung 3.5: Normale STAT3 Aktivierung in Lebergewebe LPS behandelter MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere wurden mit 1 µg LPS / g KGW für die angegebenen Zeiträume behandelt. Nach Versuchsende wurden aus den blutleer perfundierten Lebern, wie im Material und Methodenteil beschrieben, Proteinlysate hergestellt. (A) Lysate wurden in gleicher Proteinnmenge (80 µg / Probe) mittels Western-Blot untersucht. Mit spezifischen Antikörpern wurde phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3), totales STAT3 (STAT3) und GAPDH (Beladungskontrolle) nachgewiesen. (B) Je 2 µg / Probe wurden mittels STAT3 und pSTAT3 spezifischem ELISA analysiert. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der Absorptionswerte (450nm) für pSTAT3 normalisiert gegen STAT3 (n≥3).

### 3.1.3 MK2 reguliert in der Leber die LPS induzierte Expression der IL-1 Typ Zytokine IL-1-beta, IL-1-alpha und IL-33, hat aber systemisch keinen Einfluss auf die IL-1-beta Serum Proteinkonzentration.

In verschiedenen Studien wurde IL-1β als MK2 abhängiges Zytokin beschrieben [107, 116, 125]. Um zu untersuchen inwieweit diese Abhängigkeit in der LPS induzierten hepatischen APR eine Rolle spielt, wurde das Expressionsprofil von IL-1β in Leberlysaten LPS behandelter WT Tiere in Abhängigkeit der LPS Dosis charakterisiert und mit Daten aus MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren verglichen (Abb. 3.6A und B).

In Kontrolltieren ist die Expression von IL-1β nicht beeinflusst. Das Transkriptlevel von

### 3 Ergebnisse

IL-1 $\beta$  steigt nach Stimulation mit LPS jedoch unabhängig von der Dosis schnell an, erreicht zwischen 0,5h und 1h maximale Werte, geht dann langsam wieder zurück und erreicht nach 24h wieder das ursprüngliche Level. Das erreichte Niveau der IL-1 $\beta$  Expression ist dosisabhängig und erreicht in niedrig dosiert behandelten WT Tieren etwa 30% der entsprechenden Werte hoch dosiert behandelter Mäuse. Auch in MK2<sup>-/-</sup> Tieren ist das erreichte Transkriptlevel im Vergleich zu den gleich behandelten WT Mäusen signifikant reduziert.

Zur Verifikation dieser Daten wurden RNA Proben aus Lebergewebe von WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren mit IL-1 $\beta$  spezifischen Primern mittels RT-qPCR untersucht (Abb. 3.6B). Die verminderte IL-1 $\beta$  Induktion in MK2<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu WT Mäusen konnte für frühe Zeitpunkte in diesem Versuch bestätigt werden, obwohl die Reduktion in dieser Analyse weniger stark ausgeprägt ist. In MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen kann keine signifikante Reduktion der LPS induzierten IL-1 $\beta$  Expression gemessen werden.

Die RNA Daten wiesen auf einen Einfluss der MK2 und der LPS Dosis auf die Expressionsstärke von IL-1 $\beta$  in der Leber hin, jedoch kann systemisch auf Ebene der Serum Proteinkonzentration keine differenzielle Expression zwischen den Gruppen gemessen werden (Abb. 3.6C). Alle Gruppen erreichen zwischen 1h und 4h eine maximale Konzentration von etwa 50 pg/ml. Danach fällt die Konzentration leicht ab und ist auch 8h nach LPS Injektion noch mit etwa 25 pg/ml messbar.

Neben IL-1 $\beta$  wurde bislang kein weiteres Mitglied der IL-1 Typ Zytokine als MK2 abhängig beschrieben. Um den Einfluss von MK2 auf die Familie der IL-1 Typ Familie zu untersuchen, wurde neben IL-1 $\beta$  auch die LPS induzierte Expression von IL-1 $\alpha$  und des kürzlich identifizierte Mitglied IL-33 in Leberlysaten analysiert (Abb. 3.7). Wie für IL-1 $\beta$  wird die Expression von IL-1 $\alpha$  sehr schnell induziert (Abb. 3.7C). Das maximale Expressionslevel wird zwischen 0,5h und 1h nach LPS Stimulation erreicht und kehrt nach 24h wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück. Dabei sind die erreichten Transkriptionslevel sowohl abhängig von der MK2, als auch von der LPS Dosis. So ist in MK2<sup>-/-</sup> und niedrig dosiert behandelten WT Tieren, die maximale Expression von IL-1 $\alpha$  um etwa 50% im Vergleich zu den hoch dosiert behandelten WT Mäusen reduziert. In den mit NaCl behandelten Kontrolltieren kann keine Induktion von IL-1 $\alpha$  gemessen werden.

Die Kinetik der IL-33 Expression nach LPS Stimulation erfolgt deutlich langsamer, als für die beiden anderen analysierten IL-1 Typ Zytokine und erreicht erst nach 4h bis 8h maximale Level (Abb. 3.7A und B). Die erreichten Transkriptlevel in niedrig dosiert behandelten Tieren sind im Vergleich zur hoch dosiert behandelten Gruppe weniger stark induziert, dieser Unterschied erreicht aber keine statistische Signifikanz (Abb. 3.7A). Dagegen geht die LPS induzierte IL-33 Expression in MK2<sup>-/-</sup> (Abb. 3.7A und B) und MK2/3<sup>-/-</sup> (Abb. 3.7B) deutlicher zurück, sodass diese Daten einen Hinweis auf die MK2

abhängige Regulation von IL-33 im Kontext der hepatischen APR liefern.

Insgesamt weisen diese Daten auf eine Beteiligung der MK2 in der transkriptionellen Regulation der LPS induzierten Expression der Mitglieder der Familie der IL-1 Typ Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  und IL-33 in der Leber hin.

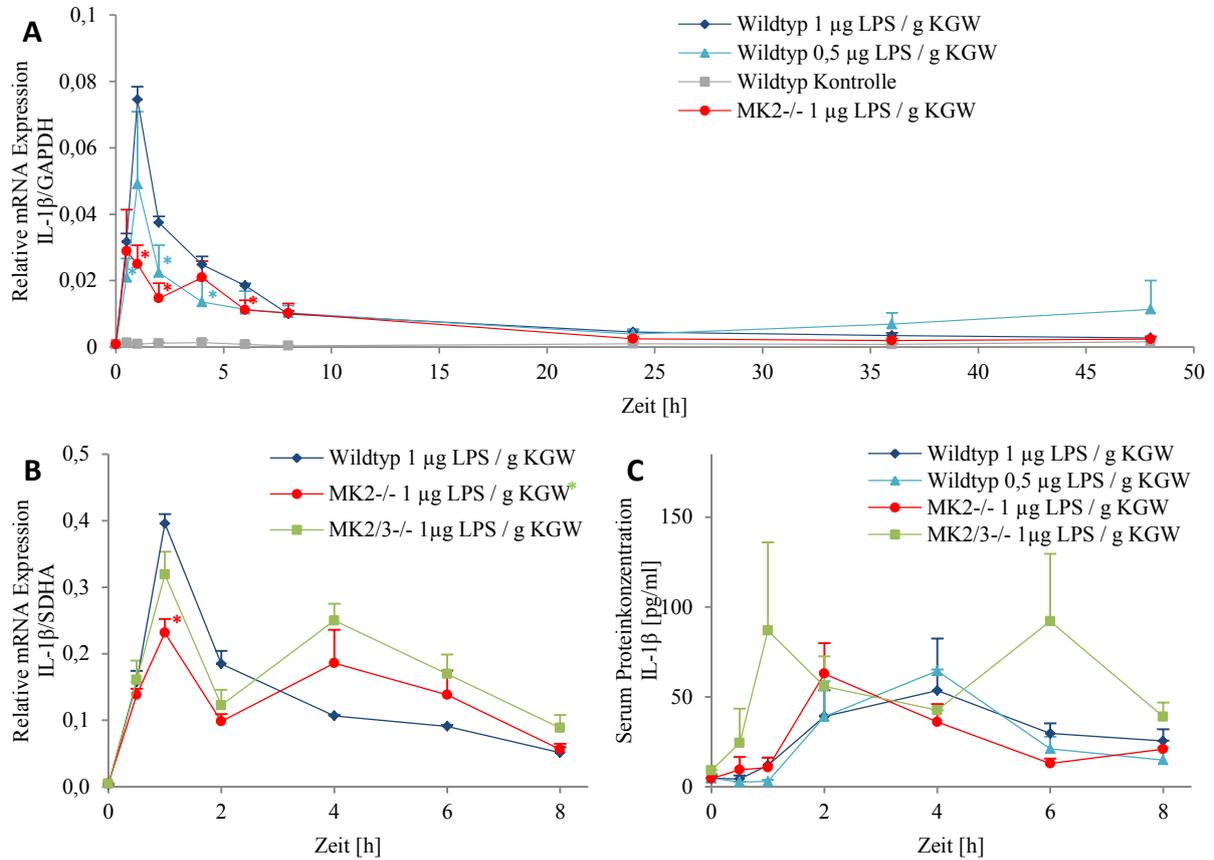
#### **3.1.4 MK2 ist für die Expression von TNF-alpha in der Leber essenziell und reguliert die Expression von LTB und TNFRSF1.**

Für TNF $\alpha$  wurde in verschiedenen Studien *in vivo* und *in vitro* eine MK2 Abhängigkeit gezeigt [107,116]. Diese Abhängigkeit wurde bislang jedoch nicht spezifisch für die Leber gezeigt, sodass die Analyse der Expression von TNF $\alpha$  Gegenstand dieser Studie war. Dazu wurden die Transkriptlevel für TNF $\alpha$  in Leberlysaten LPS behandelter WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse bestimmt (Abb. 3.8A und B). Die Expression von TNF $\alpha$  wird nach LPS Injektion sehr schnell induziert, erreicht zwischen 0,5h und 1h ihr Maximum in allen Gruppen und erreicht nach 48h wieder das basale Expressionsniveau (Abb. 3.8A). In Kontrolltieren kommt es zu keiner Induktion. Dabei ist die Expression in niedrig dosiert behandelten WT Tieren auf RNA Ebene signifikant reduziert und erreicht etwa 60% der Werte, die in hoch dosiert behandelten WT Tieren erreicht werden. Für MK2<sup>-/-</sup> Tiere ist das Expressionsprofil in Stärke und Dauer vergleichbar mit der Situation in WT Mäusen. Diese Daten konnten für Zeitpunkte bis 8h mittels RT-qPCR verifiziert werden (Abb. 3.8B). Der Expressionsverlauf in MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren ist vergleichbar mit der Situation in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen.

Demgegenüber ist die TNF $\alpha$  Expression auf Proteinebene im Serum der Tiere für MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> deutlich vermindert (Abb. 3.8C). Diese Beobachtung deckt sich dabei mit anderen Studien, die einen posttranskriptionellen Mechanismus der MK2/3 abhängigen TNF $\alpha$  Expression zeigen [106,116]. Die Serum Proteinkonzentrationen für TNF $\alpha$ , die in Abbildung 3.8C dargestellt sind, zeigen einen schnellen Anstieg der TNF $\alpha$  Konzentration in WT und MK2<sup>-/-</sup> Tieren, der nach 1h ein Maximum erreicht. Die Expression ist dabei in gering dosiert behandelten WT Tieren und in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen gleichermaßen um etwa 50% reduziert. In MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren ist die maximale Serum Proteinkonzentration noch weiter reduziert.

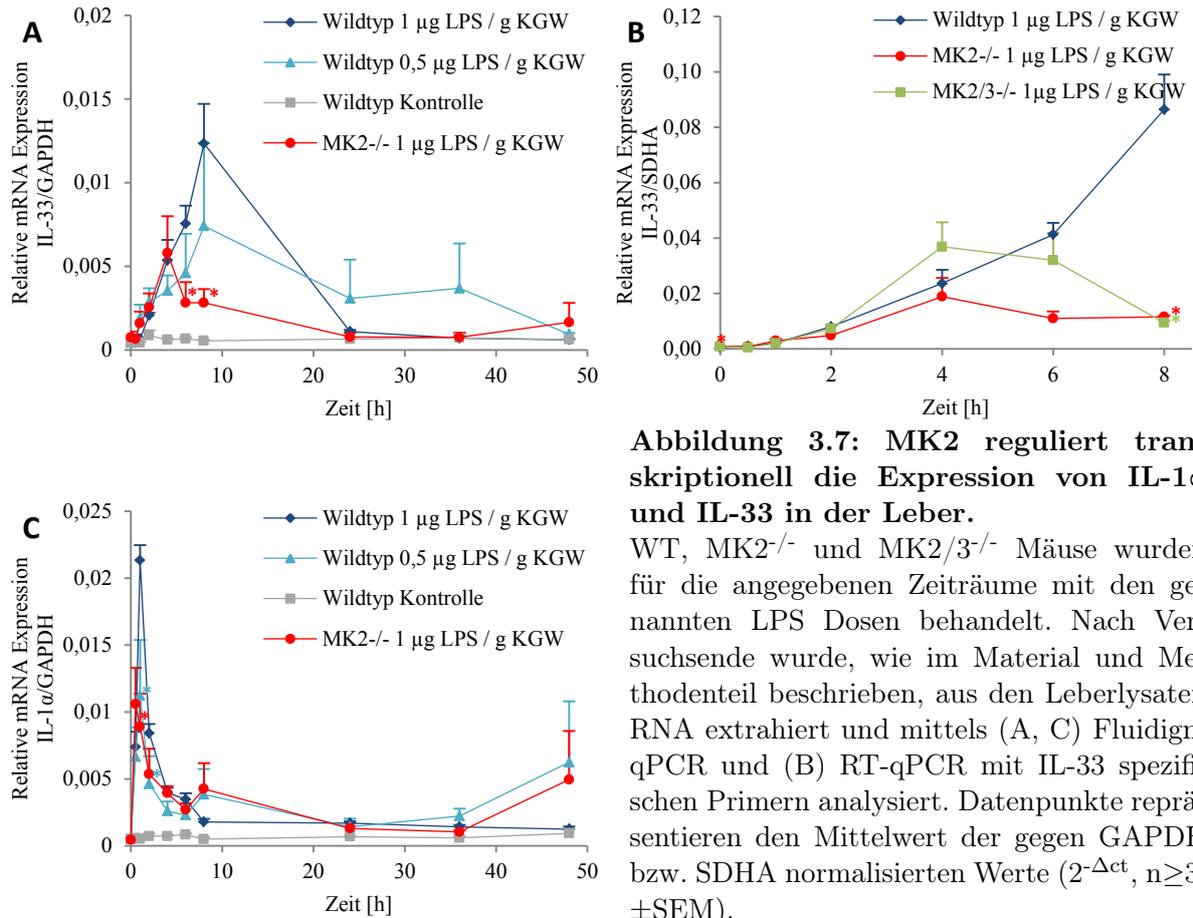
Neben TNF $\alpha$  wurde auch die Expression von Lymphotoxin alpha (LTA) und beta (LTB) in dieser Arbeit untersucht. Während für die Expression von LTA weder eine Abhängigkeit von der LPS Dosis, noch von der MK2 ermittelt werden konnte (Daten nicht gezeigt), ist die späte Phase der LTB Expression MK2 abhängig reguliert (Abb. 3.9). Die Behandlung mit NaCl in den Kontrolltieren hat dabei keinen Einfluss auf die Expression von LTB. Die Expression von LTB steigt nach der Stimulation mit LPS in der

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.6: MK2 reguliert transkriptionell die Expression von IL-1 $\beta$  in der Leber, hat aber keinen Einfluss auf die systemische Serum Proteinkonzentration.** WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A) Fluidigm qPCR und (B) RT-qPCR mit IL-1 $\beta$  spezifischen Primern analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ , n=2 für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h, n $\geq$ 3 sonst,  $\pm$ SEM). (C) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurden mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar (n=2 für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h, WT 0,50,5  $\mu$ g LPS / g KGW, n $\geq$ 3 sonst,  $\pm$ SEM).

### 3 Ergebnisse



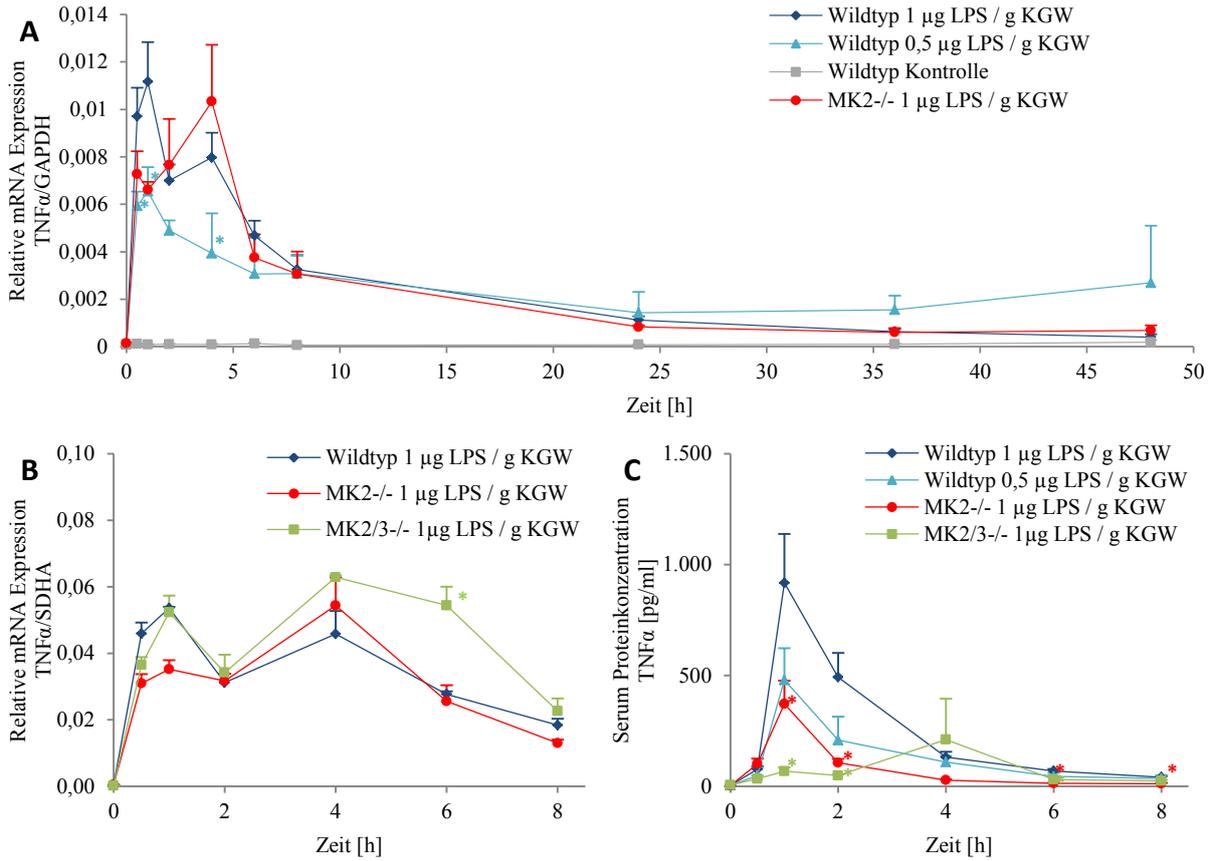
**Abbildung 3.7: MK2 reguliert transkriptionell die Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-33 in der Leber.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A, C) Fluidigm qPCR und (B) RT-qPCR mit IL-33 spezifischen Primern analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta\text{ct}}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm \text{SEM}$ ).

Leber an und erreicht nach 2h bis 4h ihr Maximum. Dabei ist die Kinetik in gering dosiert behandelten und MK2<sup>-/-</sup> Mäusen schneller als in hoch dosiert behandelten WT. Während die Expression in diesen Gruppen bereits nach 2h wieder deutlich absinkt, ist die Expression in hoch dosiert behandelten WT Mäusen deutlich länger und fällt erst nach 4h ab, sodass diese Mäuse deutlich länger LTB exprimieren und dabei höhere Transkriptlevel erreichen.

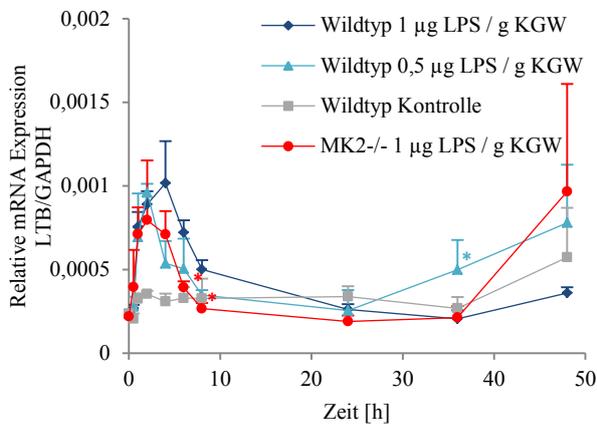
Um Hinweise auf die Verfügbarkeit der Rezeptoren für TNF Typ Zytokine zu erhalten, wurde die LPS induzierte Expression der TNF Rezeptor Superfamilienmitglieder (TNFRSF) 1A und 1B in den Lebern der LPS behandelten Tiere auf RNA Ebene untersucht. Die Transkription von TNFRSF1B zeigt dabei auf sehr geringem Expressionsniveau keinen Einfluss der Konzentration oder des Genotyps (Daten nicht gezeigt). Für TNFRSF1A ändert sich die Expression in den Kontrolltieren nicht, steigt aber in allen LPS behandelten Tieren langsam an (Abb. 3.10). In WT Tieren wird das maximale Expressionslevel dosisunabhängig nach 6h erreicht und fällt dann bis 24h wieder auf ein niedrigeres Niveau. Dabei sind die erreichten Transkriptlevel in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen vergleichbar. Im MK2<sup>-/-</sup> Tieren wird die maximale Expression dagegen bereits nach 4h erreicht, bevor das Transkriptlevel in den Lebern wieder abnimmt, sodass die späte Expression von TNFRSF1A in MK2<sup>-/-</sup> Tieren nicht aufrecht erhalten

### 3 Ergebnisse



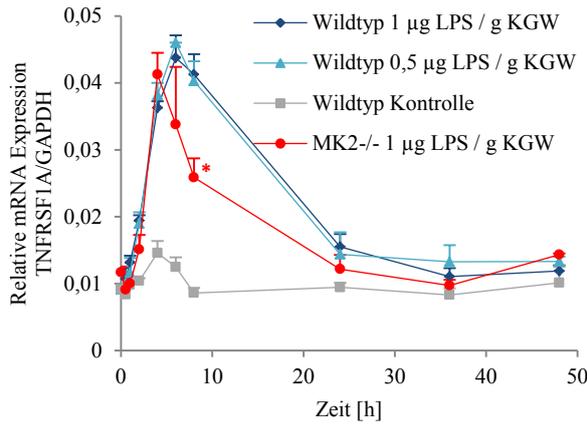
**Abbildung 3.8: MK2 ist für die Expression von TNF $\alpha$  auf Ebene der Serum Proteinkonzentration essenziell.**

WT, MK2 $^{-/-}$  und MK2/3 $^{-/-}$  Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A) Fluidigm qPCR und (B) RT-qPCR mit Tnf $\alpha$  spezifischen Primern analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ). (C) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n=2$  für MK2/3 $^{-/-}$  4h, WT 0,5,0,5  $\mu$ g LPS / g KGW,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).



**Abbildung 3.9: MK2 beeinflusst die LPS induzierte LTB Expression in der Leber.**

WT und MK2 $^{-/-}$  Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).



**Abbildung 3.10: MK2 beeinflusst die Kinetik der LPS induzierten TNFRSF1A Expression in der Leber.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n=2$  für MK2<sup>-/-</sup> und WT 0,5 µg LPS / g KGW,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).

wird.

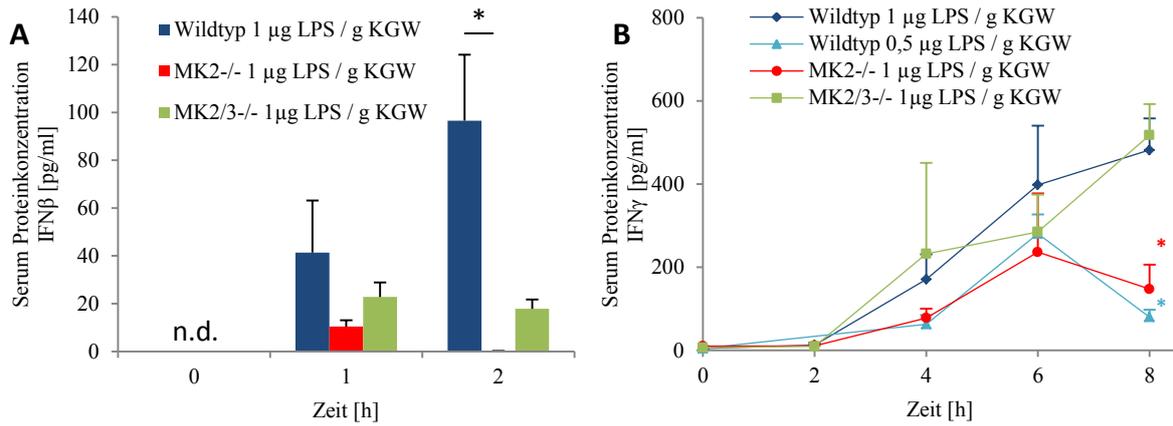
Zusammen deuten diese Daten darauf hin, dass die Expression der TNF Familienmitglieder TNF $\alpha$  und LTB nach LPS Behandlung durch MK2 reguliert wird, wobei der Einfluss für TNF $\alpha$  posttranskriptioneller Natur ist, während LTB bereits auf Transkriptionsebene reguliert wird. Zusätzlich scheint MK2 für die uneingeschränkte LPS induzierte Expression von TNFRSF1A eine wichtige Rolle zu spielen.

### 3.1.5 MK2 und MK3 haben unterschiedliche Funktionen in der Regulation der LPS induzierten Interferon Expression.

Interferone (IFN) spielen vor allem in der viralen Immunantwort des Organismus eine Rolle, werden aber auch im Kontext bakterieller Infektionen exprimiert und sind dabei potente Stimulatoren verschiedener APPs [53, 132, 133]. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte bereits eine MK2/3 abhängige Regulation der Expression für IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  gezeigt werden [120, 134]. Inwieweit IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Entzündungsmodell MK2/3 abhängig reguliert werden, war Teil der Studie.

Die Konzentration von IFN $\beta$  wurde nach der Behandlung von WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen mit 1 µg LPS / g KGW im Serum der Tiere mittels ELISA gemessen (Abb. 3.11A). Messbare IFN $\beta$  Konzentrationen werden in den Tieren nur zwischen 1h und 2h nach LPS Injektion erreicht. Basal und zu späteren Zeitpunkten bleibt die Serum IFN $\beta$  Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze von 15,6 pg/ml. Die Konzentration in WT Tieren steigt in diesem Zeitraum an, während die Konzentration in MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen stagniert und in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen bereits nach 2h die Detektionsgrenze nicht mehr erreicht wird. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen einer in Makrophagen durchgeführten Studie, in der ein inhibitorischer Effekt der MK2 auf die MK3 vermittelte Suppression der IFN $\beta$  Expression beschrieben wird [120].

### 3 Ergebnisse



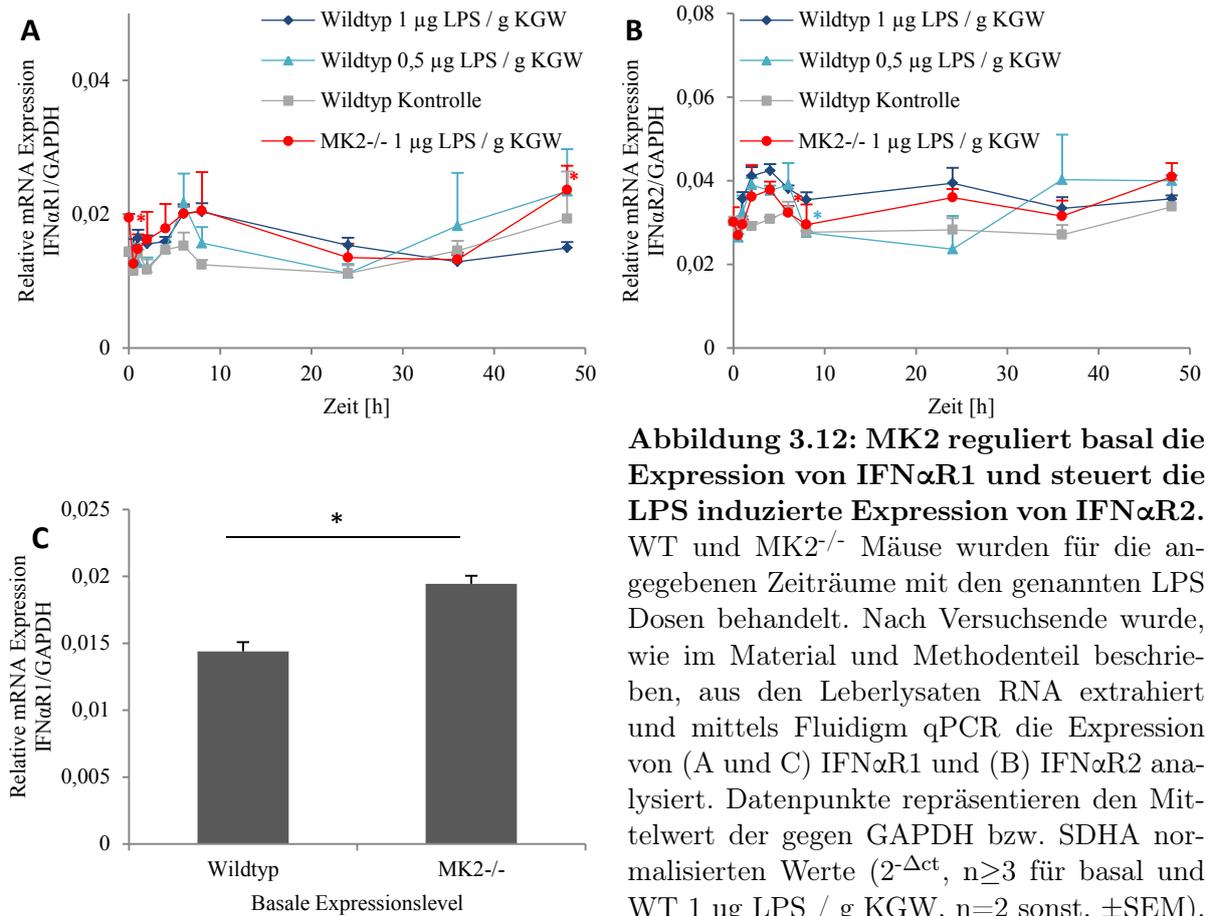
**Abbildung 3.11: MK2 und MK3 haben unterschiedlichen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  *in vivo*.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels (A) ELISA und (B) Luminex untersucht. Datenpunkte und Balkendiagramm stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar (n=2 für MK2/3<sup>-/-</sup> 2-4h, WT 0,5 µg LPS / g KGW, n $\geq$ 3 sonst,  $\pm$ SEM).

Ein ähnliches Bild der Regulation zeigt sich auch für IFN $\gamma$  (Abb. 3.11B). Die Konzentration von IFN $\gamma$  im Serum der Tiere nimmt in allen Gruppen nach 4h zu. Während die Expression in hoch dosiert behandelten WT Mäusen und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen dann über den gesamten beobachteten Zeitraum weiter ansteigt, fällt die Konzentration in gering dosiert behandelten WT Mäusen und MK2<sup>-/-</sup> Tieren nach 6h deutlich ab. Dies deutet auf eine dosissensitive Regulation von IFN $\gamma$  hin und deckt sich mit den Ergebnissen früherer Studien, die einen inhibitorischen Einfluss der MK3 auf die Expression von IFN $\gamma$  gezeigt haben [135].

Zusätzlich wurde auf Ebene der mRNA die Expression der Interferon Rezeptoren IFN $\alpha$ R1 und IFN $\alpha$ R2 untersucht, die einen heterodimeren Komplex bilden und so als Rezeptoren für Typ I Interferone wie IFN $\beta$  dienen [136] (Abb. 3.12). LPS induziert kommt es in der Leber zu einer sehr geringen Steigerung der Expression von IFN $\alpha$ R1 und IFN $\alpha$ R2 (Abb. 3.12B). Die Expression von IFN $\alpha$ R1 steigt über einen Zeitraum von 8h in allen behandelten Gruppen gleichermaßen an und fällt dann langsam wieder ab, sodass nach 36h wieder das basale Expressionslevel erreicht wird (Abb. 3.12A). Die Expression von IFN $\alpha$ R1 ist basal (Abb. 3.12C) und nach dem Rückgang der LPS induzierten Expression zum 48h Zeitpunkt (Abb. 3.12A) in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber WT Mäusen erhöht. Die Expression von IFN $\alpha$ R2 erreicht ihr Maximum bereits nach 4h und fällt dann langsam wieder ab. Dabei ist die Kinetik abhängig von der LPS Dosis und der MK2. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren und in WT Mäusen, die mit 0,5 µg LPS / g KGW behandelt wurden, ist bereits nach 8h das basale Expressionsniveau erreicht, während die Transkriptlevel in hoch

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.12: MK2 reguliert basal die Expression von IFN $\alpha$ R1 und steuert die LPS induzierte Expression von IFN $\alpha$ R2.** WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR die Expression von (A und C) IFN $\alpha$ R1 und (B) IFN $\alpha$ R2 analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$  für basal und WT 1  $\mu$ g LPS / g KGW,  $n=2$  sonst,  $\pm$ SEM).

dosiert behandelten WT Mäusen deutlich länger erhöht bleiben.

Diese Daten deuten auf einen Einfluss von MK2 und MK3 auf die LPS induzierte Interferon Antwort *in vivo* hin, der sich auf die Expression von IFN $\beta$  und IFN $\gamma$  einerseits und im Fall von MK2 auf die Verfügbarkeit des Typ I Interferon Rezeptorkomplexes andererseits erstreckt.

#### 3.1.6 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von CSF-1, reguliert aber transkriptionell die Expression des CSF-1 Rezeptors

Ein wichtiger Modulator der Immunabwehr ist das Zytokin CSF-1, das die Aktivität und Mobilität von Makrophagen reguliert. Um den Einfluss der MK2 auf die LPS induzierte intrahepatische Expression von CSF-1 zu untersuchen, wurden die Transkriptlevel in Lebergewebe von LPS behandelten WT und MK2<sup>-/-</sup> Tieren analysiert. Wie in Abbildung 3.13A dargestellt, steigen die Transkriptlevel von CSF-1 in der Leber nach LPS Behandlung in allen Gruppen an, erreichen nach 1h bis 2h ihr Maximum und fallen dann bis zum Zeitpunkt von 24h wieder auf das ursprüngliche Level zurück. Dabei ergeben sich

### 3 Ergebnisse

keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäusen, wobei die Expressionsrate in MK2<sup>-/-</sup> Tieren leicht erhöht ist. Die maximale Expression in niedrig dosiert behandelten Tieren ist leicht verringert.

Um die Ergebnisse für hoch dosiert behandelte WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse zu verifizieren, wurden die CSF-1 Transkriptlevel zusätzlich mittels RT-qPCR und spezifischen CSF-1 Primern analysiert (Abb. 3.13B). Die erhöhten Werte in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen konnten in dieser Analyse nicht bestätigt werden und liegen sogar leicht vermindert gegenüber der WT Situation. In beiden Gruppen steigt die CSF-1 Expression in der Leber an und erreicht in MK2<sup>-/-</sup> Tieren nach 1h, in WT Mäusen nach 2h maximale Werte. Danach nimmt die Expressionsrate in beiden Gruppen wieder ab, wobei die Werte in MK2<sup>-/-</sup> Tieren bis 6h nach LPS Injektion leicht unter den Werten der WT Mäuse liegen.

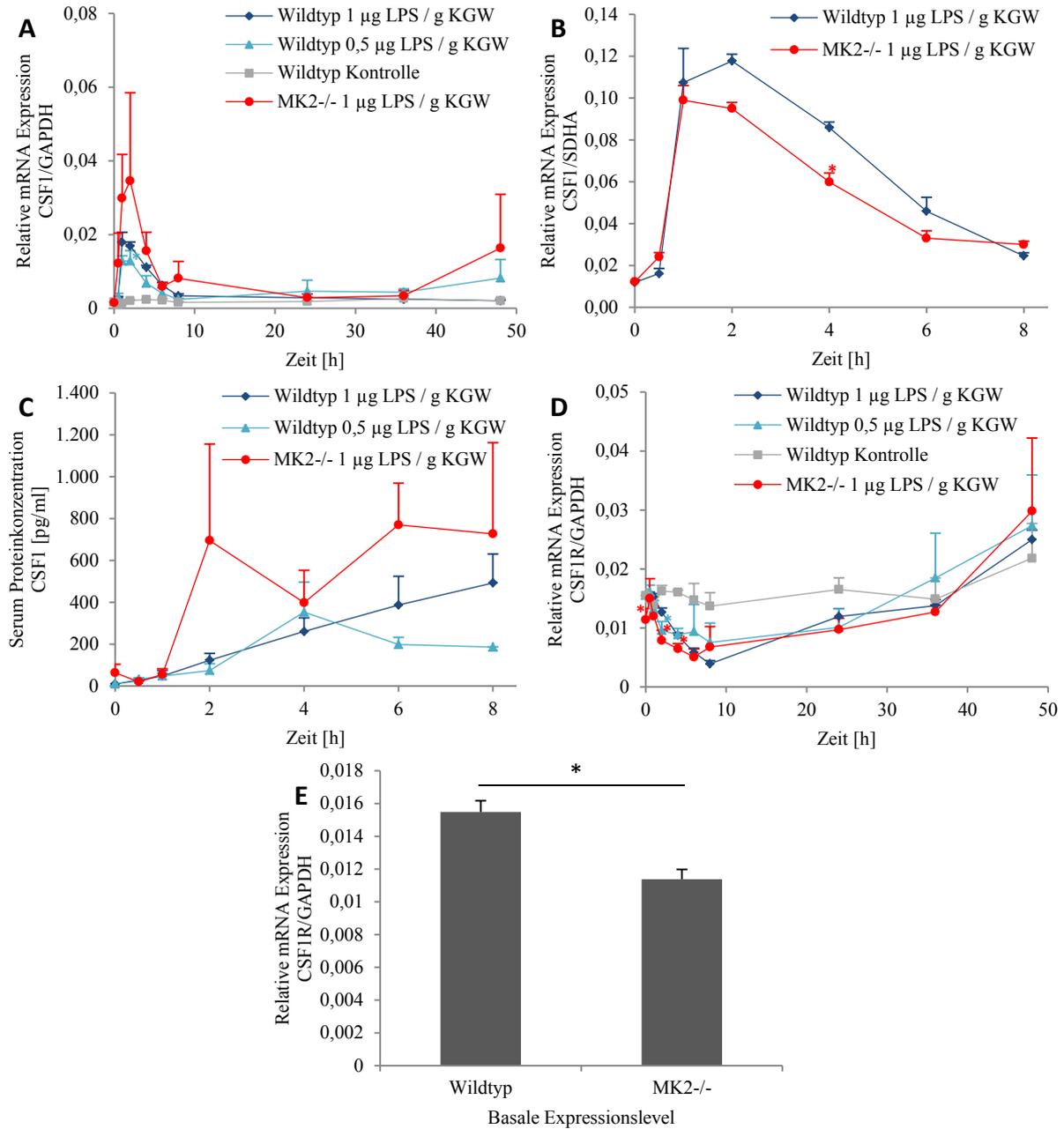
Um den Einfluss der MK2 auf Proteinebene zu untersuchen wurde die Serum Proteinkonzentration von CSF-1 in LPS behandelten Tieren mittels Luminex analysiert. Wie in Abbildung 3.13C dargestellt, steigt die Konzentration an CSF-1 im Serum hoch dosiert behandelter WT und MK2<sup>-/-</sup> Tiere über den gesamten untersuchten Zeitraum ohne signifikante Unterschiede an. In niedrig dosiert behandelten Mäusen steigt die Serum CSF-1 Konzentration initial bis 4h nach LPS Injektion gleichermaßen an, sinkt dann aber im weiteren Verlauf ab, sodass die CSF-1 Proteinkonzentrationen in diesen Tieren zu späten Zeitpunkten leicht erniedrigt sind.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die MK2 auf die LPS induzierte CSF-1 Expression im vorgestellten Entzündungsmodell keinen Einfluss hat.

Da die Responsivität von Immunzellen gegenüber CSF-1 durch LPS herabgesetzt wird, indem der CSF-1 Rezeptor (CSF-1R) degradiert und die Expression herunterreguliert wird, wurde auch die Expression von CSF-1R in Abhängigkeit von der MK2 in der Leber untersucht (Abb. 3.13D). Die Expression von CSF-1R ist in MK2<sup>-/-</sup> Tieren bereits basal im Vergleich zu WT Mäusen signifikant reduziert (Abb. 3.13D und E). Nach der Behandlung mit LPS wird die Expression von CSF-1R in allen Gruppen negativ reguliert. Diese negative Regulation der CSF-1R Expression erfolgt in niedrig dosiert behandelten WT Tieren und MK2<sup>-/-</sup> Mäusen zu frühen Zeitpunkten bis 2h bzw. 4h deutlich stärker als in hoch dosiert behandelten WT Mäusen. Danach ist in beiden Gruppen das Minimum der CSF-1R Expression erreicht, während in hoch dosiert behandelten WT Tieren das Transkriptlevel bis 8h nach LPS Injektion weiter fällt. Danach steigt die Expression von CSF-1R wieder an und erreicht 36h nach der Behandlung wieder das Niveau der mit NaCl behandelten Gruppe.

Diese Daten weisen zusammengenommen darauf hin, dass die MK2 auf die Modulation der Immunantwort durch CSF-1 nicht durch die Steuerung der CSF-1 Expression, sondern über die Verfügbarkeit des CSF-1R Einfluss nehmen könnte.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.13: MK2 hat keinen Einfluss auf die Expression von CSF-1, reguliert aber die LPS induzierte Herabsetzung der CSF-1R Transkriptlevel.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A, D und E) Fluidigm qPCR und (B) RT-qPCR mit CSF-1 spezifischen Primern analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM). (D) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n=2$  für WT 0,5 µg LPS / g KGW,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).

### 3.1.7 MK2 ist essenziell für die LPS induzierte Expression von IL-10 und SOCS3 in der Leber.

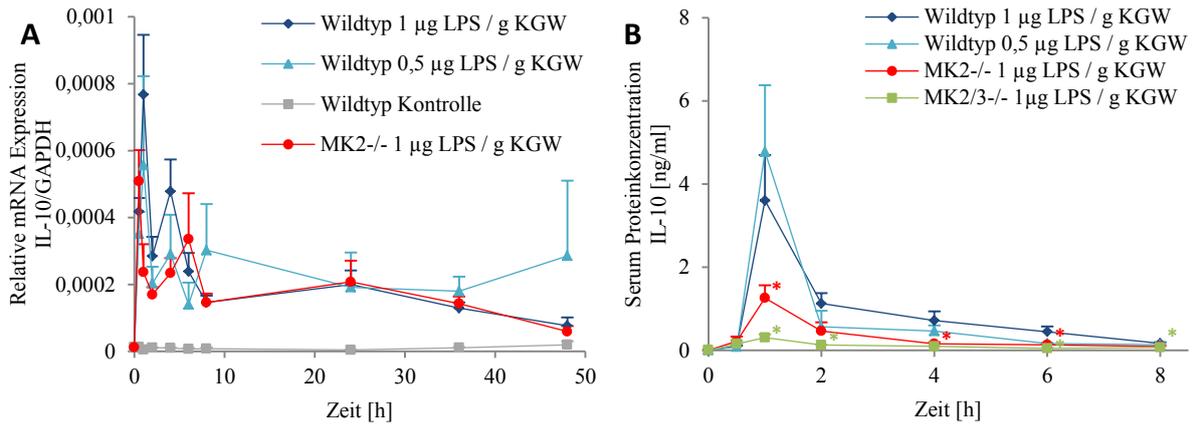
Obwohl die meisten Studien eine MK2 abhängige Expression von IL-10 postulieren [120, 135], existieren auch Arbeiten, in denen IL-10 unabhängig von MK2 exprimiert wird [137]. Um den Einfluss der MK2 auf die Expression im Entzündungsmodell dieser Studie in der Leber zu untersuchen, wurde die Expression von IL-10 in Leberlysaten LPS behandelte Tiere analysiert (Abb. 3.14).

IL-10 wird, wie in Abbildung 3.14A dargestellt, nach der Behandlung mit LPS sehr schnell induziert. Bereits nach 0,5h wird das maximale Transkriptlevel in allen Gruppen erreicht. Danach geht die Expression auf 25% bis 50% der maximalen Werte zurück und wird auf diesem Niveau bis 24h nach der Behandlung gehalten. Danach geht sie noch weiter zurück, bleibt aber bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes bei 48h signifikant erhöht. Obwohl die Transkriptlevel in MK2<sup>-/-</sup> und niedrig dosiert behandelten Tieren leicht erniedrigt sind, können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen werden.

Um den Einfluss der MK2 auf Proteinebene zu bestimmen, wurde die Konzentration an IL-10 im Serum der Tiere nach Versuchsende gemessen (Abb. 3.14B). In WT Tieren steigt die IL-10 Konzentration im Serum steil an und erreicht unabhängig von der LPS Dosis nach 1h ihr Maximum bei etwa 4 ng/ml. Danach fällt die Konzentration wieder ab und erreicht 8h nach Behandlung 100 pg/ml. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren ist die Expression von IL-10 auf Proteinebene im Serum stark vermindert und erreicht nur 25% der in WT gemessenen Werte. Dabei bleiben die gemessenen Konzentrationen in MK2<sup>-/-</sup> bis zum Ende des beobachteten Zeitraumes hinter den Werten zurück, die im WT gemessen werden. In MK2<sup>3/-</sup> Tieren geht die maximale Serum Proteinkonzentration für IL-10 noch weiter zurück und erreicht etwa 10% der vergleichbaren Werte in hoch dosiert behandelten WT Mäusen. Die Serum IL-10 Konzentrationen bleiben bis 8h nach LPS Behandlung signifikant gegenüber den WT Tieren reduziert.

Neben IL-10 wurden im Rahmen dieser Studie weitere anti-inflammatorische Zytokine auf Ebene der Transkripte in der Leber LPS behandelte Tiere gemessen wie IL-11, IL-4 und IL-13. Für diese Zytokine konnte jedoch keine signifikante Induktion nach Stimulation mit LPS in Lebergewebe nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluss der MK2 auf weitere Mitglieder der IL-10 Familie zu untersuchen, wurden die Transkriptlevel von IL-19 nach Stimulation mit LPS in Leberlysaten der behandelten Mäuse gemessen (Abb. 3.15). Die Expression von IL-19 erreicht dabei in allen behandelten Gruppen nach 4h ihr Maximum und fällt dann schnell wieder ab. Dabei sind die erreichten Werte in niedrig dosiert behandelten WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber den hoch dosiert behandelten WT Tieren um etwa 25% bzw. 50% reduziert, dieser Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.14: MK2 und MK3 sind essenziell für die LPS induzierte IL-10 Expression.**

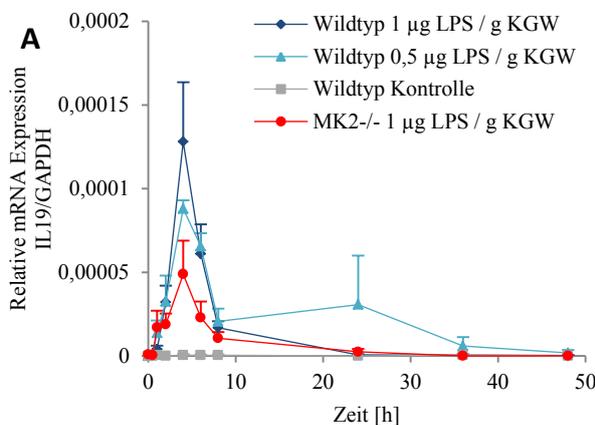
WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. (A) Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ). (B) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die IL10 Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex analysiert. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n=2$  für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h, WT 0,5 µg LPS / g KGW,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).

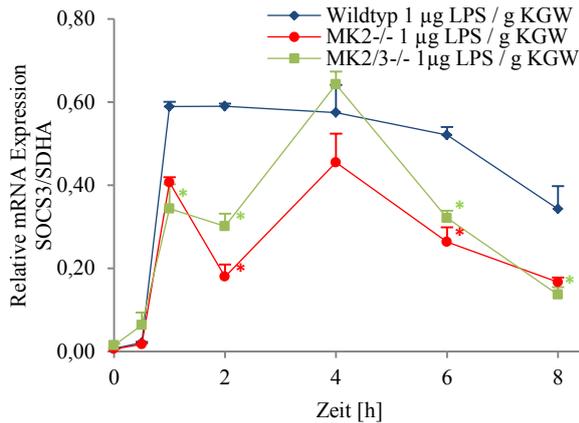
Diese Daten deuten darauf hin, dass MK2 und MK3 einen entscheidenden Einfluss auf die Expression von IL-10 nach einer Behandlung mit LPS haben und im Fall von MK2 ein untergeordneter Einfluss auf die LPS induzierte Transkription von IL-19 vorliegt.

Ein weiteres für die Herunterregulation der pro-inflammatorischen Reaktionen wichtiges Gen ist SOCS3, das während einer Entzündung durch IL-6 aber auch durch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 exprimiert wird und das die anhaltende STAT3 Aktivierung durch pro-inflammatorische Mediatoren durch Bindung an JAK2 verhindert. In Abbildung 3.16 sind die Transkriptlevel für SOCS3 in WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup>

**Abbildung 3.15: MK2 hat einen moderaten Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von IL-19 in der Leber nach LPS Behandlung.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n=2$  für WT 0,5 µg LPS / g KGW 0,5h, 4-8h,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).





**Abbildung 3.16: MK2 ist entscheidend an der LPS induzierten Expression von SOCS3 beteiligt.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methoden teil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels RT-qPCR mit SOCS3 spezifischen Primern untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ , n=2 für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h, n≥3 sonst, ±SEM).

Tieren dargestellt, wie sie sich nach der Behandlung mit LPS in den Lebern der Mäuse einstellen. Die Expression von SOCS3 steigt innerhalb 1h auf ein Maximum an und wird dann über 5h auf diesem hohen Niveau gehalten. Nach 6h fällt das Expressionslevel ab, bleibt aber deutlich erhöht gegenüber den basalen Werten. In MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren sind die Transkriptlevel deutlich gegenüber den WT Werten reduziert. Nach 4h wird zwar in beiden Genotypen kurzzeitig das WT Niveau erreicht, die Expression ist jedoch über den gesamten Zeitraum betrachtet um etwa 50% erniedrigt. Dies deutet auf einen Einfluss der MK2 auf die Expression des wichtigen anti-inflammatorischen SOCS3 hin.

### 3.1.8 MK2 reguliert in der Leber die LPS induzierte Expression von Chemokinen der CCL Familie 2, 3, 7, 8 und 11.

Neben den Zytokinen spielen Chemokine für die Regulation der APR eine wichtige Rolle, indem sie Immunzellen rekrutieren und aktivieren. Für die Vertreter der CCL Chemokin Familie CCL-2 [138, 139], CCL-3 [140] und CCL-5 [139, 141] konnte in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten in diversen Geweben mit unterschiedlichen Stimulationen eine MK2 abhängige Regulation nachgewiesen werden. Inwieweit die MK2 für die Regulation dieser Chemokine auch nach LPS Stimulation in der Leber von Relevanz ist, wurde bislang noch nicht beschrieben und war deshalb Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Nach Stimulation von WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäusen kommt es in der Leber zu einer Induktion von CCL-2, CCL3 und CCL-5, die zwischen 2h und 4h ihr Maximum erreicht und nach 24h wieder abgeklungen ist (Abb. 3.17). Die dabei erreichten Transkriptlevel sind zum Zeitpunkt der maximalen Expression für niedrig dosiert behandelte WT Tiere für die drei untersuchten Analyte um etwa 30% reduziert, dieser Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 3.17A, C und E). Die in MK2<sup>-/-</sup> ermittelten Werte

### 3 Ergebnisse

unterscheiden sich für CCL-2 und CCL-5 auf RNA Ebene nicht signifikant von den entsprechend behandelten WT Tieren, während die Transkriptlevel für CCL-3 in MK2<sup>-/-</sup> zum Zeitpunkt der maximalen Transkription signifikant reduziert sind und auch bis 8h nach der LPS Behandlung hinter den im WT erreichten Werten zurück bleiben.

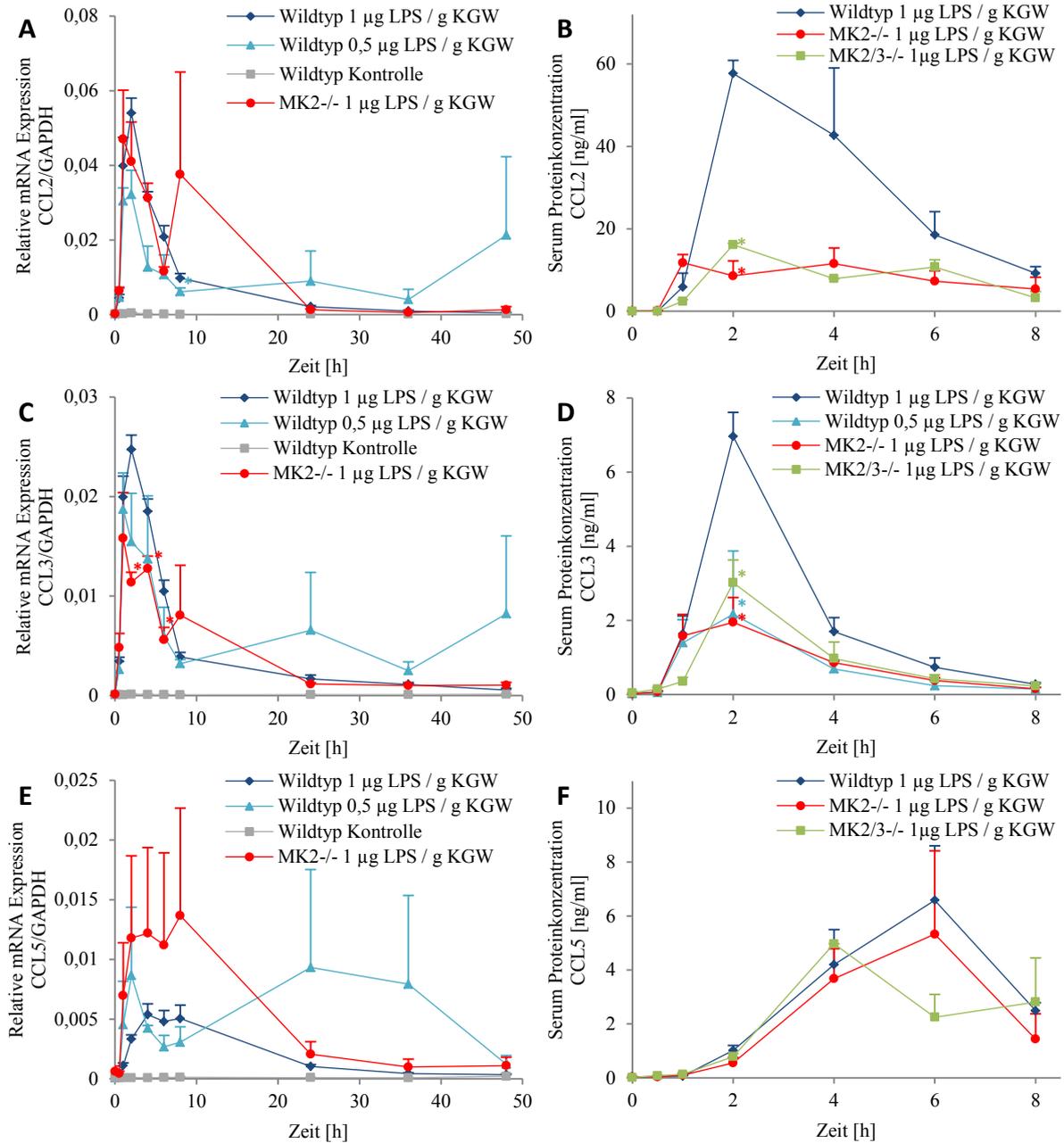
Um den Einfluss der MK2 auf die systemische Expression von CCL-2, CCL-3 und CCL-5 auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die Konzentrationen dieser Chemokine im Serum der Tiere analysiert (Abb. 3.17B, D und F). Die Konzentration von CCL-2 (Abb. 3.17B) und CCL-3 (Abb. 3.17D) steigt im Serum der LPS behandelten Tiere rasch an, erreicht nach 2h maximale Werte und fällt dann wieder ab. In MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren ist die Expression dabei deutlich reduziert und erreicht in beiden Genotypen nur etwa 30% der maximal in hoch dosiert behandelten WT Mäusen gemessenen Werte. Für CCL-3 (Abb. 3.17D) ist auch die maximal erreichte Serum Proteinkonzentration in niedrig dosiert behandelten Mäusen stark reduziert und erreicht vergleichbare Werte wie in MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren. Die CCL-5 Serum Proteinkonzentration steigt im Vergleich zu CCL-2 und CCL-3 langsamer an und erreicht erst nach 6h maximale Werte (Abb. 3.17F). Danach fällt die Konzentration wieder ab, ist aber nach 8h im Vergleich zum basalen Expressionsniveau noch deutlich erhöht. Die Serum Proteinkonzentration von CCL-5 ist dabei sowohl im zeitlichen Verlauf, als auch in der erreichten Konzentration in WT und MK2<sup>-/-</sup> Tieren vergleichbar. MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere erreichen dagegen bereits nach 4h die maximale Konzentration, die zu diesem Zeitpunkt vergleichbar zu den anderen Genotypen ist. Danach fällt die Konzentration um etwa 50% zurück und wird auf diesem Niveau gehalten, sodass die Konzentrationen 8h nach LPS Behandlung in allen Genotypen wieder vergleichbar sind. Der sich daraus ergebende Unterschied in der CCL-5 Serum Proteinkonzentration zwischen MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen und den übrigen Genotypen erreicht jedoch keine statistische Signifikanz.

Diese Daten deuten zusammengenommen darauf hin, dass die MK2 systemisch einen Einfluss auf die Expression der Chemokine CCL-2 und CCL-3 im Kontext LPS induzierter Entzündung spielt und dass die beschriebene MK2 Abhängigkeit der CCL-5 in diesem Modell keine Rolle spielt.

Darüber hinaus wurde bislang noch kein Zusammenhang zwischen der Expression von Mitgliedern der CCL Chemokin Familie in der LPS induzierten Entzündung und der MK2 beschrieben. Deshalb wurde in dieser Studie die LSP induzierte Expression weiterer CCL Chemokine untersucht.

Abbildung 3.18 stellt die Expressionsprofile der Mitglieder der CCL Chemokin Familie CCL-4 (Abb. 3.18A), CCL-7 (Abb. 3.18B), CCL-8 (Abb. 3.18G), CCL-9 (Abb. 3.18C und D) und CCL-11 (Abb. 3.18E und F) auf Ebene der Transkripte in den Lebern LPS behandelte Tiere dar. Nach der Behandlung mit LPS steigt die Expression dieser CCL Chemokine mit sehr differenzierter Kinetik an.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.17: MK2 ist essenziell für die LPS induzierte Expression von CCL-2 und CCL-3, nicht aber für CCL-5.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3/3-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. (A, C, E) Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta\text{ct}}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm\text{SEM}$ ). Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex für (B) CCL-2 (MK2<sup>3/3-</sup> 4h  $n=1$ , MK2<sup>3/3-</sup> 0,5h, 6h, MK2<sup>-/-</sup> 0,5h, 2-4h  $n=2$ ,  $n \geq 3$  sonst), (D) CCL-3 (MK2<sup>3/3-</sup> 0h, 4h und WT 0,5 µg LPS / g KGW  $n=2$ , sonst  $n \geq 3$ ) und (E) CCL-5 (MK2<sup>3/3-</sup> 4h  $n=1$ , MK2<sup>3/3-</sup> 0,5h, 6h, MK2<sup>-/-</sup> 0,5h  $n=2$ ,  $n \geq 3$  sonst) untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $\pm\text{SEM}$ ).

### 3 Ergebnisse

Die Expression von CCL-4 erreicht nach 2h maximale Werte und nimmt dann schnell wieder ab, sodass die Expression 8h nach Behandlung mit LPS nur noch leicht erhöht ist und nach 24h wieder das basale Level erreicht (Abb. 3.18A). Die maximale Expression erreicht dabei in gering dosiert behandelten WT Mäusen und MK2<sup>-/-</sup> Tieren nur etwa 50% im Vergleich zu hoch dosiert behandelten WT Mäusen (Abb. 3.18A).

Auch die Expression von CCL-7 erreicht nach 2h ihr Maximum, nimmt aber langsamer ab als bei CCL-4 und ist 48h nach der LPS Behandlung wieder auf basalem Expressionslevel (Abb. 3.18B). Auch für CCL-7 ist die maximale Expression in gering dosiert behandelten WT und MK2<sup>-/-</sup> Tieren um 50% im Vergleich zu den hoch dosiert behandelten WT Tieren reduziert.

Für CCL-9 werden in der Untersuchung mittels Fluidigm qPCR 2h nach der Behandlung mit LPS maximale Werte gemessen (Abb. 3.18C). Die Transkriptlevel gehen in der Folge langsam zurück und bleiben bis zum Zeitpunkt von 6h auf hohem Expressionsniveau. 8h nach der Behandlung werden wieder basale Expressionslevel gemessen. Diese Kinetik und auch die erreichten Expressionslevel sind dabei für beide LPS Konzentrationen vergleichbar. In MK2<sup>-/-</sup> Mäusen steigen die Transkriptlevel in der Leber bis 4h nach der LPS Stimulation an und erreichen so signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den behandelten WT Gruppen. Um diese Daten zu verifizieren und eventuelle Einflüsse der MK3 auf die Expression von CCL-9 zu untersuchen, wurden RNA Proben aus Lebergewebe von WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren mittels RT-qPCR analysiert (Abb. 3.18D). Die Kinetik der CCL-9 Expression unterscheidet sich in WT Tieren in dieser Untersuchung deutlich von den Beobachtungen der Fluidigm Analyse (Abb. 3.18C). Im WT steigt die Expression im Lebergewebe LPS behandelte Tiere über einen Zeitraum von 6h (Abb. 3.18D) an. Danach fällt die Expression schnell ab und erreicht 8h nach LPS Behandlung wieder basale Werte. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren bleibt die Expressionsrate nach LPS Stimulation für 2h auf niedrigem Niveau, bevor sie zum 4h Zeitpunkt sprunghaft ansteigt und die entsprechenden Werte in WT Tieren deutlich übersteigt, obwohl der Unterschied keine statistische Signifikanz erreicht. Danach fällt die Expression in MK2<sup>-/-</sup> Tieren ab und verläuft dann vergleichbar zu den WT Tieren. Demgegenüber kann in MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren über den gesamten untersuchten Zeitraum keine signifikante Steigerung der CCL-9 Expression gemessen werden.

Die Expression von CCL-11 nimmt in WT Tieren unabhängig von der LPS Dosis über einen Zeitraum von 8h zu und erreicht nach 36h wieder basales Niveau (Abb. 3.18E). In MK2<sup>-/-</sup> Tieren wird das Maximum dagegen bereits nach 4h erreicht und nimmt dann bereits wieder ab, sodass die maximalen Werte der WT Tiere um etwa 30% signifikant unterschritten werden. Die basale Expression von CCL-11 in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen ist signifikant gegenüber den in WT gemessenen Werten erhöht (Abb. 3.18F). Auch nachdem die Transkriptlevel nach der LPS induzierten Expression wieder auf basales Niveau zu-

rückgefallen sind, wird in MK2<sup>-/-</sup> Tieren zum Zeitpunkt von 48h erneut eine erhöhte Expressionsrate an CCL-11 in der Leber gemessen (Abb. 3.18F).

Die Expression von CCL-8 erreicht in LPS behandelten Tieren nach 8h maximale Werte und bleibt über den gesamten untersuchten Zeitraum erhöht (Abb. 3.18G). In gering dosiert behandelten WT Tieren und MK2<sup>-/-</sup> Tieren ist die maximale Expressionsrate um etwa 50% im Vergleich zu den hoch dosiert behandelten WT Mäusen reduziert.

Um einen Einfluss der MK2 auf die systemische Expression dieser Chemokine zu untersuchen, wurde repräsentativ für die übrigen Mitglieder die Serum Proteinkonzentration von CCL-4 und CCL-11 in LPS behandelten WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren bestimmt (Abb. 3.19). Systemisch ist der Einfluss der MK2 auf Ebene der Serum Proteinkonzentration von CCL-4 weniger deutlich ausgeprägt als auf Transkripte Ebene in Lebergewebe. Die Konzentration nimmt in hoch dosiert behandelten WT Mäusen in den ersten 2h stark zu und hält sich dann bis 4h auf diesem hohen Niveau, bevor sie wieder abfällt (Abb. 3.19A). Obwohl die Konzentrationen in MK2/3<sup>-/-</sup> (1h, 4h, 6h) in MK2<sup>-/-</sup> (2h, 4h, 6h) und gering dosiert behandelten WT Mäusen (2h, 6h) zu unterschiedlichen Zeitpunkten niedriger ist als in hoch dosiert behandelten Mäusen, erreichen diese Unterschiede keine statistische Signifikanz.

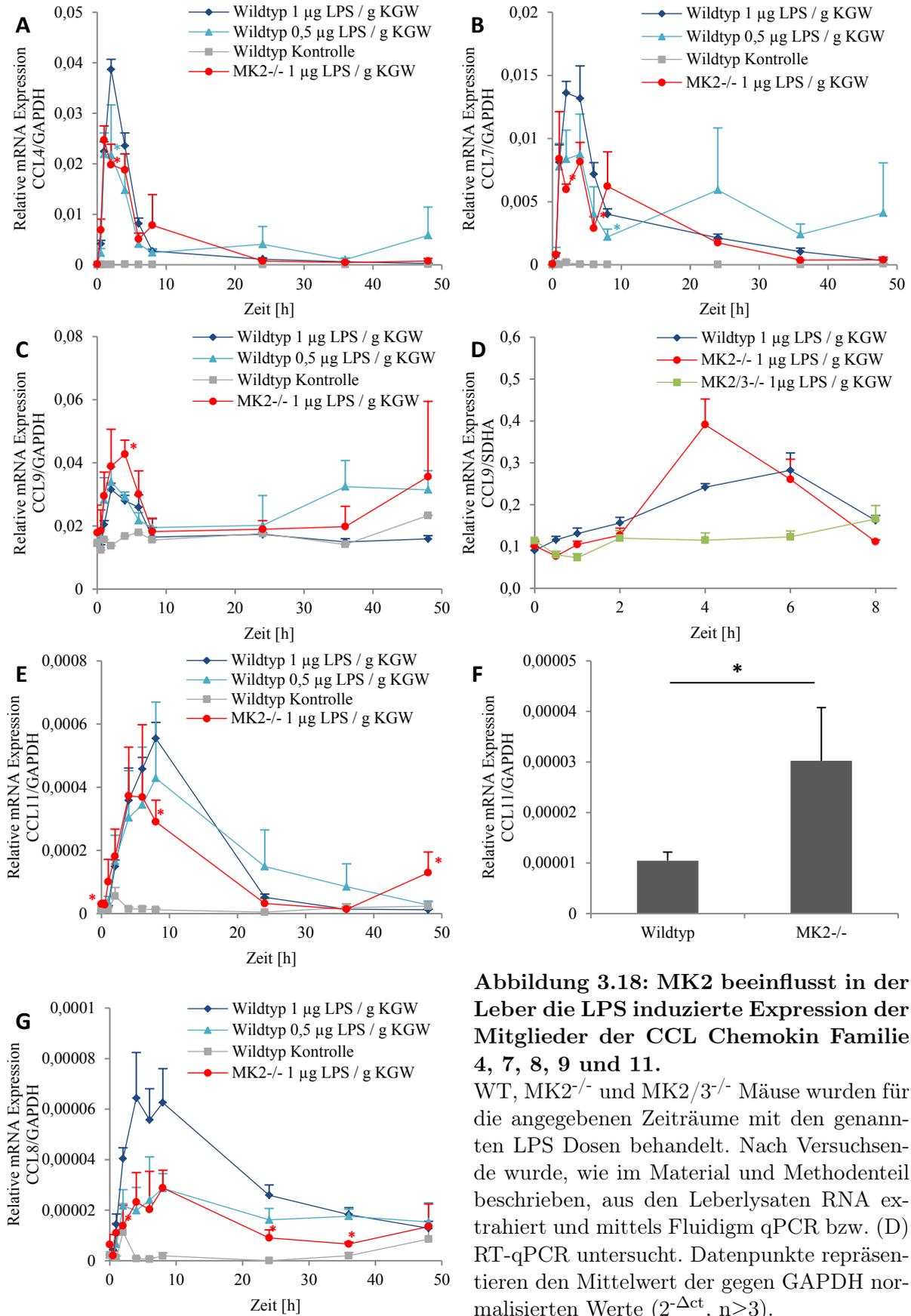
Die Serumproteinkonzentration von CCL-11 erreicht nach 2h ein hohes Niveau, das für 4h nur noch leicht ansteigt und dann stark abfällt. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren steigt die Konzentration im Serum der Tiere ebenfalls an, wird aber nicht auf hohem Niveau gehalten, sondern nimmt nach Erreichen der maximalen Konzentration schnell wieder ab. In niedrig dosiert behandelten WT Tieren bleibt die Konzentration an CCL-11 über den gesamten untersuchten Zeitraum auf niedrigerem Level. Auch hier erreichen die Unterschiede mit Ausnahme des 6h Wertes in MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren keine statistische Signifikanz.

Insgesamt deuten diese Daten auf eine MK2 abhängige Regulation der CCL Chemokin Familienmitglieder CCL-3, 4, 7, 8, 9 und 11 nach LPS Stimulation in der Leber behandelte Tiere hin. Dieser Einfluss wirkt sich jedoch nur teilweise auf die systemische Verfügbarkeit dieser Chemokine aus.

#### **3.1.9 MK2 beeinflusst basal die CXCL-10 Serum Proteinkonzentration sowie die intrahepatische, LPS induzierte Expression von CXCL-2, CXCL3 und CXCL-12.**

Die Familie der CXC Chemokine stellt eine weitere Gruppe von Chemokinen dar, die regulatorisch auf die APR wirken. Über die MK2 abhängige Regulation dieser Gruppe als LPS induzierte Antwort ist bislang wenig bekannt. Lediglich CXCL-1, CXCL-2 und CXCL-10 wurden bisher im Zusammenhang mit der MK2 in der Literatur beschrieben [142–144]. Ausgehend davon wurde in dieser Arbeit die leberspezifische LPS induzierte

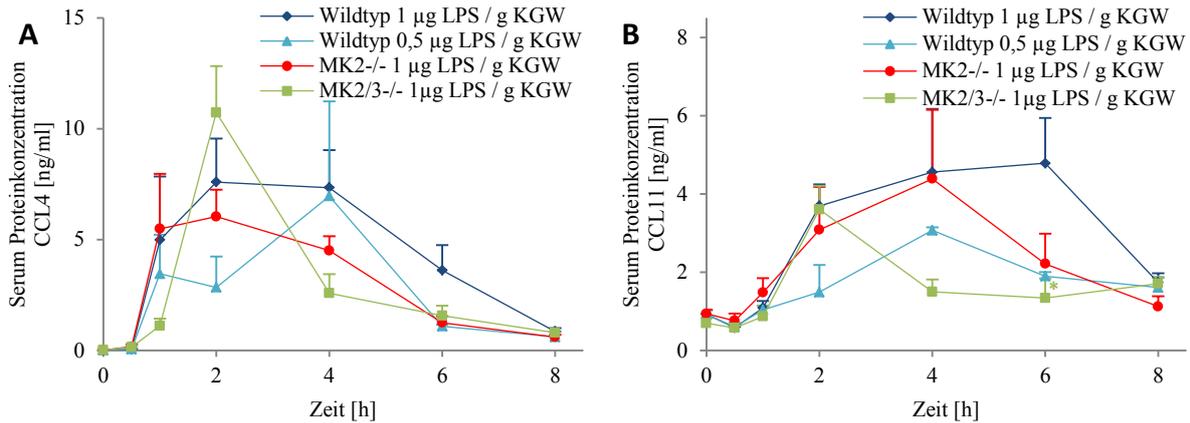
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.18: MK2 beeinflusst in der Leber die LPS induzierte Expression der Mitglieder der CCL Chemokin Familie 4, 7, 8, 9 und 11.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR bzw. (D) RT-qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.19: MK2 hat systemisch auf die Expression von CCL-4 und CCL-11 auf Ebene der Serum Proteinkonzentration keinen Einfluss.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde den Tieren, wie im Material und Methodenteil beschrieben, Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex für (A) CCL-4 und (B) CCL-11 untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar (n=2 für WT 0,5 µg LPS / g KGW und MK2/3<sup>-/-</sup> 4h, n≥3 sonst, ±SEM).

Expression verschiedener Mitglieder der Familie der CXC Chemokine in Abhängigkeit der MK2 untersucht (Abb. 3.20 und 3.21).

Wie in Abbildung 3.20A dargestellt, kommt es in der Leber nach der Behandlung mit LPS zu einer raschen Induktion der CXCL-2 Expression, die nach 2h ihr Maximum erreicht, dann wieder abfällt und nach 24h wieder basale Level erreicht. Sowohl in MK2<sup>-/-</sup> und niedrig dosiert behandelten Tieren ist die LPS induzierte Expression von CXCL-2 signifikant reduziert. Diese MK2 Abhängigkeit der LPS induzierten Expression von CXCL-2 sowie deren Dosissensitivität kann auch auf systemischer Ebene als Serum Proteinkonzentration bestätigt werden (Abb. 3.20B). Auch in MK2/3<sup>-/-</sup> Mäusen ist die Expression von CXCL-2 stark gegenüber der hoch dosiert behandelten WT Mäuse herabgesetzt. Diese Daten deuten auf eine MK2 abhängige Regulation der CXCL-2 Expression im LPS induzierten Entzündungsmodell hin.

Abbildung 3.20C stellt die Ergebnisse der LPS induzierten CXCL-10 Expression im Lebergewebe behandelte Mäuse dar. Die Transkriptlevel steigen nach LPS Stimulation unabhängig von der LPS Dosis und dem Genotyp innerhalb von 1h bis 2h auf ein vergleichbares maximales Niveau und fallen dann bis 8h nach der Behandlung wieder auf das basale Expressionslevel zurück. Dieses Ergebnis wird auch auf systemischer Ebene durch Messung der CXCL-10 Serum Proteinkonzentration bestätigt (Abb. 3.20D). Diese steigt nach der Behandlung mit LPS an und erreicht nach 2h bis 4h in allen Genotypen und unabhängig von der LPS Dosis die maximale Konzentration. Die Konzentrationswerte für niedrig dosiert behandelte WT Mäuse und die MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere sind

### 3 Ergebnisse

zwar zwischen 4h und 6h nach der Behandlung leicht erniedrigt, dieser Unterschied erreicht aber keine statistische Signifikanz. Dessen ungeachtet ist jedoch die basale Serum Proteinkonzentration an CXCL-10 in MK2<sup>-/-</sup> Tieren signifikant erniedrigt (Abb. 3.20E). Diese Daten deuten darauf hin, dass die MK2 basal auf die CXCL-10 Expression Einfluss nimmt, dieser Einfluss aber in der LPS induzierten Entzündungsantwort durch andere Einflüsse überlagert wird.

Um einen möglichen Einfluss der MK2 auf weitere Vertreter der CXC Chemokin Familie zu untersuchen, wurde auf Transkriptlevel die LPS indizierte Expression der CXC Chemokine 1, 3, 5, 11 und 12 in der Leber untersucht (Abb. 3.21). Die Transkriptlevel von CXCL-1 werden in der Leber, wie in Abbildung 3.21A dargestellt, nach Stimulation mit LPS unabhängig von der Dosis und dem Genotyp schnell erhöht und erreichen nach 2h ihr Maximum und nehmen dann bis 24h nach der Stimulation wieder ab. Die Unterschiede im Rückgang der Transkriptlevel zwischen den unterschiedlichen Gruppen erreichen keine statistische Signifikanz und deuten so nicht auf einen möglichen Einfluss der MK2 auf die LPS induzierte CXCL-1 Expression hin.

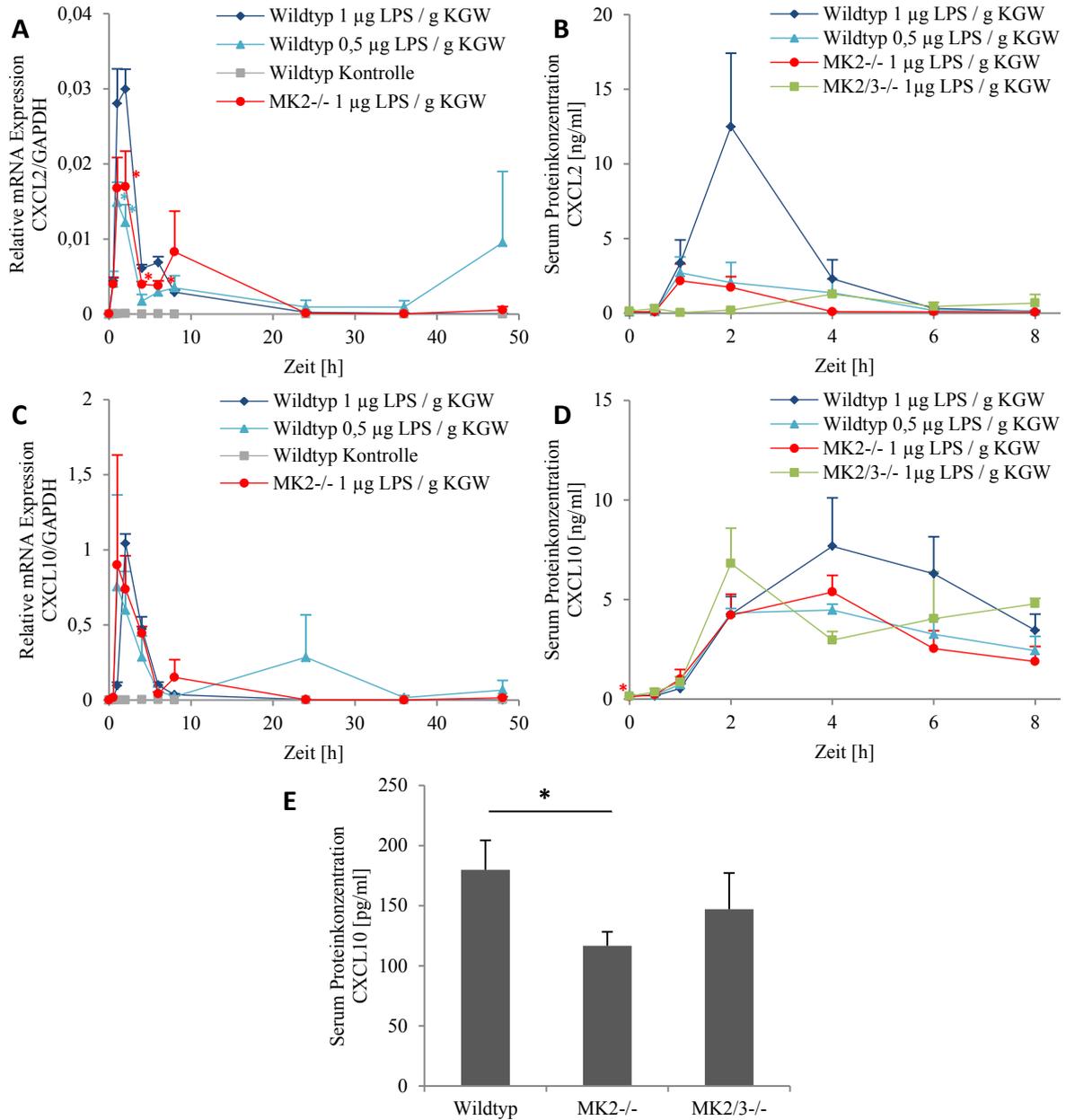
Die LPS induzierte Expression von CXCL-3 in der Leber lässt zwei Transkriptionswellen erkennen (Abb. 3.21B) mit einem Maximum nach 2h und einem zweiten nach 6h. Beide Maxima werden abhängig von der LPS Dosis und der MK2 deutlich gegenüber der hoch dosiert behandelten WT Mäuse unterschritten. Dies deutet auf eine MK2 und Dosis sensitive Expression der CXCL-3 in der Leber hin. Nach 24h wird wieder das basale Expressionslevel erreicht.

Die Expression von CXCL-5 (Abb. 3.21C) und CXCL-11 (Abb. 3.21D) lässt dagegen keine MK2 Abhängigkeit erkennen. Unabhängig von Genotyp werden nach 2h bis 4h maximale und vergleichbare Transkriptlevel in der Leber erreicht. Für beide Gene ist das erreichte Expressionsniveau jedoch dosisabhängig und unterschreitet in den gering dosiert behandelten WT Tieren signifikant die Werte der hoch dosiert behandelten Mäuse. Auch hier werden 24h nach der Behandlung wieder basale Expressionswerte erreicht.

CXCL-12 wird als Einziges der untersuchten CXC Chemokine negativ durch LPS reguliert (Abb. 3.21E). Die Transkriptlevel nehmen in den LPS behandelten Tieren in den ersten 8h ab, steigen danach langsam wieder an und erreichen 24h nach der Behandlung wieder die ursprünglichen Expressionsraten. Dabei wird das Expressionsniveau in MK2<sup>-/-</sup> Tieren leicht aber signifikant weniger stark reguliert als in hoch dosiert behandelten WT Mäusen.

Insgesamt weisen diese Daten auf einen Einfluss der MK2 auf die LPS induzierte Expression der CXC Chemokine 2, 3 und 12 in der Leber hin. Dies wirkt sich bei CXCL-2 auch auf systemischer Ebene aus. Zudem deuten die Daten eine basale Abhängigkeit der CXCL-10 Expression von der MK2 an.

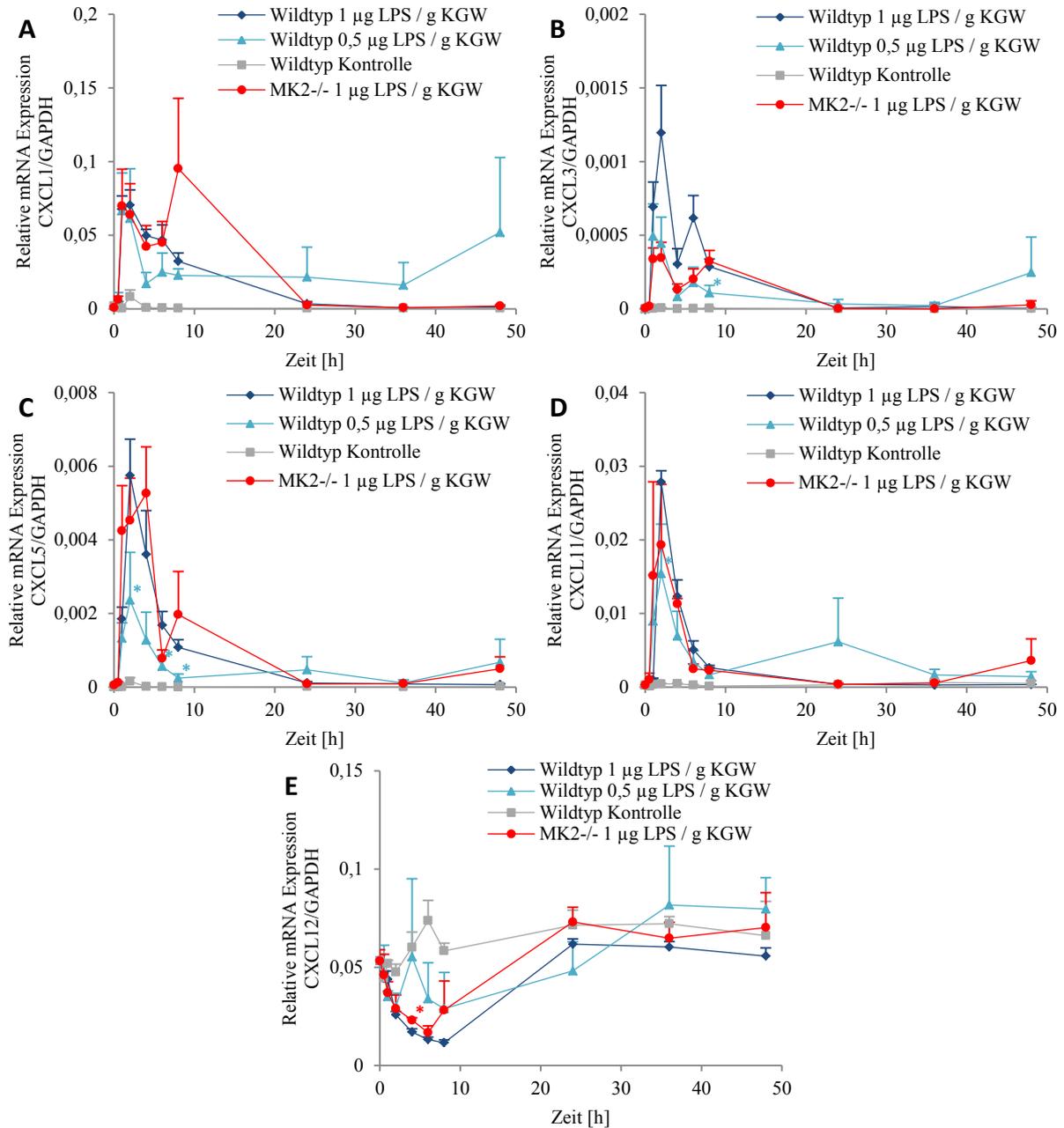
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.20: MK2 ist für die LPS induzierte Expression von CXCL-2 essenziell und reguliert basal die Expression von CXCL-10.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. (A und C) Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM). (B, D) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende bzw. (E) unstimuliert Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex für (B) CXCL-2 und (C, D) CXCL-10 untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n=2$  für WT 0,5 µg LPS / g KGW und MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> 4h,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.21: MK2 beeinflusst die LPS induzierte Expression von CXCL-3 und CXCL-12 in der Leber.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).

## 3.2 Einfluss der MK2 auf die LPS induzierte Expression von Akutphase Proteinen in der Leber

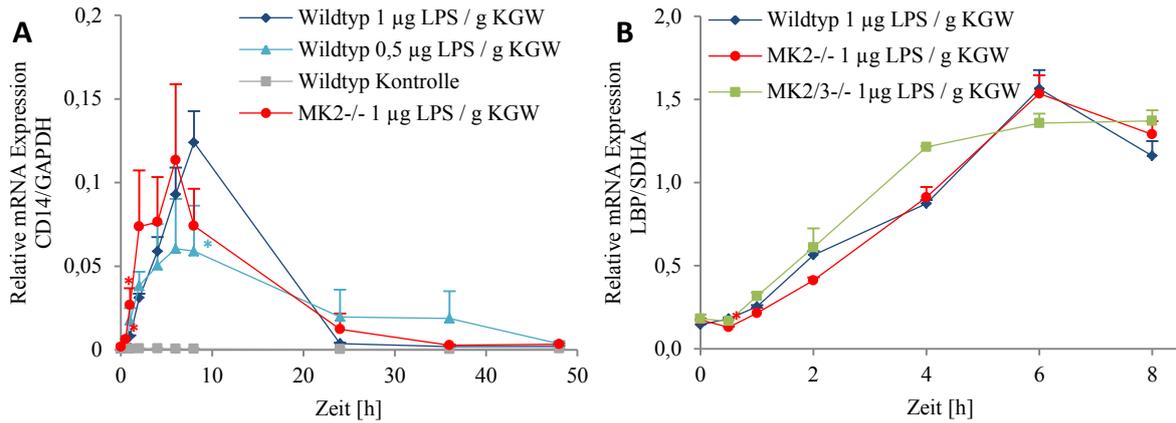
MK2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen nach einer Infektion mit Listerien eine erhöhte Sterblichkeitsrate sowie Beeinträchtigungen in der Bekämpfung des Pathogens und der lokalen Begrenzung der Pathogeninfiltration [134]. In STAT-3/rel65 defizienten Tieren, die keine hepatische APR nach einer Infektion mit Pneumokokken entwickeln, werden ähnliche Beobachtungen beschrieben [42]. Inwieweit die MK2 auch in der Regulation der APPs im Verlauf einer akuten Entzündung eine Rolle spielt wurde bislang noch nicht untersucht. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der MK2 auf die APP Expression in der Leber nach einer LPS induzierten systemischen Entzündung zu untersuchen.

### 3.2.1 MK2 hat Einfluss auf die Kinetik der LPS induzierten Expression von CD14 und beeinflusst die Expression des LPS Bindeproteins nicht.

LPS wird im Serum durch das LPS Bindeprotein (LBP) mit hoher Affinität gebunden. Der Komplex bindet dann an CD14, einen membrangebundenen Co-Rezeptor für LPS. Dieser Komplex aktiviert in der Folge TLR-4 und löst so die APR auf zellulärer Ebene aus [145]. Neuere Ergebnisse zeigen, dass CD14 während der APR in Abhängigkeit von IL-6 in der Leber synthetisiert und als APP ins Blut abgegeben wird [25]. Auch LBP wird während einer akuten Entzündung in der Leber IL-6 induziert synthetisiert. IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  verstärken synergistisch die IL-6 vermittelte LBP Synthese, ohne eigenständig die Expression zu induzieren [146]. Der Einfluss der MK2 auf die Expression dieser APPs ist noch nicht bekannt, sodass dies Gegenstand dieser Studie war.

Der zeitliche Verlauf der CD14 Expression im Lebergewebe LPS behandelte Mäuse ist in Abbildung 3.22A dargestellt. In hoch dosiert behandelte WT Mäusen nimmt die Expressionsrate von CD14 über einen Zeitraum von 8h zu, bevor sie ein Maximum erreicht und dann bis 24h nach LPS Behandlung wieder auf das basale Level abnimmt. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren sind die erreichten Transkriptlevel vergleichbar mit den Werten der hoch dosiert behandelte WT Mäuse, jedoch wird das Maximum früher erreicht. Zu frühen Zeitpunkten ist die Expression in MK2<sup>-/-</sup> Tieren signifikant erhöht. Die Transkription in niedrig dosiert behandelte Tieren folgt der Kinetik der hoch dosiert behandelte WT Mäuse, ist im Vergleich zu diesen jedoch signifikant erniedrigt.

Um den Einfluss von MK2 und MK3 auf die Expression von LBP als zweiten wichtigen Faktor zur Erkennung von LPS zu analysieren, wurden die Transkriptionen für LBP in den Lebern der Tiere gemessen (Abb. 3.22B). Die Expression von LBP steigt unabhängig



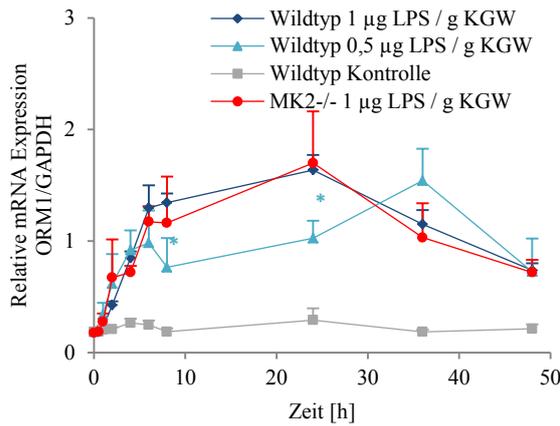
**Abbildung 3.22: MK2 beeinflusst die Kinetik der LPS induzierten CD14 Expression in der Leber und hat keinen Einfluss auf die LBP Expression.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A) Fluidigm qPCR für CD14 bzw. (B) RT-qPCR mit LBP spezifischen Primern analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta\text{ct}}$ ,  $n=2$  für MK2<sup>3/3-/-</sup> 4h,  $n\geq 3$  sonst,  $\pm\text{SEM}$ ).

vom Genotyp der Tiere in gleicher Kinetik und vergleichbarer Intensität über 6h nach der Behandlung an. In WT und MK2<sup>-/-</sup> Tieren nehmen die Werte zum 8h Zeitpunkt dann langsam ab, während sie in MK2<sup>3/3-/-</sup> Tieren auf dem hohen Niveau gehalten werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die MK2 einen Einfluss auf die Kinetik der CD14 Expression in der Leber hat, die Regulation der LPS induzierten LBP Expression aber unabhängig von der MK2 verläuft. Zudem scheint die CD14 Expression dosisabhängig reguliert zu werden.

### 3.2.2 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Orosomucoid.

Ein APP, dessen Expression in einer kürzlich erschienenen Arbeit als Effektor des Gallensalzrezeptors FXR beschrieben wurde [147], ist Orosomucoid (ORM1). ORM1 wird außerdem durch Glycocorticoide, IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  reguliert und zählt zu den Typ I APPs [148]. Eine Abhängigkeit von der MK2 wurde bislang für ORM1 noch nicht beschrieben. Um dies zu untersuchen wurden die ORM1 Transkriptlevel in Lebergewebe LPS behandelte Mäuse bestimmt (Abb. 3.23). Das ORM1 Transkriptlevel steigt über einen Zeitraum von 24h in MK2<sup>-/-</sup> und hoch dosiert behandelten WT Mäusen an und erreicht dann ein Maximum. Danach sinkt die Expressionsrate von ORM1 bleibt aber bis 48h nach der Behandlung deutlich über dem basalen Transkriptlevel messbar. In niedrig dosiert behandelten WT Tieren unterscheidet sich die Expressionsstärke nach 6h deutlich und 8h sowie 24h nach der Behandlung signifikant von den übrigen Gruppen. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von ORM1 nach einer Behandlung mit LPS



**Abbildung 3.23: MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte ORM1 Expression.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).

dosisabhängig reguliert wird. Der vergleichbare Verlauf der Expression von ORM1 in MK2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen weist außerdem darauf hin, dass die MK2 in der LPS induzierten ORM1 Transkription keinen regulatorischen Einfluss hat.

### 3.2.3 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Serum Amyloid A 1-3 und Serum Amyloid P.

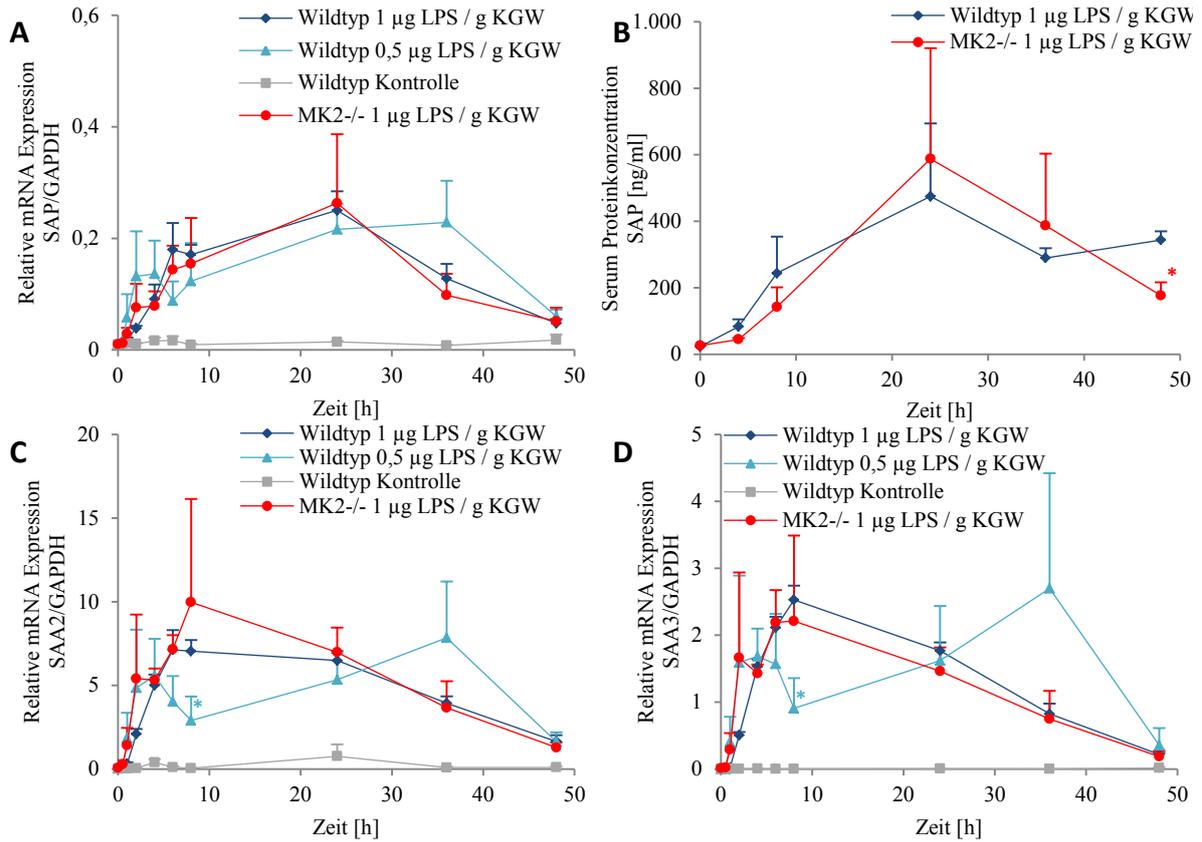
Die Serum Amyloid Komponenten SAA und SAP gelten als die wichtigsten APPs der hepatischen APR der Maus und zählen zu den Typ 1 APPs. Um zu überprüfen, ob die LPS induzierte Expression dieser Proteine MK2 abhängig reguliert wird, wurden die Transkriptlevel in Leberlysaten LPS behandelte Tiere gemessen.

Wie in Abbildung 3.24A dargestellt, steigt die Expression von SAP unabhängig von der Dosis und dem Genotyp in allen behandelten Gruppen in gleicher Stärke über einen Zeitraum von 24h an und nimmt dann bis 48h nach der Stimulation wieder ab, erreicht aber nicht die basalen Konzentrationen.

Ob die Expression von SAP auch auf Proteinebene von der MK2 unabhängig verläuft, wurde durch die Analyse der Serum Proteinkonzentrationen mittels Luminex untersucht (Abb. 3.24B). Die SAP Konzentration im Serum der Tiere steigt entsprechend des Verlaufs der Transkriptlevel in der Leber über einen Zeitraum von 24 h an und nimmt dann langsam wieder ab. Kinetik und erreichte Konzentration sind dabei unabhängig vom Genotyp. 48h nach der Behandlung ist die Konzentration an SAP in MK2<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu den WT Mäusen signifikant erniedrigt, aber ebenso wie in WT Mäusen gegenüber der basalen Expression noch erhöht.

Um den Einfluss der MK2 auf die Expression von SAA2 und SAA3 zu untersuchen wurden die Transkriptlevel dieser APPs in den Lebern LPS behandelte Tiere gemessen (Abb. 3.24C und D). Die Expression dieser APPs steigt in den Lebern über einen Zeitraum von 4h bis 6h an und wird dann auf diesem hohen Niveau gehalten. In MK2<sup>-/-</sup> und hoch dosiert behandelte WT Mäusen ist das erreichte Transkriptlevel in der Leber

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.24: MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von SAP, SAA2 und SAA3.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. (A, C, D) Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM). (B) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).

vergleichbar, während es in niedrig dosiert behandelten Tieren sowohl für SAA2 als auch für SAA3 signifikant reduziert ist. Nach 24h sind die Transkriptlevel in allen behandelten Gruppen vergleichbar und sinken dann bis zum Zeitpunkt von 48h wieder ab.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die MK2 für die Regulation der LPS induzierten Expression von SAA und SAP keinen essenziellen Einfluss hat, die LPS Dosis jedoch im gewählten Konzentrationsbereich die erreichten Transkriptlevel für SAA beeinflusst.

### 3.2.4 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Fibrinogenen.

Die Serum Proteinkonzentration von Fibrinogenen wird nahezu ausschließlich transkriptionell in Hepatozyten reguliert [149]. Dabei erfolgt die Induktion im Kontext einer APR hauptsächlich durch IL-6 [150], wobei in diesem Fall IL-1 $\beta$  die IL-6 induzierte Fibrinogen Expression in Hepatozyten hemmt [62]. Inwieweit die MK2 in die transkriptionelle Regulation von Fibrinogen nach Behandlung mit LPS *in vivo* involviert ist, wurde bislang noch nicht untersucht.

In den Lebern LPS behandelter WT und MK2<sup>-/-</sup> Tiere kommt es nach der Behandlung mit LPS zu gesteigerten Transkriptlevel für alle drei Fibrinogen Untereinheiten (FG $\alpha$ , FG $\beta$ , FG $\gamma$ ) (Abb. 3.25). Das Maximum der Transkription wird nach 6h erreicht und ist für alle Untereinheiten unabhängig vom Genotyp. In gering dosiert behandelten WT Mäusen sind die zum Zeitpunkt der maximalen Transkriptlevel erreichten Werte für FG $\alpha$  und FG $\gamma$  signifikant gegenüber den hoch dosiert behandelten WT Tieren reduziert (Abb. 3.25A und C). Für FG $\beta$  ist diese Reduktion der maximalen Transkription tendenziell vorhanden, erreicht aber keine statistische Signifikanz (Abb. 3.25B). Um den Einfluss der MK3 auf die Fibrinogen Expression zu untersuchen, wurden die intrahepatischen Transkriptlevel für FG $\gamma$  in hoch dosiert behandelten WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren mittels RT-qPCR bis 8h nach LPS Behandlung untersucht (Abb. 3.25D). Die für WT und MK2<sup>-/-</sup> Tiere gemessenen Werte der Fluidigm Analyse (Abb. 3.25C) konnten dabei bestätigt werden. Die Werte für MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse sind über den gesamten beobachteten Zeitraum vergleichbar mit den Beobachtungen in WT Tieren.

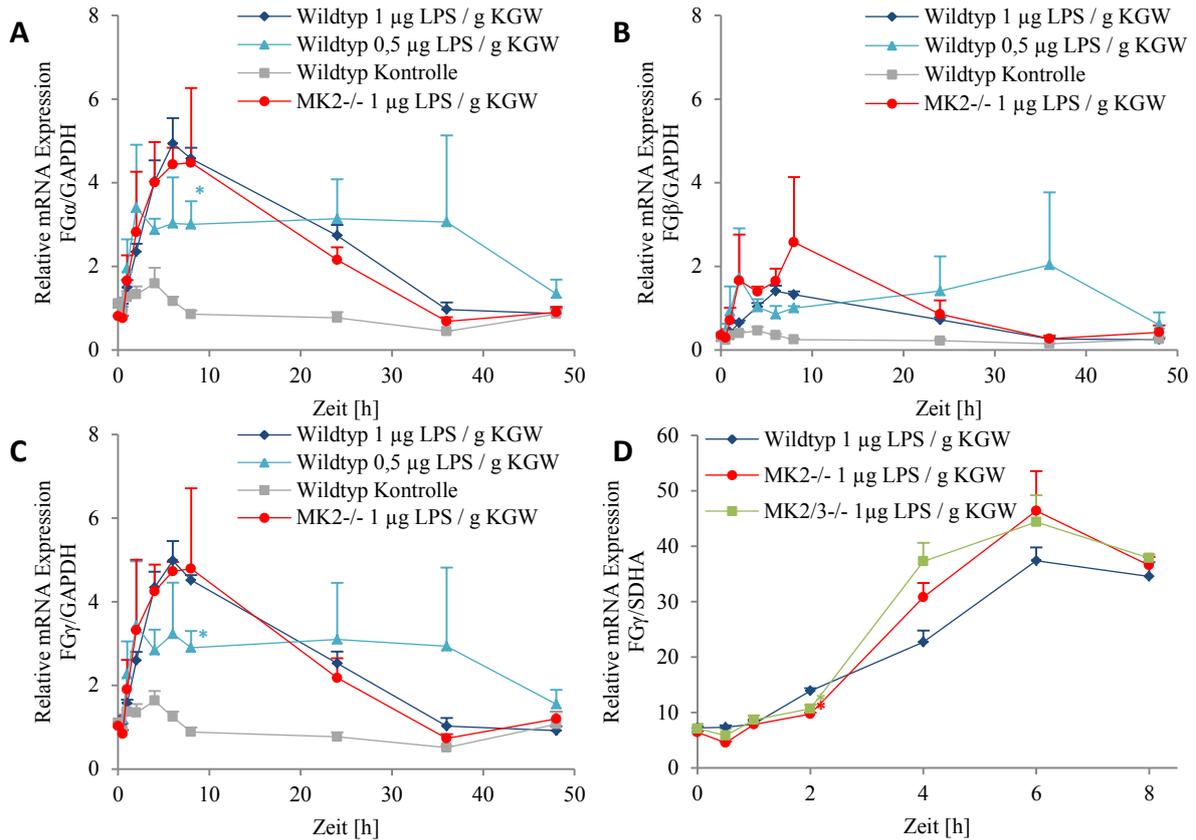
Diese Daten weisen darauf hin, dass die Fibrinogen Expression sensitiv gegenüber der LPS Dosis erfolgt. MK2 und MK3 scheinen dabei keinen Einfluss auf die LPS induzierte Fibrinogen Expression zu haben.

### 3.2.5 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Haptoglobin und Hemopexin.

Haptoglobin (HP) und Hemopexin (HPX) stellen wichtige Typ II APPs in der murinen Immunantwort dar [151, 152]. Um den Einfluss der MK2 zu untersuchen wurde die Expression dieser APPs nach *in vivo* Stimulation mit LPS in Lebergewebe behandelte Tiere analysiert.

Abbildung 3.26A stellt die Transkriptlevel für HP im Lebergewebe LPS behandelte Mäuse dar. Die Expression in MK2<sup>-/-</sup> und hoch dosiert behandelten WT Mäusen nimmt in den ersten 6h nach Behandlung gleichermaßen zu und bleibt anschließend bis 24h auf dem erreichten hohen Niveau, bevor die Expressionsrate wieder zurück geht. In niedrig

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.25: MK2 und MK3 haben keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Fibrinogen.**

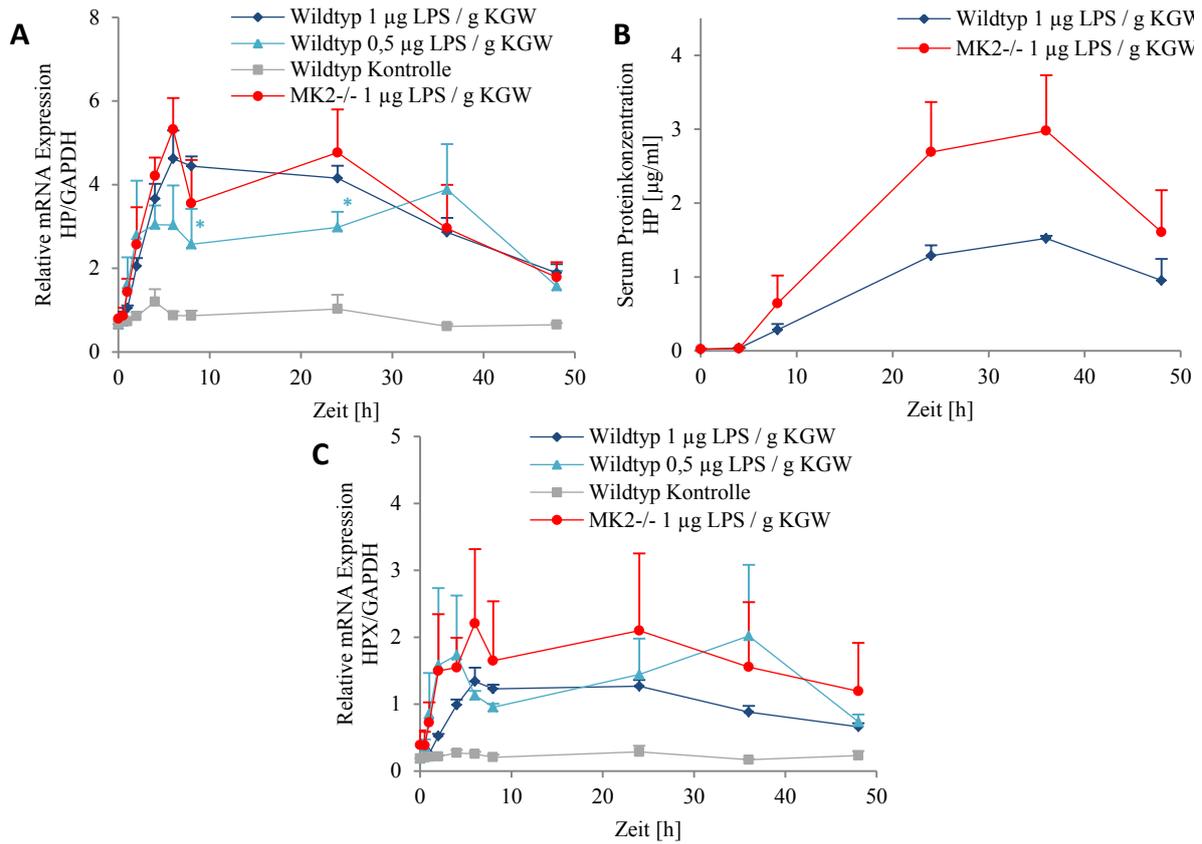
WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A, B, C) Fluidigm qPCR bzw. (D) RT-qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta\text{ct}}$ , n=2 für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h, n≥3 sonst, ±SEM).

dosiert behandelten Tieren ist das Maximum bereits nach 2h erreicht und wird bis 36h nach Behandlung gehalten. Die maximalen Werte liegen etwa bei 60% der erreichten maximalen Level in hoch dosiert behandelten WT Tieren. Die Transkriptlevel bleiben bis zum Ende des beobachteten Zeitraumes bei 48h in allen Gruppen erhöht messbar.

Um den Einfluss der MK2 auf systemischer Ebene zu bestimmen, wurde die Konzentration von HP im Serum hoch dosiert behandelter WT und MK2<sup>-/-</sup> Tiere gemessen (Abb. 3.26B). Auf Proteinebene im Serum steigt die Konzentration nach 8h langsam an und wird bis 36h nach der Behandlung weiter gesteigert, bevor sie zum 48h Zeitpunkt wieder abfällt, aber dabei gegenüber basalen Werten erhöht bleibt. Obwohl die Konzentration absolut im Mittel in MK2<sup>-/-</sup> Tieren höher liegt, als in den entsprechenden WT Mäusen, erreicht dieser Unterschied zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz.

Die Transkriptlevel für HPX im Lebergewebe LPS behandelter Tiere erreichen 6h nach der Behandlung ein Maximum und werden dann unter leichtem Rückgang bis zum Ende

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.26: MK2 hat keinen signifikanten Einfluss auf die LPS induzierte Expression von HP und HPX.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. (A, C) Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm SEM$ ). (B) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n \geq 3$ ,  $\pm SEM$ ).

der beobachteten Zeitreihe auf hohem Niveau gehalten. Zwischen den Genotypen und den Behandlungsgruppen mit unterschiedlicher LPS Dosis ist dabei kein signifikanter Unterschied in den erreichten Konzentrationen zu messen.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die MK2 auf die Expression von HP und HPX im Kontext einer LPS induzierten APR keinen Einfluss hat.

### **3.2.6 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression der Komponenten des Komplementsystems C3 und C4b reguliert aber basal die Expression von C4b.**

Wichtige APPs für die Immunabwehr gegen eindringende Pathogene sind auch Komponenten des Komplementsystems, für die noch keine MK2 Abhängigkeit beschrieben wurde. Abbildung 3.27 stellt die Transkriptlevel für die Komponenten des Komplementsystems C3 (Abb. 3.27A) und C4b (Abb. 3.27B) in Lebergewebe LPS behandelte bzw. unbehandelte (Abb. 3.27C) Tiere dar.

C3 wird auf Transkriptebene in der Leber nach LPS Behandlung innerhalb von 4h bis 8h etwa um den Faktor 3 hochreguliert, nimmt dann leicht ab und bleibt bis zum Ende des untersuchten Zeitraums auf hohem Niveau exprimiert (Abb. 3.27A). Unterschiede zwischen den Genotypen und den unterschiedlichen LPS Behandlungen erreichen dabei keine statistische Signifikanz.

C4b wird sowohl in den LPS behandelten Tieren, als auch in den Kontrolltieren in sehr geringem Umfang induziert (Abb. 3.27B). 4h nach der Behandlung fällt das Transkriptlevel in den Kontrolltieren leicht ab und bleibt dann stabil exprimiert, während es in den behandelten WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäusen weiter ansteigt und 6h nach der Behandlung signifikant erhöht ist. Nach 8h fällt auch in behandelten Tieren die Expressionsrate von C4b wieder ab und ist dann über den restlichen betrachteten Zeitraum bis 48h nicht mehr signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Der Verlauf in MK2<sup>-/-</sup> und hoch dosiert behandelten WT Tieren ist dabei vergleichbar (Abb. 3.27B), obwohl die C4b Expression in MK2<sup>-/-</sup> Tieren basal signifikant supprimiert ist (Abb. 3.27C). Unterschiede zu den niedrig dosiert behandelten Tieren erreichen keine statistische Signifikanz.

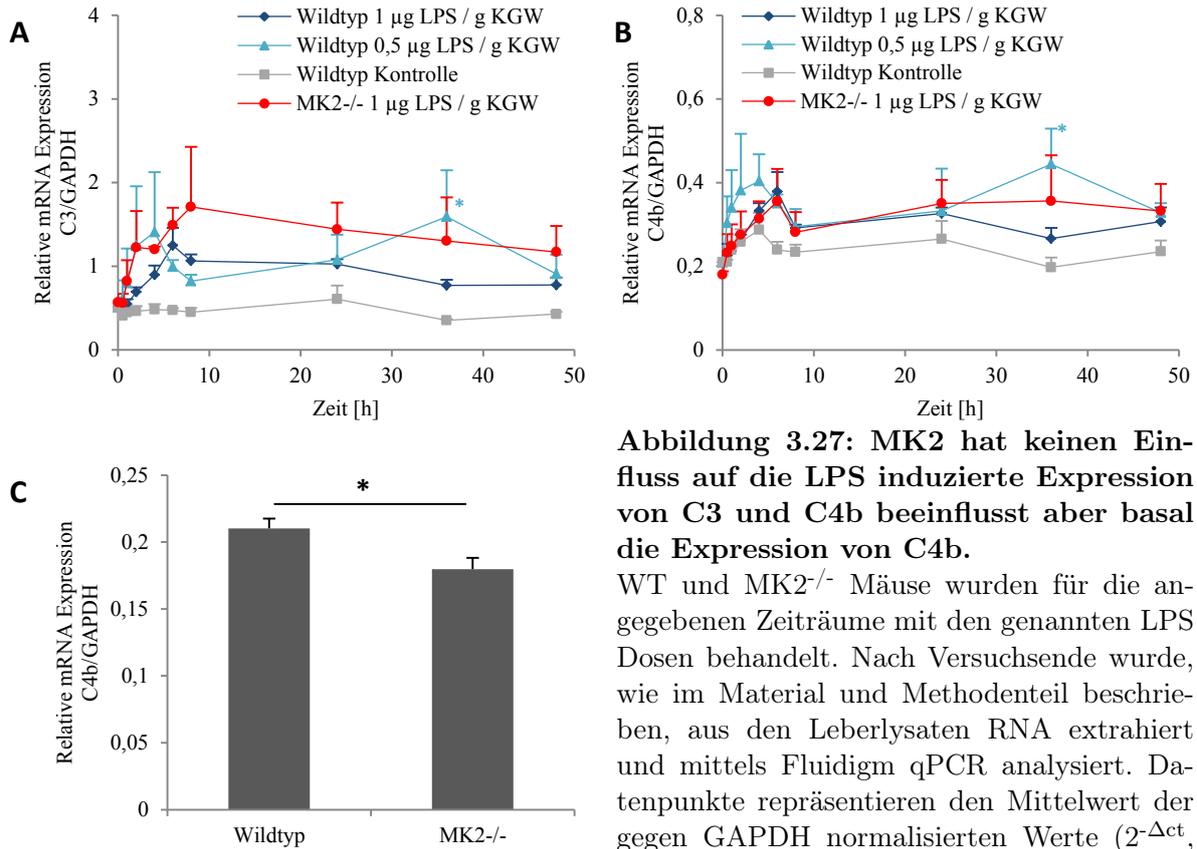
Diese Daten deuten darauf hin, dass die Expression der Komplement Komponenten in der inflammatorischen Antwort der Maus auf einen LPS Stimulus nicht von der MK2 abhängen.

### **3.2.7 MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von CRP.**

In Mäusen ist CRP im Gegensatz zu anderen Säugern ein APP von untergeordneter Bedeutung [43]. Ob für die Regulation von CRP in der LPS induzierten APR in der Maus die MK2 eine Rolle spielt wurde noch nicht beschrieben, weshalb dies in dieser Arbeit untersucht wurde.

Abbildung 3.28 stellt die Ergebnisse der Analyse der LPS induzierten CRP Expression dar. In hoch dosiert behandelten Mäusen steigt das Transkriptlevel über einen Zeitraum von 6h an. In MK2<sup>-/-</sup> Mäusen wird das maximale Transkriptlevel bereits nach 2h erreicht.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.27: MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von C3 und C4b beeinflusst aber basal die Expression von C4b.**

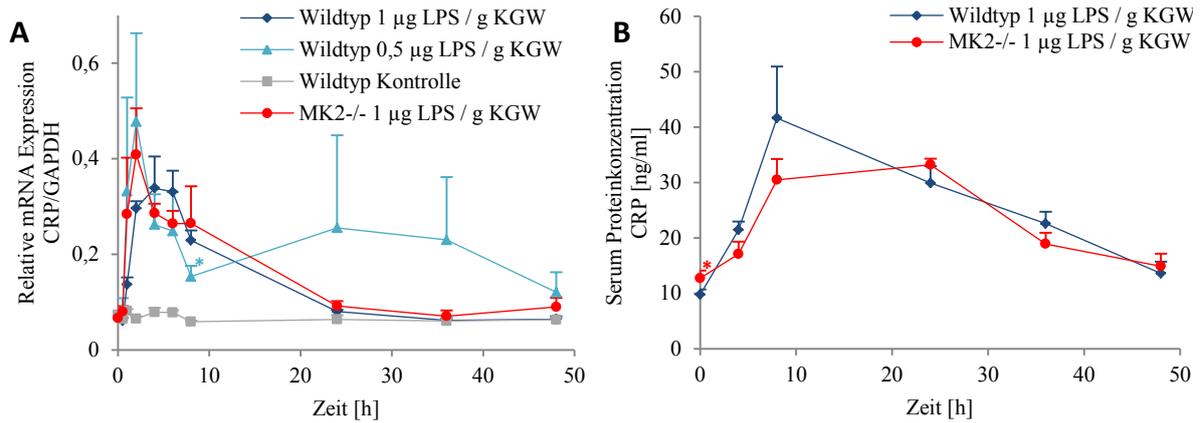
WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).

Danach sinkt die Konzentration in der Leber ab. Die beobachteten Unterschiede zwischen den WT Mäusen und MK2<sup>-/-</sup> Tieren erreichen dabei keine statistische Signifikanz. In gering dosiert behandelten WT Mäusen ist der zeitliche Verlauf der Transkriptlevel vergleichbar mit der MK2<sup>-/-</sup> Situation. Die Konzentration sinkt nach Erreichen der maximalen Transkriptkonzentration schnell ab und ist 8h nach der Behandlung signifikant gegenüber den hoch dosiert behandelten WT Mäusen erniedrigt. 36h bzw. 48h nach der Behandlung sind die Transkriptlevel in der Leber wieder auf basalem Niveau.

Die Unabhängigkeit der LPS induzierten CRP Synthese von der MK2 konnte auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 3.28B). Die CRP Konzentration im Serum LPS behandelter WT und MK2<sup>-/-</sup> Tiere steigt bis 8h nach der Stimulation unabhängig von Genotyp und in vergleichbarer Stärke an und nimmt danach langsam wieder ab.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die MK2 in der Regulation der LPS induzierten CRP Expression im murinen System keine Rolle spielt.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.28: MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von CRP.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. (A) Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta\text{ct}}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm\text{SEM}$ ). (B) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n \geq 3$ ,  $\pm\text{SEM}$ ).

#### 3.2.8 MK2 beeinflusst die alpha-2-Makroglobulin Synthese auf transkriptioneller Ebene, aber nicht auf Ebene der Serum Proteinkonzentration.

Alpha-2 Makroglobulin ( $\alpha 2\text{M}$ ) ist ein Typ II APP, dessen IL-6 vermittelte Induktion durch IL-1 $\beta$  supprimiert wird [100]. Für die Regulation von  $\alpha 2\text{M}$  in Abhängigkeit von MK2 liegen noch keine Studien vor, sodass die Expression von  $\alpha 2\text{M}$  im Lebergewebe LPS behandelte WT und MK2<sup>-/-</sup> Tiere in dieser Arbeit untersucht wurde (Abb. 3.29A).

Die  $\alpha 2\text{M}$  Transkription nimmt in allen behandelten Gruppen nach der LPS Stimulation zu und erreicht nach 6h bis 8h ein Maximum. Danach nimmt die Expressionsrate in der Leber wieder ab. In gering dosiert behandelten WT Tieren ist das maximal erreichte Transkriptlevel im Mittel niedriger, als in hoch dosiert behandelten WT Mäusen, dieser Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren ist die  $\alpha 2\text{M}$  Transkription nach LPS Stimulation erheblich eingeschränkt und erreicht nur Werte um 50% der entsprechend behandelten WT Mäuse. Auch der Rückgang der erhöhten Transkriptlevel erfolgt in MK2<sup>-/-</sup> Tieren schneller als in WT Mäusen. So erreichen MK2<sup>-/-</sup> Mäuse bereits 24h nach der Behandlung wieder basale Expressionslevel, während dies für WT Mäuse erst 12h später zum 36h Zeitpunkt der Fall ist. Diese Ergebnisse konnten mittels RT-qPCR für den Zeitraum zwischen 0h und 8h für hoch dosiert behandelte WT

und MK2<sup>-/-</sup> Tiere bestätigt werden (Abb. 3.29C). Zum Vergleich und um den Einfluss der MK3 auf die verbleibende Expression von  $\alpha$ 2M in MK2<sup>-/-</sup> defizienten Tieren zu untersuchen wurden in dieser Analyse MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse mit untersucht. Dabei werden für MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere ähnliche Werte gemessen wie für MK2<sup>-/-</sup> Mäuse.

Um den Einfluss der MK2 auf die  $\alpha$ 2M Expression auch auf systemische Ebene zu untersuchen, wurden die Serum Proteinkonzentrationen in hoch dosiert behandelten WT und MK2<sup>-/-</sup> Tieren bestimmt (Abb. 3.29B). Die Konzentration von  $\alpha$ 2M liegt bereits basal sehr hoch bei 3  $\mu$ g/ml in WT Mäusen. Nach LPS Behandlung steigt die Konzentration innerhalb von 4h auf etwa 4,5  $\mu$ g/ml an und wird bis zum Ende des Versuchszeitraumes auf diesem Niveau gehalten. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren liegen die  $\alpha$ 2M Konzentrationen im Serum bereits basal mit 4  $\mu$ g/ml höher als bei WT Mäusen, wobei dieser Unterschied keine statistische Signifikanz erreicht. Nach der Stimulation mit LPS steigt die  $\alpha$ 2M Konzentration im Serum von MK2<sup>-/-</sup> Tieren nur noch leicht an und erreicht Werte wie sie in den WT Mäusen gemessen werden.

Die Daten weisen darauf hin, dass die maximale Expression von  $\alpha$ 2M in der Leber nach Behandlung mit LPS von der MK2 abhängig ist, obwohl aufgrund erhöhter basaler Werte eine Serum Proteinkonzentration von  $\alpha$ 2M erreicht wird, die zu der in WT Tieren vergleichbar ist.

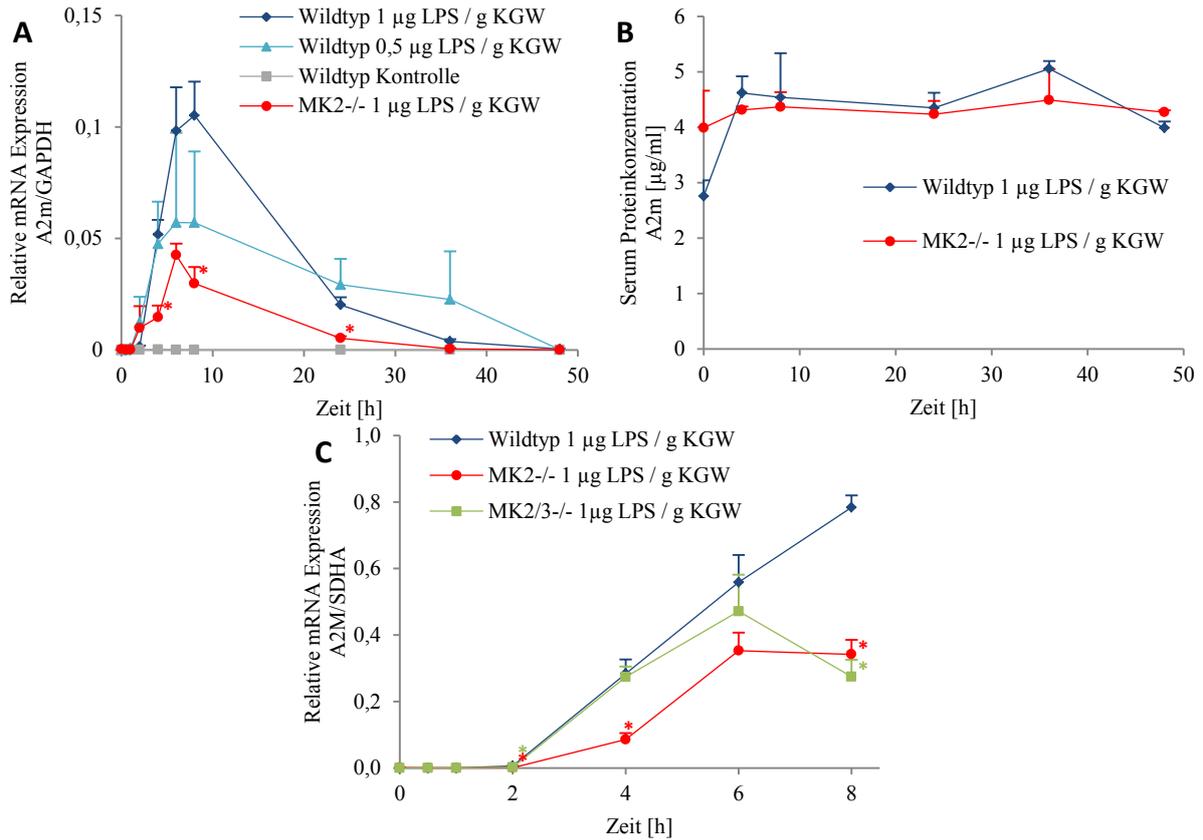
#### 3.2.9 MK2 und MK3 haben in der LPS induzierten Hepcidin Expression in der Leber unterschiedlichen Einfluss

Hepcidin ist ein APP das für die Regulation des Eisenstoffwechsels unverzichtbar ist. Basal wird es durch TGF und BMP vermittelte SMAD Signale reguliert, während in Entzündungssituationen STAT3 die Regulation übernimmt. In Hepatozyten konnte für IL-1 $\beta$  und IL-6 außerdem ein synergistischer Effekt für die Hepcidin Expression gezeigt werden [39]. Der Einfluss der MK2 auf die LPS induzierte Expression von Hepcidin sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Abbildung 3.30 stellt die Transkriptlevel von Hamp in den Lebern LPS behandelte Mäuse dar. Die Expression von Hamp schwankt dabei in den unbehandelten Kontrolltieren bereits stark im Tagesgang. In hoch dosiert behandelten WT Mäusen steigt die Konzentration nach 2h stark an und erreicht nach 6h ein Maximum, bevor die Expressionsrate wieder abnimmt und nach 24h basale Werte erreicht. In niedrig dosiert behandelten Mäusen sind die Transkriptlevel zum Zeitpunkt maximaler Expression signifikant niedriger und liegen fast auf basalem Niveau. Die in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen erhobenen Daten zeigen eine große Schwankungsbreite und liegen zu frühen Zeitpunkten bis 8h höher als in hoch dosiert behandelten WT Tieren.

Um ein differenzierteres Bild von der Hepcidin Expression in Abhängigkeit von der MK2

### 3 Ergebnisse



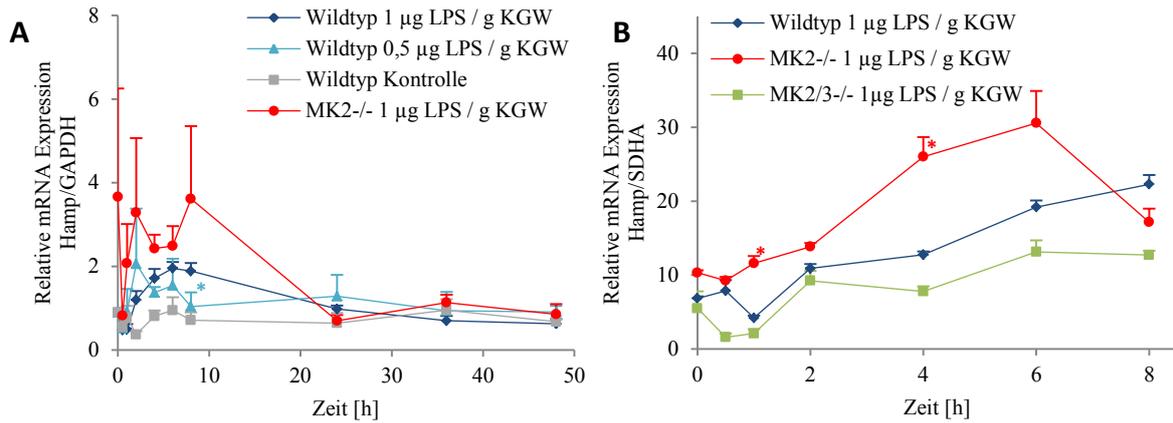
**Abbildung 3.29: MK2 ist für die LPS induzierte Expression von  $\alpha$ 2M in der Leber essenziell, beeinflusst aber nicht die erreichten Serum Proteinkonzentration.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A) Fluidigm qPCR bzw. (C) RT-qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n=2$  für MK2<sup>3/-</sup> 4h,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM). (B) Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurde den Tieren bei Versuchsende Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Proteinkonzentration im Serum wurde mittels Luminex untersucht. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen dar ( $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).

zu bekommen, wurden RNA Proben aus Lebergewebe von hoch dosiert behandelten WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3/-</sup> Mäusen mittels RT-qPCR untersucht (Abb. 3.30B). Die Expression in WT Tieren nimmt 2h nach der Behandlung mit LPS zu und steigt bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes von 8h weiter an. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren liegt die Expression von Hecpidin basal leicht aber statistisch nicht signifikant höher als in WT Mäusen. Nach der Stimulation mit LPS steigt die Expressionsrate in diesen Tieren schneller an, als in WT Tieren, sodass die Expression im MK2<sup>-/-</sup> bis zum 6h Zeitpunkt höher liegt als im WT. In MK2<sup>3/-</sup> Tieren kann in der Leber keine signifikante Induktion von Hecpidin nach der Behandlung mit LPS gemessen werden.

Um die biologische Relevanz der differentiellen Hecpidin Expression zu untersuchen, wurden in den Mäusen die Serum Eisenkonzentrationen und die Transferrinsättigung

### 3 Ergebnisse



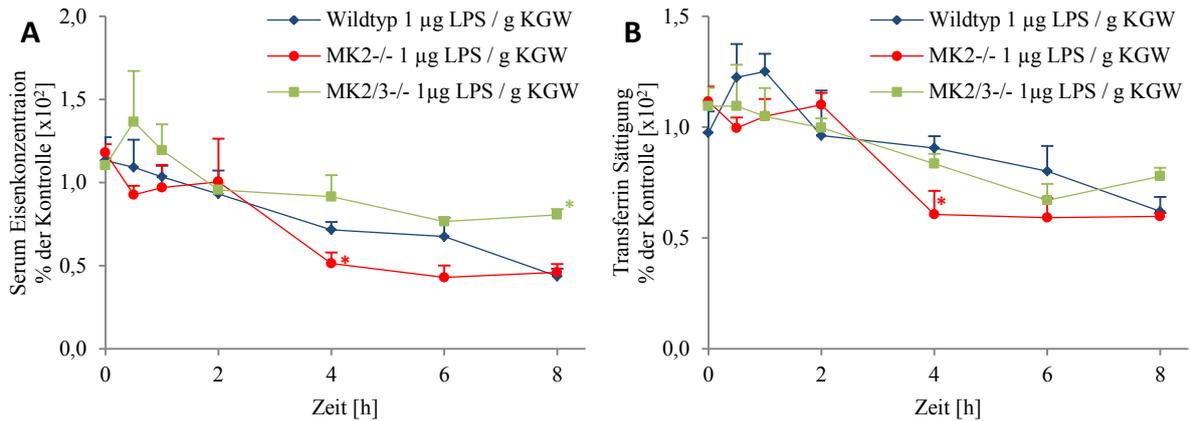
**Abbildung 3.30: MK2 und MK3 haben für die Expression von Hepcidin in der Leber nach LPS Stimulation unterschiedliche Funktionen.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels (A) Fluidigm qPCR bzw. (B) RT-qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen GAPDH bzw. SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n=2$  für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).

gemessen. Wie in Abbildung 3.31A dargestellt, sinkt die Eisenkonzentration im Serum von WT Tieren nach LPS Behandlung bis zum 8h Zeitpunkt graduell auf 45% der Ausgangskonzentration ab. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren werden bereits nach 4h signifikant niedrigere Werte um 45% der Ursprungskonzentration erreicht und dann bis zum 8h Zeitpunkt gehalten. In MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren sinkt die Eisenkonzentration maximal auf 75% der unbehandelten Kontrolle ab und bleibt signifikant gegenüber den anderen Genotypen erhöht.

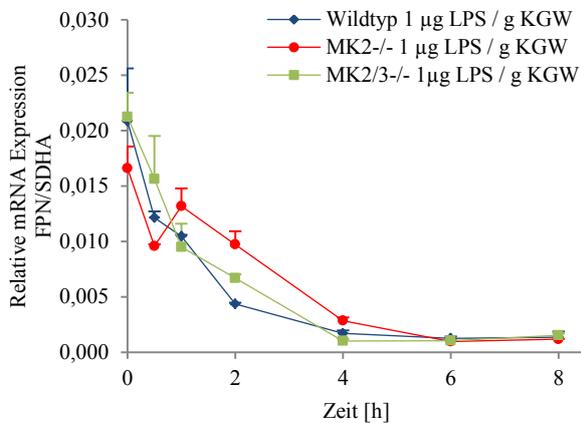
Die Transferrinsättigung (Abb. 3.31B) nimmt in den WT Tieren 2h nach der Behandlung ab und erreicht nach 8h 60% der ursprünglichen Werte. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren ist die Transferrinsättigung nach 4h bereits signifikant gegenüber der WT Situation erniedrigt und erreicht 60%, die bis zum 8h Zeitpunkt gehalten werden. In MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren nimmt die Sättigung des Transferrins ebenfalls ab. Die erreichte minimale Sättigung von 70% liegt gegenüber den WT Tieren zwar leicht höher, dieser Unterschied erreicht aber keine statistische Signifikanz. Seine biologische Wirkung in der Regulation der Serum Eisenkonzentration entfaltet Hepcidin über die Bindung an Ferroportin (FPN), das daraufhin internalisiert und degradiert wird. Zusätzlich zu dieser Regulation über das Entfernen bereits bestehenden FPNs, wird in der Leber während der APR auch die Expression von FPN herunterreguliert. Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Serum Eisenkonzentration zwischen den Genotypen auch durch eine differenzielle Regulation von FPN hervorgerufen werden könnten, wurden die FPN Transkriptlevel in Leberlysaten LPS behandelter Tiere gemessen (Abb. 3.32). Nach der Behandlung mit LPS nehmen die FPN Transkriptlevel in allen Genotypen gleichermaßen ab und erreichen nach 8h den geringsten gemessenen Wert.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.31: MK2 und MK3 haben unterschiedliche Einflüsse auf die Regulation der Serum Eisenkonzentration.**

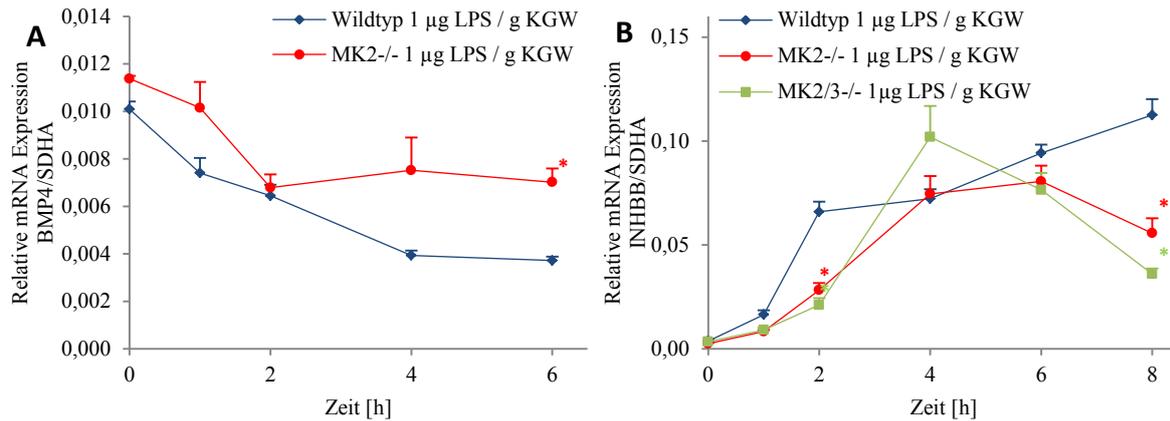
WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde den Tieren Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Serum Eisenkonzentration und Transferrinsättigung wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, gemessen. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen normalisiert gegen die unbehandelte WT Kontrolle dar ( $n=2$  für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).



**Abbildung 3.32: MK2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte Herabregulation von FPN in der Leber.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus den Leberlysaten RNA extrahiert und mittels RT-qPCR analysiert. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert der gegen SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta\text{ct}}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die unterschiedliche Regulation der Hepsidin Konzentration in den verschiedenen Genotypen biologische Relevanz hat und sich auch auf systemischer Ebene in einer differenziell gesteuerten Serum Eisenregulation äußert. Diese Unterschiede in der Eisenkonzentration im Serum lassen sich dabei nicht auf eine differenzielle Regulation von FPN zurückführen.



**Abbildung 3.33: MK2 beeinflusst die Expression der SMAD1/5/8 Aktivatoren BMP4 und INHBB in unterschiedlicher Weise.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere wurden über die angegebenen Zeiträume mit 1 µg LPS / g KGW behandelt. Nach Versuchsende wurde aus den Lebern RNA extrahiert und mittels RT-qPCR mit (A) BMP4 und (B) INHBB spezifischen Primern untersucht. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der gegen SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ , n=2 für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h, n≥3 sonst, ±SEM).

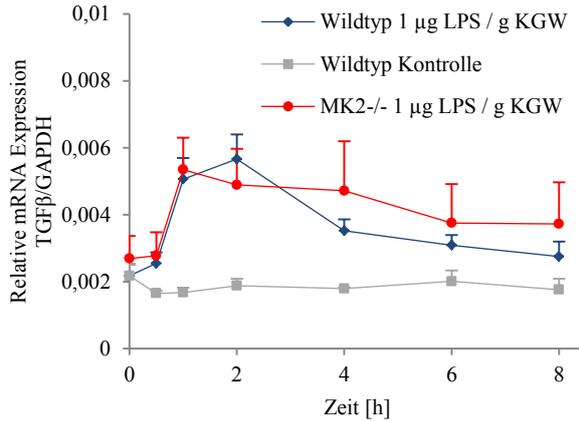
### 3.3 Einfluss der MK2 auf die Regulation der Hepcidin Expression

#### 3.3.1 MK2 beeinflusst die Expression von BMP4 im Kontext einer LPS induzierten Entzündungsantwort.

Da für die basale Regulation von Hepcidin vor allem die SMAD1/5/8 vermittelte Signaltransduktion im Komplex mit dem gemeinsamen Signalmolekül SMAD4 diskutiert wird, wurde untersucht, ob Aktivatoren dieser Signalkaskade MK2 abhängig reguliert werden. Zur Klärung des Einflusses der MK2 auf die Expression dieser Signalmoleküle wurden repräsentativ BMP4 und Aktivin B (INHBB) in den Lebern LPS behandelte Mäuse bestimmt (Abb. 3.33). Die Expression von BMP4 ist im Verlauf der APR intrahepatisch sowohl im WT als auch im MK2<sup>-/-</sup> negativ reguliert (Abb. 3.33A). Die Transkriptlevel sinken in MK2<sup>-/-</sup> Tieren über einen Zeitraum von 2h ab und bleiben dann bis zum spätesten analysierten Zeitpunkt von 6h auf diesem niedrigen Niveau. In WT Mäusen nimmt die Expressionsrate über 4h auf 40% der ursprünglichen Transkriptlevel ab und ist damit signifikant niedriger als in den MK2<sup>-/-</sup> Tieren.

Im Gegensatz dazu steigt die Expression von INHBB über den gesamten beobachteten Zeitraum von 8h in WT Mäusen an (Abb. 3.33B). Auch in MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren steigt die INHBB Expressionsrate initial an, fällt aber nach 4h bis 6h wieder ab und ist nach 2h und 8h signifikant gegenüber der Situation in WT Tieren erniedrigt.

SMAD4 dient auch als Signalmolekül für die SMAD2/3 vermittelte Signaltransduktion



**Abbildung 3.34: MK2 hat keinen Einfluss auf die Expression von TGF $\beta$  im Kontext der LPS induzierten APR.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> Tiere wurden über die angegebenen Zeiträume mit 1 µg LPS / g KGW behandelt. Nach Versuchsende wurde aus den Lebern RNA extrahiert und mittels Fluidigm qPCR untersucht. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der gegen GAPDH normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).

von TGF $\beta$ . Die TGF $\beta$  Expression in Lebergewebe im Kontext einer LPS induzierten APR ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Nach der Behandlung mit LPS kommt es innerhalb von 2h im Lebergewebe zu einer Induktion von TGF $\beta$  um den Faktor 3. Die Transkriptlevel gehen in der Folge etwas zurück und bleiben bis zum Ende des Untersuchungszeitraums von 8h leicht erhöht. Dabei weisen die Verläufe zwischen WT und MK2<sup>-/-</sup> Tieren keine signifikanten Unterschiede auf.

Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass die Regulation von BMP4 im Verlauf der LPS induzierten APR auf transkriptioneller Ebene beeinflusst wird. Die negative Regulation als Reaktion auf LPS deutet jedoch darauf hin, dass dies nicht die Ursache für die verstärkte Hecpidin Expression in MK2<sup>-/-</sup> Tieren ist.

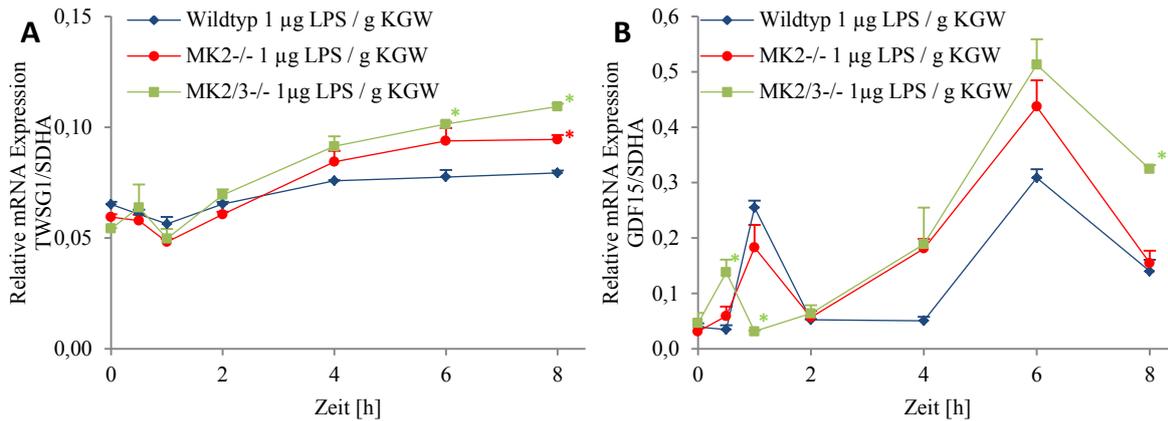
### 3.3.2 MK2 und MK3 beeinflussen die Expression der für die Hecpidin Expression inhibitorischen Erythrokin TWSG1 und GDF15.

Hecpidin spielt als Eisenregulator eine wichtige Rolle in der Erythropoese. Erythroblasten exprimieren deshalb sogenannte Erythrokin wie TWSG1 und GDF15 um die Hecpidin Expression zu steuern. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Erythrokin nach einer Stimulation mit LPS auch in der Leber exprimiert werden und ob MK2 einen Einfluss auf diese Expression hat (Abb. 3.35).

Abbildung 3.35A stellt die Expression von TWSG1 im Lebergewebe LPS behandelte Mäuse dar. Die Expression wird nach Stimulation in allen Genotypen initiiert. In MK2<sup>-/-</sup> Tieren ist die Expression gegenüber WT Mäusen erhöht. Dieser Effekt wird in MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> Tieren noch weiter verstärkt.

Auch die Expression von GDF15 wird nach der Behandlung mit LPS in allen Genotypen induziert. Dabei sind zwei Transkriptionswellen zu erkennen, die ihr Maximum nach 0,5h bis 1h und nach 6h erreichen. Das zweite Maximum ist dabei in allen Genotypen stärker

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.35: MK2 und MK3 beeinflussen die Expression der Erythrokin TWSG1 und GDF15 in der LPS induzierten hepatischen APR.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere wurden über die angegebenen Zeiträume mit 1 µg LPS / g KGW behandelt. Nach Versuchsende wurde aus den Lebern RNA extrahiert und mittels RT-qPCR mit (A) TWSG1 und (B) GDF15 spezifischen Primern untersucht. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der gegen SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ).

ausgeprägt. Ebenso wie für die Expression von TWSG1 ist die Expression von GDF15 in der Leber in MK2<sup>-/-</sup> Tieren leicht erhöht und dieser Effekt wird in MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren noch weiter verstärkt.

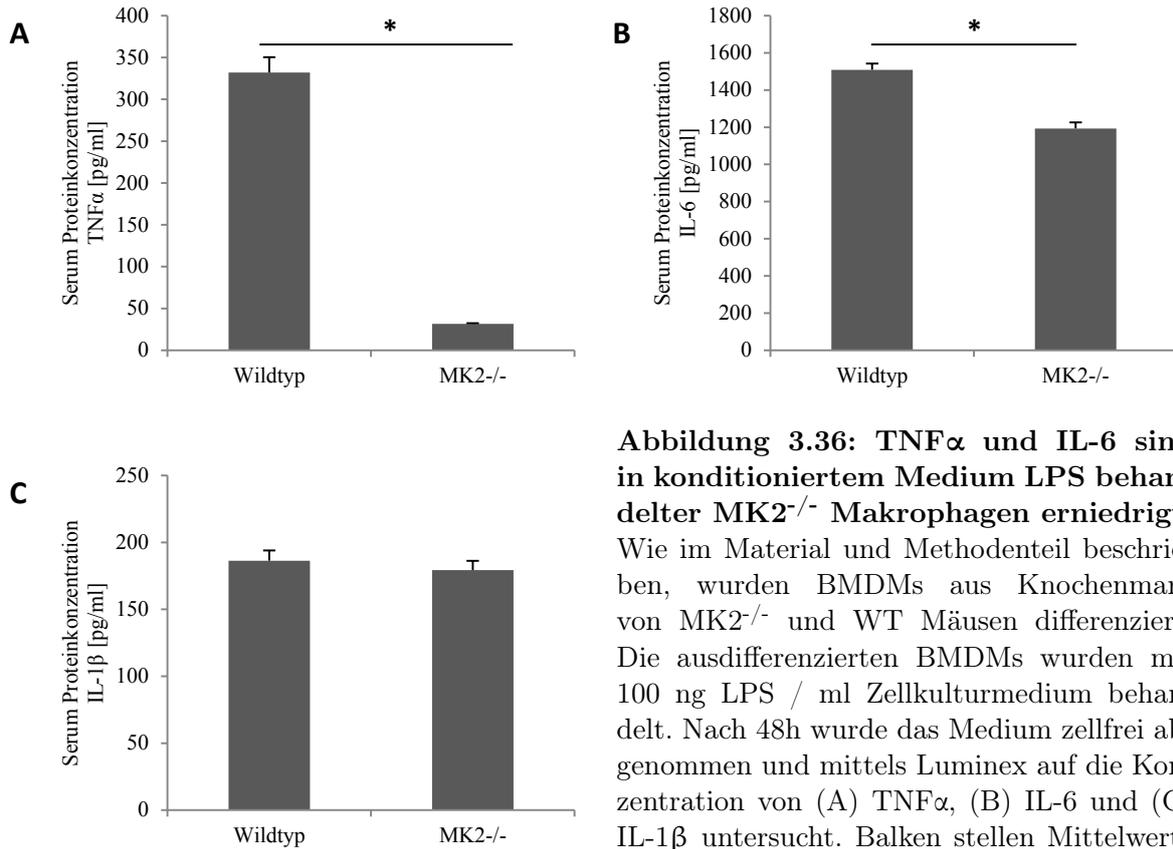
Diese Daten deuten auf einen Einfluss der MK2 auf die Erythrokinsynthese in der Leber während der LPS induzierten APR hin. Hingegen weist die gleichsinnige Regulation in MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren darauf hin, dass diese differenzielle Regulation der Erythrokinsynthese nicht die Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Hepcidin Expression während der LPS induzierten APR darstellen.

#### 3.3.3 MK2 beeinflusst die LPS induzierte Hepcidin Expression durch einen intrazellulären Mechanismus in Hepatozyten.

Um den Mechanismus der MK2 abhängigen Hepcidin Expression im Rahmen der hepatischen APR genauer zu untersuchen und den Einfluss der MK2 Zelltyp spezifisch zu bestimmen, wurde ein geeignetes Zellkultursystem etabliert. Dafür wurden BMDMs aus WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäusen 48h mit LPS inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde zellfrei gesammelt und mittels Luminex auf die Konzentration der Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  untersucht (Abb. 3.36). Die Konzentration an TNF $\alpha$  ist in konditioniertem Medium von MK2<sup>-/-</sup> BMDMs signifikant herabgesetzt und erreicht nur 10% der Konzentration, die in WT BMDMs erreicht wird (Abb. 3.36A). Auch die IL-6 Konzentration ist in MK2<sup>-/-</sup> BMDM Überstand erniedrigt (Abb. 3.36B). Die IL-1 $\beta$  Konzentration weist keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen auf (Abb. 3.36C).

Mit den so konditionierten Medien wurden primäre Hepatozyten aus WT und MK2<sup>-/-</sup>

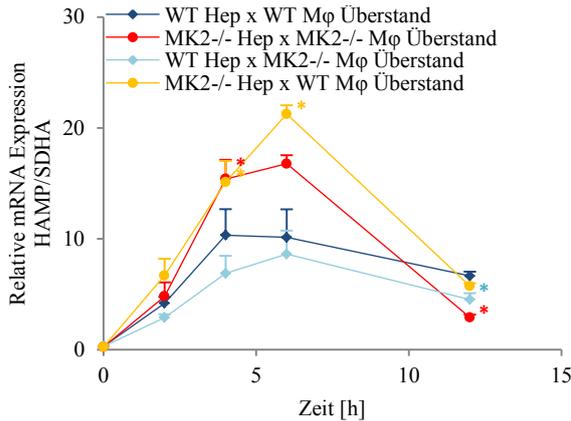
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.36: TNF $\alpha$  und IL-6 sind in konditioniertem Medium LPS behandelter MK2<sup>-/-</sup> Makrophagen erniedrigt.** Wie im Material und Methodenteil beschrieben, wurden BMDMs aus Knochenmark von MK2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen differenziert. Die ausdifferenzierten BMDMs wurden mit 100 ng LPS / ml Zellkulturmedium behandelt. Nach 48h wurde das Medium zellfrei abgenommen und mittels Luminex auf die Konzentration von (A) TNF $\alpha$ , (B) IL-6 und (C) IL-1 $\beta$  untersucht. Balken stellen Mittelwerte von technischen Triplikaten dar ( $\pm$ SEM).

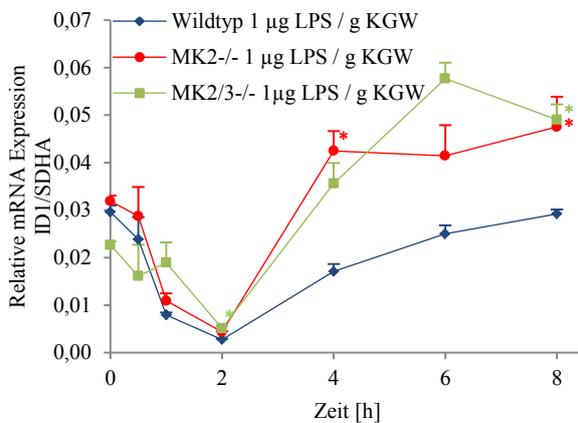
Tieren behandelt und die Expression von Hepcidin auf mRNA Ebene bestimmt. Abbildung 3.37 stellt den Expressionsverlauf von Hepcidin in den primären murinen Hepatozyten nach dem Überstandstransfer dar. Die Hepcidin Expression steigt sowohl in WT als auch in MK2<sup>-/-</sup> Hepatozyten durch die Behandlung mit konditioniertem Medium LPS behandelter Makrophagen an und erreicht nach 4h bis 6h maximale Transkriptlevel. Die Expressionsrate in MK2<sup>-/-</sup> Hepatozyten ist unabhängig vom Genotyp der Makrophagen, die zur Konditionierung des Mediums verwendet wurden, signifikant höher als in WT Hepatozyten. Eine Behandlung mit konditioniertem WT BMDM Medium bewirkt dabei in beiden Genotypen eine signifikante Steigerung der Hepcidin Expression im Vergleich zu den mit MK2<sup>-/-</sup> BMDM Medium behandelten Hepatozyten gleichen Genotyps.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die MK2 abhängige LPS induzierte Hepcidin Expression in dem in dieser Arbeit etablierten Zellkultursystem simuliert werden kann. Zudem geben die Daten einen Hinweis darauf, dass sich die höheren Hepcidin Expressionsraten am wahrscheinlichsten auf einen intrahepatozellulären Mechanismus zurückführen lassen.



**Abbildung 3.37: MK2 beeinflusst die Hecpidin Expression während der APR intrahepatozellulär.**

Primäre Hepatozyten wurden, wie im Material und Methodenteil beschrieben, aus MK2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen gewonnen und im Kollagensandwich kultiviert (siehe Material und Methoden). Die Zellen wurden mit dem zuvor beschriebenen konditionierten Medium LPS behandelter Makrophagen für die angegebenen Zeitpunkte behandelt. Datenpunkte stellen Mittelwerte der gegen SDHA normalisierten Werte dar ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).



**Abbildung 3.38: MK2 beeinflusst die Expression von ID1 im Kontext der LPS induzierten APR**

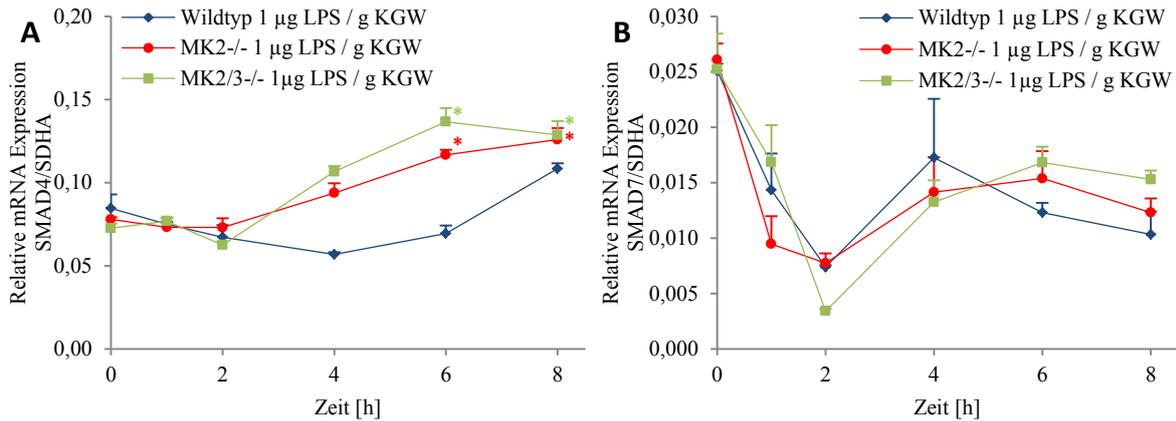
WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere wurden über die angegebenen Zeiträume mit 1 µg LPS / g KGW behandelt. Nach Versuchsende wurde aus den Lebern RNA extrahiert und mittels RT-qPCR mit spezifischen Primern für ID1 untersucht. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der gegen SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n=2$  für MK2/3<sup>-/-</sup> 4h,  $n \geq 3$  sonst,  $\pm$ SEM).

### 3.3.4 MK2 beeinflusst die LPS induzierte Regulation von SMAD4 und des Inhibitor der DNA Bindung 1 (ID1)

Um den hepatozyten spezifischen intrazellulären Mechanismus der MK2 abhängigen Hecpidin Regulation zu untersuchen, wurde die Expression von *Inhibitor of DNA Binding 1* (ID1) untersucht. ID1 wird in Hepatozyten wie auch Hecpidin durch den BMP-/SMAD1/5/8 Signalweg reguliert. Um einen Hinweis auf die SMAD1/5/8 vermittelte Genexpression in der Leber zu erhalten, wurde die Expression von ID1 untersucht (Abb. 3.38). Die ID1 Expression nimmt nach der LPS Behandlung über einen Zeitraum von 2h in allen untersuchten Genotypen ab. Danach steigen die Transkriptlevel in den Lebern behandelter MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere zum 4h Zeitpunkt sprunghaft an, während die Expression in WT Tieren nur langsam wieder zunimmt. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums bleiben die Transkriptlevel in den MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tiere signifikant höher als in WT Mäusen.

Um den Einfluss der MK2 auf die SMAD vermittelte Genexpression während der LPS induzierten APR weiter zu charakterisieren wurde der Verlauf der Expression des gemeinsamen Signaltransduktionsmoleküls SMAD4 bestimmt (Abb. 3.39A). Die Expressi-

### 3 Ergebnisse



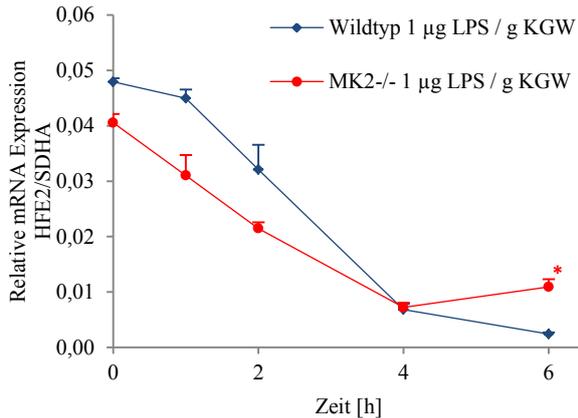
**Abbildung 3.39: MK2 beeinflusst im Verlauf der APR die Expression von SMAD4 aber nicht SMAD7 in der Leber.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> Tiere wurden über die angegebenen Zeiträume mit 1 µg LPS / g KGW behandelt. Nach Versuchsende wurde aus den blutleer perfundierten Lebern RNA extrahiert und mittels RT-qPCR mit (A) SMAD4 und (B) SMAD7 spezifischen Primern untersucht. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der gegen SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ , n=2 für MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> 4h, n≥3 sonst, ±SEM).

on von SMAD4 in Lebergewebe LPS behandelter WT Mäuse nimmt über einen Zeitraum von 4h ab, bevor die Transkriptlevel langsam ansteigen. Die basalen Transkriptlevel werden in WT Mäusen dabei zu keinem Zeitpunkt signifikant überschritten. In MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> Tieren bleibt die Transkriptionsrate über 2h konstant, steigt dann an und ist nach 6h sowohl gegenüber der basalen Expression, als auch gegenüber WT Mäusen signifikant erhöht.

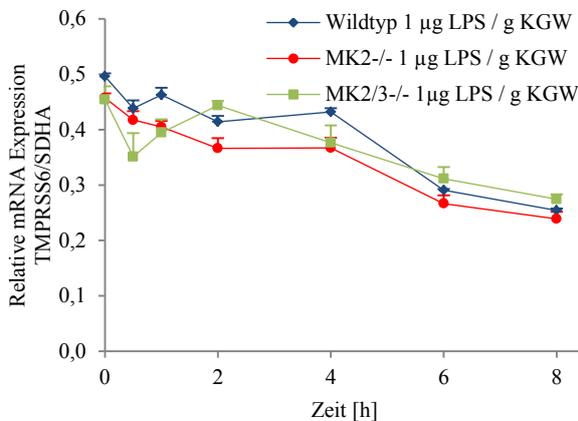
Vor dem Hintergrund der erhöhten SMAD4 Expression im Verlauf der APR in MK2<sup>-/-</sup> Tieren wurde auch die Expression des Inhibitors der SMAD Singlatransduktion SMAD7 untersucht. Abbildung 3.39B stellt die Expressionslevel von SMAD7 in Lebergewebe LPS behandelte Tiere dar. SMAD7 Transkriptlevel sinken im Verlauf der APR schnell ab und erreichen nach 2h eine minimale Expressionsrate von etwa 20% der Ausgangswerte. Danach steigt die Transkriptzahl in allen Genotypen leicht an, bleibt aber über den gesamten beobachteten Zeitraum von 8h im Vergleich zur basalen Situation erniedrigt.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die MK2 in der Leber transkriptionell einen Einfluss auf die SMAD Signalvermittlung im Verlauf einer LPS induzierten APR hat, indem es die Expression des gemeinsamen Signalmoleküls SMAD4 reguliert. Die Hochregulation von SMAD4 sowohl in MK2<sup>-/-</sup> als auch in MK2<sup>3<sup>-/-</sup></sup> Tieren weisen jedoch darauf hin, dass dieser Mechanismus nicht für die beobachtete differenzielle Regulation von Hepcidin in diesen Mäusen verantwortlich ist.



**Abbildung 3.40: MK2 beeinflusst nicht die intrahepatische HFE Expression im Rahmen der LPS induzierten APR.**

WT und MK2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde aus den blutleer perfundierten Lebern RNA extrahiert und mittels RT-qPCR mit HFE spezifischen Primern analysiert. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der gegen SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).



**Abbildung 3.41: MK2 hat auf die Expression von TMPRSS6 während der LPS induzierten APR keinen Einfluss.**

WT, MK2<sup>-/-</sup> und MK2<sup>3-/-</sup> Mäuse wurden für die angegebenen Zeiträume mit den genannten LPS Dosen behandelt. Nach Versuchsende wurde aus den blutleer perfundierten Lebern RNA extrahiert und mittels RT-qPCR mit TMPRSS6 spezifischen Primern analysiert. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte der gegen SDHA normalisierten Werte ( $2^{-\Delta ct}$ ,  $n=2$  für MK2<sup>3-/-</sup> 4h,  $n \geq 3$ ,  $\pm$ SEM).

### 3.3.5 MK2 beeinflusst nicht die Regulation von HFE und Matripase-2 während der LPS induzierten APR

Weitere wichtige Regulatoren der Eisenhomöostase und Heparin Expression sind die Membranproteine HFE und Matripase-2. Heparin wird als wichtiger Eisenregulator auch durch die Serum Eisenkonzentration reguliert. Ein wichtiger Mediator ist dabei der Transferrin Rezeptor 2, der durch das HFE Gen codiert wird. Im Rahmen der APR wird HFE intrahepatisch negativ reguliert (Abb. 3.41). Während des Beobachtungszeitraums von 6h nimmt die Expressionsrate unabhängig vom Genotyp kontinuierlich ab. Nach 6h sind die Werte in MK2<sup>-/-</sup> Tieren dabei gegenüber WT Mäusen leicht aber signifikant erhöht.

Matripase-2, die durch das Gen TMPRSS6 codiert wird, ist als negativ Regulator von Heparin beschrieben und wird in der Leber nach Stimulation mit LPS ebenfalls negativ reguliert (Abb. 3.41). Die Expressionsrate nimmt dabei im Verlauf des Beobachtungszeitraums von 8h unabhängig vom Genotyp in gleicher Kinetik und gleicher Stärke ab. Diese Daten wurden dahingehend interpretiert, dass die MK2 auf die Regulation der Heparinregulatoren Transferrin Rezeptor 2 und Matripase-2 während der hepatischen APR keinen Einfluss hat.

## 4 Diskussion

Die APR ist die erste unspezifische Reaktion des Organismus auf einen inflammatorischen Stimulus wie Trauma, Tumorerkrankungen, Entzündungen oder Infektionen. Diese Stimuli werden zunächst im betroffenen Gewebe von Immunzellen erkannt und in Kooperation mit anderen gewebsständigen Zellen lokal bekämpft. Sind diese lokalen Prozesse nicht ausreichend um den Stimulus zu beseitigen, kommt es über das Blut zu einer systemischen Ausdehnung der APR. Ein Charakteristikum dieser systemischen APR ist eine qualitative und quantitative Veränderung des Serumproteoms, die vor allem durch eine adaptierte Syntheseleistung der Leber für die betreffenden Proteine hervorgerufen wird. Diese als APP bezeichneten Proteine helfen im Kollektiv dabei den Stimulus einzudämmen sowie eine weitere Ausbreitung von Pathogenen und fortschreitende Gewebeschädigung zu verhindern. Die Orchestrierung der APP Expression in der Leber wird vor allem durch Lebermakrophagen vermittelt, die durch Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren auf die Hepatozyten regulierend einwirken. Dabei gelten dem aktuellen Stand der Literatur zufolge IL-6 und die anderen IL-6 Typ Zytokine als Hauptregulatoren, durch die die Expression der meisten APPs initiiert wird. IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  gelten dagegen als Modulatoren der IL-6 vermittelten APP Synthese, indem sie die Expression abhängig von der Spezies und dem jeweiligen APP synergistisch oder additiv verstärken oder hemmen [39].

Ziel dieser Arbeit war es, die hepatische APR zu charakterisieren und dabei den Einfluss der MK2 auf die intrahepatische Synthese von Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  einerseits und auf die Expression von APPs andererseits zu untersuchen.

Die p38<sup>MAPK</sup> abhängige Proteinkinase MK2 ist im Kontext der hepatischen APR deshalb von Interesse, da die Zytokine, denen wie oben ausgeführt eine zentrale Rolle in der Regulation der APR zugesprochen wird, MK2 abhängig reguliert werden und MK2<sup>-/-</sup> Tiere in Reaktion auf LPS diese Zytokine in deutlich reduzierter Menge produzieren. Demnach wurde IL-6 als stark MK2 abhängiges Gen beschrieben, das nach der Behandlung mit unterschiedlichen Stressoren in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen vermindert exprimiert wird [107]. Dies wurde für unterschiedliche Gewebe und Zellpopulationen gezeigt und konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für die Leber während der LPS induzierten systemischen APR bestätigt werden (Abb. 3.1). Die Familie der IL-6 Typ Zytokine umfasst neben IL-6 noch 10 weitere Vertreter, die ihre biologische Wirkung alle über die gleiche signaltransduzie-

rende Rezeptoruntereinheit gp130 und die Aktivierung von STAT3 vermitteln [153]. In IL-6 defizienten Tieren, die nach einer Stimulation mit LPS keine Beeinträchtigung der APP Synthese zeigen [45], wird deshalb für einen Teil der IL-6 Typ Zytokine diskutiert, ob diese stimulusabhängig die Aufgaben von IL-6 übernehmen können. Um ein differenzierteres Bild der MK2 Abhängigkeit der IL-6 Familie zu erhalten, wurden LIF (Abb. 3.2) und OSM (Abb. 3.3) in dieser Studie analysiert. Dabei konnte sowohl für LIF, als auch für OSM erstmals *in vivo* eine klare Abhängigkeit der LPS induzierten Expression dieser Gene von der MK2 belegt werden. Für OSM konnten damit Ergebnisse aus Zellkultursystemen bestätigt werden, die zuvor in der Arbeitsgruppe erhoben wurden [131]. Neben der Expression dieser Liganden, beeinflusst die MK2 außerdem die Signalwege, die diese auslösen. So wurde ein Mechanismus beschrieben, nach dem die aktivierte MK2 die Rezeptoruntereinheit gp130 phosphoryliert, woraufhin diese internalisiert und degradiert wird [101]. Dadurch ist es möglich, dass die MK2 die Verfügbarkeit des Rezeptors der IL-6 Familie limitiert und so einer anhaltenden Signaltransduktion über diesen Weg entgegen wirkt. OSM nimmt dabei eine Sonderrolle innerhalb der IL-6 Typ Zytokine ein, da es als einziger Vertreter dieser Familie nicht ausschließlich auf gp130 angewiesen ist. So kann OSMR auch den Erk1/2 Signalweg aktivieren und trägt darüber zur effizienten Aktivierung von APPs wie  $\alpha$ 2M bei [154]. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass die MK2 auch die Verfügbarkeit dieses Rezeptors limitiert, indem es die Expression auf transkriptioneller Ebene herunterreguliert [131]. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit *in vivo* bestätigt werden (Abb. 3.3). So ergibt sich für die IL-6 Zytokin Familie im MK2<sup>-/-</sup> die Situation, dass die Expression dieser Liganden nach einer Behandlung mit LPS stark eingeschränkt ist (Abb. 3.1, 3.2, 3.3), die Verfügbarkeit der signaltransduzierenden Rezeptoren hingegen erhöht ist [101,131] (Abb. 3.3).

Ein weiterer für die Regulation der APP Synthese zentraler Faktor ist IL-1 $\beta$ . Für dieses Zytokin konnte nachgewiesen werden, dass es die IL-6 induzierte Aktivierung von STAT3 in zwei Phasen in Hepatozyten des Menschen und der Ratte zu hemmen vermag [62,155]. Die erste Phase der STAT3 Aktivierung wird dabei durch einen p38<sup>MAPK</sup> abhängigen Signalweg unterdrückt, wohingegen die Inhibierung der späten STAT3 Aktivierung durch NF $\kappa$ B vermittelt wird. So konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  über die Regulation der IL-6 vermittelten STAT3 Aktivierung die Expression der APPs FG $\gamma$  und  $\alpha$ 2M supprimiert und so entscheidend in die hepatische APR eingreift. Andere APPs wie beispielsweise Hecpidin werden hingegen vor allem durch die gleichzeitige Stimulation mit IL-6 und IL-1 $\beta$  verstärkt exprimiert. Auch IL-1 $\beta$  wurde in früheren Studien als MK2 abhängiges Zytokin beschrieben, dessen Expression in MK2<sup>-/-</sup> Tieren in verschiedenen Modellen der APR unterdrückt wird [118,119,156]. Diese Ergebnisse konnten auf Transkriptebene in der Leber bestätigt werden (Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu werden

aber systemisch im Serum gemessene IL-1 $\beta$  Konzentrationen erreicht, die denen der WT Situation entsprechen (Abb. 3.6) was auch in verschiedenen vorangegangenen Studien beobachtet wurde [134]. Neben IL-1 $\beta$  weist auch die Familie der IL-1 Zytokine weitere Mitglieder auf, die in die Regulation der APR involviert sind. Eine Abhängigkeit der Expression dieser Zytokinfamilie von der MK2 wurde auch für IL-1 $\alpha$  beschrieben und in dieser Arbeit bestätigt [157] (Abb. 3.7). Die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Daten weisen außerdem auf eine bislang nicht beschriebene Abhängigkeit der LPS vermittelten Expression von IL-33 im Verlauf der systemischen Entzündungsantwort hin (Abb. 3.7). Neben der bereits in der Literatur veröffentlichten verminderten Expression von IL-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  in MK2 defizienten Mäusen, die in dieser Arbeit auf transkriptioneller Ebene in der Leber bestätigt werden konnte (Abb. 3.6, 3.7), ist IL-33 das dritte Familienmitglied der IL-1 Zytokin Familie, für das eine MK2 abhängige Regulation beschrieben wird. Daher ist eine kürzlich veröffentlichte Studie von Interesse, die zeigt, dass MK2 durch IL-33 vermittelte Signale aktiviert wird [158]. Dies eröffnet die Möglichkeit eines positiven Rückkopplungsmechanismus, wie er für IL-1 $\beta$  bereits beschrieben wurde [156], in dem eine ungehinderte Expression von IL-33 durch MK2 vermittelt wird und MK2 wiederum durch IL-33 aktiviert und so zu einer verstärkten IL-33 Expression beiträgt. Hervorzuheben ist auch, dass IL-33 in Mastzellen ebenfalls in die Regulation von STAT3 involviert ist. In diesen Zellen aktiviert IL-33 diesen Signalweg c-Kit abhängig [159]. So könnte auch IL-33 über die Aktivierung von STAT3 direkt in die Expression von APPs in der Leber einwirken, was jedoch noch nicht untersucht wurde.

Neben den für die APR zentralen IL-6 und IL-1 Zytokinen, wird nach derzeitigem Kenntnisstand TNF $\alpha$  als das dritte Schlüsselement der Regulation der APP Synthese angesehen. Dies begründet sich durch Studien, in denen die kombinierte Inaktivierung von IL-6 und TNF $\alpha$  die LPS induzierte Expression von SAA und SAP verhindert [51]. Die MK2 Abhängigkeit der TNF $\alpha$  Expression in unterschiedlichen Entzündungsmodellen ist dabei schon sehr umfangreich untersucht worden und wird neben post-transkriptionellen, vor allem auf translationelle Einflüsse zurückgeführt [160]. Das in dieser Arbeit gemessene Expressionsprofil von TNF $\alpha$ , das auf Transkriptlevel in der Leber wenig durch MK2 beeinflusst ist, auf Ebene der Serum Proteinkonzentration in MK2<sup>-/-</sup> Tieren hingegen stark reduziert exprimiert wird (Abb. 3.8), deutet darauf hin, dass die beschriebenen MK2 abhängigen Regulationsmechanismen auch in der Leber einen entscheidenden Einfluss auf die TNF $\alpha$  Synthese haben.

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass die für die APP Synthese in der Literatur als die wichtigsten Regulatoren diskutierten Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  auch in der Leber MK2 abhängig durch LPS induziert werden, sodass wichtige pro-inflammatorische Signalgeber in MK2<sup>-/-</sup> Tieren nur in verminderter Stärke exprimiert werden.

Neben ihren pro-inflammatorischen Effekten sind diese Zytokine jedoch auch maßgeblich in die Initiierung anti-inflammatorischer Signale involviert. So wird beispielsweise das zentrale anti-inflammatorische Zytokin IL-10 in unterschiedlichen Singalkaskaden durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  einerseits und durch IL-6 andererseits reguliert. Dabei ist die IL-6 induzierte Regulation STAT3 abhängig [161, 162], während die Regulation vermittelt durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  über p38<sup>MAPK</sup> und MK2 verläuft [120, 163]. Das Fehlen der MK2 bewirkt, dass die IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  induzierte Signaltransduktion über p38<sup>MAPK</sup> nicht ungestört ablaufen kann und führt so zu einer Verminderung der IL-10 Expression [120]. Der Befund der herabgesetzten IL-10 Synthese konnte auch in dieser Studie für die Leber MK2 defizienter Tiere belegt werden (Abb. 3.14).

IL-10 vermittelt seine anti-inflammatorischen Effekte über verschiedene Mechanismen. Einer der wichtigsten Wege, über die IL-10 und auch IL-6 ihre anti-inflammatorische Wirkung vermitteln, ist die STAT3 abhängige Induktion von SOCS3. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus, über den STAT3 sein eigenes Signal limitiert, ist in der Kontrolle der APR von entscheidender Bedeutung [164]. So zeigen SOCS3 defiziente Tiere eine erhöhte Anfälligkeit für LPS induzierte Sepsis und höhere Level pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  [164]. Die MK2 spielt in der SOCS3 Expression eine Rolle in der TNF $\alpha$  vermittelten Transkriptstabilisierung von SOCS3 [165], sodass die Expression von SOCS3 in MK2<sup>-/-</sup> Tieren durch die verminderte Transkriptstabilität herabgesetzt ist. Die in dieser Studie erhobenen Daten deuten dabei darauf hin, dass die SOCS3 Expression auch in der Leber LPS behandelter MK2<sup>-/-</sup> Tiere beeinträchtigt ist (Abb. 3.16). Darüber hinaus wurde mit LTB erstmals ein weiterer Vertreter auch für die TNF Zytokin Familie identifiziert, der MK2 abhängig reguliert wird (Abb. 3.9). Dieser Faktor wird in der Leber IL-6 und IL-1 $\beta$  abhängig reguliert [166] und reguliert die Aktivität von NK Zellen während einer APR [167]. Für die Liganden der TNF Familie stehen mehrere Rezeptoren zur Verfügung, die im Verlauf der APR LPS induziert reguliert werden. Die in dieser Studie erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die MK2 auf die Kinetik der Expression von TNFRSF1A Einfluss hat und die Expression dieses Rezeptors über einen längeren Zeitraum ermöglicht (Abb. 3.10). Damit ist es möglich, dass die MK2 die pro-inflammatorischen Effekte, die TNF $\alpha$  und andere Mitglieder der TNF Familie auf TNF sensitive Zellen ausüben, durch die Regulation der Rezeptoren und der Liganden beeinflusst.

Auch Interferone sind wichtige Immunmodulatoren der LPS induzierten APR. Beispielsweise erhöhen IFN $\alpha$ /IFN $\beta$  die Expression von IL-6 und IL-10 und können so den Übergang der pro-inflammatorischen zur anti-inflammatorischen Phase der APR regulieren [68]. Auch IFN $\gamma$  ist über die STAT Signalkaskade in die Expression von APPs

wie Angiotensin und möglicherweise weiterer APPs involviert [71]. In früheren Studien konnte bereits eine MK2 Abhängigkeit von IFN $\beta$  in Makrophagen gezeigt werden [120]. Ein interessanter Aspekt der IFN $\beta$  Expression ist dabei, dass die Proteinkinasen MK2 und MK3 für dieses Gen entgegengesetzte Funktionen zu erfüllen scheinen. Dies steht im Gegensatz zu den übrigen diskutierten Regulatoren der APR, für die MK2 und MK3 redundante Funktionen haben. So wurde gezeigt, dass die MK2 inhibitorische Effekte der MK3 auf die IFN $\beta$  Expression verhindert, wodurch die in MK2<sup>-/-</sup> Zellen beobachtete defiziente LPS induzierte IFN $\beta$  Expression in MK2/3<sup>-/-</sup> Zellen wiederhergestellt werden konnte [120]. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit tendenziell auch *in vivo* bestätigt werden (Abb. 3.11A). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit erstmals auch gezeigt werden, dass dieses Zusammenspiel von MK2 und MK3 auch für die LPS induzierte Expression von IFN $\gamma$  entscheidend ist, da auch für dieses Gen eine entsprechende Regulation in MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren gezeigt werden konnte (Abb. 3.11B).

Der Einfluss der MK2 auf IFN Signale scheint sich darüber hinaus auch auf die Rezeptoren IFN $\alpha$ R1 und IFN $\alpha$ R2 zu erstrecken (Abb. 3.12). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten dabei darauf hin, dass die MK2 die Verfügbarkeit des IFN $\alpha$ R1 basal limitiert, was sich in einer Steigerung der Transkriptlevel in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen äußert (Abb. 3.12A, C). IFN $\alpha$ R2 hingegen wird nach einem LPS Reiz in der Leber teilweise MK2 abhängig reguliert, wodurch die maximale Expression dieses Rezeptors in MK2<sup>-/-</sup> Tieren herabgesetzt ist (Abb. 3.12B). Es konnte gezeigt werden, dass Ifnar2 durch Stimulation mit IFN $\gamma$  hochreguliert wird [168]. Die verminderte Induktion von IFN $\gamma$ , die in MK2<sup>-/-</sup> Tieren beobachtet wird (Abb. 3.11) könnte demnach eine mögliche Ursache für die schnelle Reduktion von Ifnar2 in diesen Tieren sein.

So weisen diese Daten darauf hin, dass auch die Interferonantwort der Maus auf einen Entzündungsreiz sowohl auf Ebene der Liganden, als auch auf Ebene der Rezeptoren reguliert wird. Inwieweit der Einfluss auf die Rezeptoren der unterschiedlichen Interferone durch die MK3 reguliert wird, muss darüber hinaus noch untersucht werden.

Darüber hinaus weisen die hier erhobenen Daten darauf hin, dass die MK2 maßgeblich in der Expression des CSF1 Rezeptors beteiligt ist, da dieser auf Transkriptebene in MK2<sup>-/-</sup> Tieren weniger stark exprimiert wird, als in WT Mäusen (Abb. 3.13). CSF1 ist ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin, das über die Bindung an seinen Rezeptor die Aktivität von Makrophagen reguliert [169,170]. Obwohl die MK2 hier keinen Einfluss auf die Expression des Liganden hat, könnte sie durch die Regulation der Verfügbarkeit des Rezeptors auf die maximale Induktion des durch CSF1 vermittelten Signalwegs einwirken und so die Aktivierung von Makrophagen im Verlauf der APR erhöhen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CSF1R für die Genese von Osteoclasten essenziell ist [171]. Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass gezeigt werden konnte, dass die

## 4 Diskussion

p38<sup>MAPK</sup> in der TNF induzierten Differenzierung von Osteoclasten eine entscheidende Rolle spielt [172]. In diesem Experiment zeigten p38<sup>MAPK</sup> defiziente Tiere eine reduzierte Osteoclastenzahl, was auf die fehlende Transduktion der TNF vermittelten Signale zurückgeführt wurde. Die Experimente in dieser Studie weisen darauf hin, dass über die Signaltransduktion der TNF, die Defizienz des p38<sup>MAPK</sup> Signalweges möglicherweise auch Einfluss auf die Expression des essenziellen CSF1R haben könnte.

Auch Chemokine sind wichtige Modulatoren der angeborenen Immunantwort, durch die Immunzellen aktiviert und zur gerichteten Zellbewegung angeregt werden. Durch die Regulation verschiedener Chemokine wie CCL-2 und CCL-5 beeinflusst die MK2 diese Vorgänge und damit den pro-inflammatorischen Status im geschädigten Gewebe [139]. Beispielsweise führt eine Inhibierung der MK2 in einem Modell endothelialer Gewebeschädigung zu einer verminderten Anheftung inflammatorischer Zellen und einer Beschleunigung des Wundheilungsprozesses, vermutlich durch Herabregulation pro-inflammatorischer Reize. Neben den bereits bekannten MK2 Abhängigkeiten, die für die Expression der CCL Chemokine 2, 3 und 5 (siehe Abb. 3.17) sowie der CXCL Chemokine 2 und 10 beschrieben wurden (Abb. 3.20, 3.21) und die in dieser Arbeit auch im Kontext LPS induzierter APR in der Leber bestätigt werden konnten, wurden in dieser Studie außerdem eine Reihe neuer MK2 abhängiger Chemokine identifiziert.

Viele der hier diskutierten Mediatoren der APR entfalten ihre biologische Wirkung über STAT3 oder beeinflussen die STAT3 vermittelte Signaltransduktion, die durch andere Regulatoren ausgelöst wird. Beispielsweise ist die IL-6 Typ Zytokin vermittelte Signalübertragung über gp130 ein wichtiger Faktor für die STAT3 Aktivierung während der APR. Mäuse, in denen dieser Signalweg durch Mutationen im gp130 unterbunden ist, zeigen nach einem inflammatorischen Reiz eine reduzierte STAT3 Phosphorylierung und eingeschränkte APP Synthese [40, 173, 174]. Wie bereits beschrieben beeinflusst IL-1 $\beta$  vermittelt über p38<sup>MAPK</sup> und NF $\kappa$ B maßgeblich die Aktivierung von STAT3 im Verlauf der APR und modifiziert darüber die Synthese verschiedener APPs wie  $\alpha$ 2M und  $\gamma$ -Fibrinogen [62]. Auch Chemokine können über ihre Rezeptoren STAT3 aktivieren. So wurde beispielsweise beschrieben, dass die Signale von CXCR-2 teilweise über STAT3 vermittelt werden [175]. Auch die Wirkung von Interferonen in Hepatozyten ist entscheidend von STAT3 abhängig [176]. So konnte gezeigt werden, dass das Hepatitis C Virus in Hepatozyten die Interferon vermittelte Aktivierung von STAT1 und STAT3 verhindert und so wichtige anti-virale Signale unterdrückt.

Interessanter Weise haben die in dieser Arbeit beschriebenen zahlreichen Abhängigkeiten von wichtigen Regulatoren der APR intrahepatisch keinen Einfluss auf die STAT3 Aktivierung (Abb. 3.5). Dies könnte zum Teil auf die höhere Sensitivität MK2 defizien-

ter Tiere gegenüber Zytokinen der IL-6 Familie zurückgeführt werden. Die verminderte Expression dieser Zytokine könnte also teilweise durch die fehlende Internalisierung von gp130 und die basal erhöhte Expression von OSMR kompensiert werden [101] (Abb. 3.3). Zudem sind auch wichtige Negativregulatoren der STAT3 Aktivierung wie IL-1 $\beta$  [62] und SOCS3 vermindert exprimiert. In der Summe scheinen sich die unterschiedlichen MK2 Abhängigkeiten für die STAT3 Aktivierung gegenseitig aufzuheben und so eine normale Signaltransduktion über diesen Transkriptionsfaktor zu ermöglichen.

STAT3 gilt als der Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich für die Induktion von APPs verantwortlich ist. Dabei wird er durch NF $\kappa$ B beeinflusst. Die Beeinflussung kann zum einen positiv, zum anderen aber auch negativ auf die Expression der unterschiedlichen APPs wirken und basiert auf unterschiedlichen Mechanismen wie der Konkurrenz um überlappende Bindestellen in den Promotoren der APP Gene, Komplexbildung und Beeinflussung der Aktivierung von STAT3. Dies wird dadurch unterstrichen, dass die gleichzeitige Hepatozyten-spezifische Defizienz von STAT3 und der NF $\kappa$ B Untereinheit RelA zu einem Ausbleiben der APP Synthese führt, die Defizienz nur eines dieser Faktoren aber nur einen Teil der APPs beeinträchtigt [40, 42]. IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  gelten dabei als die maßgeblichen Induktoren dieser Signalkaskaden. Im hier vorgestellten System ist die LPS induzierte STAT3 Aktivierung in MK2<sup>-/-</sup> Tieren nicht beeinträchtigt (Abb. 3.5), obwohl die Expression dieser Mediatoren in der Leber eingeschränkt ist (Abb. 3.1, 3.6, 3.8).

Überraschender Weise ist auch die Expression der meisten untersuchten APPs nicht differenziell in MK2<sup>-/-</sup> Tieren reguliert. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund von Interesse, dass beispielsweise die Expressionsstärke von CD14 (Abb. 3.22), SAA (Abb. 3.24), der Fibrinogene (Abb. 3.25) und Haptoglobin (Abb. 3.26) zwar nicht vom Genotyp, aber von der verwendeten LPS Dosis abhängt, obwohl die Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in den niedrig dosiert behandelten Tieren der in MK2<sup>-/-</sup> Tieren gemessenen Intensität entspricht (Abb. 3.6, 3.8) und diese wie im Fall von IL-6 sogar teilweise noch übersteigt (Abb. 3.1). Diese Daten weisen darauf hin, dass nicht die Expression der hauptsächlich diskutierten Regulatoren IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  alleine über den Ausgang der APP Synthese entscheiden, sondern dass die Expression der APPs in der Leber eher das Ergebnis der Summe einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren ist, über die durch unterschiedliche Signalkaskaden und Rezeptoren eine Gesamtantwort in der Leber integriert wird. So wäre es denkbar, dass ein noch nicht identifizierter Faktor im Kontext der MK2 Defizienz die Aufgaben von IL-6 als Induktor der APP Synthese übernimmt. Dafür scheinen die ansonsten diskutierten IL-6 Familien Zytokine LIF und OSM jedoch nicht in Betracht zu kommen, da auch diese Faktoren in MK2<sup>-/-</sup> Tieren reduziert exprimiert werden. Hervorzuheben ist, dass  $\alpha$ 2M das einzige in dieser Untersuchung analysierte APP Gen

ist, das im MK2<sup>-/-</sup> Tieren weniger stark exprimiert wird als in WT Mäusen (Abb. 3.29). Die Bestimmung der Serum Proteinkonzentrationen von  $\alpha$ 2M ergab dabei jedoch, dass trotz der herabregulierten Induktion der  $\alpha$ 2M Expression in der Leber, die in WT Tieren gemessenen Konzentrationen im Blut erreicht werden. Hingegen ist die basale  $\alpha$ 2M Konzentration im Serum MK2 defizienter Tiere höher als in der WT Situation und erreicht bereits unbehandelt fast die Konzentration, die nach der Behandlung gemessen wird. Dies könnte auf einen möglichen Rückkopplungsmechanismus hinweisen, der die Konzentration von  $\alpha$ 2M im Serum kontrolliert und der ein Überschießen dieses APPs während der APR verhindert. Um sich einem solchen Rückkopplungsmechanismus experimentell zu nähern, wäre es möglich die  $\alpha$ 2M Expression in einem Zellkulturexperiment zu induzieren und dabei durch die Zugabe von exogenem  $\alpha$ 2M die Ausgangskonzentrationen im Medium zu beeinflussen. Es bleibt abzuwarten, ob durch fortschreitende Forschung ein solcher Mechanismus für  $\alpha$ 2M beschrieben werden kann.

Überraschender Weise ist die Expression von Heparin in MK2<sup>-/-</sup> Tieren nach der Injektion von LPS initial sogar stärker als in WT Mäusen, während in MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren keine signifikante Induktion der Heparin Expression gemessen werden kann (Abb. 3.30). Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss der MK2 und der MK3 für dieses APP unterschiedlich ist. Heparin ist ein wichtiger Regulator der Serum Eisenkonzentration, indem er an Ferroportin (FPN) bindet [177]. FPN ist der einzige bekannte Eisenexporter, der Eisen aus dem Zellinneren in den Extrazellulären Raum befördern kann. Seine Expression ist auf Hepatozyten, Makrophagen und Enterozyten beschränkt. Nach der Bindung von Heparin wird FPN internalisiert und degradiert [177, 178]. Das noch im Blut verbleibende Eisen wird dann zum Beispiel für die Erythropoese von den Zellen aufgenommen. Durch das Fehlen von FPN und die damit verhinderte Eisenabgabe ins Blut, kommt es dann zu einer Verringerung der Eisenkonzentration im Serum. Die Transkriptdaten in den Lebern LPS behandelte Mäuse lassen demnach vermuten, dass die Eisenkonzentration in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen schneller absinkt, als in WT Tieren, während die Regulation in MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren moderater verlaufen müsste. Tatsächlich entspricht der Verlauf der Serum Eisenkonzentration in MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren dieser Vorhersage. Die Expression von FPN wird neben der Heparin vermittelten Degradation auch durch eine Herabregulation der Neusynthese auf transkriptioneller Ebene beeinflusst. Diese Regulation der FPN Expression ist dabei in allen Genotypen gleichermaßen stark ausgeprägt (Abb. 3.32), sodass diese Daten darauf hinweisen, dass die Unterschiede in der Serum Eisenkonzentration tatsächlich auf die differenzielle Regulation von Heparin zurückzuführen sind.

Für die Regulation der Heparin Expression wurden vor allem SMAD und STAT3 abhängige Mechanismen beschrieben. So wird für die basale Regulation ein SMAD ab-

hängiger Mechanismus über die rezeptorassoziierten SMAD1/5/8 diskutiert [179]. Nach deren Aktivierung durch TGF/BMP Signalrezeptoren, gehen diese einen Komplex mit SMAD4 ein, der dann in den Zellkern transloziert und dort die Hepcidin Synthese initiiert. Im Verlauf der APR übernimmt dem derzeitigen Stand der Literatur zur Folge hauptsächlich die durch IL-6 ausgelöste STAT3 Signalkaskade die Regulation der Hepcidin Expression. Dieser STAT3 abhängige Mechanismus konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch als Einflussfaktor für den Befund der differentiellen Hepcidin Regulation in  $MK2^{-/-}$  und  $MK2/3^{-/-}$  Tieren ausgeschlossen werden (Abb. 3.5). Auch durch die Expressionslevel der bekannten Hepcidin Regulatoren wie BMP4, INHBB (Abb. 3.33), GDF15 und TWSG1 [180, 181] (Abb. 3.35 sowie des SMAD Aktivators TGF $\beta$  (Abb. 3.34) können die beobachteten Unterschiede der Regulation von Hepcidin in den  $MK2^{-/-}$  und  $MK2/3^{-/-}$  Tieren nicht erklärt werden.

Um den Ursprung der unterschiedlichen Regulation in den verschiedenen Genotypen für weiterführende Studien zunächst zelltyp-spezifisch zu lokalisieren, wurde ein Zellkultur basiertes System etabliert, das die Untersuchung der Hepcidin Expression *ex vivo* erlaubt. Dafür wurden aus Knochenmark differenzierte Makrophagen (BMDM) für 48h mit LPS inkubiert und das konditionierte Medium anschließend zellfrei auf primäre Hepatozyten transferiert. Eine Untersuchung der zentralen Regulatoren der APR IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in den konditionierten Medien LPS behandelter BMDMs zeigt eine deutliche Abhängigkeit der TNF $\alpha$  Expression in  $MK2^{-/-}$  BMDMs. Die Expression von IL-6 ist in diesem System zwar leicht verringert, dieser Effekt ist jedoch im Vergleich zur *in vivo* Situation erheblich geringer. Die IL-1 $\beta$  Expression ist unter diesen Bedingungen nicht von der MK2 abhängig (Abb. 3.36). Werden primäre  $MK2^{-/-}$  und WT Hepatozyten mit Überständen von Makrophagen der jeweils gleichen Genotypen behandelt, wird die Hepcidin Expression wie *in vivo* im  $MK2^{-/-}$  schneller und stärker induziert als im WT. Werden WT Hepatozyten mit dem Überstand  $MK2$  defizienter Makrophagen behandelt und umgekehrt, wird dieser Effekt noch verstärkt. Dies deutet auf einen intrazellulären Mechanismus hin, der im Hepatozyten MK2 abhängig die Expression von Hepcidin reguliert.

Interessanter Weise ist die Regulation des signaltransduzierenden SMAD4 in den Lebern von  $MK2^{-/-}$  und  $MK2/3^{-/-}$  Tieren erhöht (Abb. 3.39). Dies könnte mit einer höheren Sensitivität dieses Signalweges einhergehen, wodurch die stärkere Expression von Hepcidin in  $MK2^{-/-}$  Tieren erklärt werden könnte. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von ID1 gemessen, das wie Hepcidin über den SMAD1/5/8 vermittelten Signalweg reguliert wird [179] (Abb. 3.38). Tatsächlich ist die Expression dieses SMAD abhängigen Gens in  $MK2^{-/-}$  Tieren gegenüber WT Mäusen zu späten Zeitpunkten ab 4h erhöht. Die ebenso verstärkte Expression von ID1 in  $MK2/3^{-/-}$  Tieren weist jedoch darauf hin, dass die für die Hepcidin beobachtete differenzielle Expression in  $MK2^{-/-}$  und  $MK2/3^{-/-}$  Tieren

eine andere Ursache haben muss.

Neben den SMAD Aktivatoren ist es auch möglich, die Regulation von HFE über die Verfügbarkeit von Oberflächenrezeptoren zu regulieren. HFE ist als Co-Rezeptor für Mitglieder der BMP Familie einer der wichtigsten Faktoren in der Regulation der Serum Eisenkonzentration und ein positiver Regulator von HFE [182]. Ein Defekt in diesem Gen ist mit Eisenstoffwechselkrankheiten assoziiert die durch eine defiziente HFE Regulation hervorgerufen werden [183, 184]. Hingegen ist Matripase-2, die durch das Gen *TMPRSS6* codiert wird, ein Inhibitor der HFE Expression, durch den die BMP/SMAD Signalkaskade negativ beeinflusst wird [185]. Die Expressionsanalyse dieser Regulatoren zeigt allerdings, dass HFE im Kontext der LPS induzierten APR in der Leber unabhängig vom Genotyp herabreguliert wird und so als möglicher Induktor der HFE Expression in dieser Situation nicht in Frage kommt. Auch Matripase-2 wird nicht differenziell in den Genotypen exprimiert.

Somit weisen diese Daten insgesamt darauf hin, dass die Regulation der HFE Expression im Verlauf der LPS induzierten APR von den Proteinkinasen MK2 und MK3 intrazellulär im Hepatozyten mit gesteuert wird. Der genaue Mechanismus, über den diese Kinasen dabei ihren Einfluss auf die HFE Expression vermitteln muss darüber hinaus in weiterführenden Studien noch untersucht werden. In dieser Untersuchung konnten den bereits bekannten MK2 abhängigen Zytokinen und Chemokinen eine Reihe neuer Faktoren hinzugefügt werden, deren Expression im Verlauf der LPS induzierten APR differenziell reguliert werden. Interessanter Weise ist dabei die STAT3 Phosphorylierung in der Leber nicht beeinträchtigt, obwohl die Expression der bislang als zentrale STAT3 Aktivatoren diskutierten Mitglieder der IL-6 Typ Zytokine IL-6, LIF und OSM, abhängig von der MK2 reguliert werden. Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die MK2 zwar entscheidend in die Expression einiger der wichtigsten Regulatoren der APR involviert ist, dieser Einfluss sich jedoch nicht generell auf die Expression von APPs auswirkt, sondern nur einzelne APPs abhängig von der MK2 sind. Dies deutet darauf hin, dass für die Schlüsselfunktionen der zentralen Zytokine wie IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  im Kontext der Defizienz von MK2 und MK3 durch andere Faktoren übernommen werden kann. So scheinen für die Regulation der APR nicht einige wenige Faktoren eine entscheidende Rolle zu spielen, sondern viel mehr die Signale einer großen Anzahl an Mediatoren im Hepatozyten integriert zur Regulation der APP Synthese zu führen. Hingegen scheinen die MK2 und MK3 intrazellulär in Hepatozyten unterschiedlich in die Expression des APP HFE eingebunden zu sein. Auch hier belegen die Daten, dass der bislang diskutierte zentrale Einfluss von IL-6 auf die LPS induzierte Expression von HFE im MK2<sup>-/-</sup> vernachlässigbar ist. Der genaue Mechanismus, über den die Regulation im MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> stattfindet, muss in weiteren Experimenten erforscht werden. Das in dieser Arbeit etablierte Zellkultursystem kann dazu beitragen diese Mechanismen aufzuklären.

## 5 Zusammenfassung

Während der systemischen Akutphase Reaktion kommt es in der Leber und spezifisch im Hepatozyten zu einer differenziellen Expression verschiedener Serum Proteine, den sogenannten Akutphase Proteinen. Hauptregulatorenregulation dieser veränderten Syntheseleistung sind Zytokine und Chemokine die vor allem von Lebermakrophagen sezerniert werden. Für die Zytokin Familien Interleukin (IL)-6, IL-1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF) wird dabei eine Schlüsselrolle diskutiert. Diese regulieren, vermittelt über die Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF $\kappa$ B, die Akutphase Protein Synthese. Die wichtige Rolle von STAT3 und NF $\kappa$ B wird dadurch unterstrichen, dass die gleichzeitige Hepatozyten-spezifische Defizienz dieser Faktoren zu einem nahezu vollständigen Fehlen der APP Synthese führt. Die p38<sup>MAPK</sup> abhängigen Proteinkinasen MK2 und MK3 sind wichtige Regulatoren der durch zellulären Stress induzierten Zytokin- und Chemokin-synthese in Makrophagen, wobei die MK2 größeren Einfluss zu haben scheint. Zahlreiche Studien belegen, dass die Expression zentraler Entzündungsmediatoren und Regulatoren der Akutphase Proteinsynthese wie IL-6, IL-1 $\beta$ , und TNF $\alpha$  MK2 abhängig verläuft. Ausgehend von diesen Befunden sollte in dieser Arbeit der Einfluss der MK2 auf die Akutphase Protein Synthese *in vivo* untersucht werden. Darüber hinaus war ein wichtiges Ziel die Identifikation neuer MK2 abhängiger Entzündungsmediatoren *in vivo*.

Dazu wurden Wildtyp (WT), MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Mäuse mit LPS behandelt und anschließend die Expression wichtiger Entzündungsmediatoren und Akutphaseproteine in der Leber und im Serum analysiert. Dabei konnten die bereits für andere Gewebe und Modelle beschriebene MK2 Abhängigkeit einiger Zytokine und Chemokine wie IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL-10, CCL-2, CCL-3 und CXCL-2 *in vivo* bestätigt werden. Darüber hinaus konnten erstmals *in vivo* MK2 Abhängigkeiten der Expression von Leukämie Inhibitorischer Faktor (LIF), Oncostatin M (OSM) und dessen Rezeptor OSMR, IL-33, Lymphotoxin B (LTB), dem Rezeptor der TNF Familie TNFRSF1A, IFN $\gamma$ , CCL-7, CCL-8, CCL-11, CXCL-3, CXCL-10 und CXCL-12 beschrieben werden. Überraschender Weise haben diese Abhängigkeiten keinen Einfluss auf den Verlauf der STAT3 Aktivierung und auf die Synthese der meisten untersuchten Akutphase Proteine. Nur  $\alpha$ -2-Makroglobulin wird auf transkriptioneller Ebene MK2 abhängig reguliert. Darüber hinaus wird die Expression von Hecpidin in MK2<sup>-/-</sup> und MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren diffe-

renziell reguliert, wobei die Expression in MK2<sup>-/-</sup> Mäusen verstärkt und in MK2/3<sup>-/-</sup> Tieren abgeschwächt wird. Überstandstransfermodelle mit kultivierten Hepatozyten legen hierbei nahe, dass die differentielle Regulation der Hepsidin Expression durch MK2 und MK3 auf Ebene der intrazellulären Signalübertragung erfolgt und nicht durch MK2 bzw. MK3 abhängige Veränderungen der interzellulären Kommunikation verursacht wird.

Die vorliegenden Daten belegen somit, dass IL-6 Typ Zytokinen bzw. Zytokinen, die MK2 abhängig reguliert werden, keine essenzielle Rolle für die LPS induzierte Aktivierung von STAT3 in der Leber zukommt. Auch kommt ihnen *in vivo*, anders als bisher angenommen, keine unersetzbare Bedeutung für die Regulation der durch LPS induzierten Synthese von einem Großteil von Akut-Phase Proteinen zu. Hiervon ausgenommen sind lediglich  $\alpha$ -2-Makroglobulin und Hepsidin, wobei letzteres über noch ungeklärte Mechanismen differentiell durch MK2 und MK3 reguliert wird.

## 6 Summary

In the course of a systemic acute phase response, the liver and more specifically the hepatocyte show differential expression of a certain set of serum proteins, the so called acute phase proteins. Key regulators of the observed changes of expression of these proteins are cytokines and chemokines that are mainly synthesized by liver macrophages. Members of the family of IL-6, IL-1 and TNF type cytokines are discussed as the main regulators of these processes. These cytokines regulate the synthesis of acute phase proteins, mediated by STAT3 and NF $\kappa$ B. The importance of STAT3 and NF $\kappa$ B is further evidenced by experiments showing that simultaneous hepatocyte specific deletion of these transcription factors lead to an abrogation of acute phase protein synthesis. The p38<sup>MAPK</sup> dependent protein kinases MK2 and MK3 are central regulators for stress induced cytokine and chemokine synthesis in macrophages, where MK2 seems to have a greater impact. Numerous studies could show a MK2 dependent expression of central mediators of inflammation and regulators of acute phase protein synthesis such as IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ . Thus, this study aimed to analyze the influence of MK2 on the synthesis of acute phase proteins *in vivo*. Additionally, identification of novel MK2 dependent inflammatory mediators was an objective of this study.

Therefore, WT, MK2<sup>-/-</sup> and MK2/3<sup>-/-</sup> mice were treated with LPS with subsequent analysis of the expression profiles of central inflammatory mediators and acute phase proteins in the liver and serum of these animals. Dependencies of IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL-10, CCL-2, CCL-3 and CXCL-2 on MK2, which had been described previously for other tissues and models, could also be described in this study. In addition, *in vivo* dependency of LIF, OSM and its receptor OSMR, IL-33, lymphotoxin B (LTB), the TNF family receptor TNFRSF1A, IFN $\gamma$ , CCL-7, CCL-8, CCL-11, CXCL-3, CXCL-10 and CXCL-12 on MK2 could be shown for the first time. Most surprisingly, these dependencies did not translate into a differential activation of STAT3 or the synthesis of most analyzed acute phase proteins. The only exception was  $\alpha$ -2 macroglobulin ( $\alpha$ 2M) that was transcriptionally dependent on MK2. Additionally, expression of hepcidin was differentially regulated in MK2<sup>-/-</sup> and MK2/3<sup>-/-</sup> animals, in which expression is enhanced in MK2<sup>-/-</sup> mice whereas it is suppressed in MK2/3<sup>-/-</sup> animals. Supernatant transfer experiments with cultured hepatocytes indicate, that this differential regulati-

## 6 Summary

on of hepcidin expression by MK2 and MK3 is based on changes in intracellular signal transduction pathways rather than a differential intercellular communication.

Hence, these data show that IL-6 type cytokines and MK2 dependent cytokines do not play an essential role in the LPS induced STAT3 activation in the liver. Additionally, these cytokines do not exhibit an indispensable role in regulating the LPS induced synthesis of most acute phase proteins, except for  $\alpha$ -2-macroglobulin and hepcidin. However, the mechanism by which the latter of both is differentially regulated by MK2 and MK3 is not yet clarified.

# Literaturverzeichnis

- [1] C. Gabay and I. Kushner. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 340(6):448–454, Feb 1999.
- [2] M. E. Bianchi. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, 81(1):1–5, Jan 2007.
- [3] D. Haussinger, R. Kubitz, R. Reinehr, J. G. Bode, and F. Schliess. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol. Aspects Med.*, 25(3):221–360, Jun 2004.
- [4] J. G. Bode and P. C. Heinrich. Interleukin-6 signaling during the acute-phase response of the liver. In I. M. Arias, J. L. Boyer, F. V. Chisari, N. Fausto, D. Schachter, and D. A. Shafritz, editors, *The Liver: Biology and Pathobiology*, pages 565–580. Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 4th edition, 2001.
- [5] M. Yaron, I. Yaron, O. Smetana, E. Eylan, and U. Zor. Stimulation of prostaglandin E production by bacterial endotoxins in cultured human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 23(8):921–925, Aug 1980.
- [6] J. L. Humes, R. J. Bonney, L. Pelus, M. E. Dahlgren, S. J. Sadowski, F. A. Kuehl, and P. Davies. Macrophages synthesis and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature*, 269(5624):149–151, Sep 1977.
- [7] T. J. Williams and M. J. Peck. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature*, 270(5637):530–532, Dec 1977.
- [8] V. Strunk, K. Hahnenkamp, M. Schneuing, L. G. Fischer, and G. F. Rich. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth. Analg.*, 92(3):681–687, Mar 2001.
- [9] J. Raud. Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute mast cell-dependent inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 99(3):449–454, Mar 1990.
- [10] R. S. Byrum, J. L. Goulet, J. N. Snouwaert, R. J. Griffiths, and B. H. Koller. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. *J. Immunol.*, 163(12):6810–6819, Dec 1999.
- [11] V. Laux and D. Seiffge. Mediator-induced changes in macromolecular permeability in the rat mesenteric microcirculation. *Microvasc. Res.*, 49(1):117–133, Jan 1995.
- [12] A. Gyorfi, A. Fazekas, E. Posch, F. Irmes, and L. Rosivall. Role of histamine in the development of neurogenic inflammation of rat oral mucosa. *Agents Actions*, 32(3-4):229–236, Mar 1991.
- [13] L. Kindle, L. Rothe, M. Kriss, P. Osdoby, and P. Collin-Osdoby. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, 21(2):193–206, Feb 2006.
- [14] J. T. Liou, H. B. Yuan, C. C. Mao, Y. S. Lai, and Y. J. Day. Absence of C-C motif chemokine ligand 5 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and behavioral hypersensitivity in a murine neuropathic pain model. *Pain*, 153(6):1283–1291, Jun 2012.
- [15] S. Braber, S. A. Overbeek, P. J. Koelink, P. A. Henricks, G. J. Zaman, J. Garsen, A. D. Kraneveld, and G. Folkerts. CXCR2 antagonists block the N-Ac-PGP-induced neutrophil influx in the airways of mice, but not the production of the chemokine CXCL1. *Eur. J. Pharmacol.*, 668(3):443–449, Oct 2011.

## Literaturverzeichnis

- [16] A. P. Campanelli, C. I. Brodskyn, V. Boaventura, C. Silva, A. M. Roselino, J. Costa, A. C. Saldanha, L. A. de Freitas, C. I. de Oliveira, M. Barral-Netto, J. S. Silva, and A. Barral. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. *Hum. Immunol.*, 71(12):1220–1227, Dec 2010.
- [17] D. Lo, L. Feng, L. Li, M. J. Carson, M. Crowley, M. Pauza, A. Nguyen, and C. R. Reilly. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol. Rev.*, 169:225–239, Jun 1999.
- [18] J. M. Krueger and J. A. Majde. Microbial products and cytokines in sleep and fever regulation. *Crit. Rev. Immunol.*, 14(3-4):355–379, 1994.
- [19] E. K. LeGrand and J. Alcock. Turning up the heat: immune brinkmanship in the acute-phase response. *Q Rev Biol*, 87(1):3–18, Mar 2012.
- [20] J. J. Morley and I. Kushner. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 389:406–418, 1982.
- [21] I. A. Al-Rayahi and R. H. Sanyi. The overlapping roles of antimicrobial peptides and complement in recruitment and activation of tumor-associated inflammatory cells. *Front Immunol*, 6:2, 2015.
- [22] A. Inatsu, M. Kinoshita, H. Nakashima, J. Shimizu, D. Saitoh, S. Tamai, and S. Seki. Novel mechanism of C-reactive protein for enhancing mouse liver innate immunity. *Hepatology*, 49(6):2044–2054, Jun 2009.
- [23] J. A. Hoffmann, F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418):1313–1318, May 1999.
- [24] W. S. Tillett and T. Francis. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.*, 52(4):561–571, Sep 1930.
- [25] S. Bas, B. R. Gauthier, U. Spenato, S. Stingelin, and C. Gabay. CD14 is an acute-phase protein. *J. Immunol.*, 172(7):4470–4479, Apr 2004.
- [26] H. Tsukamoto, K. Fukudome, S. Takao, N. Tsuneyoshi, and M. Kimoto. Lipopolysaccharide-binding protein-mediated Toll-like receptor 4 dimerization enables rapid signal transduction against lipopolysaccharide stimulation on membrane-associated CD14-expressing cells. *Int. Immunol.*, 22(4):271–280, Apr 2010.
- [27] N. Yu, S. Liu, X. Yi, S. Zhang, and Y. Ding. Serum amyloid A induces interleukin-1 $\beta$  secretion from keratinocytes via the NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 inflammasome. *Clin. Exp. Immunol.*, 179(2):344–353, Feb 2015.
- [28] L. Sun, Z. Zhu, N. Cheng, Q. Yan, and R. D. Ye. Serum amyloid A induces interleukin-33 expression through an IRF7-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.*, 44(7):2153–2164, Jul 2014.
- [29] W. Poller, J. P. Faber, G. Klobeck, and K. Olek. Cloning of the human alpha 2-macroglobulin gene and detection of mutations in two functional domains: the bait region and the thiolester site. *Hum. Genet.*, 88(3):313–319, Jan 1992.
- [30] K. Nakamura, I. Ito, M. Kobayashi, D. N. Herndon, and F. Suzuki. Orosomucoid 1 drives opportunistic infections through the polarization of monocytes to the M2b phenotype. *Cytokine*, 73(1):8–15, May 2015.
- [31] J. W. Weisel. Fibrinogen and fibrin. *Adv. Protein Chem.*, 70:247–299, 2005.
- [32] M. I. Barnhart. Role of blood coagulation in acute inflammation. *Biochem. Pharmacol.*, pages :205–219, Mar 1968.
- [33] T. Ganz. Iron in innate immunity: starve the invaders. *Curr. Opin. Immunol.*, 21(1):63–67, Feb 2009.
- [34] M. V. Verga Falzacappa and M. U. Muckenthaler. Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide. *Gene*, 364:37–44, Dec 2005.

- [35] G. Nicolas, M. Bennoun, I. Devaux, C. Beaumont, B. Grandchamp, A. Kahn, and S. Vaulont. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(15):8780–8785, Jul 2001.
- [36] C. H. Park, E. V. Valore, A. J. Waring, and T. Ganz. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.*, 276(11):7806–7810, Mar 2001.
- [37] A. Krause, S. Neitz, H. J. Magert, A. Schulz, W. G. Forssmann, P. Schulz-Knappe, and K. Adermann. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.*, 480(2-3):147–150, Sep 2000.
- [38] H. M. Cantor and A. E. Dumont. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature*, 215(5102):744–745, Aug 1967.
- [39] J. G. Bode, U. Albrecht, D. Haussinger, P. C. Heinrich, and F. Schaper. Hepatic acute phase proteins—regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- $\kappa$ B-dependent signaling. *Eur. J. Cell Biol.*, 91(6-7):496–505, 2012.
- [40] L. E. Sander, S. D. Sackett, U. Dierssen, N. Beraza, R. P. Linke, M. Muller, J. M. Blander, F. Tacke, and C. Trautwein. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.*, 207(7):1453–1464, Jul 2010.
- [41] R. Sakamori, T. Takehara, C. Ohnishi, T. Tatsumi, K. Ohkawa, K. Takeda, S. Akira, and N. Hayashi. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology*, 46(5):1564–1573, Nov 2007.
- [42] L. J. Quinton, M. T. Blahna, M. R. Jones, E. Allen, J. D. Ferrari, K. L. Hilliard, X. Zhang, V. Sabharwal, H. Algul, S. Akira, R. M. Schmid, S. I. Pelton, A. Spira, and J. P. Mizgerd. Hepatocyte-specific mutation of both NF- $\kappa$ B RelA and STAT3 abrogates the acute phase response in mice. *J. Clin. Invest.*, 122(5):1758–1763, May 2012.
- [43] N. O. Ku and R. F. Mortensen. The mouse C-reactive protein (CRP) gene is expressed in response to IL-1 but not IL-6. *Cytokine*, 5(4):319–326, Jul 1993.
- [44] T. Alonzi, E. Fattori, M. Cappelletti, G. Ciliberto, and V. Poli. Impaired Stat3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6-deficient mice. *Cytokine*, 10(1):13–18, Jan 1998.
- [45] M. Kopf, H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Kohler. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, 368(6469):339–342, Mar 1994.
- [46] H. Zheng, D. Fletcher, W. Kozak, M. Jiang, K. J. Hofmann, C. A. Conn, D. Soszynski, C. Grabiec, M. E. Trumbauer, and A. Shaw. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity*, 3(1):9–19, Jul 1995.
- [47] C. M. Uhlar and A. S. Whitehead. The kinetics and magnitude of the synergistic activation of the serum amyloid A promoter by IL-1 beta and IL-6 is determined by the order of cytokine addition. *Scand. J. Immunol.*, 49(4):399–404, Apr 1999.
- [48] C. Kerr, C. Langdon, F. Graham, J. Gauldie, T. Hara, and C. D. Richards. Adenovirus vector expressing mouse oncostatin M induces acute-phase proteins and TIMP-1 expression in vivo in mice. *J. Interferon Cytokine Res.*, 19(10):1195–1205, Oct 1999.
- [49] B. F. Lin, N. O. Ku, K. Zahedi, A. S. Whitehead, and R. F. Mortensen. IL-1 and IL-6 mediate increased production and synthesis by hepatocytes of acute-phase reactant mouse serum amyloid P-component (SAP). *Inflammation*, 14(3):297–313, Jun 1990.
- [50] L. R. Leon, S. Dineen, M. D. Blaha, M. Rodriguez-Fernandez, and D. C. Clarke. Attenuated thermoregulatory, metabolic, and liver acute phase protein response to heat stroke in TNF receptor knockout mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 305(12):R1421–1432, Dec 2013.

## Literaturverzeichnis

- [51] M. Bopst, C. Haas, B. Car, and H. P. Eugster. The combined inactivation of tumor necrosis factor and interleukin-6 prevents induction of the major acute phase proteins by endotoxin. *Eur. J. Immunol.*, 28(12):4130–4137, Dec 1998.
- [52] Y. Wang, J. Ripperger, G. H. Fey, D. Samols, T. Kordula, M. Wetzler, R. A. Van Etten, and H. Baumann. Modulation of hepatic acute phase gene expression by epidermal growth factor and Src protein tyrosine kinases in murine and human hepatic cells. *Hepatology*, 30(3):682–697, Sep 1999.
- [53] K. Ichiki, K. Ikuta, L. Addo, H. Tanaka, Y. Sasaki, Y. Shimonaka, K. Sasaki, S. Ito, M. Shindo, T. Ohtake, M. Fujiya, Y. Torimoto, and Y. Kohgo. Upregulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon  $\alpha$ . *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 29(2):387–394, Feb 2014.
- [54] M. D. Frazier, L. B. Mamo, A. J. Ghio, and J. L. Turi. Hepcidin expression in human airway epithelial cells is regulated by interferon- $\gamma$ . *Respir. Res.*, 12:100, 2011.
- [55] S. J. Wigmore, K. C. Fearon, J. P. Maingay, P. B. Lai, and J. A. Ross. Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, 273(4 Pt 1):E720–726, Oct 1997.
- [56] Z. Xing, J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X. F. Lei, and M. K. Achong. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.*, 101(2):311–320, Jan 1998.
- [57] A. Cianciulli, T. Dragone, R. Calvello, C. Porro, T. Trotta, D. D. Lofrumento, and M. A. Panaro. IL-10 plays a pivotal role in anti-inflammatory effects of resveratrol in activated microglia cells. *Int. Immunopharmacol.*, 24(2):369–376, Feb 2015.
- [58] J. G. Bode, A. Nimmesgern, J. Schmitz, F. Schaper, M. Schmitt, W. Frisch, D. Haussinger, P. C. Heinrich, and L. Graeve. LPS and TNF $\alpha$  induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett.*, 463(3):365–370, Dec 1999.
- [59] J. Li, F. Hou, Z. Guo, Y. Shan, X. Zhang, and Z. Liu. Advanced glycation end products upregulate C-reactive protein synthesis by human hepatocytes through stimulation of monocyte IL-6 and IL-1 beta production. *Scand. J. Immunol.*, 66(5):555–562, Nov 2007.
- [60] C. F. Thorn and A. S. Whitehead. Differential transcription of the mouse acute phase serum amyloid A genes in response to pro-inflammatory cytokines. *Amyloid*, 9(4):229–236, Dec 2002.
- [61] T. Andus, T. Geiger, T. Hirano, T. Kishimoto, T. A. Tran-Thi, K. Decker, and P. C. Heinrich. Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures. *Eur. J. Biochem.*, 173(2):287–293, Apr 1988.
- [62] U. Albrecht, X. Yang, R. Asselta, V. Keitel, M. L. Tenchini, S. Ludwig, P. C. Heinrich, D. Haussinger, F. Schaper, and J. G. Bode. Activation of NF-kappaB by IL-1beta blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human gamma-fibrinogen gene. *Cell. Signal.*, 19(9):1866–1878, Sep 2007.
- [63] J. Gauldie, C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp, and H. Baumann. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(20):7251–7255, Oct 1987.
- [64] M. D. Josephs, C. C. Solorzano, M. Taylor, J. J. Rosenberg, D. Topping, A. Abouhamze, S. L. Mackay, E. Hirsch, D. Hirsh, M. Labow, and L. L. Moldawer. Modulation of the acute phase response by altered expression of the IL-1 type 1 receptor or IL-1ra. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 278(4):R824–830, Apr 2000.
- [65] M. Labow, D. Shuster, M. Zetterstrom, P. Nunes, R. Terry, E. B. Cullinan, T. Bartfai, C. Solorzano, L. L. Moldawer, R. Chizzonite, and K. W. McIntyre. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J. Immunol.*, 159(5):2452–2461, Sep 1997.

- [66] A. Pardo-Saganta, M. U. Latasa, J. Castillo, L. Alvarez-Asiain, M. J. Perugorria, P. Sarobe, C. M. Rodriguez-Ortigosa, J. Prieto, C. Berasain, M. Santamaria, and M. A. Avila. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin is a negative regulator of hepatic acute-phase gene expression. *J. Hepatol.*, 51(6):1010–1020, Dec 2009.
- [67] R. Grozovsky, A. J. Begonja, K. Liu, G. Visner, J. H. Hartwig, H. Falet, and K. M. Hoffmeister. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat. Med.*, 21(1):47–54, Jan 2015.
- [68] U. M. Wegenka, N. Dikopoulos, J. Reimann, G. Adler, and C. Wahl. The murine liver is a potential target organ for IL-19, IL-20 and IL-24: Type I Interferons and LPS regulate the expression of IL-20R2. *J. Hepatol.*, 46(2):257–265, Feb 2007.
- [69] P. C. Heinrich, I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.*, 334 ( Pt 2):297–314, Sep 1998.
- [70] M. Begbie, C. Notley, S. Tinlin, L. Sawyer, and D. Lillicrap. The Factor VIII acute phase response requires the participation of NFkappaB and C/EBP. *Thromb. Haemost.*, 84(2):216–222, Aug 2000.
- [71] S. Jain, Y. Li, S. Patil, and A. Kumar. HNF-1alpha plays an important role in IL-6-induced expression of the human angiotensinogen gene. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 293(1):C401–410, Jul 2007.
- [72] W. Hallatschek, G. Fiedler, C. J. Kirschning, F. Creutzburg, N. Lamping, A. Nussler, and R. R. Schumann. Inhibition of hepatic transcriptional induction of lipopolysaccharide-binding protein by transforming-growth-factor beta 1. *Eur. J. Immunol.*, 34(5):1441–1450, May 2004.
- [73] D. B. Longley, D. M. Steel, and A. S. Whitehead. Posttranscriptional regulation of acute phase serum amyloid A2 expression by the 5'- and 3'-untranslated regions of its mRNA. *J. Immunol.*, 163(8):4537–4545, Oct 1999.
- [74] A. M. Konijn, N. Carmel, R. Levy, and C. Hershko. Ferritin synthesis in inflammation. II. Mechanism of increased ferritin synthesis. *Br. J. Haematol.*, 49(3):361–370, Nov 1981.
- [75] A. N. Ahyi, L. J. Quinton, M. R. Jones, J. D. Ferrari, Z. A. Pepper-Cunningham, J. R. Mella, D. G. Remick, and J. P. Mizgerd. Roles of STAT3 in protein secretion pathways during the acute-phase response. *Infect. Immun.*, 81(5):1644–1653, May 2013.
- [76] U. M. Wegenka, J. Buschmann, C. Luttkicken, P. C. Heinrich, and F. Horn. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell. Biol.*, 13(1):276–288, Jan 1993.
- [77] A. Kaptein, V. Paillard, and M. Saunders. Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 271(11):5961–5964, Mar 1996.
- [78] C. Luttkicken, U. M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A. G. Harpur, A. F. Wilks, K. Yasukawa, and T. Taga. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, 263(5143):89–92, Jan 1994.
- [79] U. Novak, H. Ji, V. Kanagasundaram, R. Simpson, and L. Paradiso. STAT3 forms stable homodimers in the presence of divalent cations prior to activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247(3):558–563, Jun 1998.
- [80] C. Trautwein, T. Rakemann, M. Niehof, S. Rose-John, and M. P. Manns. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology*, 110(6):1854–1862, Jun 1996.
- [81] M. L. Vignais, H. B. Sadowski, D. Watling, N. C. Rogers, and M. Gilman. Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 16(4):1759–1769, Apr 1996.
- [82] G. J. Brunn, E. L. Falls, A. E. Nilson, and R. T. Abraham. Protein-tyrosine kinase-dependent activation of STAT transcription factors in interleukin-2- or interleukin-4-stimulated T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 270(19):11628–11635, May 1995.

- [83] C. Boccaccio, M. Ando, L. Tamagnone, A. Bardelli, P. Michieli, C. Battistini, and P. M. Comoglio. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature*, 391(6664):285–288, Jan 1998.
- [84] T. Kishimoto. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells*, 12 Suppl 1:37–44, 1994.
- [85] L. Dumoutier, C. Leemans, D. Lejeune, S. V. Kotenko, and J. C. Renauld. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J. Immunol.*, 167(7):3545–3549, Oct 2001.
- [86] Z. Zhong, Z. Wen, and J. E. Darnell. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264(5155):95–98, Apr 1994.
- [87] R. Raz, J. E. Durbin, and D. E. Levy. Acute phase response factor and additional members of the interferon-stimulated gene factor 3 family integrate diverse signals from cytokines, interferons, and growth factors. *J. Biol. Chem.*, 269(39):24391–24395, Sep 1994.
- [88] J. K. Riley, K. Takeda, S. Akira, and R. D. Schreiber. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J. Biol. Chem.*, 274(23):16513–16521, Jun 1999.
- [89] J. D. Ochrieter, K. A. Harrison, K. Zahedi, and R. F. Mortensen. Role of STAT3 and C/EBP in cytokine-dependent expression of the mouse serum amyloid P-component (SAP) and C-reactive protein (CRP) genes. *Cytokine*, 12(7):888–899, Jul 2000.
- [90] K. Hagihara, T. Nishikawa, Y. Sugamata, J. Song, T. Isobe, T. Taga, and K. Yoshizaki. Essential role of STAT3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression. *Genes Cells*, 10(11):1051–1063, Nov 2005.
- [91] H. Kim and H. Baumann. The carboxyl-terminal region of STAT3 controls gene induction by the mouse haptoglobin promoter. *J. Biol. Chem.*, 272(23):14571–14579, Jun 1997.
- [92] M. V. Verga Falzacappa, M. Vujic Spasic, R. Kessler, J. Stolte, M. W. Hentze, and M. U. Muckenthaler. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*, 109(1):353–358, Jan 2007.
- [93] D. M. Wrighting and N. C. Andrews. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, 108(9):3204–3209, Nov 2006.
- [94] T. Alonzi, D. Maritano, B. Gorgoni, G. Rizzuto, C. Libert, and V. Poli. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol. Cell. Biol.*, 21(5):1621–1632, Mar 2001.
- [95] T. Nishikawa, K. Hagihara, S. Serada, T. Isobe, A. Matsumura, J. Song, T. Tanaka, I. Kawase, T. Naka, and K. Yoshizaki. Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and hepatocyte NF-1 alpha is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression. *J. Immunol.*, 180(5):3492–3501, Mar 2008.
- [96] S. Ray, C. Lee, T. Hou, K. K. Bhakat, and A. R. Brasier. Regulation of signal transducer and activator of transcription 3 enhanceosome formation by apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in hepatic acute phase response. *Mol. Endocrinol.*, 24(2):391–401, Feb 2010.
- [97] K. Hagihara, T. Nishikawa, T. Isobe, J. Song, Y. Sugamata, and K. Yoshizaki. IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314(2):363–369, Feb 2004.
- [98] P. Tiwari, L. P. Tripathi, T. Nishikawa-Matsumura, S. Ahmad, S. N. Song, T. Isobe, K. Mizuguchi, and K. Yoshizaki. Prediction and experimental validation of a putative non-consensus binding site for transcription factor STAT3 in serum amyloid A gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830(6):3650–3655, Jun 2013.

- [99] A. Uskoković, S. Dinić, M. Mihailović, N. Grdović, J. Arambašić, M. Vidaković, D. Bogojević, S. Ivanović-Matić, V. Martinović, M. Petrović, G. Poznanović, and I. Grigorov. STAT3/NF- $\kappa$ B interactions determine the level of haptoglobin expression in male rats exposed to dietary restriction and/or acute phase stimuli. *Mol. Biol. Rep.*, 39(1):167–176, Jan 2012.
- [100] J. G. Bode, R. Fischer, D. Haussinger, L. Graeve, P. C. Heinrich, and F. Schaper. The inhibitory effect of IL-1 beta on IL-6-induced alpha 2-macroglobulin expression is due to activation of NF-kappa B. *J. Immunol.*, 167(3):1469–1481, Aug 2001.
- [101] S. Radtke, S. Wuller, X. P. Yang, B. E. Lippok, B. Mutze, C. Mais, H. S. de Leur, J. G. Bode, M. Gaestel, P. C. Heinrich, I. Behrmann, F. Schaper, and H. M. Hermanns. Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *J. Cell. Sci.*, 123(Pt 6):947–959, Mar 2010.
- [102] A. Giebeler, L. O. Brandenburg, M. Kaldenbach, S. Erschfeld, H. Wasmuth, C. Wruck, C. Trautwein, and K. L. Streetz. Lack of hepatic c-Met and gp130 expression is associated with an impaired antibacterial response and higher lethality after bile duct ligation. *Lab. Invest.*, 92(12):1726–1737, Dec 2012.
- [103] T. Moriguchi, N. Kuroyanagi, K. Yamaguchi, Y. Gotoh, K. Irie, T. Kano, K. Shirakabe, Y. Muro, H. Shibuya, K. Matsumoto, E. Nishida, and M. Hagiwara. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.*, 271(23):13675–13679, Jun 1996.
- [104] J. Han, J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265(5173):808–811, Aug 1994.
- [105] J. C. Lee, J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, and S. W. Landvatter. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372(6508):739–746, 1994.
- [106] N. Ronkina, M. B. Menon, J. Schwermann, C. Tiedje, E. Hitti, A. Kotlyarov, and M. Gaestel. MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem. Pharmacol.*, 80(12):1915–1920, Dec 2010.
- [107] A. Kotlyarov, A. Neining, C. Schubert, R. Eckert, C. Birchmeier, H. D. Volk, and M. Gaestel. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat. Cell Biol.*, 1(2):94–97, Jun 1999.
- [108] W. S. Lai, E. A. Kennington, and P. J. Blakeshear. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.*, 23(11):3798–3812, Jun 2003.
- [109] E. Carballo, W. S. Lai, and P. J. Blakeshear. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science*, 281(5379):1001–1005, Aug 1998.
- [110] C. A. Chrestensen, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. W. Pelo, M. T. Worthington, and T. W. Sturgill. MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J. Biol. Chem.*, 279(11):10176–10184, Mar 2004.
- [111] G. Stoecklin, T. Stubbs, N. Kedersha, S. Wax, W. F. Rigby, T. K. Blackwell, and P. Anderson. MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.*, 23(6):1313–1324, Mar 2004.
- [112] W. Zhao, M. Liu, N. J. D’Silva, and K. L. Kirkwood. Tristetraprolin regulates interleukin-6 expression through p38 MAPK-dependent affinity changes with mRNA 3’ untranslated region. *J. Interferon Cytokine Res.*, 31(8):629–637, Aug 2011.
- [113] G. Stoecklin, S. A. Tenenbaum, T. Mayo, S. V. Chittur, A. D. George, T. E. Baroni, P. J. Blakeshear, and P. Anderson. Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *J. Biol. Chem.*, 283(17):11689–11699, Apr 2008.

- [114] R. L. Ogilvie, J. R. Sternjohn, B. Rattenbacher, I. A. Vlasova, D. A. Williams, H. H. Hau, P. J. Blackshear, and P. R. Bohjanen. Tristetraprolin mediates interferon-gamma mRNA decay. *J. Biol. Chem.*, 284(17):11216–11223, Apr 2009.
- [115] R. Winzen, M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C. Y. Chen, A. B. Shyu, M. Muller, M. Gaestel, K. Resch, and H. Holtmann. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.*, 18(18):4969–4980, Sep 1999.
- [116] A. Neiningner, D. Kontoyiannis, A. Kotlyarov, R. Winzen, R. Eckert, H. D. Volk, H. Holtmann, G. Kollias, and M. Gaestel. MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.*, 277(5):3065–3068, Feb 2002.
- [117] C. Tiedje, N. Ronkina, M. Tehrani, S. Dhamija, K. Laass, H. Holtmann, A. Kotlyarov, and M. Gaestel. The p38/MK2-driven exchange between tristetraprolin and HuR regulates AU-rich element-dependent translation. *PLoS Genet.*, 8(9):e1002977, Sep 2012.
- [118] Y. Xie, C. Chen, M. A. Stevenson, P. E. Auron, and S. K. Calderwood. Heat shock factor 1 represses transcription of the IL-1beta gene through physical interaction with the nuclear factor of interleukin 6. *J. Biol. Chem.*, 277(14):11802–11810, Apr 2002.
- [119] X. Wang, M. A. Khaleque, M. J. Zhao, R. Zhong, M. Gaestel, and S. K. Calderwood. Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *J. Biol. Chem.*, 281(2):782–791, Jan 2006.
- [120] C. Ehlting, N. Ronkina, O. Bohmer, U. Albrecht, K. A. Bode, K. S. Lang, A. Kotlyarov, D. Radzioch, M. Gaestel, D. Haussinger, and J. G. Bode. Distinct functions of the mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinases MK2 and MK3: MK2 mediates lipopolysaccharide-induced signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation by preventing negative regulatory effects of MK3. *J. Biol. Chem.*, 286(27):24113–24124, Jul 2011.
- [121] H. A. Prins, C. Meijer, P. G. Boelens, J. Diks, R. Holtz, S. Masson, M. Daveau, S. Meijer, M. Scotte, and P. A. van Leeuwen. Kupffer cell-depleted rats have a diminished acute-phase response following major liver resection. *Shock*, 21(6):561–565, Jun 2004.
- [122] M. Schug, T. Heise, A. Bauer, D. Storm, M. Blaszkewicz, E. Bedawy, M. Brulport, B. Geppert, M. Hermes, W. Follmann, K. Rapp, L. Maccoux, W. Schormann, K. E. Appel, A. Oberemm, U. Gundert-Remy, and J. G. Hengstler. Primary rat hepatocytes as in vitro system for gene expression studies: comparison of sandwich, Matrigel and 2D cultures. *Arch. Toxicol.*, 82(12):923–931, Dec 2008.
- [123] F. M. Gurgis, Y. T. Yeung, M. X. Tang, B. Heng, M. Buckland, A. J. Ammit, J. Haapasalo, H. Haapasalo, G. J. Guillemin, T. Grewal, and L. Munoz. The p38-MK2-HuR pathway potentiates EGFRvIII-IL-1 $\beta$ -driven IL-6 secretion in glioblastoma cells. *Oncogene*, Aug 2014.
- [124] E. C. Yego and J. F. Dillman. Cytokine regulation by MAPK activated kinase 2 in keratinocytes exposed to sulfur mustard. *Toxicol In Vitro*, 27(7):2067–2075, Oct 2013.
- [125] X. Liu, T. Wu, and P. Chi. Inhibition of MK2 shows promise for preventing postoperative ileus in mice. *J. Surg. Res.*, 185(1):102–112, Nov 2013.
- [126] J. Xu, X. Su, J. X. Shi, H. Sun, T. Wu, and Y. Shi. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor-induced interleukin-6 expression via human antigen R. *Chin. Med. J.*, 126(22):4322–4326, Nov 2013.
- [127] D. Metcalf. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells*, 21(1):5–14, 2003.
- [128] S. Vollmer, C. Haan, and I. Behrmann. Oncostatin M up-regulates the ER chaperone Grp78/BiP in liver cells. *Biochem. Pharmacol.*, 80(12):2066–2073, Dec 2010.
- [129] H. Liu, C. Fenollar-Ferrer, A. Cao, C. Anselmi, P. Carloni, and J. Liu. Molecular dissection of human oncostatin M-mediated signal transductions through site-directed mutagenesis. *Int. J. Mol. Med.*, 23(2):161–172, Feb 2009.

- [130] V. B. Matthews, B. Knight, J. E. Tirnitz-Parker, J. Boon, J. K. Olynyk, and G. C. Yeoh. Oncostatin M induces an acute phase response but does not modulate the growth or maturation-status of liver progenitor (oval) cells in culture. *Exp. Cell Res.*, 306(1):252–263, May 2005.
- [131] C. Ehlting, O. Bohmer, M. J. Hahnel, M. Thomas, U. M. Zanger, M. Gaestel, W. T. Knoefel, J. Schulte Am Esch, D. Haussinger, and J. G. Bode. Oncostatin M regulates SOCS3 mRNA stability via the MEK-ERK1/2-pathway independent of p38(MAPK)/MK2. *Cell. Signal.*, 27(3):555–567, Mar 2015.
- [132] S. Davidson, M. K. Maini, and A. Wack. Disease-promoting effects of type I interferons in viral, bacterial, and coinfections. *J. Interferon Cytokine Res.*, 35(4):252–264, Apr 2015.
- [133] M. T. Boylan, A. D. Crockard, M. E. Duddy, M. A. Armstrong, S. A. McMillan, and S. A. Hawkins. Interferon-beta1a administration results in a transient increase of serum amyloid A protein and C-reactive protein: comparison with other markers of inflammation. *Immunol. Lett.*, 75(3):191–197, Jan 2001.
- [134] M. D. Lehner, F. Schwoebel, A. Kotlyarov, M. Leist, M. Gaestel, and T. Hartung. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.*, 168(9):4667–4673, May 2002.
- [135] K. Kother, C. Nordhoff, D. Masemann, G. Varga, J. H. Bream, M. Gaestel, V. Wixler, and S. Ludwig. MAPKAP kinase 3 suppresses Ifng gene expression and attenuates NK cell cytotoxicity and Th1 CD4 T-cell development upon influenza A virus infection. *FASEB J.*, 28(10):4235–4246, Oct 2014.
- [136] E. Croze, D. Russell-Harde, T. C. Wagner, H. Pu, L. M. Pfeffer, and H. D. Perez. The human type I interferon receptor. Identification of the interferon beta-specific receptor-associated phosphoprotein. *J. Biol. Chem.*, 271(52):33165–33168, Dec 1996.
- [137] C. Johansen, A. T. Funding, K. Otkjaer, K. Kragballe, U. B. Jensen, M. Madsen, L. Binderup, T. Skak-Nielsen, M. S. Fjording, and L. Iversen. Protein expression of TNF-alpha in psoriatic skin is regulated at a posttranscriptional level by MAPK-activated protein kinase 2. *J. Immunol.*, 176(3):1431–1438, Feb 2006.
- [138] J. F. de Boer, A. Dikkers, A. Jurdzinski, J. von Felden, M. Gaestel, U. Bavendiek, and U. J. Tietge. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 deficiency reduces insulin sensitivity in high-fat diet-fed mice. *PLoS ONE*, 9(9):e106300, 2014.
- [139] P. R. Kapopara, J. von Felden, O. Soehnlein, Y. Wang, L. C. Napp, K. Sonnenschein, K. C. Wollert, B. Schieffer, M. Gaestel, J. Bauersachs, and U. Bavendiek. Deficiency of MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) prevents adverse remodelling and promotes endothelial healing after arterial injury. *Thromb. Haemost.*, 112(6):1264–1276, Dec 2014.
- [140] A. A. Culbert, S. D. Skaper, D. R. Howlett, N. A. Evans, L. Facci, P. E. Soden, Z. M. Seymour, F. Guillot, M. Gaestel, and J. C. Richardson. MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, 281(33):23658–23667, Aug 2006.
- [141] H. Liu, H. Ning, H. Men, R. Hou, M. Fu, H. Zhang, and J. Liu. Regulation of CCL5 expression in smooth muscle cells following arterial injury. *PLoS ONE*, 7(1):e30873, 2012.
- [142] Y. Y. Li, B. Yuece, H. M. Cao, H. X. Lin, S. Lv, J. C. Chen, S. Ochs, A. Sibaev, E. Deindl, C. Schaefer, and M. Storr. Inhibition of p38/Mk2 signaling pathway improves the anti-inflammatory effect of WIN55 on mouse experimental colitis. *Lab. Invest.*, 93(3):322–333, Mar 2013.
- [143] J. P. Luyendyk, L. D. Lehman-McKeeman, D. M. Nelson, V. M. Bhaskaran, T. P. Reilly, B. D. Car, G. H. Cantor, J. F. Maddox, P. E. Ganey, and R. A. Roth. Unique gene expression and hepatocellular injury in the lipopolysaccharide-ranitidine drug idiosyncrasy rat model: comparison with famotidine. *Toxicol. Sci.*, 90(2):569–585, Apr 2006.

## Literaturverzeichnis

- [144] S. Rousseau, N. Morrice, M. Peggie, D. G. Campbell, M. Gaestel, and P. Cohen. Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. *EMBO J.*, 21(23):6505–6514, Dec 2002.
- [145] Y. Asai, M. Hashimoto, and T. Ogawa. Treponemal glycoconjugate inhibits Toll-like receptor ligand-induced cell activation by blocking LPS-binding protein and CD14 functions. *Eur. J. Immunol.*, 33(11):3196–3204, Nov 2003.
- [146] B. J. Grube, C. G. Cochane, R. D. Ye, C. E. Green, M. E. McPhail, R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias. Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, 269(11):8477–8482, Mar 1994.
- [147] G. Porez, B. Gross, J. Prawitt, C. Gheeraert, W. Berrabah, J. Alexandre, B. Staels, and P. Lefebvre. The hepatic orosomucoid/ $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene cluster is regulated by the nuclear bile acid receptor FXR. *Endocrinology*, 154(10):3690–3701, Oct 2013.
- [148] T. Fournier, N. Medjoubi-N, and D. Porquet. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482(1-2):157–171, Oct 2000.
- [149] R. J. Fish and M. Neerman-Arbez. Fibrinogen gene regulation. *Thromb. Haemost.*, 108(3):419–426, Sep 2012.
- [150] G. M. Fuller, J. M. Otto, B. M. Woloski, C. T. McGary, and M. A. Adams. The effects of hepatocyte stimulating factor on fibrinogen biosynthesis in hepatocyte monolayers. *J. Cell Biol.*, 101(4):1481–1486, Oct 1985.
- [151] S. Immenschuh, D. X. Song, H. Satoh, and U. Muller-Eberhard. The type II hemopexin interleukin-6 response element predominates the transcriptional regulation of the hemopexin acute phase responsiveness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207(1):202–208, Feb 1995.
- [152] S. Pajovic, V. E. Jones, K. R. Prowse, F. G. Berger, and H. Baumann. Species-specific changes in regulatory elements of mouse haptoglobin genes. *J. Biol. Chem.*, 269(3):2215–2224, Jan 1994.
- [153] J. J. Babon, L. N. Varghese, and N. A. Nicola. Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Semin. Immunol.*, 26(1):13–19, Feb 2014.
- [154] H. M. Hermanns, S. Radtke, F. Schaper, P. C. Heinrich, and I. Behrmann. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J. Biol. Chem.*, 275(52):40742–40748, Dec 2000.
- [155] S. T. Ahmed and L. B. Ivashkiv. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J. Immunol.*, 165(9):5227–5237, Nov 2000.
- [156] U. Moens, S. Kostenko, and B. Sveinbjörnsson. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation. *Genes (Basel)*, 4(2):101–133, 2013.
- [157] A. Aicher, G. L. Shu, D. Magaletti, T. Mulvania, A. Pezzutto, A. Craxton, and E. A. Clark. Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J. Immunol.*, 163(11):5786–5795, Dec 1999.
- [158] S. M. Pinto, R. S. Nirujogi, P. L. Rojas, A. H. Patil, S. S. Manda, Y. Subbannayya, J. C. Roa, A. Chatterjee, T. S. Prasad, and A. Pandey. Quantitative phosphoproteomic analysis of IL-33-mediated signaling. *Proteomics*, 15(2-3):532–544, Jan 2015.
- [159] S. Drube, S. Heink, S. Walter, T. Lohn, M. Grusser, A. Gerbaulet, L. Berod, J. Schons, A. Dudeck, J. Freitag, S. Grotha, D. Reich, O. Rudeschko, J. Norgauer, K. Hartmann, A. Roers, and T. Kamradt. The receptor tyrosine kinase c-Kit controls IL-33 receptor signaling in mast cells. *Blood*, 115(19):3899–3906, May 2010.
- [160] M. Gaestel. What goes up must come down: molecular basis of MAPKAP kinase 2/3-dependent regulation of the inflammatory response and its inhibition. *Biol. Chem.*, 394(10):1301–1315, Oct 2013.
- [161] P. Kothari, R. Pestana, R. Mesraoua, R. Elchaki, K. M. Khan, A. J. Dannenberg, and D. J. Falcone. IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J. Immunol.*, 192(1):349–357, Jan 2014.

- [162] M. J. Pattison, K. F. Mackenzie, and J. S. Arthur. Inhibition of JAKs in macrophages increases lipopolysaccharide-induced cytokine production by blocking IL-10-mediated feedback. *J. Immunol.*, 189(6):2784–2792, Sep 2012.
- [163] A. D. Foey, S. L. Parry, L. M. Williams, M. Feldmann, B. M. Foxwell, and F. M. Brennan. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J. Immunol.*, 160(2):920–928, Jan 1998.
- [164] H. Qin, A. T. Holdbrooks, Y. Liu, S. L. Reynolds, L. L. Yanagisawa, and E. N. Benveniste. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J. Immunol.*, 189(7):3439–3448, Oct 2012.
- [165] C. Ehltling, W. S. Lai, F. Schaper, E. D. Brenndorfer, R. J. Matthes, P. C. Heinrich, S. Ludwig, P. J. Blakeshear, M. Gaestel, D. Haussinger, and J. G. Bode. Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J. Immunol.*, 178(5):2813–2826, Mar 2007.
- [166] L. S. Subrata, K. N. Lowes, J. K. Olynyk, G. C. Yeoh, E. A. Quail, and L. J. Abraham. Hepatic expression of the tumor necrosis factor family member lymphotoxin-beta is regulated by interleukin (IL)-6 and IL-1beta: transcriptional control mechanisms in oval cells and hepatoma cell lines. *Liver Int.*, 25(3):633–646, Jun 2005.
- [167] A. S. Franki, K. Van Beneden, P. Dewint, K. J. Hammond, S. Lambrecht, G. Leclercq, M. Kronenberg, D. Deforce, and D. Elewaut. A unique lymphotoxin alphabeta-dependent pathway regulates thymic emigration of Valpha14 invariant natural killer T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(24):9160–9165, Jun 2006.
- [168] H. Fan, Z. Zhu, Y. Wang, X. Zhang, Y. Lu, Y. Tao, W. Fan, Z. Wang, H. Wang, M. Roggendorf, M. Lu, B. Wang, and D. Yang. Molecular characterization of the type I IFN receptor in two woodchuck species and detection of its expression in liver samples from woodchucks infected with woodchuck hepatitis virus (WHV). *Cytokine*, 60(1):179–185, Oct 2012.
- [169] H. Kodama, M. Nose, S. Niida, and A. Yamasaki. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J. Exp. Med.*, 173(5):1291–1294, May 1991.
- [170] A. F. Muller, L. Strauss, M. Greter, H. Gast, M. Recher, B. Becher, and A. Fontana. Neutralization of colony-stimulating factor 1 receptor prevents sickness behavior syndrome by reprogramming inflammatory monocytes to produce IL-10. *Brain Behav. Immun.*, Mar 2015.
- [171] T. Hiraga and H. Nakamura. Imatinib mesylate suppresses bone metastases of breast cancer by inhibiting osteoclasts through the blockade of c-Fms signals. *Int. J. Cancer*, 124(1):215–222, Jan 2009.
- [172] M. Matsumoto, T. Sudo, M. Maruyama, H. Osada, and M. Tsujimoto. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is crucial in osteoclastogenesis induced by tumor necrosis factor. *FEBS Lett.*, 486(1):23–28, Dec 2000.
- [173] M. Hatting, M. Spannbauer, J. Peng, M. Al Masaoudi, G. Sellge, Y. A. Nevzorova, N. Gassler, C. Liedtke, F. J. Cubero, and C. Trautwein. Lack of gp130 expression in hepatocytes attenuates tumor progression in the DEN model. *Cell Death Dis*, 6:e1667, 2015.
- [174] U. Dierssen, N. Beraza, H. H. Lutz, C. Liedtke, M. Ernst, H. E. Wasmuth, and C. Trautwein. Molecular dissection of gp130-dependent pathways in hepatocytes during liver regeneration. *J. Biol. Chem.*, 283(15):9886–9895, Apr 2008.
- [175] H. Nguyen-Jackson, A. D. Panopoulos, H. Zhang, H. S. Li, and S. S. Watowich. STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. *Blood*, 115(16):3354–3363, Apr 2010.
- [176] N. J. Stevenson, N. M. Bourke, E. J. Ryan, M. Binder, L. Fanning, J. A. Johnston, J. E. Hegarty, A. Long, and C. O’Farrelly. Hepatitis C virus targets the interferon- $\alpha$  JAK/STAT pathway by promoting proteasomal degradation in immune cells and hepatocytes. *FEBS Lett.*, 587(10):1571–1578, May 2013.

- [177] G. Song, Q. Jiang, T. Xu, Y. L. Liu, Z. G. Xu, and Z. Y. Guo. A convenient luminescence assay of ferroportin internalization to study its interaction with hepcidin. *FEBS J.*, 280(8):1773–1781, Apr 2013.
- [178] T. Ganz. Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab.*, 1(3):155–157, Mar 2005.
- [179] L. Kautz, D. Meynard, A. Monnier, V. Darnaud, R. Bouvet, R. H. Wang, C. Deng, S. Vaulont, J. Mosser, H. Coppin, and M. P. Roth. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, 112(4):1503–1509, Aug 2008.
- [180] T. Tanno, P. Porayette, O. Sripichai, S. J. Noh, C. Byrnes, A. Bhupatiraju, Y. T. Lee, J. B. Goodnough, O. Harandi, T. Ganz, R. F. Paulson, and J. L. Miller. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*, 114(1):181–186, Jul 2009.
- [181] T. Tanno, N. V. Bhanu, P. A. Oneal, S. H. Goh, P. Staker, Y. T. Lee, J. W. Moroney, C. H. Reed, N. L. Luban, R. H. Wang, T. E. Eling, R. Childs, T. Ganz, S. F. Leitman, S. Fucharoen, and J. L. Miller. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat. Med.*, 13(9):1096–1101, Sep 2007.
- [182] A. B. Core, S. Canali, and J. L. Babitt. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol*, 5:104, 2014.
- [183] X. G. Wu, Y. Wang, Q. Wu, W. H. Cheng, W. Liu, Y. Zhao, C. Mayeur, P. J. Schmidt, P. B. Yu, F. Wang, and Y. Xia. HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood*, 124(8):1335–1343, Aug 2014.
- [184] G. Papanikolaou, M. E. Samuels, E. H. Ludwig, M. L. MacDonald, P. L. Franchini, M. P. Dube, L. Andres, J. MacFarlane, N. Sakellaropoulos, M. Politou, E. Nemeth, J. Thompson, J. K. Risler, C. Zaborowska, R. Babakaiff, C. C. Radomski, T. D. Pape, O. Davidas, J. Christakis, P. Brissot, G. Lockitch, T. Ganz, M. R. Hayden, and Y. P. Goldberg. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat. Genet.*, 36(1):77–82, Jan 2004.
- [185] K. E. Finberg, R. L. Whittlesey, and N. C. Andrews. Tmprss6 is a genetic modifier of the Hfe-hemochromatosis phenotype in mice. *Blood*, 117(17):4590–4599, Apr 2011.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes Bode, für die Ausgabe des Themas der Dissertation, die Betreuung bei der Anfertigung der Arbeit sowie die vielen wertvollen Anregungen und die Unterstützung, die ich in den vergangenen Jahren in zahlreichen nächtlichen Besprechungen durch Ihn erfahren habe. Lieber Johannes, darüber hinaus danke ich Dir und Deiner Familie für die schönen Abende, die Ihr für uns organisiert habt. Als Grillmeister, Fondue-Koch und nicht zuletzt als Kinofan hast Du mir und der ganzen Arbeitsgruppe Deine Wertschätzung weit über die Arbeitsebene hinaus entgegengebracht. Auch bei 8°C und Regenwetter konnten wir uns auf Dich verlassen, wenn Du zum Hobbit ins Freilichtkino mit Regenausrüstung für die ganze Kompanie angeköckelt bist. Das sind wahre Doktorvater-Qualitäten und dafür möchte ich Dir und Deiner Familie herzlich danken.

Mein außerordentlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold, für die Begutachtung meiner Dissertation als Betreuer an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität. Vielen Dank, dass Sie diese Aufgabe übernommen haben und mir dadurch die Promotion an der Math.-Nat. ermöglicht haben.

Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger, in dessen Laborräumen und mit dessen Unterstützung ich die experimentellen Arbeiten durchführen durfte. Durch Ihr großes Engagement haben Sie eine erstklassige Infrastruktur und zahlreiche Möglichkeiten zum wissenschaftlichen Austausch in zwei SFBs aufgebaut, die ich als Teil der Abteilung nutzen durfte.

Für die angenehme und erfolgreiche Kooperation möchte ich auch Frau Dr. Maria Thomas vom IKP Stuttgart in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Zanger danken, die für mich die Messung der von mir aufbereiteten RNA Proben mittels Fluidigm qPCR übernommen hat.

Auch Herrn Dr. Christoph Metzendorf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martina Muckenthaler danke ich für die schöne und anregende Zusammenarbeit und die Durchführung der Messung der Serum Eisenkonzentration im Serum von  $MK2^{-/-}$  und WT Tieren, die ich im Verlauf dieser Studie erzeugt habe (Abb. 3.31).

Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei Judith, Steffi und Leah bedanken, mit denen es mir eine Ehre war, das Labor in Raum 62 teilen zu dürfen. Mit Euch zusammen zu arbeiten und zu reisen war super. Der tägliche Blick in die Zukunft, alle möglichen und unmöglichen Gesprächsthemen, Laserpointer-Zielschießen und weiterer Schabernack, der einem so in den Sinn kommt haben mir mit Euch die Zeit verkürzt. Auch außerhalb der Arbeitsstunden (was der Volksmund leichtthin „Freizeit“ nennt) haben wir viele schöne Stunden geteilt, die ich immer in bester Erinnerung behalten werde und für die ich Euch sehr dankbar bin.

Mein besonderer Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie, die immer für ein angenehmes Arbeitsumfeld gesorgt haben. Auch wenn mich im Zusammenhang mit der Raumluft, den Warnschildern bezüglich der Fluchtbalkone oder der Bürokratie mal die Unruhe beschlichen hat, habt Ihr immer zu mir gestanden, wofür ich Euch sehr dankbar bin. Dies gilt insbesondere für all jene, die sich mit mir das sogenannte „große“ Büro geteilt haben. Besonders der tägliche Kaffee, das Quiz und die Gespräche mit Lina, die Witze von Torsten, die bunten Geschichten von Ayşe und die erfrischende Offenheit von Maria haben in unvergleichlicher Weise dazu beigetragen, etwaige Unannehmlichkeiten zu vergessen.

Liebe Katrin, auch Dir danke ich für die vergangenen Jahre. Du warst immer für mich da, obwohl Du mit der Pendelei nach Essen und Deiner eigenen Doktorarbeit selber unendlich viel um die Ohren hattest. Der Comic-Spruch „ohne Dich ist alles doof“ ist mir an dieser Stelle zu negativ. Drum lass es mich anders formulieren: Mit Dir ist alles super!

Nicht genügend Danken kann ich an dieser Stelle meiner Familie, ohne deren uneingeschränkte Unterstützung in allen erdenklichen Facetten ich den Weg bis hierher niemals hätte bewältigen können. Hier eine Aufzählung zu beginnen würde sicher den Rahmen der Danksagung sprengen und so danke ich Euch ganz schlicht für: Alles.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

# Lebenslauf

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