

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

Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Regulation der LPS-induzierten STAT3-Aktivierung durch
MK2 und MK3 in Makrophagen und Fibroblasten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Lorenz Philipp Graalman
geb. Selic
2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes G. Bode

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Julia Reifenberger

Gewidmet
meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit

Zusammenfassung

Aufgabe dieser Arbeit war zu klären, ob LPS in Fibroblasten auch zu einer Aktivierung von STAT3 führt, wie es für Makrophagen beschrieben ist. Darüberhinaus sollte analysiert werden, ob diese STAT3 Aktivierung ggf. über vergleichbare Mechanismen wie für Makrophagen erfolgt. Die Befunde belegen, dass LPS auch in Fibroblasten eine verzögerte STAT3 Aktivierung induziert, die ebenfalls MK2 abhängig ist und durch eine zusätzliche Deletion von MK3 wieder hergestellt werden kann. Im Gegensatz zu Makrophagen erfolgt dies jedoch nicht über eine MK2 abhängige Induktion/Expression von IFN- β und nachfolgend IL-10. Vielmehr ist es sogar so, dass in Fibroblasten anders als in Makrophagen die Expression von IFN- β MK2 unabhängig erfolgt und es zu keiner signifikanten IL-10 Produktion unter Stimulation mit LPS kommt. Auch sind Fibroblasten nicht responsiv gegenüber IL-10, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die MK2 abhängige Aktivierung von STAT3 in Fibroblasten durch andere MK2 regulierte Faktoren erfolgt. Welche MK2 abhängigen Faktoren hierfür verantwortlich sein könnten, ist unklar und muss in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. So ist z.B. ein relevanter Teil der IL-6-Typ-Zytokine MK2 abhängig reguliert wie IL-6, OSM[1] und LIF (noch unveröffentlichte Beobachtungen der AG Bode, dieses Zitat erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Johannes G. Bode). Als weiteres MK2 abhängiges STAT3 aktivierendes Zytokin ist IL-12 zu nennen. Zusammenfassend geht die Identifizierung des Faktors, der in Fibroblasten MK2 abhängig die LPS induzierte Aktivierung von STAT3 vermittelt, jedoch über die Zielsetzung dieser Arbeit hinaus und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Zielsetzend für die siRNA Experimente war zum einen der *knockdown* und zum anderen die Feststellung, dass sich sowohl die größere als auch die kleinere Bande von derselben RNA ableiten. Es konnten sowohl für MK2 als auch für MK3 erfolgreich siRNA etabliert werden, die spezifisch zu einem *knockdown* führen, wobei es unabhängig ist, in welchem Transkript-Teil die MK2-siRNA bindet. Beide Isoformen werden gleich unterdrückt, so dass beide Isoformen durch das gleiche Konstrukt kodiert werden. Entsprechend lassen die Ergebnisse der Untersuchungen annehmen, dass beide Isoformen vom selben Transkript abstammen. Jedoch legen die Untersuchungen mit einem Expressionsvektor, der für das gesamte MK2 Transkript inkl. regulatorischer und kodierender Sequenzen mit transfizierter FLAG-Markierung kodiert nahe, dass die Expression des Transkriptes alleine nicht ausreicht, um auch die große Isoform zu exprimieren. Die Entstehung des großen Signals konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Offen bleibt, wie die zweite größere Isoform entsteht. Denkbar wären hier sekundäre Modifikationen wie posttranslationale Ereignisse.

Summary

The aim of this study was to investigate whether LPS in fibroblasts also results in an activation of STAT3, as has been observed in macrophages. Furthermore, possible STAT3 activation via comparable mechanisms as for macrophages was analysed. Results show that LPS induces a delayed STAT3 activation also in fibroblasts which is MK2-dependent and can be reproduced by means of an additional MK3 deletion. Unlike in macrophages, this does not occur via MK2-dependent induction/expression of IFN- β and subsequently of IL-10. Different to macrophages, the expression of IFN- β MK2 in fibroblasts occurs independently without significant IL-10 production under LPS stimulation. Moreover, fibroblasts do not respond to IL-10 so that the MK2- dependent activation of STAT3 in fibroblasts is most likely induced by other factors regulated by MK2. The question, which MK2-dependent factors could be responsible, remains unclear and needs to be investigated in further studies. A relevant part of IL-6-type cytokines is regulated MK2-dependently such as IL-6, OSM[1] and LIF (unpublished observations by AG Bode, provided with the kind permission of Prof. Dr. med. Johannes G. Bode). IL-12 is a further MK2-dependent, STAT3 activating cytokine.

In summary, the identification of the factor, which MK2-dependently mediates LPS-induced activation of STAT3 in fibroblasts, was not within the scope of this study and further studies are required. The *knockdown* as well as the observation that both the larger and smaller band derived from the same RNA constituted the goal of the siRNA experiments. siRNA was successfully established for MK2 as well as for MK3, which specifically result in a *knockdown*, with MK2-siRNA binding independently in the transcribed part. Both isoforms are equally suppressed so that both are encoded by the same construct. Accordingly, results imply that both isoforms derive from the same transcript.

However, analyses with an expression vector which encodes for the entire MK2 transcript including regulatory and coding sequences with transfecting FLAG-markings suggest that the expression of the transcript does not suffice to additionally express the large isoform. Yet, further unknown steps are necessary to establish the large signal which could not be determined in the framework of this study and which need to be assessed in future work. It remains to be clarified how the second larger isoform develops. In this context, secondary modifications such as post-translational events could play a role.

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XII
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeine Einführung und Ausgangssituation.....	1
1.2 Entzündungsprozesse und ihre Regulation.....	3
1.2.1 Lipopolysaccharide - wichtige Mediatoren der Entzündungsreaktion im Rahmen einer Infektion mit gramnegativen Bakterien.....	3
1.2.2 Toll Like Rezeptoren - zentrale Sensoren für von Pathogenen abstammende molekulare Signaturen.....	5
1.2.3 Relevanz von p38/MK2/3 für die Regulation der Entzündungsantwort.....	6
1.2.4 Relevanz von STAT3-abhängiger Signalübertragung für die Akutphase- und die Endotoxin-induzierte Entzündungsreaktion.....	7
1.2.4.1 Der JAK-STAT-Signalweg in der STAT3-abhängigen Signalübertragung.....	8
1.2.4.2 Relevanz von STAT3 für die Signalübertragung von IL-10.....	8
1.2.5 Einteilung der Typ I und Typ II Interferone mit Relevanz für die TLR4-abhängige Zytokinexpression im Kontext der Resolutionsphase des Entzündungsgeschehens.....	9
1.2.6 Rolle von IRF3 für die Regulation in der Interferon-β Expression.....	10
1.3 Rolle von Makrophagen im Kontext des Entzündungsgeschehens.....	11
1.4 Rolle von Fibroblasten im Kontext des Entzündungsgeschehens.....	12
1.5 Endotoxin-induzierte Signalübertragung im experimentellen Ansatz... 	14
1.6 Zielsetzung.....	14

2. Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Antikörper.....	16
2.1.2 Lösungen und Puffer für Western Blot.....	17
2.1.2.1 Ansatz für ein 8%-PAA-Trenngel.....	17
2.1.2.2 Ansatz für ein 5% PAA-Sammelgel.....	17
2.1.2.3 1x Elektrophoresepuffer.....	17
2.1.2.4 Elektrophoreseauftragpuffer (4-fach Lämmli).....	17
2.1.2.5 Blotting-Puffer.....	18
2.1.2.5.1 Anodenpuffer I.....	18
2.1.2.5.2 Anodenpuffer II.....	18
2.1.2.5.3 Kathodenpuffer.....	18
2.1.2.6 TBS-T Waschpuffer.....	18
2.1.2.7 Stripping Puffer.....	18
2.1.2.8 Lyse Puffer "TLP" (Triton X 100 1%).....	19
2.1.3 Zelllinien-NIH 3T3-Zellen und MEF-Zellen-.....	19
2.1.4 Zytokine und bakterielles Endotoxin.....	20
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot.....	20
2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	20
2.2.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	21
2.2.4.1 Real Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	22
2.2.4.2 Primer für die RT-PCR.....	23
2.2.5.1 Transfektion von Fibroblasten (MEF, NIH3T3).....	24
2.2.5.2 siRNA.....	24
2.2.5.3 Aufbau des p3XFLAG Plasmid.....	26

2.2.6 Densitometrie und Statistische Evaluation.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1 Regulation der LPS induzierten STAT3 Aktivierung durch MK2 und MK3.....	29
3.2 Rolle von MK2 und MK3 für das IFN-β aktivierte STAT3-Signal.....	32
3.3 Bedeutung der IL-10 Expression für die STAT3 Aktivierung durch LPS in Makrophagen und vergleichend in Fibroblasten.....	33
3.4 LPS-induzierte NFκB/p65 und ATF2 Signalgebung in Fibroblasten.....	39
3.5 Untersuchung des Einflusses von MK2/3 auf die LPS-induzierte Interferon-β mRNA Expression in Fibroblasten (MEF).....	42
3.6 Etablierung von siRNA gegen MK2.....	43
3.7 Etablierung von siRNA gegen MK3.....	45
3.8 Etablierung von transfizierter FLAG-markierter MK2.....	47
4. Diskussion.....	49
4.1 Diskussion: experimenteller Teil.....	49
4.2 Diskussion: methodischer Teil.....	54
5. Ausblick.....	56
6. Literaturverzeichnis.....	57
7. Danksagung.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Karte des p3XFLAG-MK2-Konstruktes.....	26/27
Abbildung 2: LPS induzierte STAT3 Aktivierung in wildtypischen, MK2 defizienten und MK2/MK3 defizienten MEF Zellen.....	30/31
Abbildung 3: IFN- β induzierte STAT3 Aktivierung in wildtypischen, MK2 defizienten und MK2/MK3 defizienten MEF Zellen.....	32
Abbildung 4: LPS und IL-10 induzierte STAT3 Aktivierung in wildtypischen NIH Zellen.....	34
Abbildung 5: LPS und IL-10 induzierte STAT3 und p38 Aktivierung in wildtypischen Makrophagen(PBDM).....	35/36
Abbildung 6: LPS pre und IL-10 induzierte STAT3 und p38 Aktivierung in wildtypischen NIH Zellen.....	36/37
Abbildung 7: LPS induzierte IL-10 mRNA Expression in wildtypischen, MK2 defizienten und MK2/MK3 defizienten MEF Zellen.....	38
Abbildung 8: LPS-induzierte NF κ B/p65 und ATF2 Aktivierung in wildtypischen, MK2 defizienten und MK2/MK3 defizienten MEF Zellen.....	39-41
Abbildung 9: LPS induzierte IFN- β mRNA Expression in wildtypischen, MK2 defizienten und MK2/MK3 defizienten MEF Zellen.....	42
Abbildung 10: Grafische Darstellung der MK2-mRNA Sequenz.....	44
Abbildung 11: Transfektion von siRNAs gegen MK2 in MEF-Zellen.....	45
Abbildung 12: Transfektion von siRNAs gegen MK3 in MEF-Zellen.....	46
Abbildung 13: Schematische Darstellung der vollständigen murinen MK2-mRNA-Sequenz (ohne ATG Startcodon) mit 3XFLAG Markierung.....	47
Abbildung 14: Etablierung von transfizierter FLAG-markierter MK2.....	48
Abbildung 15: Schematische Darstellung der LPS induzierten IL-10 Expression in Makrophagen.....	50
Abbildung 16: Schematische Darstellung der LPS induzierten STAT3 Aktivierung in Fibroblasten.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen, murines IFN β 1, murines SDHA und murines IL-10.....23

Tabelle 2: Basensequenz der siRNA gegen die murine MK2 und MK3 mRNA.....25/26

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Homozygote Deletion des betreffenden Gens
AK	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APR	Akut-Phase-Reaktion
APS	Ammonium-Persulfat
ARE	AU-reiches Element
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
B-	<i>bone-</i>
beta-ME	β - Mercaptoethanol
BMK1	<i>big MAP kinase 1</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BstXI	Bacillus stearothermophilus XI
C/EBP	<i>CAAT/enhancer binding protein</i>
CaM-Kinase	Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC25	<i>cell division control protein 25</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CF	<i>corneal fibroblast</i>

CMV	Zytomegalie Virus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX2	Cyclooxygenase 2
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
CSIF	<i>Cytokine-synthesis inhibitory factor</i>
c-Src	<i>cellular sarcoma</i>
d	Drosophila
delta-ct	<i>Δ-cycle threshold</i>
DBD	DNA Bindungsdomäne
DC	<i>dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i>
ds	<i>double stranded</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EcoRI	Restriktionsenzym Escherichia coli RI
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
Elk1	<i>E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1</i>
Epo	Erythropoetin
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FLS	<i>fibroblast-like synoviocytes</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAS	<i>gamma activated site</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GH	<i>growth hormon</i>
GKS	Glukokortikosteroide

gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	human
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IF	Initiationsfaktor
IF	Isoform
Ifi1	<i>mus musculus interferon inducible protein 1</i>
IFIT1	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
IFNAR 1	Interferon alpha/beta Rezeptor 1
IFNbeta	Interferon beta
Ig	Immunglobulin
IkB	<i>inhibitor of kappa B</i>
IKKepsilon	<i>I kappa B kinase ε</i>
<i>IKK-i</i>	induzierbare I/B Kinase
IL	Interleukin
IP10	<i>interferon-gamma induced protein 10</i>
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
IRF3a	<i>interferon regulatory factor 3 alternative</i>
ISGF3	<i>interferon stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
ISG15	<i>interferon stimulated genes 15</i>
JAK	Januskinase, ursprünglich " <i>just another kinase</i> "
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
KHK	koronare Herzkrankheit

K.O.	<i>Knockout</i>
LBP	<i>LPS binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine rich repeats</i>
LTK	<i>leukocyte receptor tyrosine kinase</i>
MAL	<i>MyD88 adapter like</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MD-2	<i>myeloid differentiation factor-2</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten Zelllinie
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MK2	Mitogen aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase2
MKK3	MAPKKinase 3
MNK	<i>MAPK-interacting kinase</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSK	Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
Mx1	<i>myxovirus (influenza virus) resistance 1</i>
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NEC	<i>no enzyme control</i>
NIH 3T3	Fibroblasten-Zelllinie <i>National Institutes of Health, 3-day transfer, inoculum 3 x 10⁵ cell</i>
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK Zellen	natürliche Killerzellen
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NO	Stickstoffmonoxid (reaktives Stickoxid)
NotI	Restriktionsenzym <i>Nocardia otitidis-cavarium</i> I

O ₂ *-	Superoxid-Anion
p-	phospho-
p38 ^{MAPK}	p38 mitogen aktivierte Proteinkinase
p65	<i>transcription factor p65</i>
PAA	Polyacrylamid
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBDM	<i>PBMC-derived macrophages</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	potentia hydrogenii
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PDL	<i>periodontal ligament</i>
poly I:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRAK	p38-regulierte /aktivierte Protein Kinase
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
RA	rheumatoide Arthritis
RanGDP	<i>RAs-related Nuclear protein Guanosindiphosphat</i>
RANTES	<i>regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
RNAi	RNA Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RSK	ribosomale S6 Kinasen
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Sall	Restriktionsenzym Streptomyces albus I
SAPK	<i>stress activated protein kinases</i>
SARM	<i>sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein</i>

SDHA	<i>succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SmaI	Restriktionsenzym <i>Serratia marcescens</i> I
SpeI	Restriktionsenzym <i>Sphaerotilus species I</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T-	Thymus-
TANK	<i>TRAF family member-associated NF-kappa-B activator</i>
TAK-1	<i>transforming growth factor activated kinase-1</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBK1	<i>TRAF family member-associated NF-iB activator binding kinase1</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TH1 Zelle	Thymus Helferzelle 1
TICAM1	<i>TIR domain-containing adapter molecule 1</i>
TIRAP	<i>toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein</i>
TIR-domain	<i>Toll/IL1-Receptor homology domain</i>
TLP	Triton X-100 Lysepuffer
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TRAF6	<i>TNFR associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN-beta</i>

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Tristetraprolin
Tween	<i>Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate</i>
TYK1	LTK
Tyk	Tyrosinkinase
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung und Ausgangssituation

Die Initiation der auch als Akute Phase Reaktion bezeichneten Entzündungsreaktion ist wichtiger Bestandteil der angeborenen wie auch der adaptiven Immunität[2]. In diesem Kontext ist sie auch für die Aktivierung und Regulation von Reparaturmechanismen essentiell, kann zugleich aber auch wesentliche Ursache der durch ein Pathogen oder eine Noxe ausgelösten Gewebsschädigung sein[2, 3]. Um letzteres nach Möglichkeit zu verhindern oder so gering wie möglich zu halten, ist eine enge Kontrolle des Entzündungsgeschehens erforderlich. Eine Störung der hierfür verantwortlichen Kontrollmechanismen führt entweder zu einer überschießenden Entzündungsreaktion oder zu einer unzureichenden Aktivierung derselben. Während ersteres zu einer vermehrten Schädigung von Organismus und Gewebe führen würde und damit einen fatalen Verlauf bedingen kann, würde letzteres eine unzureichende Aktivierung von Reparaturmechanismen zur Folge haben sowie mitunter eine insuffiziente Aktivierung von angeborener und adaptiver Immunität[4, 5]. Ein für die Untersuchung der molekularen Regulation von Entzündungsreaktion oft verwendetes experimentelles Modellsystem ist die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte Entzündungsreaktion. LPS ist ein Bestandteil der Bakterienwand gramnegativer Bakterien und führend für die Induktion der Entzündungsreaktion verantwortlich, die im Rahmen einer Infektion mit gramnegativen Bakterien beobachtet werden kann.

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist im LPS-induzierten Entzündungsmodell die LPS-induzierte, IL-10 vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors „*signal transducer and activator of transcription*(STAT)3“ essentiell für die Hemmung der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Makrophagen und damit Voraussetzung für eine Deeskalation der Entzündungsreaktion[2, 6]. In Makrophagen erfolgt die Aktivierung von STAT3 indirekt über eine Typ I Interferon Rezeptor-abhängige Produktion von IL-10[7]. Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten belegen, dass in Makrophagen MK2 für die LPS-induzierte Produktion von IFN- β und die nachfolgende IL-10 vermittelte STAT3 Aktivierung wichtig ist[8]. Die Bedeutung von MK2 beruht in diesem Zusammenhang wesentlich auf ihrer Fähigkeit, negativ-regulatorische Effekte von MK3 auf die Induktion der Genexpression von IFN- β zu unterdrücken[8] sowie auf ihrer Relevanz für die Stabilisierung des IL-10 Transkriptes.

Die vorliegende Arbeit ist in einen ersten experimentellen Teil und einen zweiten methodisch ausgerichteten Teil gegliedert. Im ersten Teil der Arbeit sollte vor dem oben ausgeführten Hintergrund überprüft werden, ob es in anderen Zellpopulationen, die auch in die Regulation von Entzündungsgeschehen involviert sind, nach Exposition gegenüber LPS ebenfalls zu einer Aktivierung von STAT3 kommt. Ferner war zu klären, ob hierfür auch die am Modell der Makrophagen ausgearbeiteten MK2-abhängigen regulatorischen Mechanismen relevant sind.

Eine Zellpopulation, die nach gegenwärtigem Kenntnisstand auch *in vivo* an der Regulation und hierbei insbesondere der Eskalation einer Entzündungsreaktion beteiligt ist, sind Fibroblasten. Sie sind Bestandteil des mesenchymalen Gewebes und vergleichsweise einfach bereits aus embryonalem Gewebe isolierbar und kultivierbar. Darüber hinaus sind sie einer experimentellen / gentechnischen Manipulation gut zugänglich und wurden daher in vielen Arbeiten als bevorzugtes Modellsystem für die Abklärung der intra-zellulären Signalverarbeitung im Rahmen von Entzündungsreaktion verwendet. Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen der Arbeit geklärt werden, ob es wie in Makrophagen auch in Fibroblasten zu einer Aktivierung von STAT3 nach Exposition gegenüber LPS kommt und ob hierfür die gleichen regulatorischen Mechanismen wie in Makrophagen verantwortlich sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob die beschriebene MK2 mRNA in murinen Zellpopulationen auch für die Kodierung der beiden unterschiedlich großen Isoformen des MK2-Proteins verantwortlich ist. Hierfür wurden siRNAs generiert und getestet, die gegen verschiedene Bereiche des gesamten MK2 Transkriptes inklusive der nicht translatierten Bereiche gerichtet sind. Darüber hinaus wurden auch gegen die kodierende Sequenz der MK3 gerichtete siRNAs generiert und validiert. Dabei sollte geprüft werden, ob ein siRNA-vermittelter *knockdown* der mRNA einen Einfluss auf die Protein-Expression von MK2 und MK3 hat und ob eine über unterschiedliche Zielsequenzen vermittelte Degradation der MK2 mRNA das Expressionsverhältnis der beiden MK2-Protein-Isoformen zueinander verändert. Desweiteren sollte die Expression eines co-transfizierten Plasmides, welches die vollständige mRNA-Sequenz der murinen MK2 inklusive der 5' und 3' regulatorischen Sequenzen enthält und im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden ist, getestet werden. Hier galt es zu klären, ob die Transfektion des kompletten Transkriptes (und nicht nur der kodierenden Sequenz) in Fibroblasten zur Expression beider Isoformen führt.

Zusammenfassend war die Zielsetzung dieser Untersuchungen zum einen zu klären, ob der Aktivierung von MK2 und MK3 in Fibroblasten für die LPS-induzierte Aktivierung von STAT3 eine vergleichbare Bedeutung zukommt, wie sie für Makrophagen beschrieben ist.

Zum anderen sollte mit Hilfe von gegen verschiedene Bereiche des MK2 Transkriptes gerichteten siRNAs sowie durch Transfektion eines Plasmides, welches für die vollständige MK2 mRNA kodiert, geklärt werden, ob die zwei verschieden großen Isoformen der MK2 durch das gleiche Transkript kodiert werden.

1.2 Entzündungsprozesse und ihre Regulation

Entzündungsprozesse spielen im Organismus eine wichtige Rolle. Gelangt ein Pathogen in den Körper, werden Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert und leiten ein streng kontrolliertes Entzündungsgeschehen ein[9]. In der Folge werden über zum Teil evolutionär hochkonservierte Abwehrmechanismen, die auch unter dem Begriff angeborene Immunität zusammengefasst werden, Krankheitserreger erkannt und die Eliminierung derselben über die adaptive Immunität in die Wege geleitet[2]. Die Steuerung von Entzündungsprozessen ist in vielen Bereichen z.B. in der Bedeutung der verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Organs für die Immunantwort auf Pathogene noch unzureichend verstanden.

Die Aktivierung von Entzündungsprozessen durch pro-inflammatorische Mediatoren im Rahmen der Entzündungsantwort ist für die suffiziente Elimination von Pathogenen essentiell, führt zugleich jedoch auch zu einer verstärkten Schädigung von Gewebe[2, 3]. Um eine überschießende Entzündungsantwort zu verhindern, werden regulatorische Rückkopplungsmechanismen aktiviert, die auch als *negative feedback loops* (negative Rückkopplung) bezeichnet werden[2, 10]. Diese Mechanismen deeskalieren das Entzündungsgeschehen[2, 11-13] und schützen auf Organismusebene vor *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS)[14] mit Multiorganversagen durch sterile Entzündung.

1.2.1 Lipopolysaccharide – wichtige Mediatoren der Entzündungsreaktion im Rahmen einer Infektion mit gramnegativen Bakterien

Die auch als Endotoxine bezeichneten Lipopolysaccharide (LPS) entstammen aus der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und werden durch Zerfall freigesetzt[2]. LPS spielt bei der Induktion von durch gram-negative Bakterien (mit-)verursachte Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle[15]. Strukturchemisch handelt es sich um Verbindungen, die einen Fett (Lipo-) und einen Mehrfachzucker (Polysaccharid-) Anteil besitzen[16]. Im Rahmen der

Entzündungsreaktion bilden responsive Wirtszellen nach Kontakt mit LPS Botenstoffe wie beispielsweise pro-inflammatorisches TNF- α [2].

Mit der Entdeckung der *toll*-Gene als wichtige Komponenten zur Erkennung mikrobieller Bestandteile bei *Drosophila melanogaster* und der entsprechenden Homologen Gene in Vertebraten wurde festgestellt, dass *toll like receptor* (TLR)4 die inflammatorische Antwort auf LPS in Mäusen vermittelt. Dieser grundlegende Zusammenhang erweiterte das Wissen über die Pathogen-medierte intrazelluläre Signalkaskade maßgeblich und ist Meilenstein im Verständnis über die Mechanismen der angeborenen Immunität[2, 4, 17, 18]. TLR4 ist ein Transmembran-Rezeptorprotein, das aus einer zytosolischen Region -genannt *TIR domain* - sowie einer großen Leucin-reichen extrazellulären Region besteht[4, 15, 18]. MD2 (*myeloid differentiation factor-2*) assoziiert mit der extrazellulären Domäne von TLR4 und ist für die Detektion von LPS sowie die Liganden-induzierte Rezeptoranordnung notwendig[2]. Die *downstream* Signalweiterleitung über den TLR4-Rezeptorkomplex als Antwort auf LPS wird größtenteils durch den Einfluss von Adapterproteinen wie MyD88, MAL, TRIF und TRAM ermöglicht. LPS stimuliert auch die TNF- α Produktion[2, 4, 18], wobei der Aktivierung der p38-MAPK sowie der durch diese aktivierten Effektorproteine MK2 und MK3 eine wichtige Bedeutung zukommt[19, 20]. LPS induziert auch die Produktion von IFN- β , welches in Makrophagen für die Induktion der Produktion von IL10 sowie für die Aktivierung von STAT3 essentiell ist und einer weiteren Eskalation des Entzündungsgeschehens entgegenwirkt[2, 12].

LPS aktiviert als *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) den TLR4-Rezeptorkomplex, der als *pathogen recognition receptor* (PRR) der Pathogen-Erkennung dient[2, 4, 9, 18]. Es gibt Membran-gebundene und zytosolische Rezeptorstrukturen, die durch ihre Fähigkeit, extrazelluläre und intrazelluläre Pathogene oder auch durch Gewebeschädigung assoziierte molekulare Strukturen zu erkennen, angeborene Immunität initiieren[2, 4, 9, 18]. In Makrophagen beispielsweise aktiviert LPS Makrophagen-typische Effektorfunktionen wie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen. Aber auch andere an der Entzündungsreaktion beteiligte Zellpopulationen wie Fibroblasten erkennen LPS als PAMP über die Aktivierung des LPS/TLR4-Rezeptorkomplexes als PRR. Die weitergehende Charakterisierung der LPS-Signalgebung speziell in Fibroblasten und vergleichend dazu in Makrophagen soll in dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.2.2 Toll Like Rezeptoren – zentrale Sensoren für von Pathogenen abstammende molekulare Signaturen

LPS und TLR4 bilden eine evolutionär konservierte Einheit zur Weiterleitung extrazellulärer Stimuli in das Zellinnere, die durch von Pathogenen abstammende Moleküle wie LPS aktiviert wird[15]. Bruce Beutler erhielt 2011 mit der Entdeckung des LPS-aktivierten TLR4 im Rahmen der angeborenen Immunantwort den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin[5]. Diese Entdeckung ist ein Meilenstein im Verständnis des septischen Schocks, der unverändert eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität darstellt[21]. TLR sind wichtige Pathogen erkennende Rezeptoren des angeborenen Immunsystems[2, 4, 9, 17]. Die TLR sind als Membran-ständige Rezeptorfamilie eine Rezeptor-Untergruppe der PRR, deren Fähigkeit Pathogene zu erkennen darunter subsummiert wird. Diese Rezeptorfamilie ist zentrales Element der angeborenen Immunität und erkennt natürlich vorkommende von Pathogenen abstammende molekulare Signaturen (PAMP)[2, 9]. TLRs erkennen dabei Bestandteile von Viren, Bakterien und Pilzen, die eine Kaskade von inter- und intrazellulären Signalereignissen in Gang setzen, die zum einen direkt gegen das jeweilige Pathogen gerichtete Effektormechanismen aktivieren, zum anderen essentiell für die Aktivierung und Prägung einer adaptiven Pathogen-spezifischen Immunantwort des Wirtes sind[22]. Die gemeinsamen Strukturmerkmale aller *Toll-like*-Rezeptoren sind die N-terminalen LRR (*leucine-rich-repeats*) Sequenzen und die TIR-Domain (*Toll/IL-1R homology domain*)[23].

Dabei besetzen PAMP für sie spezifische TLR und lösen eine bereits gerichtete Entzündungsreaktion, d.h. eine durch das Muster der aktivierten Rezeptorstrukturen schon Erreger-spezifische initiale Reaktion gegen eintretende Mikroorganismen aus[2, 24]. In der Folge werden sowohl Signalmoleküle als auch weitere Zellen des Immunsystems aktiviert oder in ihrer Expression gesteigert, die eine essentielle Rolle in der Ausbildung eines erworbenen Immunsystems spielen[2, 25]. So wird unter anderem die p38/MK2/3-Signalkaskade aktiviert[2, 26-28].

1.2.3 Relevanz von p38/MK2/3 für die Regulation der Entzündungsantwort

Inflammatorische Stimuli wie LPS aktivieren über den TLR4/CD14/MD2-Rezeptorkomplex ein weitverzweigtes intrazelluläres Signal-Netzwerk[2]. Dieser Rezeptorkomplex aktiviert u.a. MAPK-Signalwege, die neben Entwicklungs-, Differenzierungs-, Alterungs- und Proliferationsprozessen in eukaryotischen Zellen auch in die Kontrolle der Genexpression im Rahmen von Entzündungsreaktionen involviert sind[2, 29]. Das aktivierte p38^{MAPK}-Signal ist dabei Ausdruck einer Stressantwort wie unter anderem Hitzeschock, UV-Strahlung oder LPS [30], welche mit der Induktion der Expression zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β oder TNF- α [31] einhergeht. Die p38^{MAPK} aktiviert u.a. die ihr untergeordneten Proteinkinasen MK2 und MK3[2, 19, 28, 32]. In Makrophagen führt die LPS induzierte Aktivierung der p38^{MAPK} sowohl zur Initiierung der inflammatorischen Zytokinantwort als auch zur Beendigung des Entzündungsgeschehens (Resolutionsphase)[2, 19, 28, 32].

Der hier beschriebene TLR4 abhängige p38 Signalweg weist in Abhängigkeit vom Zelltyp im Rahmen des inflammatorischen Geschehens einen ausgeprägten intrazellulären *cross-talk* zu anderen Signalwegen beispielsweise NF κ B, IRF3, STAT3 oder JNK und ERK sowie SAPK und BMK1 auf[2, 33-39]. Diese verschiedenen Signaltransduktionsmechanismen steuern im ständigen Zusammenspiel die Genexpression von inflammatorischen Proteinen, welche auf Transkriptionsebene, mRNA Stabilität, Translation, post-translationale Modifikation und Protein Stabilität reguliert sind[2, 19, 28, 32].

MK2 und MK3 sind funktionell und strukturell einander verwandt, wobei sie sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte in der Entzündungsreaktion haben[32]. Die Aktivierung des p38 Signalweges führt neben der Phosphorylierung von *downstream* Kinasen (MK2 und MK3[19]) aber auch zur Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie z.B. ATF2, der Entzündungsprozesse, Zellteilung, Apoptose und Karzinogenese reguliert[19, 32, 40-43].

Zur Rolle der MKs: MKs regulieren die Genexpression u.a. in Makrophagen durch transkriptionelle[2, 8] und posttranskriptionelle Modifikation[2, 20, 32]. Sie kontrollieren die Zytoarchitektur[20], nehmen Einfluss auf den Zellzyklus und sind in Entzündungsprozesse sowie der Tumorentstehung involviert[19]. MK2 ist für die LPS-induzierte Hochregulierung der Zytokin-mRNA-Stabilität[2, 32, 44], translationale Prozesse und der Zytokinbiosynthese bedeutsam[27, 32]. MK2 defiziente Tiere sind zwar für bakterielle Infektionen susceptibler aber gegenüber Endotoxin-induziertem SIRS resistenter[19, 45]. In einigen Arbeiten konnte

bereits belegt werden, dass MK2 und MK3 mit einer vergleichbaren Kinetik parallel aktiviert werden[8, 44] und kontextspezifisch ähnliche Funktionen haben, wobei das Aktivitätslevel der MK2 in der Regel signifikant höher als das der MK3 ist[28]. Hierbei war fraglich, ob MK3 signifikante möglicherweise neue Effekte in einer MK2 freien Umgebung zeigt[20]. Beim Doppel-*knockout* sind entgegen der Erwartung die Mäuse lebensfähig und zeigen keine zusätzlichen Defekte im Vergleich zum MK2-K.O.[28].

1.2.4 Relevanz von STAT3-abhängiger Signalübertragung für die Akutphase- und die Endotoxin-induzierte Entzündungsreaktion

STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch das STAT3 Gen kodiert wird, und vermittelt die Effekte von Stimuli oder wird indirekt durch diese aktiviert, wodurch die Genexpression während Entzündungsprozessen ansteigt[46]. Diese Arbeit charakterisiert die Regulation von STAT3 im Entzündungsgeschehen. Der bei der Akutphasereaktion und Endotoxin-induzierten Entzündungsreaktion intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismus ist u.a. IL-6 abhängig und an die Anwesenheit von STAT3 und auch NF κ B gebunden[47-49]. Über Importin α/β [50] werden aktivierte STAT-Dimere in den Zellkern transportiert. Die durch nukleäre Phosphatasen inaktivierten STAT-Proteine werden z.B. über Exportin crm1/RanGTP wieder aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert[51]. Daneben gibt es zur Regulation endogene Inhibitoren, die STATs selbst hemmen (z.B. durch *protein inhibitor of activated STAT*, PIAS Proteine) oder die Aktivierung von STATs hemmen (z.B. durch *suppressor of cytokine signaling*, SOCS- Proteine)[2, 52]. Arbeiten konnten belegen, dass beispielsweise STAT3-defiziente Makrophagen und andere Immunzellen exzessiv Zytokine auf LPS exprimieren, wodurch es zu einer überschießenden Entzündungsreaktion kommt[2]. STAT3 vermittelt u.a. in der Entzündungsreaktion die protektiven und anti-inflammatorischen Effekte von IL-10[6]. IL-10 ist hierbei für die verzögert anhaltende STAT3 Aktivierung in Makrophagen verantwortlich, welche im Gegensatz zur STAT3 Aktivierung durch andere Zytokine wie IL-6, welches nur transient pro-inflammatorisch wirkt, oder IFN- β nicht durch endogene Inhibitoren der STAT3 vermittelten Zytokin-Signalwege wie SOCS gehemmt werden kann[2, 53].

1.2.4.1 Der JAK-STAT-Signalweg in der STAT3-abhängigen Signalübertragung

In Hepatozyten spielt u.a. der IL-6-Rezeptorkomplex eine wichtige Rolle bei der inflammatorischen Antwort auf externe Stimuli[49]. Hierbei ist der JAK-STAT-Signalweg involviert: Der Ligand IL-6 bildet den Rezeptorkomplex, wobei die sterische Nähe der JAKs eine Autophosphorylierung bewirkt, welche zur Dimerisierung von phosphorylierten STAT3 Molekülen führt. Die STAT-Dimere erkennen im Zellkern spezifische Promotorsequenzen über DNA-Bindungsdomänen (DBD), wodurch die Transkriptionsrate stark ansteigt[48].

Die Zytokinrezeptoren, welche via STAT signalisieren, weisen in diesem Zusammenhang verschiedene für sie typische Liganden auf. So sind neben Zytokinen wie beispielsweise Interferone und Interleukine auch Hormone wie Erythropoetin (Epo) und Wachstumshormone (*growth hormon*, GH) Zielstrukturen für Tyrosinkinase-Rezeptoren[46, 54]. Es gibt allerdings auch Hinweise, die von einer Hemmung der STAT abhängigen Transkription ausgehen [55, 56].

1.2.4.2 Relevanz von STAT3 für die Signalübertragung von IL-10

Basierend auf den oben erläuterten Transduktionsmechanismen der STAT3 abhängigen Signalübertragung auf externe Stimuli induziert LPS Faktoren, die STAT3 aktivieren. STAT3 ist hierbei wichtig für die Resolutionsphase der inflammatorischen Reaktion, also der Beendung der inflammatorischen Zytokinproduktion[2, 6, 57]. IL-10 spielt grundsätzlich eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems und wurde früher als *Cytokine-synthesis inhibitory factor* (CSIF) bezeichnet[58], dessen Hauptproduzenten leukozytäre und lymphozytäre Zellen, Monozyten, TH2-Lymphozyten und aktivierte Makrophagen sind. Als wichtiger Negativregulator der inflammatorischen Antwort ist IL-10 ein Schlüsselmediator der Gegenregulation von Entzündungsprozessen[57, 59, 60]. IL-10 vermittelt seine Effekte führend über den JAK/STAT-Signalweg (vgl.1.2.4.1)[2, 57, 60, 61].

Mechanistisch aktiviert IL-10 autokrin den IL-10 Rezeptor an der Zelloberfläche von Makrophagen, wodurch in der Folge eine verzögert anhaltende STAT3 Aktivierung eintritt, welche wiederum die proinflammatorische Genexpression von beispielsweise TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 und IFN- γ hemmt[2, 57, 60]. Andererseits vermittelt IL-10 verstärkt die Degradation der Transkripte von proinflammatorischen Zytokinen, was zur Verminderung

deren Translation führt[2]. Eine verminderte oder gar fehlende IL-10-Aktivität würde dementsprechend zu einer verstärkten bzw. überschießenden Entzündungsreaktion führen[59, 60, 62].

Auf der Grundlage von *knockout*-Tiermodellen konnte in Makrophagen belegt werden, dass LPS über die Induktion der Expression von IL-10 zu einer Aktivierung von STAT3 führt, welches die Effekte von IL-10 vermittelt[2, 7, 8, 57]. Zudem regulieren STAT3 Proteine aber auch das Zellwachstum beispielsweise durch Antiapoptose p21/Kaspasen hoch, so dass STAT3 Moleküle durch die Beeinflussung von Cyclinen und Proteinen der Bcl-2 Familie Tumor aktivierende Prozesse beeinflussen[46, 55].

1.2.5 Einteilung der Typ I und Typ II Interferone mit Relevanz für die TLR4-abhängige Zytokinexpression im Kontext der Resolutionsphase des Entzündungsgeschehens

Typ I Interferone (IFN α/β) sind v.a. als antivirale Faktoren wichtig[63, 64] und sind darüberhinaus auch für andere Prozesse wie die Induktion der IL-10 Produktion durch LPS relevant[8]. Interferone sind Glykoproteine, die antivirale, antitumoröse und immunmodulierende Funktionen im zellulären Apparat auf Stress-Reize hin vermitteln[63-65]. Als Gewebshormone, die von Fibroblasten, T-Lymphozyten und Monozyten sezerniert und in Typ I (IFN- α und IFN- β) sowie Typ II Interferone unterteilt werden, wobei letzteres nur Interferon- γ ist[66, 67], sind zwischenzeitlich Typ III Interferone im Rahmen von *Mycobacterium tuberculosis* Infektionen entdeckt worden[68], von denen insgesamt 3 humane Subtypen IFN- λ 1, - λ 2 und - λ 3 klassifiziert werden. Typ I Interferone inkludieren 17 Subtypen, von denen 13 Subtypen IFN α neben IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω beschrieben werden[64]. Typ I Interferone signalisieren über den aus IFNAR1 und IFNAR2 zusammengesetzten (IFNAR)1[65], Typ II Interferone signalisieren über die zusammengesetzte Rezeptorkomplex Untereinheit IFN- γ R1 und IFN- γ R2.

Für Makrophagen-Zellpopulationen löst der LPS gebundene TLR4-Rezeptorkomplex (PAMP-*sensing*) eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die durch eine veränderte Genexpression die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IFN- β , IL-1 β , IL-6, IL-12 und TNF α steigert[2]. Im Rahmen dessen setzen Makrophagen u.a. IFN- β frei, welches als Typ I Interferon den an der Zelloberfläche befindlichen Interferon- α -Rezeptor(IFNAR)1 bindet, wodurch autokrine/parakrine Rückkopplungsschleifen u.a. auch JAK/STAT-Signalwege

aktiviert werden[2, 8]. Hierbei sind auch die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 beteiligt[69, 70].

IFN- β wird u.a. von Fibroblasten und anderen Zellpopulationen wie Makrophagen[2, 7, 8], Zellen der glatten Gefäßmuskulatur[71], dendritischen Zellen[72] oder humane periphere mononukleäre Leukozyten exprimiert[73]. IFN- β wird von Virus-infizierten Fibroblasten exprimiert[74]. Aber auch bakterielle Bestandteile wie das Endotoxin LPS induzieren in Fibroblasten die IFN- β Expression[75-78].

IFN- β bindet an den gleichen Interferon-Rezeptor wie IFN- α [79]. Dabei handelt es sich um den IFNAR1 Rezeptor (Interferon- α/β -Rezeptor 1), der nach Aktivierung durch IFN- β und IL-10 u.a. das STAT3 Signal vermittelt [2]. γ -Interferon ist das einzige Mitglied der Typ-II-Interferone. Es wird v.a. von T-Lymphozyten (CD4⁺TH1-Zellen) nach Kontakt mit phagozytierenden und Antigen-präsentierenden Makrophagen gebildet[64]. Es hat vorrangig immunmodulierende Funktionen wirkt aber auch antiviral, antineoplastisch und aktiviert Makrophagen, welche Stickoxide und reaktive Oxygen-Spezies freisetzen[64, 80].

LPS aktiviert über TLR4/CD14/MD2 u.a. die p38^{MAPK} (s.o.), welche als klassische *downstream-targets* MK2 und MK3 aktiviert[19, 20, 32, 45, 81]. Unter dem Einfluss der MK3 in MK2-freier Umgebung hält I κ B- β beispielsweise den Faktor p65 durch verzögerte Degradation länger im Zytosol, wodurch die NF κ B/p65 vermittelte Signalgebung gestärkt wird[8]. Im Rahmen der Entzündungsreaktion auf externe Stimuli ist die IRF3 und p65/p50 Aktivierung für die IFN- β Expression (vgl. 1.2.6) als wichtiger Schritt in der Regulation des STAT3 Moleküls mitverantwortlich. Ergänzend zudem ist IFN- β aktiviertes STAT3 wichtig für die nachhaltige Expression von IL-10. Desweiteren unterliegt IL-10 einer MK2-abhängigen Transkriptstabilität[2, 8].

1.2.6 Rolle von IRF3 für die Regulation der Interferon- β Expression

In Makrophagen führt der LPS induzierte TLR4/MD2 Rezeptorkomplex im Rahmen der inflammatorischen Antwort neben der Aktivierung von IKK/I κ B α /NF κ B und der p38 MAPK auch zur Aktivierung des IRF3 Signals, dessen Einfluss in der Kontrolle der inflammatorischen IFN- β Genexpression liegt[8]. Im Zuge dessen bilden IRF3 zusammen mit NF κ B einen Transkriptionskomplex, welcher maßgeblich an der Regulation der IFN- β Gentranskription beteiligt ist[82]. IRF3 ist einer der insgesamt neun Transkriptionsfaktoren,

die zur Familie der IFN- α/β induzierenden Gene gehören. Im Kontext der Interferon-Antwort in Virus-infizierten Fibroblasten ist die Anwesenheit der beiden Faktoren IRF3 und IRF7 für die Generierung einer antiviralen Immunantwort wichtig[83]. Andere Transkriptionsfaktoren wie c-Jun/ATF2 binden ebenfalls am IFN-Promotor, wodurch sie die Regulation der IFN- β Expression kontrollieren[43].

1.3 Rolle von Makrophagen im Kontext des Entzündungsgeschehens

Makrophagen sind Zellen des Immunsystems und spielen sowohl im Rahmen der angeborenen Immunität als auch in der Prägung einer adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle[2, 26]. Wie auch für andere Zellpopulationen (z.B. dendritische Zellen) sind Monozyten die Vorstufen für Makrophagen, die aus in das Gewebe rekrutierte Monozyten entstehen[84]. Je nach Lokalisation unterteilt man sessile also ortsständige/residente Makrophagen: in der Leber die Kupffer-Zellen, im Zentralen Nervensystems (ZNS) die Mikroglia und in der Lunge die Alveolarmakrophagen[85]. Residente Makrophagen wie Kupffer-Zellen sind permanent im Gewebe vor Ort, um als erstes auf Krankheitserreger reagieren zu können[86]. Ihre Ortsgebundenheit ist unabhängig von einem entzündlichen Stimulus, was sie von den Makrophagen unterscheidet, die aus infiltrierenden Monozyten ausdifferenziert sind[87].

Makrophagen phagozytieren im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr Pathogene, indem Lysosomen mit lytischen Enzymen die phagozytierten Erregerbestandteile inaktivieren[88]. Die phagozytierten Partikel werden an MHC-Proteine gekoppelt und an der Zelloberfläche der Makrophagen präsentiert. Gleichzeitig werden Chemokine als "Lockstoffe" von aktivierten Makrophagen freigesetzt, die wiederum andere Immunzellen aus dem Blutkreislauf und der Umgebung rekrutieren, so dass das Entzündungsgeschehen lokal verstärkt wird[89].

Im Rahmen der Entzündungsreaktion werden nach Kontakt mit Pathogenen aus Makrophagen vermehrt Zytokine wie beispielsweise IL-1 β und TNF- α freigesetzt, die als inflammatorische Mediatoren die Synthese und Sekretion von weiteren Zytokinen wie IL-6 und IL-8 aus rekrutierten Makrophagen, Monozyten und lokalen Stroma-Zellen verstärken[2]. Während der Akutphase-Reaktion spielen Hepatozyten als Vermittler der angeborenen Immunität bei der Kontrolle der systemischen inflammatorischen Antwort eine maßgebliche Rolle, indem sie Akute-Phase-Proteine freisetzen und u.a. das Komplement-System aktivieren[49]. Hierbei haben sich IL-1 β und IL-6 als führende Zytokine mit additiven, inhibitorischen und

synergistischen Effekten in Bezug auf die Regulation der Akutphase-Proteinexpression herausgestellt[49]. So modifiziert IL-1 β die IL-6 induzierte Akutphase-Proteinsynthese, indem es die Produktion von γ -Fibrinogen, α 2-Makroglobulin, α 1-Chymotrypsin hemmt, wogegen Hepzidin, C-reaktives Protein und Serum Amyloid A stark hochreguliert werden[49]. Beide o.g. Zytokine sind für die Akutphase-Antwort in Makrophagen essentiell, da sie zum einen durch chemotaktisch regulatorische Effektorfunktionen das lokale Entzündungsgeschehen verstärken und zum anderen die Pathogen-Beseitigung auf inflammatorische Stimuli beeinflussen. Im Gegensatz dazu spielen nicht-phagozytierende Makrophagen bei der Steuerung von Proliferations- und Differenzierungsprozessen sowie der Regeneration z.B. von geschädigten Muskelfasern eine Rolle[90].

Makrophagen synthetisieren zur Bekämpfung von Pathogenen reaktive Stickoxide (NO), Superoxid-Anionen (O₂^{*-}) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂)[80, 91]. Makrophagen bilden Narbengewebe[92] und unterstützen durch die Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie des Angiogenesefaktors VEGF den Wundheilungsprozess nach Haut- und Gewebeverletzungen[93].

Im Rahmen der Regulation der Makrophagen-typischen Effektorfunktionen bestimmt die Art des Stimulus den Makrophagen spezifischen Differenzierungsstatus: Ist IFN- γ oder LPS der Stimulus spricht man von klassischer Makrophagen Aktivierung, werden Makrophagen dagegen mit IL-4 oder Glukokortikosteroiden (GKS) stimuliert, handelt es sich um eine alternative Makrophagen Aktivierung[94]. Die klassische Makrophagen Aktivierung durch TH1-Helferzellen via IFN- γ führt bei den intrazellulären Pathogenen (z.B. *Mycobacterium tuberculosis* und HIV) zu einer Aktivierung der zellulären Immunantwort[95]. Der alternative Weg via IL-4 und IL-13 durch TH2-Zellen aktiviert die humorale Immunabwehr, welche bei der Bekämpfung von beispielsweise Helminthen-Infektionen oder allergischen Reaktionen im Vordergrund steht[96, 97]. Hieran wird deutlich, dass Makrophagen funktionell das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem verbinden[85].

1.4 Rolle von Fibroblasten im Kontext des Entzündungsgeschehens

Neben Makrophagen sind Fibroblasten ebenfalls an der Entzündungsreaktion und der damit verbundenen Kontrolle der Regulation der Genexpression für die Akutphaseproteine beteiligt. Die Fähigkeit der Fibroblasten, auf bakterielle Reize wie Lipopolysaccharide und Viren[98] mit einer Typ I Interferon (IFN α/β) Produktion zu reagieren, welche zahlreiche

Verteidigungsmechanismen gegenüber bakteriellen und viralen Infektionen vermitteln, ist im Zusammenhang der inflammatorischen Antwort bei der Pathogen-Beseitigung hervorzuheben. Zu den allgemeinen Funktionen der Fibroblasten gehört die Produktion der extrazellulären Matrix, welche Zellen untereinander mit Kollagen und Proteoglykanen zu stabilen und zugfesten Zell- und Gewebeverbänden verbindet[99, 100]. Histologisch stammen Fibroblasten (Bindegewebszellen) vom Mesenchym ab[101]. Es sind bewegliche, ortsständige Zellen, die je nach Stimulus und Reifung zu bewegungsunfähigen Fibrozyten differenzieren. Bei einer Gewebeschädigung proliferieren Fibroblasten und synthetisieren vermehrt Zytokine. Diese Botenstoffe regulieren u.a. Entzündungs- und Heilungsprozesse[102, 103]. Fibroblasten konvertieren durch IL-6 zu Myofibroblasten, die eine wichtige Rolle bei Lungenerkrankungen wie Asthma spielen[104]. Normale Wundheilungsprozesse werden insbesondere durch das IL-6 *trans-signaling* vermittelt, wodurch die Bildung von Fibrosegewebe und Kollagen verstärkt wird. Beim *trans-signaling* wird der membrangebundene IL-6 Rezeptor (mIL-6R α) auf Makrophagen übertragen und vermittelt als löslicher IL-6 Rezeptor (sIL-6R α) die typischen inflammatorischen Effekte auf Fibroblasten. Die Aktivierung des IL-6 *trans-signaling* verstärkt die Proliferation von Fibroblasten und die Produktion von extrazellulären Matrix-Proteinen, deren fibrotische inflammatorische Antwort sehr komplex in das Entzündungsgeschehen involviert ist[104]. Zudem spielen Fibroblasten bei chronisch-entzündlichen Knochendestruktionsprozessen wie bei der rheumatoiden Arthritis (RA) als IL-6/sIL-6R stimulierte Fibroblasten-*like*-Synoviozyten (FLS) eine wichtige Rolle[105, 106]. Fibroblasten sind zudem an der antiviralen Antwort z.B. bei humaner Zytomegalievirus-Infektion (HCMV) beteiligt und haben hierbei Einfluss auf die Signaltransduktion und Zytokinstimulation sowie Genexpression im IL-6 induzierten viralen Infektionszyklus[107]. Fibroblasten sind ebenso reaktiv gegenüber bakteriellen Bestandteilen und sezernieren auf LPS endogenes IFN- β 2, welches in Fibroblasten einen antiviralen Zustand hervorruft. Hierdurch leisten Fibroblasten einen entscheidenden Beitrag bei der Auseinandersetzung mit gramnegativen Pathogenen wie LPS[78, 108] und zwar sowohl in der initialen Entzündungsreaktion[66, 103] als auch in der Resolutionsphase über IL-10 als Suppressor der inflammatorischen Antwort[109]. Zudem sind Fibroblasten auch an der Entstehung von Tumorgewebe beteiligt[110] und vermitteln die Kommunikation zwischen Tumorzellen und deren Umgebung sowie das Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung[111].

1.5 Endotoxin-induzierte Signalübertragung im experimentellen Ansatz

Bei LPS-induzierten Signalwegen spielt die STAT3 Aktivierung in Makrophagen eine wichtige Rolle, da sie die Expression entzündlicher Mediatoren hemmt und dadurch eine anti-inflammatorische Wirkung ausübt[2, 12, 57, 60]. Diese Arbeit soll die LPS-abhängige STAT3-Signalgebung in Makrophagen und vergleichend dazu in Fibroblasten analysieren. Basierend auf diesem Hintergrund wurden für die Untersuchungen Zellkulturen aus immortalisierten Zellen (Fibroblasten und Makrophagen), die von *knockout*-Tieren sowie ihren Kontrolltieren abstammen, verwendet. In *knockout* Mäusen ist ein spezifischer Genbereich selektiv inaktiviert oder deletiert, wodurch die Genexpression eines bestimmten Faktors unterbleibt. An dieser Stelle sei erwähnt, dass dafür im Jahre 2007 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin an Mario R. Capecchi (University of Utah, Salt Lake City, USA), O. Smithies (University of North Carolina, Chapel Hill, USA) und Sir Martin J. Evans (Cardiff University, Cardiff, UK) verliehen wurde[112]. Mit diesem Ansatz lässt sich modellhaft das durch LPS-induzierte Entzündungsgeschehen im Rahmen der Sepsis auf zellulärer Ebene experimentell nachvollziehen[17, 113]. Ein weiterer wichtiger LPS-induzierter Signalweg ist die p38^{MAPK}-Signalkaskade mit den Faktoren MK2 und MK3[19, 32], die essentiell für die LPS-vermittelte Zytokinexpression sind[20, 44, 114-116]. MK2 und MK2/3-defiziente Fibroblasten und Makrophagen sowie deren Wildtyp-Form ermöglichen die Charakterisierung der Beteiligung von MK2 und MK3 an der Regulation des Entzündungsgeschehens im LPS-behandelten Modell[28, 44, 117, 118]. Darin involviert sind LPS-aktivierte Transkriptionsfaktoren wie IRF3 und NFκB/p65[119-123].

1.6 Zielsetzung

Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe belegen, dass die Kinase MK2 in Makrophagen bei der LPS-induzierten STAT3 Aktivierung eine essentielle Rolle spielt[2, 8]. Ausgehend von diesem Befund wurde der Fragestellung nachgegangen, ob es in weiteren Zellen, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind, zu einer vergleichbaren Regulation kommt. Fibroblasten beispielsweise sind als Bindegewebszellen im Rahmen der Entzündungsantwort in solche inflammatorische Steuer- und Regulationsprozesse einbezogen[99, 101] und sind an der Verstärkung und Modulation der inflammatorischen Antwort beteiligt. Insbesondere sind

embryonische Fibroblasten einer experimentellen Manipulation gut zugänglich und darüber hinaus leicht aus gentechnisch veränderten Tieren zu isolieren. Vor diesem Hintergrund werden Maus-embryonische Fibroblasten (MEF)-Zellen als Modellsystem für die Regulation von Entzündungsprozessen herangezogen. Andere Immunzellen z.B. Makrophagen sind bezüglich dieser Technik schlecht zugänglich. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wie auch die Ergebnisse anderer legen nahe, dass LPS über einen Typ I Interferon abhängigen Rückkopplungsmechanismus die Expression von IL-10 wie auch die nachfolgende Aktivierung von STAT3 durch IL-10 induziert. Dies wird durch die Kinasen MK2 und MK3 kontrolliert. Im ersten Teil der Arbeit sollte nun die Frage geklärt werden, ob für die Regulation der STAT3 Aktivierung in Reaktion auf die Stimulation mit LPS in Fibroblasten vergleichbare Signalketten verantwortlich sind wie sie für Makrophagen beschrieben sind.

Darüberhinaus sollte in einem weiteren eher methodisch orientierten zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, ob die aufgeführte MK2 mRNA in murinen Fibroblasten beide Isoformen des MK2-Proteins kodiert. Im Rahmen dessen wurden siRNAs gegen verschiedene Bereiche des gesamten MK2 Transkriptes, auch der nicht translatierten Bereiche gerichtet. Zudem wurde eine gegen die kodierende Sequenz der MK3 gerichtete siRNA entwickelt und untersucht. Mittels siRNA vermitteltem *knockdown* sollte daraufhin der Einfluss auf die Proteinexpression der MK2 und MK3 analysiert und das durch die veränderte Zielsequenz abhängige Degradation der MK2 mRNA übermittelte Proteinexpressionslevel der MK2-Isoformen untereinander verglichen werden. Abschließend sollte geklärt werden, ob die Transfektion des kompletten Transkripts sowohl mit den kodierenden als auch den nicht kodierenden Sequenzen durch die Expression eines co-transfizierten Plasmides, welches hierfür hergestellt wurde, in Fibroblasten zur Expression beider Isoformen führt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

ATF2	polyklonal	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
FLAG-M2	monoklonal	(Sigma-Aldrich, St.Louis MO)
GAPDH	monoklonal	(Bioss International, Saco ME)
MK2	monoklonal	(Cell Signaling, Boston MA)
MK3	monoklonal	(Bethyl Laboratories, Montgomery TX)
p65 (C-20)	polyklonal	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
Phospho-Ser-536-p65	monoklonal	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
Phospho-Thr-71-ATF2	polyklonal	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
Phospho-Tyr-705-STAT3	polyklonal	(Cell Signaling, Boston, MA)
STAT3 (C20)	polyklonal	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

2.1.2 Lösungen und Puffer für Western Blot

2.1.2.1 Ansatz für ein 8%-PAA-Trenngel

Acrylamid	8%
Tris pH 8,8	0,38 M
SDS	0,1%
Ammonium-Persulfat (APS)	0,1%
TEMED	0,00006%

2.1.2.2 Ansatz für ein 5% PAA-Sammelgel

Acrylamid	5%
Tris pH 6,8	0,126 M
SDS	0,1%
Ammonium-Persulfat	0,1%
TEMED	0,0001%

2.1.2.3 1x Elektrophoresepuffer

Tris	125 mM
SDS	17,5 mM
Glycin	1,25 M

2.1.2.4 Elektrophoreseauftragpuffer (4-fach Lämmli)

Glycerol	40%
SDS	5%
TRIS-HCl bei pH 6,8	250 mM
Bromphenolblau	0,005%

2.1.2.5 Blotting-Puffer

2.1.2.5.1 Anodenpuffer I

Tris	0,3 M
Methanol	20%

2.1.2.5.2 Anodenpuffer II

Tris	0,025 M
Methanol	20%

2.1.2.5.3 Kathodenpuffer

6-Aminocapronsäure (Aminohexansäure)	0,04 M
Methanol	20%

2.1.2.6 TBS-T Waschpuffer

NaCl	0,75 M
Tris	1 M
Tween	0,1%
pH-Wert	7,6

2.1.2.7 Stripping Puffer

Tris-HCL	62,5 mM
SDS	2%
pH-Wert	6,7

2.1.2.8 Triton Lyse Puffer (TLP)

NaCl	136 mM
Tris-HCl	20 mM
Glycerol	10%
EDTA	2 mM
b-Glycerophosphat	50 mM
Na-Pyrophosphat	20 mM
Pefabloc	0,2 mM
Aprotinin	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml
Benzamidin	4 mM
Na-Vanadat	1 mM
Triton X 100	1%
SDS	0,2%
pH 7,4	

2.1.3 Zelllinien -NIH3T3-Zellen und MEF-Zellen-

NIH3T3-Zellen entstammen einer embryonalen Fibroblastenzelllinie der Maus, die nach dem 3T3-Protokoll transformiert wurde[124]. Diese Zelllinie ist mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 nach Herstellerangaben (Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt) mit einer Effizienz bis zu 80% besonders gut transfizierbar. MEF-Zellen, embryonale Mausfibroblasten, wurden als immortalisierte Zelllinie in Kultur gehalten[44]. Für die Kultivierung beider Zelllinien in 75 cm² Zellkulturflaschen (Fa. Greiner BioOne, Frickenhausen) wurde "Dulbecco's MEM (DMEM) mit Glutamax-I-Medium mit 1000 mg/L Glukose" (Fa. Biochrome, Berlin) inklusive 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) (Fa. Biochrome, Berlin) verwendet. Alle ein bis zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Nach Behandlung mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA (Fa. Cytogen, Sinn) wurden die Zellen in Suspension gebracht und in frisches Zellkulturmedium überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei konstant 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre.

2.1.4 Zytokine und bakterielles Endotoxin

LPS (Lipopolysaccharid)	(E.coli, Sigma)
IFN- β (Interferon)	(murin, PBL)
IL-6	(murin, Peprotech)
gp80	(murin, Aachen)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot

NIH3T3, MEF und Makrophagen-Zelllinien wurden auf 6-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach Zugabe des Stimulus und nach Ablauf der Inkubationszeit wurde geerntet. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 200 μ L Triton-Lyse-Puffer. Die Proben wurden in 1,5-ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf) überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 20 min bei 4°C und 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Bis zur analytischen Auswertung mittels Western Blot wurden die Proteinzelllysate bei -20°C gelagert.

2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde das 5xBradford Reagenz (Fa. Bio-Rad, München) 1:5 mit Wasser verdünnt. Das benötigte Lösungsvolumen von einem Milliliter wurde gemäß der Anzahl der Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden drei Mikroliter des Proteinlysates in die Bradford Lösung pipettiert. Der Farbumschlag nach Blau ist ein Maß für die Proteinkonzentration. Am Photometer erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge gemessen gegen die Referenzprobe bei einer Wellenlänge von 595 nm. Mit dem Umrechnungsfaktor 18, der sich aus der mit einer BSA-Verdünnungsreihe ermittelten Eichgerade ergibt, und der Formel „Absorption (Mittelwert) * Verdünnungsfaktor/ eingesetzte Probenmenge“ ließ sich die Proteinkonzentration in μ g/ μ l berechnen.

2.2.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden 8% Polyacrylamid-Gele (PAA-Gel) verwendet. Die Polymerisierung der Gel-Lösung erfolgte durch die Zugabe von APS (Fa. Merck, Darmstadt) und TEMED (Fa. Sigma, München). Nach abgeschlossener Polymerisierung wurden die Gele in Elektrophoresekammern (Fa. Biometra, Goettingen) eingesetzt. 60 µg Protein wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorbereitet. Dabei wurden die Proben vor Verwendung gevortext und dann zu den errechneten Mengen auf die Reaktionsgefäße verteilt. Es wurden die gleichen Mengen an 2x-Laemmli-Puffer inklusive 4% β-Mercaptoethanol (2 µl β-ME auf 25 µl 2x-Laemmli-Puffer) pro Probe hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proben für 5 min bei 95°C im Thermoblock (Fa. Eppendorf, Hamburg). Die Gelkammer wurde mit 1x Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Nach der Auftragung der vorbereiteten Proben wurde die Gelelektrophorese bei 120 Volt durchgeführt. Als mit aufgetragener Größenmarker wurde der Dual Color Marker (Fa. BioRad, München) verwendet.

Nach Auftrennung der Proben und Beendigung der Elektrophorese wurde das PAA-Gel in Kathodenpuffer inkubiert. Im Anschluss wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach der "halbtrockenen Westernblotmethode" vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert. Die mit Methanol aktivierte Membran wurde bis zur Verwendung in Anodenpuffer II gelagert. Das Polyacrylamidgel wurde in den Kathodenpuffer gegeben. Es wurde nach den Angaben des Herstellers (Hybond-P, Amersham/Fa. GE Healthcare Life Sciences) verfahren und nach den Vorbereitungen eine Spannung angelegt, die sich aus der folgenden Formel errechnen ließ:

$$\text{Stromstärke } I \text{ [mA]} = 0,8 * \text{Fläche des Gels [cm}^2\text{]}$$

Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran nach dem Blotten in TBS-T für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 5%-iger Blockierlösung (BSA in TBS-T gelöst) geschwenkt. Danach wurde 2 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation des proteinspezifischen Primär-Antikörpers(1:1000 bzw. 1:2000) bei 4°C über Nacht. Daraufhin wurde 3 x 20 min mit TBS-T gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Rabbit oder Anti-Mouse HRP-Konjugat; 1:5000) erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur.

Die anschließende Detektion erfolgte nach der ECL-Methode (*Enhanced Chemoluminescence*) mit Lösungen der Firma Perkin Elmer (Life Science, Massachusetts, USA) unter Verwendung

der „Amersham Hyperfilm ECL“ (Fa. GE Healthcare) Filme. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren.

Um die Western Blot Membran auch für weitere Detektionen zu verwenden, wurde der proteinspezifische Antikörper wieder entfernt. Dafür wurde ein Stripping-Puffer inklusive 0,8% β -Mercaptoethanol verwendet. Nach einer Inkubation bei 70°C für 20 Minuten wurde die Membran in TBS-T gewaschen. Nach dem Blocken mit 5%-iger BSA-Lösung und Waschen in TBS-T war die PVDF-Membran für weitere Detektionen vorbereitet.

2.2.4.1 Real Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Für die cDNA-Synthese mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (Fa. Qiagen, Hilden). 1 μ g der gesamten RNA wurde mittels Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) mit integriertem Verdau der genomischen DNA nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurde eine NEC (*no enzyme control*) hergestellt, in der die Reverse Transcriptase fehlte, um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA prüfbar zu machen. Es wurde mit der Zugabe von Nuklease-freiem Wasser für die weitere Verwendung in der Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) 1:5 verdünnt. 1,2 μ l der verdünnten cDNA wurde als Template zu einem Endvolumen von 25 μ l inklusive *1x SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt) und Oligonukleotiden (Sequenzen siehe 2.1.4.2) als spezies- sowie sequenzspezifische Primer entsprechend den Herstellerangaben für die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) verwendet.

Die Messung erfolgte mit dem 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, Darmstadt). Dabei wurde SYBR Green (Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Die semiquantitative Auswertung erfolgte nach der Δ CT Methode und der Software des 7500 Real-Time PCR Systems nach den Angaben des Herstellers (Life Technologies, Darmstadt).

2.2.4.2 Primer für die RT-PCR

Die folgenden *Primer* wurden für die *Real Time PCR* verwendet:

Tabelle 1: Primersequenzen, murines IFN β 1, murines SDHA, murines IL-10

murin IFN β 1 Accession number NM_010510

sense, 5'-CCC TAT GGA GAT GAC GGA GA-3'
antisense, 5'-ACC CAG TGC TGG AGA AAT TG-3'

murin SDHA Accession number NM_023281

sense, 5'-TGG GGA GTG CCG TGG TGT CA-3'
antisense, 5'-GTG CCG TCC CCT GTG CTG GT-3'

murin IL-10 Accession number NM_010548

sense, 5'-CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA-3'
antisense, 5'-TCT CAC CCA GGG AAT TCA AA-3'

Die verwendeten *Primer* wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) erworben. Als endogene Kontrolle wurde die Succinat-Dehydrogenase (SDHA) mRNA verwendet. Die Expressionswerte für IFN- β und IL-10 wurden mit den Messwerten für SDHA relativ verrechnet. Die Ct-Werte von IFN- β und IL-10 wurden mit den Ct-Werten von SDHA normalisiert. Dabei wurde der Ct-Wert von IFN- β bzw. IL-10 von dem SDHA-Messwert abgezogen und mit 2^n verrechnet. Damit ergab sich der „*relative RNA unit*“ Wert. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden anschließend als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

2.2.5.1 Transfektion von Fibroblasten (MEF, NIH3T3)

Die Transfektion, also das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, wurde drei bis vier Tage vor Versuchsbeginn durchgeführt. Mittels Lipofektion (Lipofectamin 2000, Invitrogen, Karlsruhe) fusioniert dabei ein Plasmid eingebettet in Liposomen mit der Zellmembran. Die eingeschleuste DNA wird dabei jedoch nicht in das Genom eingebaut, sondern verbleibt nur zeitlich begrenzt -also transient- im Zytoplasma.

Pro Ansatz (6 cm-Zellkulturschale) wurden 2,5 µg DNA verwendet, welche mit 50 µl OptiMEM (Invitrogen, Karlsruhe) vermengt wurden. Ein zweiter Reaktionsansatz wurde mit 4 µl Lipofectamin 2000 und 250 µl OptiMEM vorbereitet. Beide Ansätze wurden miteinander vereint und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die zu transfizierenden MEF-Zellen wurden in der 75 cm² Zellkulturflasche mit 80% Konfluenz mit 2 ml Trypsin/EDTA in Suspension gebracht. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml frischem Medium (*high Glucose* 10% FCS) aufgenommen und bei 4°C und 1000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml Medium resuspendiert. Nun wurden 300 µl Zellsuspension je Zellkulturschale zu den Transfektionsansätzen hinzugegeben und mit 1,4 ml Medium vermengt. Pro 6 cm-Zellkulturschale standen damit 2 ml Transfektionsreagenz zur Verfügung. Im Brutschrank wurde 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und danach mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺-haltig) gewaschen. Anschließend wurde den transfizierten Zellen frisches Medium zugegeben und dadurch das Transfektionsreagenz entfernt. Am nächsten Tag erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Nach weiteren zwei bis drei Tagen in Kultur erfolgten die Stimulationsversuche. Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben wurden die Zellen zur Proteingewinnung lysiert.

2.2.5.2 siRNA

Für den *knockdown* der murinen MK2 (Accession Number NM 008551) wurde ein 10 µM Mix aus drei verschiedenen siRNAs verwendet, die mit der siMAX Design Software entwickelt wurden (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) und im Folgenden aufgeführt sind.

Tabelle 2: Basensequenz der siRNA gegen die murine MK2 und MK3 mRNA**siRNA, Basensequenz**

siR-mMK2-#1	5'-AA AGA GAG GCG UCA GAG AUC A UG-3'
siR-mMK2-#2	5'-AA GUA UCA GAA GAA GUG AAG A UG-3'
siR-mMK2-#3	5'-AA GCC UGA GAA CCU CUU AUA U-3'
siR-mMK2-#4	5'-AGAUGUCUUGACUCUGUCCUU-3'
siR-mMK2-#5	5'-UGCCUAGGUAGCUUGUCUAUU-3'
siR-mMK2-#6	5'-AGGCUGAGGCUUAUCCACAUU-3'

Als Kontroll-siRNA wurde eine GFP-spezifische siRNA verwendet, die keine Zielsequenz in endogener mRNA besitzt.

Kontrollsequenz GFP

siR-GFP-1	5'-AGCAGAAGAACGGCAUCAA-3'
-----------	---------------------------

Die Endkonzentration der siRNA in der Probe während der Inkubation mit dem Transfektionsansatz ist 25 nM.

Für den *knockdown* der murinen MK3 (Accession Number NM 178907) wurde ein 10 µM Mix aus drei verschiedenen siRNAs (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) verwendet:

siRNA, Basensequenz

siR-mMK3-1 5'- AAAAC CUA CUC UAU ACA UCC AAG -3'

siR-mMK3-2 5'- GAGGA UGC CAA GCA GCU AAU CCG -3'

siR-mMK3-3 5'- AACCA UCC UUG GAU CAA UCA AUC -3'

Als Kontroll-siRNA wurde eine GFP-spezifische siRNA verwendet, die keine Zielsequenz in endogener mRNA besitzt.

Kontrollsequenz GFP

siR-GFP-1 5'-AGCAGAAGAACGGCAUCA-3'

Die Endkonzentration der siRNA in der Probe während der Inkubation mit dem Transfektionsansatz ist 25 nM.

2.2.5.3 Aufbau des p3XFLAG Plasmid

Für die Co-Transfektion der MK2 wurde ein p3XFLAG-CMV-7.1 Plasmid (Sigma-Aldrich, München, Catalog Number E7533) verwendet, in dem sich die vollständige in cDNA umgeschriebene murine MK2 mRNA Sequenz befindet. Nach Co-Transfektion dieses Konstruktes wird in der Zelle eine FLAG-markierte MK2 exprimiert. Dieses Plasmid wurde in der Arbeitsgruppe hergestellt.

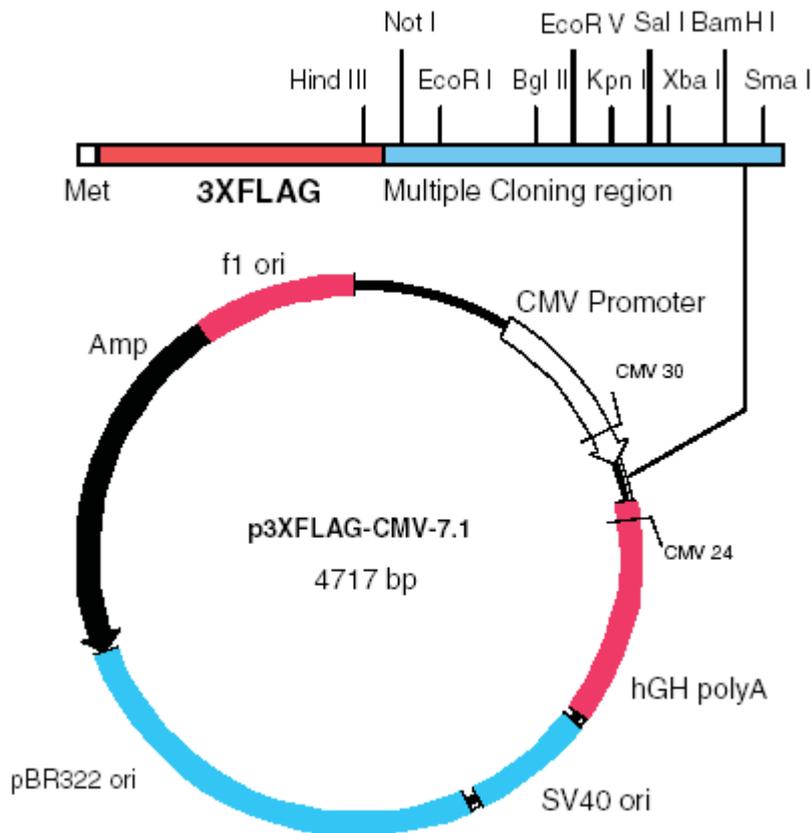


Abbildung 1: Karte des p3XFLAG-MK2-Konstruktes

Plasmid Name: p3XFLAG-CMV-7.1-, No: 287, mMK2 Δ ATG mRNA (Klon A1)

Plasmid History:

a) Insert: murine MK2 mRNA (cDNA) sequence w/o ATG

b) Vector: p3XFLAG-CMV-7.1 (Sigma)

Einklonierung der MK2 Δ ATG cDNA (2.565 bp) über die Schnittstellen NotI (BstXI, EcoRI) und SalI (EcoRI, BstXI, SpeI, SmaI). Vektor von Fa. Sigma (Kat.Nr.: E4026) mit Einbausequenz der murinen MK2 ohne Startcodon (Acc.Nr.: NM_008551). Bisher unveröffentlicht von Prof. Johannes Bode und Dr. Christian Ehling zur Verfügung gestellt.

Für die Amplifikation der MK2 mRNA-Sequenz wurde zunächst aus murinen Makrophagen die mRNA isoliert und in doppelsträngige cDNA umgeschrieben, die dann als *Template* für eine Polymerasekettenreaktion (PCR) diente. Für diese PCR wurden Oligonucleotide verwendet, die am Transkriptionsstart (*Forward-Primer*) sowie am Poly-A-Abschnitt (*Reverse-Primer*) am 3'-Ende der MK2-mRNA-Sequenz bei einer Anlagerungstemperatur von 58 °C hybridisieren. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind 5'-CGC GAG TCG CCG GGC ACC AT-3' (*Forward*) sowie 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAA CTA TTA AAT TTG TTT AG-3'. Das daraus folgende PCR-Produkt mit einer Länge von 2583 bp wurde in einen modifizierten pCR2.1-TOPO Vektor (Fa. Invitrogen) ligiert, der zusätzlich zu

der vom Hersteller angegebenen Sequenz die Restriktionsstellen *SalI* und *SmaI* in der *Multiple Cloning Site* enthielt. Anschließend wurde die MK2-Sequenz über die Restriktionsenzyme *NotI* und *SalI* in den p3XFLAG-CMV-7.1 Vektor (Fa. Sigma) umkloniert. Das Start-Codon ATG wurde mittels Mutations-PCR (Mutagenesis Kit QuickChange II Site-Directed, Fa. Stratagene) zu AGG mutiert, so dass bei Expression des Plasmides die mit einem Start-Codon beginnende FLAG-Markierung am 5'-Ende vor der MK2-Sequenz mit dieser zusammen transkribiert wird. Die FLAG-Markierung vergrößert das aufgrund dieser Nukleinsäuresequenz exprimierte Protein um 3 kDa.

2.2.6 Densitometrie und Statistische Evaluation

Für die densitometrische Berechnung der Western Blots wurde die Software ImageJ 1.46 (NIH, USA) angewandt. Zur statistischen Signifikanzberechnung wurde die Prism 5.0 Software von GraphPad verwendet. Dafür wurden die Experimente dreimal wiederholt (n=3). Die Signifikanz wurde mittels Zwei-Weg Analyse (Two-Way Anova) zusammen mit dem Bonferroni Test berechnet. Dabei ist $p < 0.05$ als mathematische Größe signifikant. Hierbei bedeuten die Symbole in den Grafiken: *) $p < 0,05$; **) $p < 0,01$; ***) $p < 0,001$; ****) $p < 0,0001$.

3. Ergebnisse

3.1 Regulation der LPS induzierten STAT3 Aktivierung durch MK2 und MK3

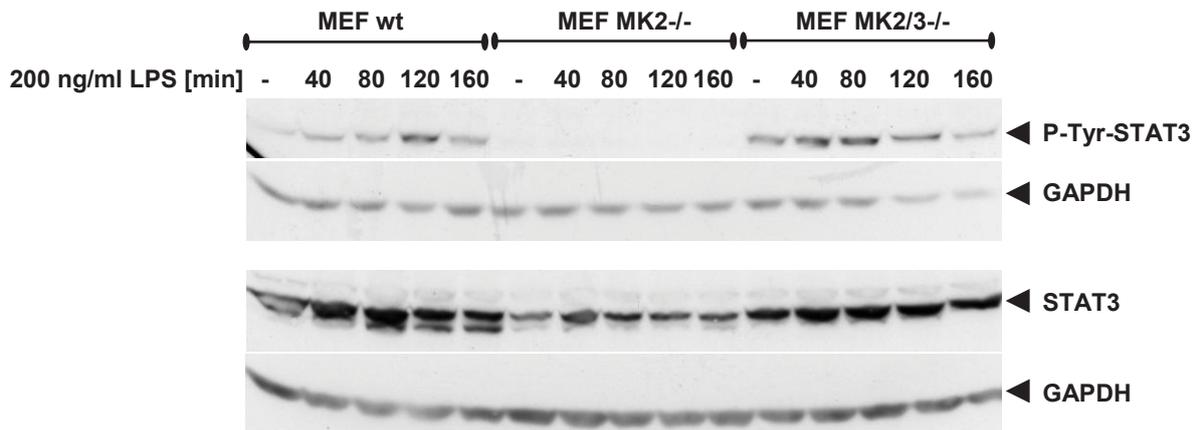
LPS induziert in Makrophagen während der inflammatorischen Antwort eine verzögert einsetzende, anhaltende STAT3-Aktivierung[2, 8, 12, 59, 60, 62, 125]. Die Bedeutung von STAT3 liegt im Kontext der Entzündungsantwort auf LPS u.a. in der Herunterregulation des Entzündungsgeschehens[46, 60]. Eine selektive Deletion des STAT3-Gens in Makrophagen bewirkt im Tiermodell eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der LPS-induzierten Entzündungsreaktion, welche überschießend mit einer deutlich gesteigerten Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1, IFN- γ und IL-6 einhergeht[6, 60].

Vorarbeiten konnten in diesem Zusammenhang belegen, dass die LPS-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 in Makrophagen indirekt durch die MAP-Kinasen MK2 und MK3 reguliert wird[8]. Neben Makrophagen als immunkompetente Zellen sind auch Fibroblasten also Bindegewebszellen in die Entzündungsantwort einbezogen[101, 103]. Eine vorrangige Fragestellung dieser Arbeit war, inwieweit neben Makrophagen auch Fibroblasten (murine embryonale Fibroblasten, MEF) auf die Stimulation mit einer Aktivierung von STAT3 reagieren und inwieweit die für den Makrophagen ausgearbeiteten Mechanismen auf Fibroblasten übertragbar sind. Hierfür wurde zunächst überprüft, ob LPS auch in Fibroblasten eine Aktivierung von STAT3 hervorruft und wenn, mit welcher Kinetik. Es sollte dabei auch geklärt werden, ob die STAT3 Phosphorylierung unter LPS gegenüber der Kontrolle signifikant zunimmt.

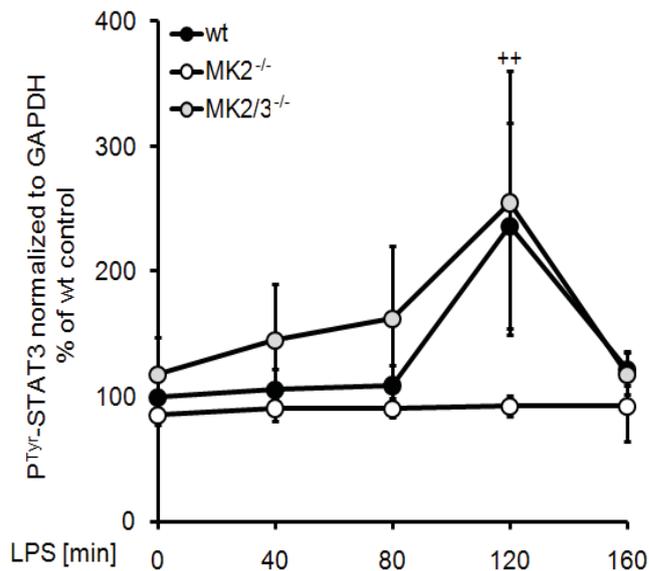
Hierzu wurden Stimulationszeitreihen durchgeführt und die Aktivierung von STAT3 über den Nachweis der aktivierenden Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 im Western Blot bestimmt. Dabei ließ sich in Fibroblasten (MEF) eine LPS induzierte STAT3 Aktivierung nachweisen, die ähnlich wie es für Makrophagen bereits beschrieben ist, schleichend einsetzt und etwa 80 bis 120 Minuten nach LPS-Gabe ihr Maximum erreicht (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2). Übereinstimmend mit den bereits für Makrophagen beschriebenen Befunden führt die Deletion des MK2 Gens in MEF-Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen zu einer nahezu vollständigen Unterbrechung der LPS-induzierten STAT3 Aktivierung. Wie in Makrophagen auch führt die zusätzliche Deletion des MK3 Gens zu einer Wiederherstellung des STAT3 Signals, wobei dieses bereits basal verstärkt erscheint und eine veränderte Kinetik aufweist. Die Proteinexpression von STAT3 selbst wirkt in den MK2 defizienten Zellen leicht

schwächer als in den beiden anderen Zellpopulationen (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2), welche sich aber in der Bedeutung der Mittelwerte in der Densitometrie nicht von den anderen Zelltypen unterscheidet, so dass es im Hinblick auf die Expression von STAT3 Gesamtprotein auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen gibt.

A



B



C

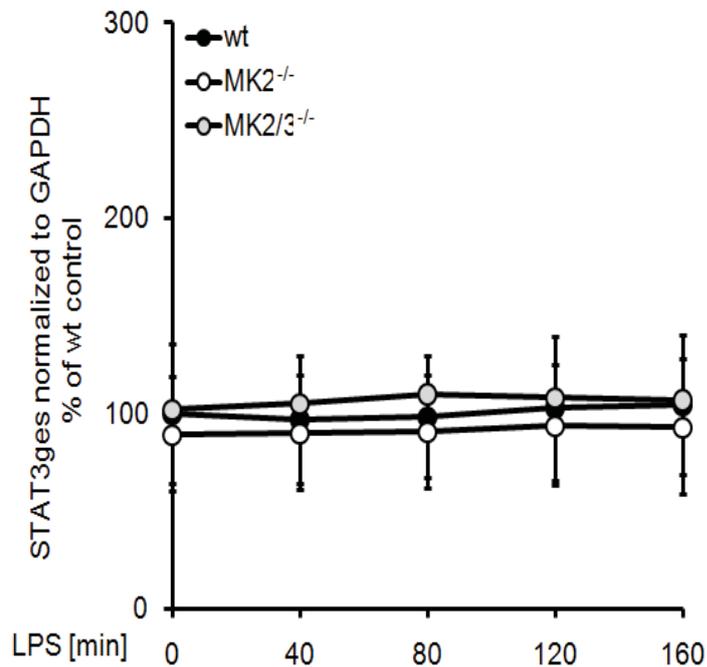


Abbildung 2: MEF-Zellen von Wildtyp, MK2^{-/-} und MK2^{-/-}MK3^{-/-} Tieren wurden mit 200 ng/ml LPS behandelt. Die Zellyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zellysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für Phospho-Tyrosin705-STAT3 (Cell Signaling, Boston MA) und STAT3 (Cell Signaling, Boston MA) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Biodesign International, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000 (A). Anschließend wurden die detektierten Signale densitometrisch vermessen und graphisch dargestellt (B, C). Die Signifikanz wurde mittels Zwei-Weg Analyse (Two-Way Anova) zusammen mit dem Bonferroni Test berechnet. Dabei ist $p < 0.05$ signifikant.

Zusammenfassend ist wie in Makrophagen auch in Fibroblasten die Verfügbarkeit der MK2 essentiell für die LPS induzierte STAT3-Aktivierung. Ebenso führt wie in Makrophagen die zusätzliche Deletion des MK3 Gens zu einer Wiederherstellung des STAT3 Signals in Fibroblasten, welches jedoch eine etwas veränderte Kinetik aufweist (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2 A/B). Auch ließ sich im Beobachtungszeitraum keine relevante Zunahme der Menge an STAT3 Gesamtprotein feststellen (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2 C).

3.2 Rolle von MK2 und MK3 für das IFN- β aktivierte STAT3-Signal

Die vorangehend ausgeführten Befunde belegen, dass es wie in Makrophagen auch in Fibroblasten zu einer anhaltenden Aktivierung von STAT3 in Reaktion auf Stimulation mit LPS kommt. In Makrophagen ist diese im Endeffekt durch die über Typ I Interferone und Aktivierung des Typ I Interferonrezeptor (IFNAR)1 vermittelte Induktion der Produktion von IL-10 bedingt. Allerdings induzieren auch Typ I Interferone in Makrophagen die Aktivierung von STAT3. Im Gegensatz zu der durch IL-10 bedingten STAT3-Aktivierung ist diese jedoch transient und nicht über mehrere Stunden anhaltend. Zusammenfassend ist hierbei wichtig, dass in Makrophagen die anhaltende Aktivierung von STAT3 durch IL-10 vermittelt wird, während IFN- β nur ein transientes Signal hervorruft[2, 8]. Es sollte daher zunächst geklärt werden, ob IFN- β in den verwendeten Maus-embryonischen Fibroblasten (MEF) zu einer Aktivierung von STAT3 führt und inwieweit diese durch das Fehlen von MK2 bzw. MK3 beeinflusst wird. Wie in Abbildung 3 dargestellt kommt es sowohl in MEF Zellen die von Wildtyp Tieren abstammen wie auch in MK2^{-/-} und MK2/3^{-/-}MEF-Zellen nach Stimulation mit IFN- β zu einer Aktivierung von STAT3, die bereits nach 5 minütiger Stimulation detektierbar ist und nach 20 bis 40 Minuten ihr Maximum erreicht. Im untersuchten Zeitraum lassen sich keine signifikanten Differenzen zwischen Wildtyp, MK2^{-/-} und MK2/3^{-/-}MEF-Zellen feststellen, so dass davon auszugehen ist, dass in Fibroblasten weder MK2 noch MK3 einen relevanten Einfluss auf die Aktivierbarkeit von STAT3 durch IFN- β haben.

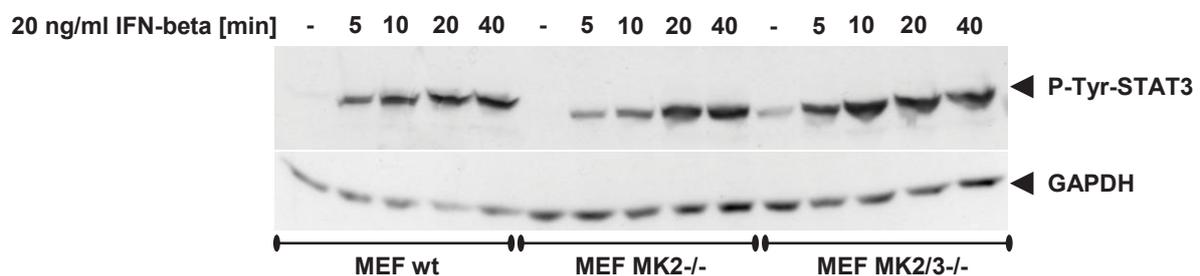


Abbildung 3: Wildtyp, MK2^{-/-} und MK2^{-/-}MK3^{-/-} Fibroblasten (MEF) Zellen wurden mit 20 ng/ml IFN- β stimuliert. Die Zelllyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zelllysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für Phospho-Tyrosin705-STAT3 (Cell Signaling, Boston MA) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Biosdesign International, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000.

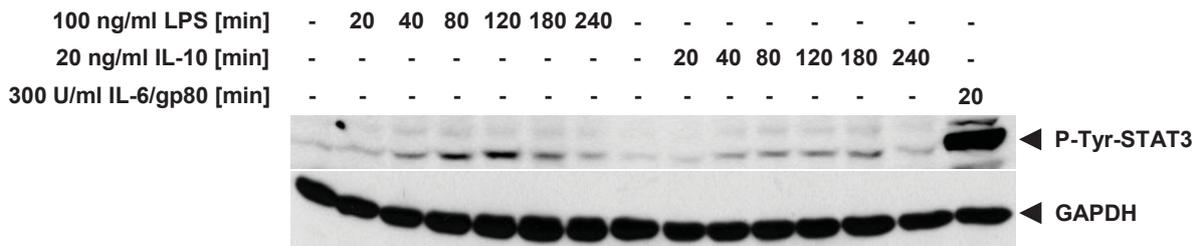
3.3 Bedeutung der IL-10 Expression für die STAT3 Aktivierung durch LPS in Makrophagen und vergleichend in Fibroblasten

Typ I Interferone und die damit verbundene Aktivierung des Typ I Interferon Rezeptors (IFNAR)1 sind im Rahmen der inflammatorischen Antwort auf Stimuli wie LPS in Makrophagen für die Produktion von IL-10 und dadurch hervorgerufene STAT3 Aktivierung verantwortlich (vgl. Ergebnis 3.2, Abb. 3). Die vorangehend ausgeführten Befunde (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2) belegen, dass es auch in Fibroblasten unter Stimulation mit LPS zu einer MK2-abhängigen Aktivierung von STAT3 kommt. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe legen nahe, dass diese in Makrophagen auf die in Abwesenheit der MK2 fehlende Neutralisierung der inhibitorischen Aktivität der MK3 auf die Genexpression von IFN- β zurückzuführen ist und auf die hierdurch eingeschränkte LPS-induzierte Expression von IFN- β wie auch auf die damit ausbleibende IFNAR1-vermittelte Expression von IL-10. In Makrophagen setzt die Stabilisierung des IL-10 Transkriptes ebenfalls die Anwesenheit der MK2 voraus, so dass in MK2 defizienten Makrophagen die LPS-induzierte Expression von IL-10 auf zwei Ebenen gestört ist: i) der fehlenden Expression von IFN- β und ii) der ausbleibenden Stabilisierung des IL-10 Transkriptes. Dementsprechend beruht in Makrophagen die Wiederherstellung der STAT3 Aktivierung nach zusätzlicher Deletion von MK3 nicht auf der Wiederherstellung der LPS-induzierten Expression von IL-10 sondern unter anderem auf der Wiederherstellung der IFN- β Expression[8].

Vor diesem Hintergrund sollte zunächst geprüft werden, ob die Stimulation mit IL-10 in Fibroblasten zu einer Aktivierung von STAT3 führt und diese mit der LPS induzierten Aktivierung von STAT3 in Fibroblasten verglichen werden kann. Wie in Abbildung 4 dargestellt ist IL-10 zwar in der Lage, in Fibroblasten die Aktivierung von STAT3 zu induzieren, diese fällt jedoch vergleichsweise schwach aus und erreicht selbst bei einer Konzentration von 20 ng/ml nicht einmal die Intensität der durch LPS induzierten Aktivierung von STAT3. Darüberhinaus fällt auf, dass die STAT3 Aktivierung nur sehr zögerlich einsetzt, so dass hier möglicherweise auch indirekte bzw. unspezifische Effekte zu diskutieren sind. Als weiterer Vergleich hierzu sollte die LPS bzw. IL-10 induzierte Aktivierung von STAT3 in humanen und murinen Makrophagen untersucht werden, wobei die in Abbildung 5 wiedergegebene Bestimmung der Aktivierung von STAT3 in murinen Makrophagen auf einer Abbildung beruht, die freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Christian Ehling zur Verfügung gestellt wurde.

Die Aktivierung der p38^{MAPK} durch LPS wie auch die Expression von IL-10 sind hierbei wichtige Schlüsselereignisse in der Signalkaskade, die in Makrophagen zur LPS-induzierten Aktivierung von STAT3 führt. Es sollten daher vergleichbare Untersuchungen zur Aktivierung der p38^{MAPK} erfolgen und die Induktion der Expression von IL-10 durch LPS in Fibroblasten in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von MK2 und MK3 untersucht werden.

A



B

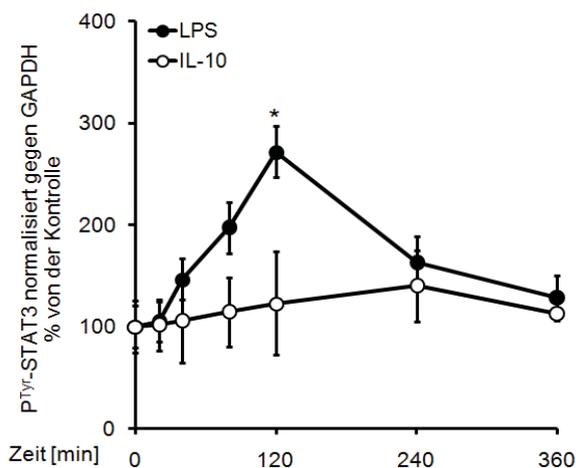
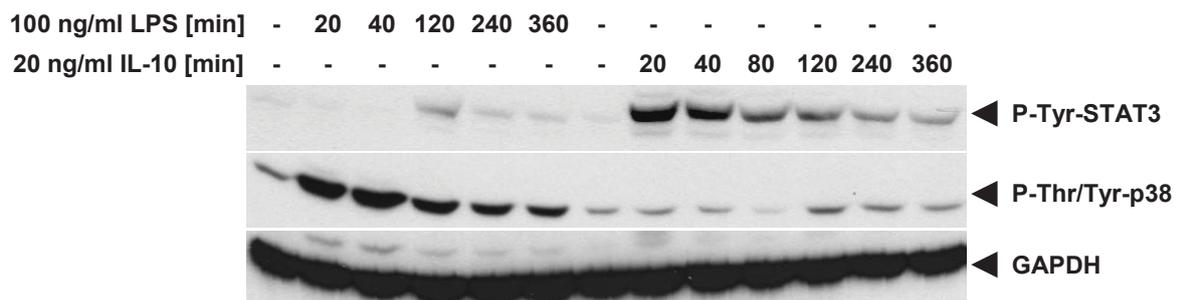


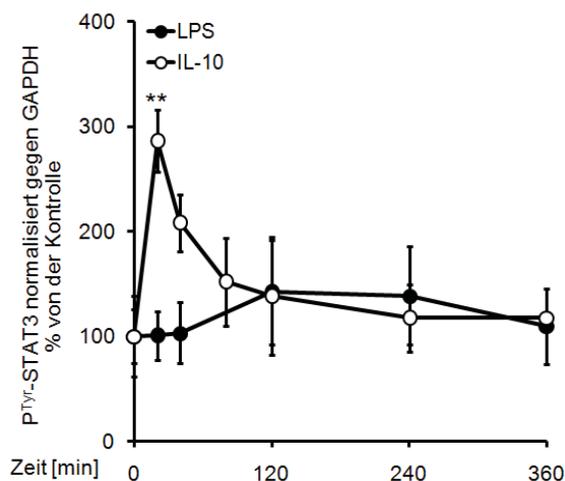
Abbildung 4: Fibroblasten (NIH3T3) vom Wildtyp wurden zum einen mit 100 ng/ml LPS und zum anderen mit 20 ng/ml IL-10 stimuliert. Als Kontrolle für eine detektierbare STAT3 Aktivierung wurden 300 U/ml IL-6/gp80 verwendet. Das Glykoprotein gp80 ist Teil des IL-6-Rezeptorkomplexes, der von Fibroblasten nicht selbst exprimiert wird und daher als rekombinantes Protein zusätzlich ins Medium gegeben wird. Die Zellyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zellysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für Phospho-Tyrosin705-STAT3 (Cell Signaling, Boston MA) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Biodesign International, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000 (A). Anschließend wurden die detektierten Signale densitometrisch vermessen und graphisch dargestellt (B). Die Signifikanz wurde mittels Zwei-Weg Analyse (Two-Way Anova) zusammen mit dem Bonferroni Test berechnet. Dabei ist $p < 0.05$ signifikant. Abbildung 4A wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Christian Ehling zur Verfügung gestellt.

Interessant ist, dass in Makrophagen die LPS induzierte STAT3 Aktivierung deutlich zeitverzögerter als in Fibroblasten erfolgt. Im Gegensatz hierzu ist in Makrophagen bereits 20 Minuten nach IL-10 Stimulation eine STAT3-Phosphorylierung zu erkennen, welche im zeitlichen Verlauf abnimmt (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 5). Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist eine p38-Aktivierung[19] Voraussetzung für die nachgeschaltete Aktivierung von MK2 und MK3 und die Expression von IL-10[2, 8]. Mit IL-10 als Stimulus konnte in Makrophagen keine p38-Aktivierung nachgewiesen werden. Mit LPS als Stimulus konnte wie in Abbildung 5 dargestellt in Makrophagen bereits nach 20 Minuten eine signifikante Aktivierung der p38 nachgewiesen werden, welche im zeitlichen Verlauf wieder abnimmt. Nach 120 min und damit im Gegensatz zu IL-10 deutlich verzögert ist eine STAT3-Aktivierung nach LPS in Makrophagen zu erkennen. Dieses STAT3 Signal ist im Vergleich zur direkten Stimulation mit IL-10 in Makrophagen signifikant schwächer. Anders als in Fibroblasten ist IL-10 damit in Makrophagen in der Lage, eine prompte und starke Aktivierung von STAT3 zu induzieren.

A



B



C

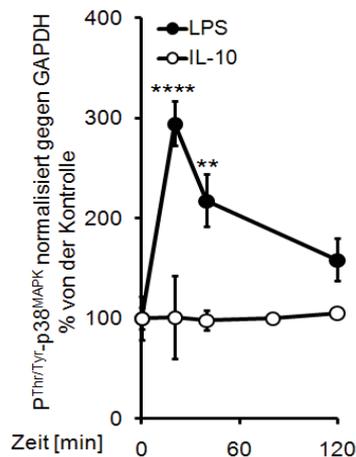
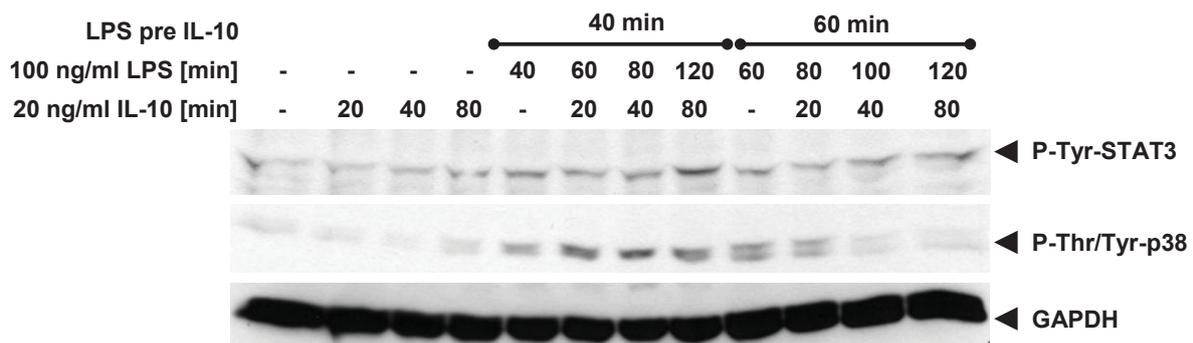


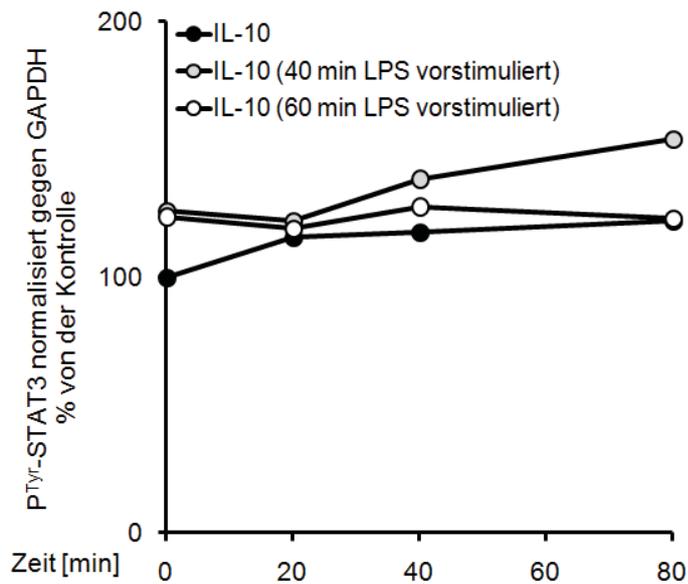
Abbildung 5: Primäre humane Makrophagen (PBDM) wurden zum einen mit 100 ng/ml LPS und zum anderen mit 20 ng/ml IL-10 zu den oben aufgeführten Zeitpunkten stimuliert. Die Zellen wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Zellyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zelllysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für Phospho-Tyrosin705-STAT3 (Cell Signaling, Boston MA) und Phospho-Threonin/Tyrosin-p38 (Cell Signaling) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Biodesign International, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000 (A). Anschließend wurden die detektierten Signale densitometrisch vermessen und graphisch dargestellt (B, C). Die Signifikanz wurde mittels Zwei-Weg Analyse (Two-Way Anova) zusammen mit dem Bonferroni Test berechnet. Dabei ist $p < 0.05$ signifikant.

Die vorangehend ausgeführten Befunde legen nahe, dass anders als in Makrophagen IL-10 in den untersuchten Fibroblasten-Zelllinien, wenn überhaupt nur ein sehr schwacher Aktivator von STAT3 ist. In einem weiteren Experiment sollte daher überprüft werden, ob eine vorangehende Stimulation mit LPS die Sensibilität von Fibroblasten gegenüber IL-10 verändert. Wie in Abbildung 6 exemplarisch dargestellt, führt jedoch eine Vorstimulation mit LPS in Fibroblasten weder nach 40 Minuten noch nach 60 Minuten zu einer relevanten Änderung der Aktivierbarkeit von STAT3 durch IL-10.

A



B



C

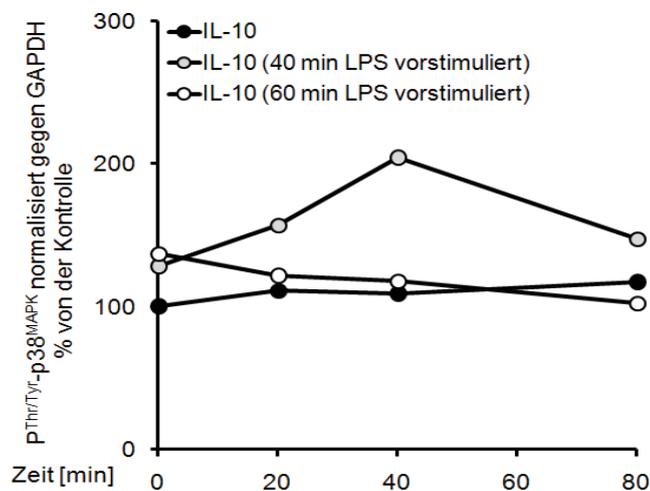


Abbildung 6: Fibroblasten (NIH3T3) wurden mit 100 ng/ml LPS 40 Minuten und 60 Minuten vorinkubiert. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit (LPS pre IL-10) erfolgte die Stimulation mit 20 ng/ml IL-10 zu den oben aufgeführten Zeitpunkten. Die Zellyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zelllysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für Phospho-Tyrosin705-STAT3 (Cell Signaling, Boston MA) und Phospho-Threonin/Tyrosin-p38 (Fa. Cell Signaling) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Biosdesign International, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000 (A). Anschließend wurden die detektierten Signale densitometrisch vermessen und graphisch dargestellt (B), (n=1, vorläufiger Befund).

Die Responsivität der Fibroblasten gegenüber IL-10 wird somit auch durch eine Vorinkubation mit LPS nicht entscheidend verstärkt. Die Phosphorylierung der p38 belegt, dass die Fibroblasten in diesem experimentellen Ansatz aber generell responsiv gegenüber LPS sind. Schließlich sollte überprüft werden, ob Fibroblasten in Reaktion auf LPS überhaupt mit einer IL-10 Produktion reagieren. Hierzu wurde die Induzierbarkeit der IL-10 mRNA durch LPS in Wildtyp, MK2^{-/-} und MK2/3^{-/-} Fibroblasten untersucht.

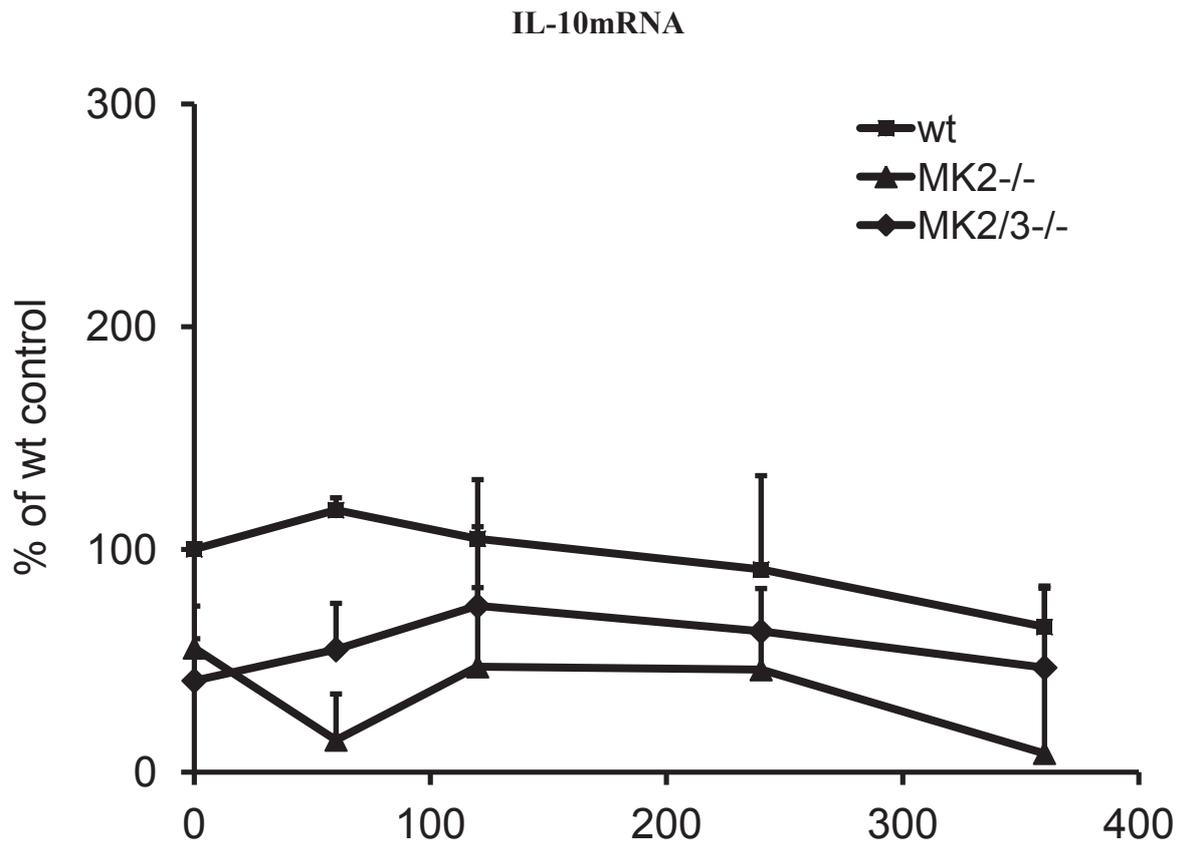


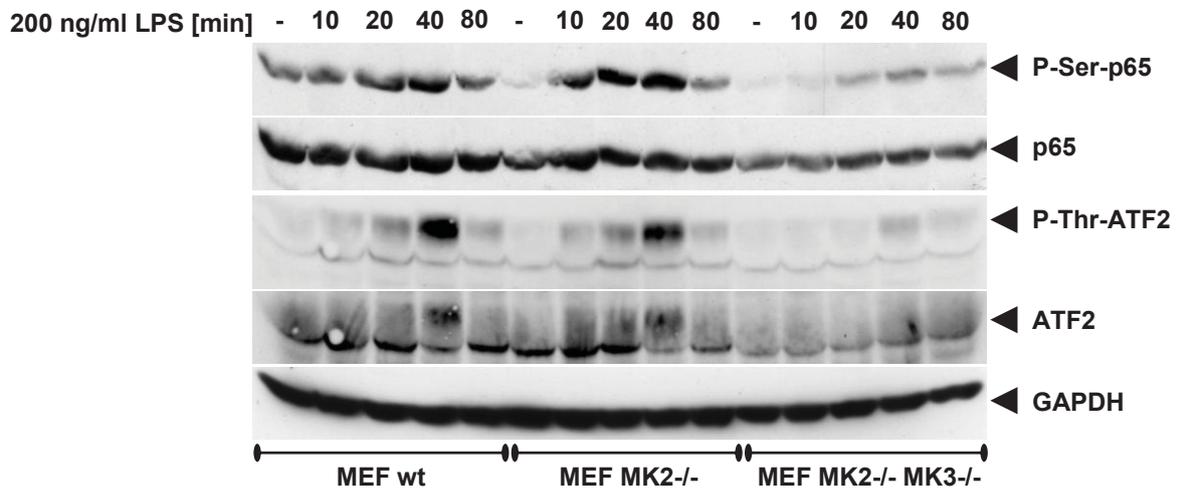
Abbildung 7: Wildtypische, MK2- und MK2/MK3-defiziente Fibroblasten (MEF) wurden zu den aufgeführten Zeitpunkten in Minuten (siehe X-Achse) mit 100 ng/ml LPS behandelt. Anschließend wurde mittels Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Light Cycler 7500, Applied Biosystems) und der Auswertung nach Δ CT-Methode die LPS induzierte relative Syntheserate der IL-10-mRNA bestimmt. Hierbei ist die unbehandelte wildtypische Probe 100% und gilt als bezugnehmende Größe (Y-Achse). Angegeben sind die Mittelwerte aus drei verschiedenen Experimenten plus Standardfehler.

Wie in Abbildung 7 dargestellt kommt es anders als in Makrophagen in keiner der drei untersuchten Zellkulturen unter Stimulation mit LPS zu einer signifikanten Heraufregulation der Expression von IL-10 mRNA.

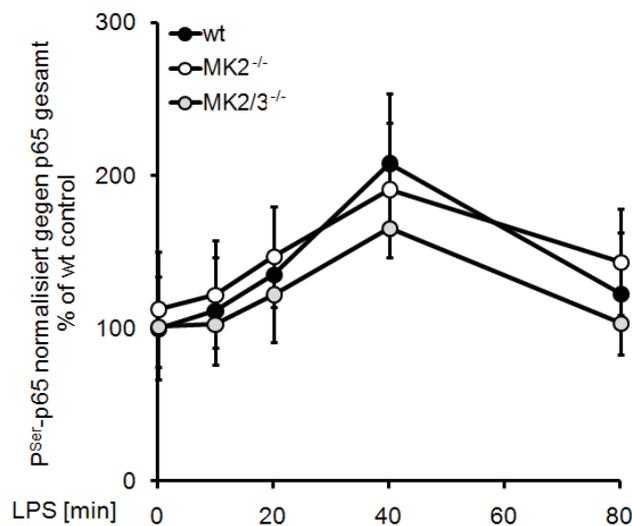
3.4 LPS-induzierte NFκB/p65 und ATF2 Signalgebung in Fibroblasten

Um den o.g. Makrophagen typischen Mechanismus dem Fibroblasten-Modell gegenüberzustellen, wurde der in Abbildung 8 dargestellte Versuchsaufbau gewählt, wobei die Phosphorylierung der NFκB-Untereinheit p65 als Merkmal der NFκB-Aktivierung in Fibroblasten hierbei charakterisiert wurde. Dem folgend wurden LPS Stimmulationsreihen an MEF Zellen vom Wildtyp, MK2^{-/-} und MK2/3^{-/-} durchgeführt mit dem Ziel, die Aktivierungskinetik von NFκB/p65 unter LPS zu beschreiben.

A



B



C

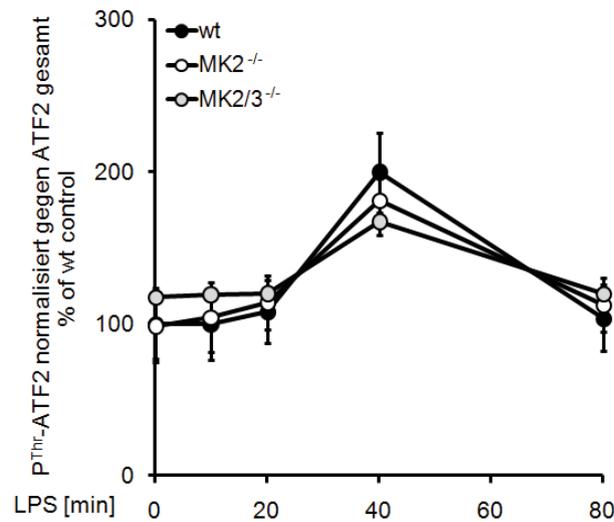
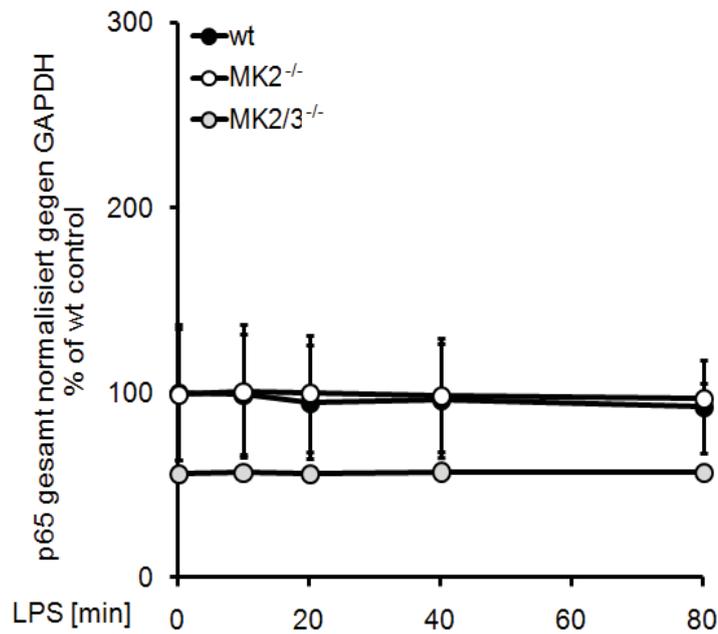


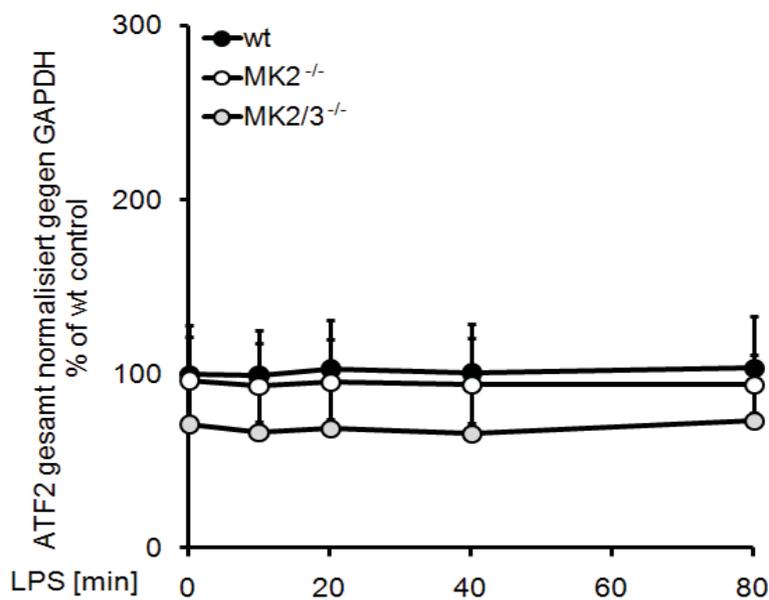
Abbildung 8: Wildtypische, MK2^{-/-} und MK2^{-/-}MK3^{-/-} MEF-Zellen wurden an den oben aufgeführten Zeitpunkten mit 200 ng/ml LPS stimuliert. Die Zellyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zelllysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für Phospho-Serin536-p65 (Cell Signaling, Boston MA), p65 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), Phospho-Threonin71-ATF2 (Cell Signaling, Boston MA) und ATF2 (Cell Signaling, Boston MA) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Biodesign International, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000 (A). Anschließend wurden die detektierten Signale densitometrisch vermessen und graphisch dargestellt (B, C, D, E). Die Signifikanz wurde mittels Zwei-Weg Analyse (Two-Way Anova) zusammen mit dem Bonferroni Test berechnet. Dabei ist $p < 0.05$ signifikant.

Die vorangehend ausgeführten Befunde belegen, dass LPS in Fibroblasten eine Aktivierung von STAT3 induziert, die durch Deletion des MK2 Gens unterbunden werden kann, während die zusätzliche Deletion des MK3 Gens zu einer Wiederherstellung der Aktivierbarkeit von STAT3 durch LPS in Fibroblasten führt. Anders als für Makrophagen beschrieben, ist diese MK2 abhängige Aktivierung von STAT3 jedoch nicht auf die LPS induzierte Expression von IL-10 zurückzuführen. Es sollte nun in weiteren Experimenten geklärt werden, ob andere durch LPS induzierte Signalketten in Fibroblasten durch Deletion des MK2 Gens ebenfalls gestört werden. Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob die LPS induzierte Expression von IFN- β in Fibroblasten ebenfalls (wie in Makrophagen) MK2 abhängig erfolgt. Hierzu wurde zunächst die LPS induzierte Aktivierung von NF κ B und ATF2 in Wildtyp, MK2^{-/-} und MK2/3^{-/-} Fibroblasten untersucht und anschließend geprüft, ob die LPS induzierte Expression der IFN- β mRNA in Fibroblasten MK2 abhängig erfolgt.

D



E



Wie in Abbildung 8 und 9 dargestellt, ist weder die LPS induzierte Phosphorylierung von p65 oder von ATF2 noch die Expression des IFN- β Transkriptes in Fibroblasten MK2 oder MK2/3 abhängig. Auch ergeben sich im Hinblick auf die zeitliche Kinetik der Phosphorylierung von p65 (vgl. Ergebnis 3.4, Abb. 8 B), von ATF2 (vgl. Ergebnis 3.4, Abb. 8 C) und der Expression des IFN- β Transkriptes (vgl. Ergebnis 3.5, Abb. 9) keine Differenzen

zwischen den drei Zelllinien. Entsprechend ist davon auszugehen, dass in Fibroblasten sowohl die aktivierende Phosphorylierung von ATF2 als auch die Phosphorylierung von p65 MK2 unabhängig erfolgt. Entsprechend erfolgt auch die Expression des IFN- β Transkriptes in Fibroblasten unabhängig von MK2 und MK3.

3.5 Untersuchung des Einflusses von MK2/3 auf die LPS-induzierte Interferon- β mRNA Expression in Fibroblasten (MEF)

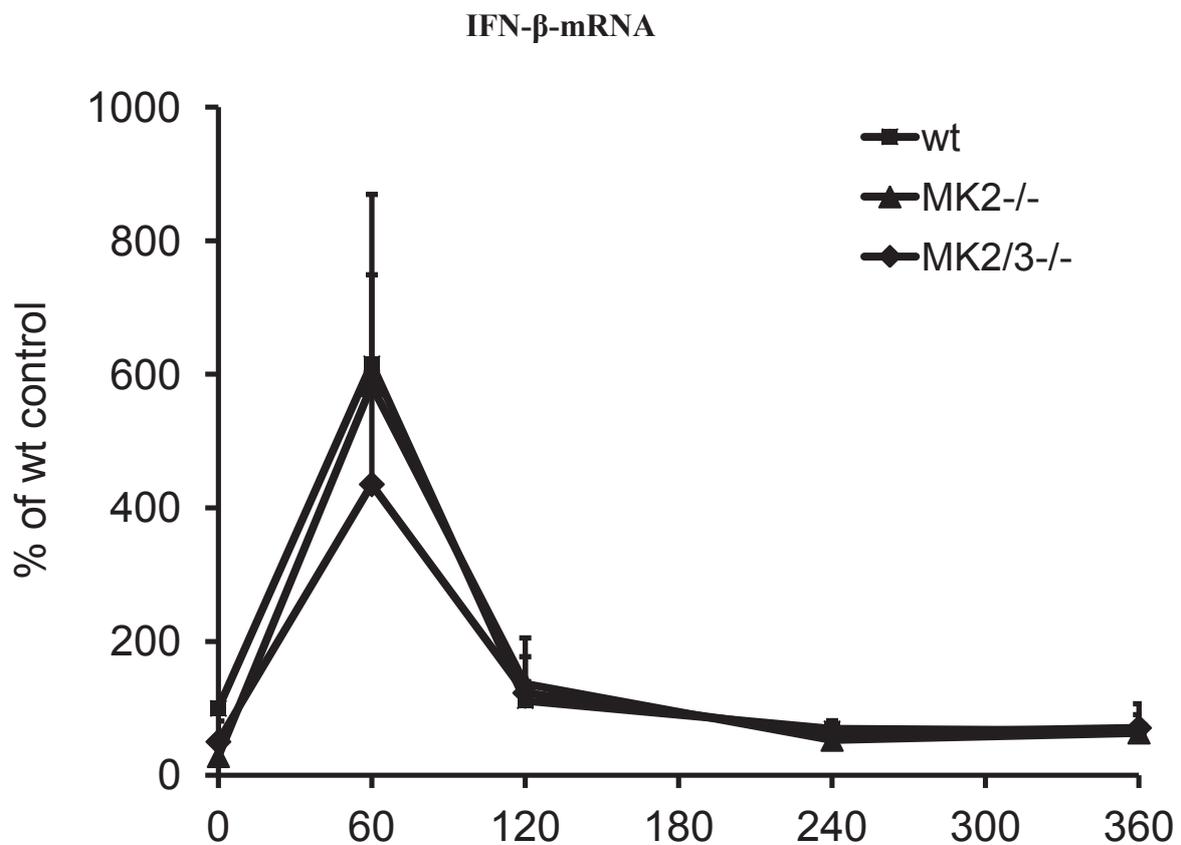


Abbildung 9: Wildtypische, MK2- und MK2/MK3-defiziente Fibroblasten (MEF) wurden zu den aufgeführten Zeitpunkten in Minuten (siehe X-Achse) mit 100 ng/ml LPS behandelt. Anschließend wurde mittels Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Light Cycler 7500, Applied Biosystems) und der Auswertung nach Δ CT-Methode die LPS induzierte relative Syntheserate der IFN- β -mRNA bestimmt. Als *house-keeping gene* diente SDHA zur Verrechnung. Hierbei ist die unbehandelte wildtypische Probe 100% und gilt als bezugnehmende Größe (Y-Achse). Angegeben sind die Mittelwerte aus drei verschiedenen Experimenten plus Standardfehler.

Im folgenden sind die Ergebnisse 3.1 bis 3.5 aus den jeweiligen *knockout* Zellpopulations-Experimenten zusammengefasst: In Fibroblasten (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2) wie in

Makrophagen kommt es zur verzögerten STAT3 Aktivierung in Reaktion auf LPS[8]. Die LPS induzierte STAT3 Aktivierung ist wie in Makrophagen auch in Fibroblasten MK2 abhängig und kann durch kombinierten K.O. von MK3 wieder hergestellt werden (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2). Die LPS induzierte IFN- β Expression ist in Fibroblasten im Gegensatz zu Makrophagen[8] nicht MK2 abhängig (vgl. Ergebnis 3.2, Abb. 3 und Ergebnis 3.5, Abb. 9). IL-10 induziert in Fibroblasten im Gegensatz zu Makrophagen kaum eine STAT3 Antwort und wird durch Fibroblasten in Reaktion auf LPS anders als in Makrophagen nicht exprimiert (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 4, Abb. 5 und Abb. 7). Bei den ATF2 und p65 Untersuchungen ist in Fibroblasten im Gegensatz zu Makrophagen[8] die Gesamtexpression in MK2/MK3 D.K.O. auf Proteinebene reduziert (vgl. Ergebnis 3.4, Abb. 8 A, D und E). Jedoch gibt es bei der densitometrischen Auftragung der Phosphorylierung ATF2/p65 gegen das Gesamtprotein ATF2/p65 keine Differenzen zwischen den verschiedenen Zelltypen (vgl. Ergebnis 3.4, Abb. 8 B und C). Den eigenen Befunden folgend ist die LPS induzierte ATF2/p65 Aktivierung in Fibroblasten daher im Gegensatz zu Makrophagen[8] MK2 unabhängig (vgl. Ergebnis 3.4, Abb. 8 A, B und C).

3.6 Etablierung von siRNA gegen MK2

In einem vorrangig methodisch orientierten zweiten Teil der Arbeit sollte ergänzend zu den *knockout* Versuchen (vgl. Ergebnis 3.1 bis 3.5) siRNA gegen MK2 und MK3 entwickelt und getestet werden. Hierbei wurden siRNAs entworfen, die gegen unterschiedliche Bereiche der kodierenden und nicht-kodierenden Sequenz der MK2 und daran anknüpfend auch der MK3 gerichtet sind (vgl. Ergebnis 3.6, Abb. 10 sowie Sequenzen im Methodenteil, Tab. 2). Die MK2 als Zielmolekül für siRNA hat als Besonderheit im Western Blot zwei unterschiedlich migrierende Isoformen, welche sich auf der 50 kDa und der 40 kDa Ebene detektieren lassen (vgl. Ergebnis 3.6, Abb. 11). Unklar ist bislang, wie diese Isoformen entstehen. Mit Hilfe der siRNA sollte zunächst geklärt werden, ob es sich bei beiden Banden tatsächlich um die MK2 handelt und ob sich durch die verschiedenen Zielsequenzen die beiden Isoformen differenziell beeinflussen lassen.



Abbildung 10: Darstellung der MK2-mRNA Sequenz von 5' in 3' Richtung. Die kodierende Sequenz (CDS, *coding sequence*) ist grün dargestellt. Der restliche Abschnitt der mRNA zeigt den nicht in Protein übersetzten Bereich = *untranslated region* (UTR), Poly-A Schwanz (AAAAA). Verschiedene siRNAs (#1 bis #6) wurden gegen spezifische Zielsequenzen (s. Abschnitt: Material und Methoden, Tab.2) der MK2 mRNA gerichtet. Dafür wurden siRNAs sowohl für kodierende (#1-3) als auch nicht-kodierende Bereiche (#4-6) der mRNA entwickelt.

Um die Effektstärke der jeweils eingesetzten MK2-siRNA zu quantifizieren, wurden die in Abbildung 10 schematisch dargestellten siRNA zunächst in die Zelle transfiziert. Dabei wurden sechs siRNA verwendet, die jeweils gegen einen bestimmten Abschnitt der kodierenden oder nicht kodierenden Region der MK2-mRNA gerichtet waren. Die mit #1 bis #3 nummerierten siRNAs wurden als Mix (vgl. Ergebnis 3.6, Abb. 11) verwendet und waren gegen mehrere Bereiche der kodierenden Sequenz gerichtet. Zur Kontrolle wurde eine siRNA verwendet, die sich gegen *green fluorescent protein* (GFP)-kodierende Plasmide richtet, die endogen in den MEF-Zellen nicht vorkommen.

Abbildung 11 untermauert die Auswirkungen der jeweils eingesetzten siRNA auf die Gesamtexpression der MK2. Festzustellen ist, dass die Verwendung von siRNA (vgl. MK2 siRNA #1, #2, #3, #5 und #6, Ergebnis 3.6, Abb. 11) gegen einen einzelnen Bereich der MK2 mRNA vergleichbar starke herunter regulierende Effekte hervorruft, was an der verminderten Expression des MK2 Proteins sichtbar wird und beide Isoformen gleichermaßen betrifft (vgl. Ergebnis 3.6, Abb.11). Bei der kombinierten Verwendung von siRNA, die gegen mehrere Bereiche der mRNA von MK2 gerichtet ist (vgl. MK2-siRNA-Mix aus #1, #2 und #3, bzw. #4, #5 und #6, Ergebnis 3.6, Abb. 11), ist die MK2 im Western Blot nicht mehr nachweisbar. Abbildung 11 belegt, dass in den GFP siRNA-Kontrollen beide Isoformen der MK2 grundsätzlich aber detektierbar sind. Methodisch ist daher eine effektive Herunterregulation der MK2 durch siRNA gelungen. Die Frage, ob sich auch die beiden Isoformen der MK2 mit verschiedener siRNA (vgl. Ergebnis 3.6, Abb. 11) jeweils unterschiedlich herunter regulieren lassen, ist zusammenfassend zu verneinen, so dass davon auszugehen ist, dass beide Isoformen durch das gleiche Transkript kodiert werden, welches auch durch die Befunde der MK2^{-/-}-Tiere gestützt wird, in welchen ebenfalls beide Isoformen vollständig fehlen.

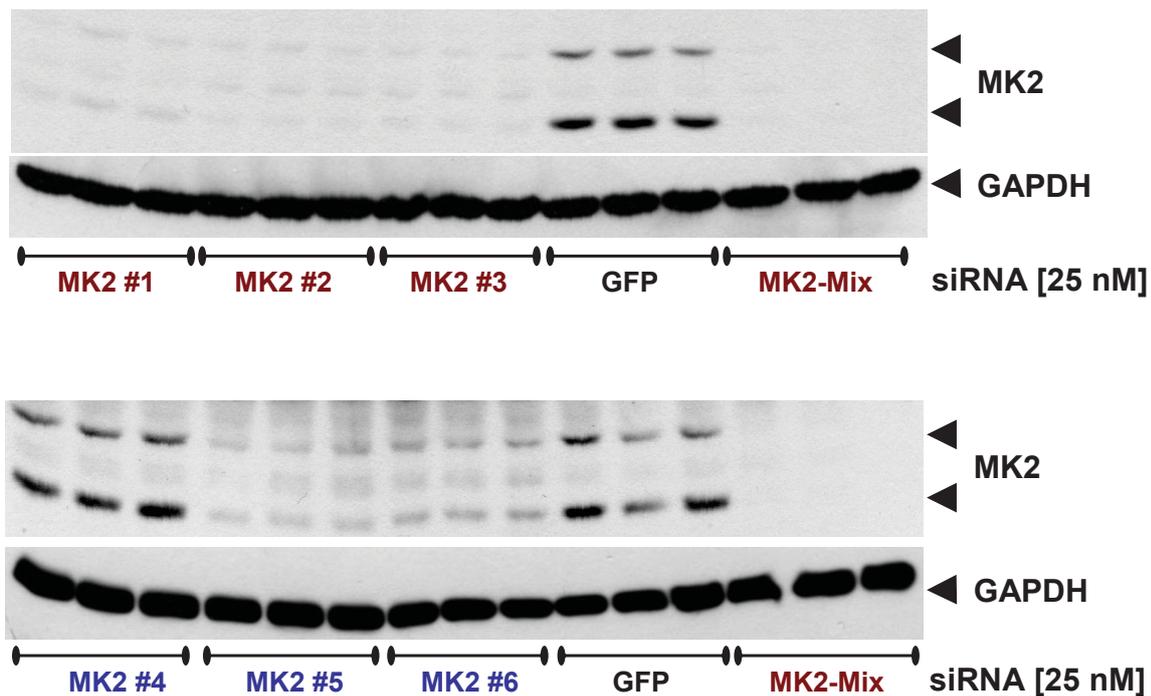


Abbildung 11: MEF Zellen vom Wildtyp wurden mit den oben aufgeführten siRNAs gegen MK2 transfiziert (s. Material und Methoden, Tab. 2). Die Zellyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zellysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für MK2 (Cell Signaling, Boston MA) mit den beiden Isoformen (obere, größere 50 kDa und untere, kleinere 40 kDa Bande der MK2) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Bioscience Resource Project, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000. Abbildung 11 wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Christian Ehling zur Verfügung gestellt.

3.7 Etablierung von siRNA gegen MK3

Im Rahmen weiterer siRNA Transfektionen wurde im Folgenden siRNA gegen MK3 gerichtet (vgl. Material Methoden 2.2.5.2, Tab. 2). Es galt auch hier eine siRNA zu generieren und zu testen, die zu einem suffizienten *knockdown* der MK3 führt. Abbildung 12 veranschaulicht das Ergebnis der Herunterregulation der MK3 in wildtypischen und MK2 defizienten Fibroblasten (MEF). Im Ergebnis ist ersichtlich, dass die Transfektion zur Herunterregulation der MK3 in der MK2 freien Umgebung[19] geführt hat. Im Gegensatz dazu ist die MK3 Gesamtexpression im MK2-*knockout* bezogen auf die GFP Kontrolle unverändert. Hier ist zu erinnern, dass das MK3 Protein in den wildtypischen Fibroblasten im Gegensatz zu den MK2^{-/-} Zellen aufgrund der niedrigen Expression[32, 44] im Western Blot

nach Auftragung von Gesamtzelllysaten ohne MK3-Anreicherung z.B. durch eine Immunpräzipitation nicht detektierbar ist[19, 28].

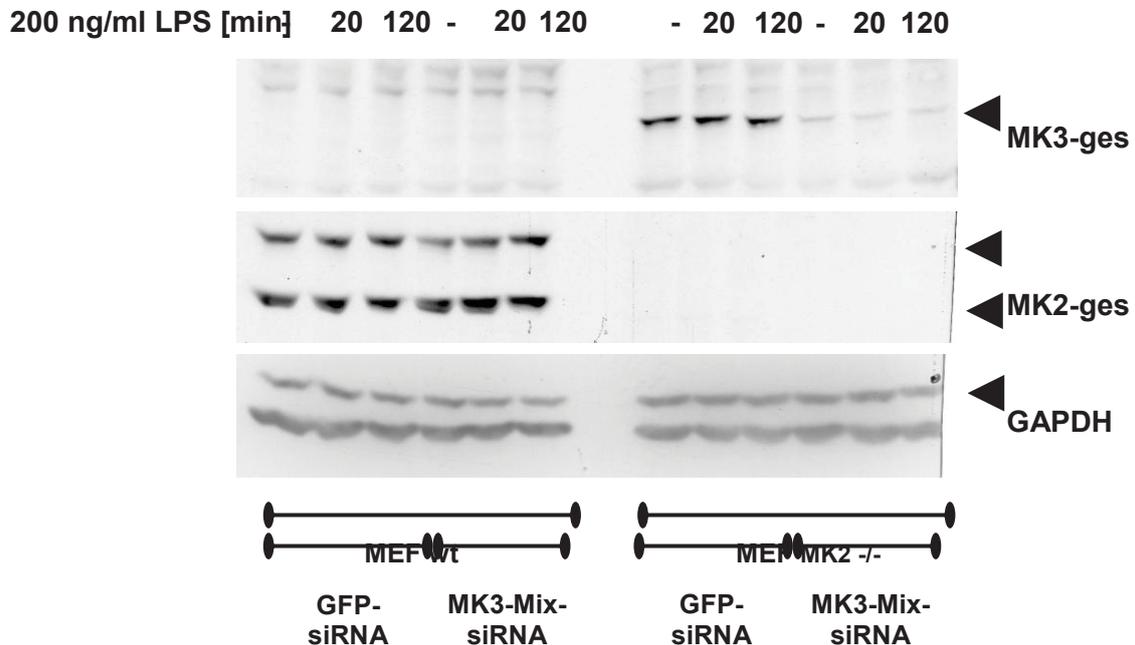


Abbildung 12: MEF Zellen vom Wildtyp und MK2 defiziente Zellen wurden mit siRNA im Mix (#1-3) gerichtet gegen MK3 transfiziert (s. Material und Methoden, Tab. 2). Die eingesetzten MEF Zellen wurden zu den oben aufgeführten Zeitpunkten mit 200 ng/ml LPS stimuliert. Die Zellyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zelllysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für MK2 (Cell signaling, Boston MA) mit den beiden Isoformen und MK3 (Bethyl Laboratories, Montgomery TX) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Bioscience International, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000.

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den aufbauenden Versuchsreihen 3.6 und 3.7 zusammengefasst: Die Methode des siRNA vermittelten *knockdown* von MK2 und MK3 konnte für das Fibroblasten-Zellsystem im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden (vgl. Ergebnis 3.6, Abb. 11 und Ergebnis 3.7, Abb. 12). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei den verwendeten MK2-siRNAs bereits einzelne siRNA-Moleküle, die sowohl im kodierenden als auch im nicht kodierenden Bereich binden (vgl. siRNA #1-3, #5-6), starke herunter regulierende Effekte in Bezug auf beide Isoformen generieren. Die Summe der siRNA im Mix (vgl. siRNA-Mix #1-3 kodierende Sequenz und siRNA-Mix #4-6 nicht kodierende Sequenz) vermindert die MK2 Expression, so dass diese unterhalb der Nachweisgrenze im Western Blot liegt. Ebenso ließ sich die MK3 Gesamtproteinexpression durch geeignete MK3 siRNA im Mix (vgl. Material Methoden 2.2.5.2, Tab. 2) effektiv vermindern (Ergebnis 3.7,

Abb. 12). Die Etablierung einer siRNA gegen MK2 und MK3 konnte somit zusammenfassend erfolgreich durchgeführt werden.

3.8 Etablierung von transfizierter FLAG-markierter MK2

Nachdem in Transfektionsexperimenten (vgl. Ergebnis 3.6 und 3.7) die Etablierung von MK2 und MK3 siRNA effektiv nachgewiesen werden konnte, galt es nun in einem ebenfalls methodisch orientierten Ansatz einen exogenen Faktor durch Lipofektion in die Zelle einzuführen. Im Rahmen dieses Versuchssettings wird methodisch Fremd-cDNA in Fibroblasten eingeschleust (vgl. Material und Methoden 2.2.5.3, Abb. 1), wodurch ein Faktor verstärkt exprimiert werden sollte. Dabei wird Plasmid-DNA in der Zelle unter der Kontrolle eines im Plasmid vorhandenen CMV-Promotors exprimiert[126, 127], wodurch das im Western Blot detektierbare Protein entsteht. Hier ging es vorrangig um die Frage, ob die große Variante der MK2 (vgl. Ergebnis 3.8, Abb. 14) durch dasselbe Transkript verglichen mit der unteren Bande kodiert wird. Auf Grundlage dessen wurde ein Konstrukt, welches die in cDNA umgeschriebene mRNA-Sequenz des kodierenden Bereichs sowie die 3'-untranslatierte Region der MK2 mit der vollständigen Information für die Translation sowie die in der 3'-UTR potenziell vorhandenen regulatorischen Elemente trägt, in den zellulären Apparat transfiziert[128].



Abbildung 13: Schematische Darstellung der vollständigen murinen MK2-mRNA-Sequenz (ohne ATG Startcodon) mit 3xFLAG Markierung

Die FLAG-Markierung erlaubt bei der Detektion im Western Blot eine Unterscheidung zwischen endogener und exogener MK2 mittels FLAG-spezifischem Antikörper. Zur genauen Verfahrensweise sei auf die Kapitel 2.2.5.1 und 2.2.5.3 Material und Methoden hingewiesen. Hierbei sollte neben der Transfektion und Expression zusätzlich geprüft werden, ob sich beide für die MK2 charakteristischen Isoformen durch die Transfektion der exogen zugeführten vollständigen MK2 mRNA Sequenz herstellen lassen. Außerdem galt es nachzuweisen, auf

welcher Ebene im Western Blot ein entsprechendes Korrelat für das FLAG-MK2 Konstrukt zu finden ist.

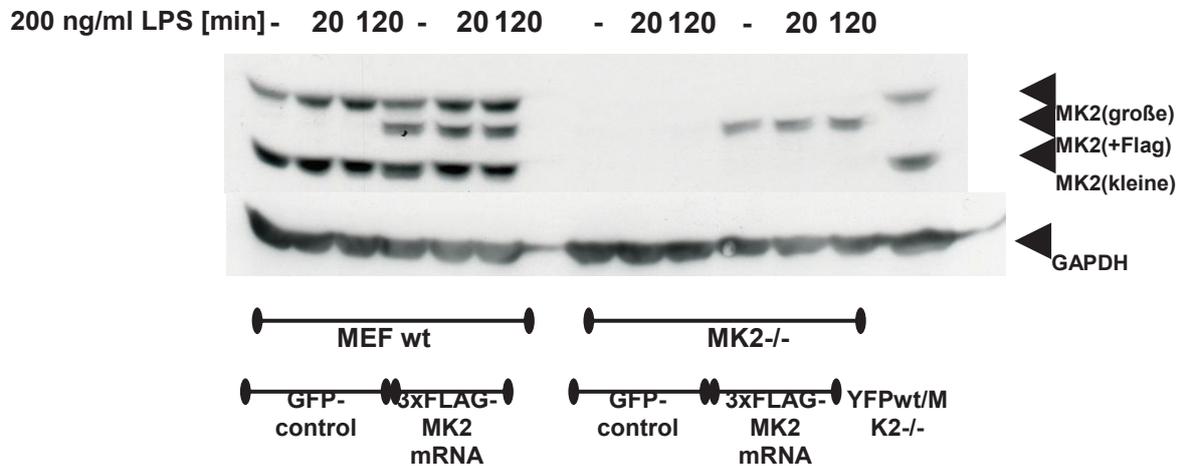


Abbildung 14: In MEF Zellen vom Wildtyp und MK2-defiziente Zellen wurde das 3XFLAG Konstrukt mit der nahezu vollständigen mRNA der MK2 transfiziert. Die eingesetzten MEF Zellen wurden zu den oben aufgeführten Zeitpunkten mit 200 ng/ml LPS stimuliert. Die Zellyse, die elektrophoretische Auftrennung der Zellysate sowie der anschließende Western Blot erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Es erfolgte die Detektion der dargestellten Signale mit Antikörpern spezifisch für MK2 (Cell Signaling, Boston MA) mit den beiden Isoformen und FLAG (M2) (Sigma-Aldrich, Darmstadt) in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 und GAPDH (Biosdesign International, Saco ME) in einer Verdünnung von 1:20000.

Wie Abbildung 14 belegt, konnte das MK2 FLAG Konstrukt effektiv in die Zellen transfiziert werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung ist das FLAG-getaggte MK2 Protein zwischen den beiden Isoformen der MK2 im Western Blot detektierbar. Es ist naheliegend, dass es sich dabei um die untere, kleinere Isoform der MK2 handelt, da die FLAG-Markierung das MK2-Protein nachweislich um 3 kDa vergrößert.

Zusammenfassend wurde im Rahmen der Überexpressionsexperimente die Etablierung von transfizierter FLAG-markierter MK2 in Fibroblasten im Rahmen der Arbeit nachgewiesen (vgl. Ergebnis 3.8, Abb. 14).

4. Diskussion

4.1 Diskussion experimenteller Teil

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung der LPS induzierten STAT3 Aktivierung in Fibroblasten. Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten belegen, dass MK2 in Makrophagen bei der LPS vermittelten inflammatorischen Antwort eine wichtige Rolle bei der IL-10 induzierten STAT3 Aktivierung spielt[2]. Davon ausgehend sollte diese Arbeit wie eingangs erwähnt prüfen, ob auch andere Entzündungs-Zellen dabei involviert sind. Fibroblasten sind am Entzündungsgeschehen beteiligt. Basierend auf den Voruntersuchungen an Makrophagen wurden diese Befunde Fibroblasten gegenübergestellt und verglichen[8].

Aus Ergebnissen der Arbeitsgruppe und anderer konnte belegt werden, dass es in Makrophagen nach Behandlung mit LPS zu einer aktivierenden Phosphorylierung von STAT3 kommt[2, 7, 8, 125], dessen verzögert einsetzende und lang anhaltende Aktivierung durch das Zytokin IL-10 vermittelt wird und im Rahmen der Kontrolle der Genexpression eine wichtige antiinflammatorische Rolle spielt. Um eine wesentliche zielsetzende Fragestellung dieser Arbeit zu beantworten, lässt sich aus dem gegenwärtigen Kenntnisstand der Literatur und den eigenen Ergebnissen abschließend bejahen, dass Makrophagen und auch andere Zellen wie Fibroblasten (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2) im Rahmen der Entzündungsreaktion auf LPS hin eine nach ca. 80 min verzögert einsetzende lang anhaltende STAT3 Aktivierung generieren, was für Fibroblasten-Zellpopulationen bisher nicht bekannt war. Um neben der Zelltypspezifität Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Makrophagen und Fibroblasten auszuarbeiten, wurde der Einfluss der beschriebenen Proteinkinasen MK2 und MK3 auf das LPS induzierte Entzündungsgeschehen analysiert, welche in Makrophagen basierend auf den Daten der Literatur essentiell für die Expression von IL-10 und IFN- β sind[1, 2, 19, 20, 27, 28]. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe identifizierten einen LPS und auch Viren spezifischen Mechanismus, der im Wesentlichen darin besteht, dass ein Typ I Interferon abhängiger Rückkopplungsmechanismus die Expression von IL-10 (vgl. Diskussion 4.1, Abb. 15) und die nachfolgende induzierte langanhaltende STAT3 Aktivierung durch IL-10 kontrolliert, deren Induktion an die Anwesenheit der MK2 und MK3 gebunden ist und für Makrophagen gilt[8].

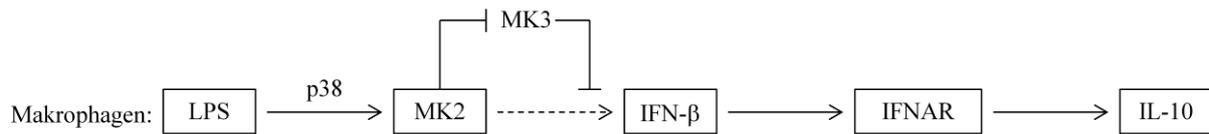


Abbildung 15: Schematische Darstellung der LPS induzierten IL-10 Expression in Makrophagen

Um die nächste einleitend zielsetzende Fragestellung dieser Arbeit zu beantworten, belegen eigene Untersuchungen, dass im Fibroblasten-Zellmodell (vgl. Ergebnis 3.1, Abb. 2) die LPS induzierte STAT3 Aktivierung auch MK2 abhängig ist und in beiden Zellspezies[8] durch kombinierte Deletion von MK2 und MK3 wieder hergestellt werden kann, wobei der Fibroblasten-spezifische Befund bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.

Bezugnehmend auf die oben beschriebene Relevanz der LPS abhängigen Typ I Interferon abhängigen Rückkopplung während inflammatorischer Reaktionsketten wurde im Rahmen der Arbeit in einem nächsten vergleichenden Ansatz die Relevanz der IFN-β abhängigen STAT3 Aktivierung[103] im Entzündungsgeschehen an beiden Zelltypen (Fibroblasten und Makrophagen) auf die Abhängigkeit der Faktoren MK2 und MK3 geprüft. Hierfür wurden zur Abgrenzung der LPS induzierten Zytokinexpression gegenüber anderen Mediatoren im nächsten Schritt vergleichende Experimente mit IFN-β als Stimulus durchgeführt (vgl. Ergebnis 3.2, Abb. 3). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe belegten, dass die Stimulation mit Interferon-β in Makrophagen eine MK2 unabhängige STAT3 Aktivierung induziert[8]. Im eigenen experimentellen Vergleich mit Fibroblasten (vgl. Ergebnis 3.2, Abb. 3) konnte untermauert werden, dass Fibroblasten mit IFN-β als Stimulus ebenso STAT3 induzieren und zwar auch MK2 unabhängig. Damit ist die Fragestellung zum gemeinsamen Mechanismus der IFN-β induzierten vorübergehend kurzen nur transient generierten MK2 unabhängigen STAT3 Aktivierung als Zellspezies-übergreifende Signalkette für Makrophagen und Fibroblasten-Zellsysteme mit Ja zu beantworten[129], wobei diese Beobachtungen an Fibroblasten in der Form gegenwärtig nicht beschrieben sind. In Ergänzung zu den Western Blot Protein-Untersuchungen wurden RNA Präparationen durchgeführt (Ergebnis 3.5, Abb. 9), um der Fragestellung nachzugehen, ob Fibroblasten in Gegenwart von LPS IFN-β produzieren und welche Rolle dabei MK2 und MK3 spielen. Eigene Beobachtungen belegen dabei, dass wildtypische, MK2 sowie MK2/3 kombiniert defiziente Fibroblasten alle nach LPS Stimulation verstärkt IFN-β mRNA produzieren (vgl. Ergebnis 3.5, Abb. 9). Dies steht im Kontrast zu Makrophagen, bei denen die Synthese von Interferon-β MK2 abhängig erfolgt

[2, 8]. Die Ursache der hier belegten LPS induzierten MK2 unabhängigen IFN- β Expression in Fibroblasten bleibt zu klären (vgl. Diskussion 4.1, Abb. 16). Im Gegensatz zu diesem Befund ist die LPS-induzierte IFN- β Expression in Makrophagen MK2 abhängig[8], so dass eine zielsetzende Fragestellung dieser Arbeit eine auf die Zellpopulation übergreifende mechanistische Gemeinsamkeit zwischen Fibroblasten (vgl. Ergebnis 3.5, Abb. 9) und Makrophagen bezüglich der LPS induzierten IFN- β Expression im beobachteten Zeitfenster aufgrund des Unterschiedes der MK2 Relevanz in Makrophagen zu verneinen ist, was der Literatur folgend zuvor nicht bekannt war.

Basierend auf den Vorergebnissen aus den Untersuchungen, die an Makrophagen erfolgten, wurde angenommen, dass LPS via MK2 und MK3 die Expression von IFN- β und IL-10 steuert. Dabei regulieren MK2 und MK3 auf transkriptionellem Weg die IFN- β Expression und hierdurch indirekt auch die IFNAR vermittelte Expression von IL-10, die in Makrophagen eine Aktivierung von IFNAR voraussetzt. Die Stabilisierung des IL-10 Transkriptes wiederum erfordert die Aktivierung der MK2[8]. Bezugnehmend auf eine weitere grundlegende Fragestellung dieser Arbeit sollte mit den folgenden Versuchsreihen geprüft werden, ob der für Makrophagen spezifisch ausgearbeitete Mechanismus mit IL-10 als der zentrale Mediator für das LPS induzierte inflammatorische Geschehen im Kontext der langanhaltenden STAT3 Aktivierung auf das Fibroblasten-Zellsystem übertragbar ist. Basierend auf den eigenen Untersuchungen ist diese Fragestellung eindeutig zu verneinen, da IL-10 in Fibroblasten im Gegensatz zu Makrophagen kaum eine STAT3-Antwort induziert (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 5). Durch LPS pre IL-10 als Vorinkubationsversuch mit der daran anknüpfenden Fragestellung einer möglichen IL-10 Rezeptorsensibilisierung durch die Vorbehandlung mit LPS, zeigen vorläufige Befunde in Gegenwart von LPS eine zeitversetzte STAT3 Aktivierung durch IL-10 (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 6). Vergleichbare Daten sind diesbezüglich noch nicht vorhanden.

Ebenso beweisen die hier durchgeführten Experimente, dass IL-10 in Fibroblasten in Reaktion auf LPS nicht exprimiert wird (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 7), was ein grundlegender Unterschied zu Makrophagen ist[130, 131]. Damit ist die erste zusammenfassende und grundlegend zielsetzende Fragestellung dieser Arbeit, ob für die Regulation der STAT3 Aktivierung in Reaktion auf die Stimulation mit LPS in Fibroblasten vergleichbare Signalketten wie der Makrophagen spezifische Effekt über Typ I Interferon abhängige IFNAR rückgekoppelte IL-10 Expression mit nachfolgender lang anhaltender verzögerter MK2 abhängiger STAT3 Aktivierung existieren, wie folgt zu beantworten: Gemeinsam ist beiden Zellsystemen die Endstrecke, dass LPS nach zwei Stunden STAT3 verzögert induziert. Als

mechanistische Gemeinsamkeit auszuschließen und damit in Bezug zur Fragestellung zu verneinen ist, dass Fibroblasten den eigenen Befunden folgend den Entzündungsmediator IL-10 nicht exprimieren (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 7) im Gegensatz zu Makrophagen[2, 8].

Die eigenen Experimente belegen, dass die LPS induzierte STAT3 Aktivierung in Fibroblasten zwar MK2 abhängig ist, jedoch nicht über die Freisetzung von IL-10 vermittelt wird (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 7 und Diskussion 4.1, Abb. 16).

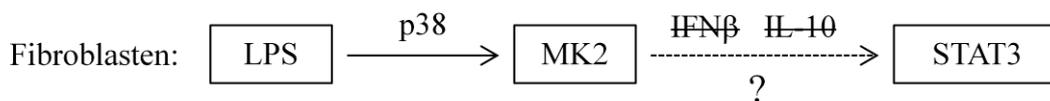


Abbildung 16: Schematische Darstellung der LPS induzierten STAT3 Aktivierung in Fibroblasten

Zukünftig bleibt zu klären, welcher Mediator für die Initiierung der LPS induzierten STAT3 Aktivierung in Fibroblasten verantwortlich ist.

Überleitend zu einer nächsten Fragestellung galt es, die aus der Literatur bekannten Faktoren ATF2 und NFκB für die Regulation der LPS induzierten Genexpression im Fibroblasten Zellsystem den Makrophagen gegenüberzustellen[132]. ATF2 ist ein *downstream-target* von p38 und damit möglicherweise an der Signalweiterleitung ausgehend von MK2 und MK3 indirekt beteiligt[42]. Der p38- und der NFκB-Signalweg stehen dabei über *cross-talk* in Verbindung[30]. Aus anderen Arbeiten ist gegenwärtig belegt, dass LPS in Makrophagen auch ATF2 induziert[2, 133]. ATF2 kontrolliert hierbei die Transkriptionsaktivität auf TLR-induzierte Stimuli wie LPS in Makrophagen. So wurde in dieser Arbeit experimentell versucht, vergleichende Mechanismen in Fibroblasten zu finden, deren Relevanz in der Aufschlüsselung der Bedeutung von MK2 und MK3 liegt. Basierend auf den Erkenntnissen, dass Fibroblasten LPS responsiv sind und ATF2 aktivieren, galt es zu prüfen, ob sich in Fibroblasten spezifische Effekte auf die Induktion und Aktivierbarkeit von ATF2 und p65(NFκB) in Abhängigkeit von MK2 und MK3 nachweisen lassen. Diese Fragestellung ließ sich abschließend insofern beantworten, dass den eigenen Beobachtungen zufolge LPS nach Deletion von MK2 sowie in der kombinierten MK2 und MK3 Deletion ATF2 und p65(NFκB) aktiviert (vgl. Ergebnis 3.4, Abbildung 8). Allerdings ist die Gesamtexpression von ATF2/p65(NFκB) im MK2/MK3 Doppel-*Knock-Out* (D.K.O.) sowohl auf Proteinebene als auch auf Phosphorylierungsebene im Gel reduziert, was ein entscheidender Unterschied zu

Makrophagen ist[8]. Hingegen sind bei densitometrischer Analyse der Phosphorylierung von ATF2/p65(NFκB) bezogen auf das Gesamtprotein ATF2/p65(NFκB) keine signifikanten Differenzen in der LPS-vermittelten Aktivierbarkeit zwischen den unterschiedlichen *knock-out*-Zelltypen nachweisbar (vgl. Ergebnis 3.4, Abb. 8). Diese beiden Beobachtungen sind in der Literatur bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht beschrieben und legen nahe, dass MK3 in Fibroblasten im Gegensatz zu Makrophagen einen regulatorischen Einfluss auf die Gesamtexpression von ATF2 und p65(NFκB) haben könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Makrophagen und Fibroblasten bzgl. der IFN-β Synthese und der STAT3 Aktivierung herausgearbeitet werden. Hierbei spielt die zeitliche Kinetik also die kurzfristige gegenüber der langanhaltend verzögerten STAT3 Aktivierung in der Gegenüberstellung eine Rolle. Dabei galt es herauszufinden, ob einzelne Beobachtungen Makrophagen spezifische Phänomene sind oder ob sie zellübergreifend analog in Fibroblasten zu finden sind. Nach eigenen Untersuchungen konnte zusammenfassend im Gegensatz zu Makrophagen[2] ausgeschlossen werden, dass IL-10 der Vermittler der LPS-induzierten STAT3 Aktivierung in Fibroblasten ist (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 7).

In vergangenen Arbeiten konnte bewiesen werden, dass in Makrophagen Typ-I-Interferone vermittelt über IFNAR1 und über IL-10 eine verzögerte aber anhaltende STAT3 Aktivierung hervorrufen[2, 8]. Basierend auf der sich davon ableitenden Fragestellung sollen zukünftige Untersuchungen mögliche LPS-induzierte STAT3 Aktivatoren in Fibroblasten identifizieren: Hier nennt die Literatur beispielsweise LIF[134] oder Cardiotrophin-1[135]. Letztlich ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, welcher LPS induzierte Mediator MK2-abhängig STAT3 in Fibroblasten aktiviert, so dass diese Fragestellung im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden konnte. In Ergänzung zu dem konnten Experimente der Arbeitsgruppe bereits Mechanismen in der Signaltransduktion in MK3 defizienten Makrophagen aufklären[8], in Anlehnung an MK3 defiziente Fibroblasten gibt es bislang noch keine Daten.

Die erweiterte Fragestellung bezüglich der "Substratspezifität" insbesondere im p38-Signalweg lässt sich zuletzt nur unklar beantworten[136], da offen bleibt, ob MK3 ein eigenständiger Faktor einer Signalkaskade oder Voraussetzung für eine unbekannte Größe ist. Zum Schluss sei die "Zelltypspezifität" im Rahmen dieser Arbeit hervorzuheben[135], der eine kontextspezifische aber modulierbare Regulation des Entzündungsmechanismus auf einen definierten Stimulus wie LPS in verschiedenen Zelltypen zugrunde liegt[137]. Hierbei liegt die Besonderheit darin, dass die Signalkette innerhalb des einen Zelltyps auf einen

definierten Reiz zur Expression eines bestimmten Proteins führt, in der die Anwesenheit bestimmter nachrangiger in den Transduktionsmechanismus involvierter Faktoren bekannt ist. Interessant ist nun, dass derselbe definierte Reiz in einem anderen Zelltyp die Expression desselben Proteins generiert, obwohl einzelne Faktoren in der zellulären Signalkette eines anderen Zelltyps nachweislich fehlen bzw. nicht hochreguliert werden (vgl. Ergebnis 3.3, Abb. 7). In Bezug auf die eingangs zielsetzende Fragestellung nach der Vergleichbarkeit der LPS induzierten STAT3 Aktivierung in Makrophagen und Fibroblasten im Kontext der Signalverkettung legen die mit dieser Arbeit erzielten Befunde nahe, dass nicht jeder Zelltyp alle zur Genexpression bekannten Faktoren eines anderen Zelltyps zur Expression des Proteins benötigt. Daran anknüpfend ist denkbar, dass das Fehlen einzelner oder mehrerer Faktoren im zellulären Signalnetzwerk durch *cross-talk* kompensiert werden kann.

4.2 Diskussion methodischer Teil

In einem vorrangig methodisch orientierten zweiten Teil galt es, siRNAs zu etablieren mit deren Hilfe MK2 und MK3 selektiv herab reguliert werden können. Damit sollte die zweite grundlegend zielsetzende Fragestellung dieser Arbeit beantwortet werden, ob die verwendeten siRNAs einen Einfluss auf die Proteinexpression von MK2 und MK3 haben und ob die aufgeführte MK2 mRNA im Rahmen des Transfektionsexperiment beide Isoformen kodiert. Im Rahmen dessen wurden daher siRNAs, welche auch gegen nicht translatierte Bereiche gerichtet waren, analysiert, um die Fragestellung einer siRNA induzierten MK2 mRNA-Degradation aufgrund unterschiedlicher Zielsequenzen und deren Auswirkungen auf das Proteinexpressionslevel bezogen auf die beiden MK2 Isoformen untereinander zu beantworten.

Den eigenen Befunden folgend (vgl. Ergebnis 3.6, Abb. 10 und 3.7, Abb. 11) ist die Methode der siRNA Transfektion gelungen, so dass die Fragestellung der Etablierung von effizienter siRNA gegen MK2 und MK3 (vgl. Material Methoden 2.2.5.2, Tab. 2) mit nachweislicher Minderung der Proteinexpression abschließend zu bejahen ist. Einzig miRNA #4 ist gegenüber den anderen siRNA nicht äquipotent. Daten der Literatur belegen, dass siRNA Transfektionsversuche für p38-MAPK im Fibroblasten-Zellmodell bereits durchgeführt wurden[138], nicht aber für MK2 oder MK3.

Abschließend galt es, die zielsetzende Fragestellung zu beantworten, ob die Expression eines co-transfizierten Plasmides, welches die vollständige mRNA-Sequenz der murinen MK2

inklusive der 5' und 3' regulatorischen Sequenzen enthält, im Rahmen der Transfektion des kompletten Transkriptes (und nicht nur der kodierenden Sequenz) in Fibroblasten zur Expression beider Isoformen führt. Den eigenen Befunden folgend führt die Kotransfektion von MK2-FLAG nur zur Expression der unteren Bande der MK2 (vgl. Ergebnis 3.8, Abb. 14) statt der bekannten zwei Isoformen[20]. Es wurde angenommen, dass ein co-transfiziertes Plasmid mit der DNA-Sequenz der MK2 inklusive FLAG-Markierung zur Unterscheidung zwischen endogener und exogener MK2 (vgl. Material Methoden 2.2.5.3) in Fibroblasten exprimierbar ist. Eigene Experimente belegen, dass das MK2 FLAG-Konstrukt als translatiertes Protein im zellulären System vorliegt, jedoch nur eine exogene MK2 Isoform hervorbringt (vgl. Ergebnis 3.8, Abb. 14). Den hier dargestellten Befunden nach sind unterschiedlich große mRNA Isoformen vermutlich nicht die Ursache der zwei endogenen Isoformen. Diese Entdeckung stellt den zugrundeliegenden Mechanismus dieses Befundes vor ein bisher nicht bekanntes Prinzip und ist so nicht in der Literatur beschrieben. Im Vergleich dazu besteht die humane MK2 nur aus einer Isoform[8], daher ist das beobachtete Phänomen mit zwei unterschiedlich großen MK2 Isoformen speziesspezifisch nur bei der Maus zu finden. Zielsetzung zukünftiger Experimente ist es, beide Isoformen der MK2 herzustellen und deren jeweilige Auswirkungen auf intrazelluläre Signalgebungsprozesse zu untersuchen. Darüber hinaus wird die Frage, ob beiden Isoformen das gleiche Transkript zugrunde liegt, noch zu beantworten sein.

Zusammenfassend belegen die bisherigen Experimente, dass der *knockdown* durch siRNA und die Kotransfektion des FLAG-MK2-Plasmids methodisch funktioniert und die Konzentration der MK2 innerhalb der Zelle verändert. Den hier zugrundegelegten eigenen Untersuchungen folgend, wird der zelleigene Signaltransduktionsmechanismus dadurch jedoch nicht beeinträchtigt.

5. Ausblick

Die LPS induzierte STAT3 Aktivierung in Fibroblasten und vergleichend dazu in Makrophagen wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Dabei ist MK2 grundsätzlich essentiell für die Zytokinexpression insbesondere für IL-10, IFN- β und auch STAT3[2, 8]. Aus eigenen Experimenten ist abschließend davon auszugehen, dass sowohl IL-10 als auch die Kostimulation mit IL-10 das LPS-induzierte STAT3 Signal in Fibroblasten im Gegensatz zu den Makrophagen (vgl. Ergebnis 3.3) nicht vermittelt. Eine Makrophagen typische autokrine IL-10 Wirkung unter LPS ist folglich in Fibroblasten ausgeschlossen. Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten die Bedeutung der LPS induzierten MK2 abhängigen IFN- β Expression für die kurze schnelle als auch die langanhaltend verzögerte STAT3 Aktivierung in Makrophagen klären[8]. Eigene RNA Experimente untermauern, dass die IFN- β mRNA Synthese auf LPS zeitlich und mengenmäßig in Fibroblasten MK2 und MK3 unabhängig ist (vgl. Ergebnis 3.5, Abb. 9) im Gegensatz zu Makrophagen[8]. Darüberhinaus wurde belegt, dass die IFN- β induzierte STAT3 Aktivierung in Fibroblasten MK2 und MK3 unabhängig ist (vgl. Ergebnis 3.2, Abb. 3, [8]). Hier gilt es ausblickend, den Teil des Mechanismus der Sekretion des IFN- β Proteins in Fibroblasten zu entschlüsseln, welcher sich vom MK2/3-abhängigen Mechanismus in Makrophagen unterscheidet. Offen bleibt die abschließende Frage, welcher Mediator in Fibroblasten das LPS induzierte STAT3 Signal vermittelt.

Aus Transfektionsversuchen mit siRNA gegen Bereiche der kodierenden und nicht kodierenden Sequenz der MK2 und MK3 wurde nachgewiesen, dass beide Faktoren über diese Methode in ihrer Proteinexpression herunter regulierbar sind. Ob sich dabei die Signaltransduktion beeinflussen lässt, ist zukünftigen Arbeiten vorbehalten. Aus Überexpressionsexperimenten[139] mit dem FLAG-MK2-Konstrukt in Fibroblasten bleibt zu klären, warum trotz vollständiger mRNA Sequenz der MK2 nicht beide Isoformen der MK2 sondern nur die kleinere von beiden hergestellt wird. Denkbar wäre, dass sekundäre Modifikationen wie posttranslationale Prozesse eine Rolle spielen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ehltting, C., et al., *Oncostatin M regulates SOCS3 mRNA stability via the MEK-ERK1/2-pathway independent of p38(MAPK)/MK2*. Cell Signal, 2015. **27**(3): p. 555-67.
2. Bode, J.G., C. Ehltting, and D. Häussinger, *The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis*. Cellular Signalling, 2012. **24**(6): p. 1185-1194.
3. Trautwein, C., K. Böker, and M. Manns, *Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms*. Gut, 1994. **35**(9): p. 1163-1166.
4. Miller, S.I., R.K. Ernst, and M.W. Bader, *LPS, TLR4 and infectious disease diversity*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(1): p. 36-46.
5. Wagner, H., *Innate immunity's path to the Nobel Prize 2011 and beyond*. European journal of immunology, 2012. **42**(5): p. 1089-1092.
6. Takeda, K., et al., *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 39-49.
7. Chang, E.Y., et al., *Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(11): p. 6705-6709.
8. Ehltting, C., et al., *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*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(27): p. 24113-24124.
9. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
10. Winsauer, G. and R.d. Martin, *Resolution of inflammation: Intracellular feedback loops in the endothelium*. Thrombosis and Haemostasis, 2007. **97**(3): p. 364-369.
11. Purvis, H.A., et al., *A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses*. J Immunol, 2014. **193**(3): p. 1142-50.
12. Gaba, A., et al., *Cutting edge: IL-10-mediated tristetraprolin induction is part of a feedback loop that controls macrophage STAT3 activation and cytokine production*. J Immunol, 2012. **189**(5): p. 2089-93.
13. Chan, C.S., et al., *Interleukin-10 Inhibits Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis Factor- α Translation through a SHIP1-dependent Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(45): p. 38020-38027.

14. Sakamori, R., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice*. *Hepatology*, 2007. **46**(5): p. 1564-73.
15. Guha, M. and N. Mackman, *LPS induction of gene expression in human monocytes*. *Cellular signalling*, 2001. **13**(2): p. 85-94.
16. Saluk-Juszczak, J. and B. Wachowicz, *[The proinflammatory activity of lipopolysaccharide]*. *Postepy Biochem*, 2005. **51**(3): p. 280-7.
17. Beutler, B., et al., *How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers*. *Journal of leukocyte biology*, 2003. **74**(4): p. 479-485.
18. Deng, M., et al., *Lipopolysaccharide Clearance, Bacterial Clearance, and Systemic Inflammatory Responses Are Regulated by Cell Type-Specific Functions of TLR4 during Sepsis*. *The Journal of Immunology*, 2013. **190**(10): p. 5152-5160.
19. Gaestel, M., *MAPKAP kinases—MKs—two's company, three's a crowd*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2006. **7**(2): p. 120-130.
20. Ronkina, N., A. Kotlyarov, and M. Gaestel, *MK2 and MK3—a pair of isoenzymes*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 5511-5521.
21. Jones-Carson, J., et al., *Suppressor alpha T lymphocytes control innate resistance to endotoxic shock*. *J Infect Dis*, 2005. **192**(6): p. 1039-46.
22. Applequist, S.E., R.P. Wallin, and H.G. Ljunggren, *Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines*. *International immunology*, 2002. **14**(9): p. 1065-1074.
23. Delneste, Y., C. Beauvillain, and P. Jeannin, *[Innate immunity: structure and function of TLRs]*. *Medecine sciences: M/S*, 2007. **23**(1): p. 67-73.
24. Lin, W.-J. and W.-C. Yeh, *Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor α signaling in septic shock*. *Shock*, 2005. **24**(3): p. 206-209.
25. Werling, D. and T.W. Jungi, *TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2003. **91**(1): p. 1-12.
26. Fujihara, M., et al., *Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex*. *Pharmacology & therapeutics*, 2003. **100**(2): p. 171-194.
27. Kotlyarov, A., et al., *MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- α biosynthesis*. *Nature cell biology*, 1999. **1**(2): p. 94-97.
28. Gaestel, M., *What goes up must come down: molecular basis of MAPKAP kinase 2/3-dependent regulation of the inflammatory response and its inhibition*. *Biological chemistry*, 2013. **394**(10): p. 1301-1315.

-
29. An, H., et al., *Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF-kappaB, ERK and p38 MAPK signal pathways*. Immunol Lett, 2002. **81**(3): p. 165-9.
 30. Gorina, R., et al., *Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways*. Glia, 2011. **59**(2): p. 242-255.
 31. Li, X., et al., *Unfractionated heparin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through blocking p38 MAPK and NF-kB activation on endothelial cell*. Cytokine, 2012. **60**(1): p. 114-121.
 32. Ronkina, N., et al., *MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin*. Biochemical pharmacology, 2010. **80**(12): p. 1915-1920.
 33. Cowan, K.J. and K.B. Storey, *Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress*. Journal of Experimental Biology, 2003. **206**(7): p. 1107-1115.
 34. Hoesel, B. and J.A. Schmid, *The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 86.
 35. Lin, J., et al., *Ursolic acid promotes colorectal cancer cell apoptosis and inhibits cell proliferation via modulation of multiple signaling pathways*. Int J Oncol, 2013. **43**(4): p. 1235-43.
 36. Jin, W., et al., *Down-regulation of the P-glycoprotein relevant for multidrug resistance by intracellular acidification through the crosstalk of MAPK signaling pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **54c**: p. 111-121.
 37. Fey, D., et al., *Crosstalk and signalling switches in mitogen-activated protein kinase cascades*. Frontiers in Physiology, 2012. **3**.
 38. Peng, T., et al., *JNK1/c-fos inhibits cardiomyocyte TNF- α expression via a negative crosstalk with ERK and p38 MAPK in endotoxaemia*. Cardiovascular research, 2009. **81**(4): p. 733-741.
 39. Xiao, Y.Q., et al., *Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor- β* . Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(17): p. 14884-14893.
 40. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiology and molecular biology reviews, 2004. **68**(2): p. 320-344.
 41. Ono, K. and J. Han, *The p38 signal transduction pathway activation and function*. Cellular signalling, 2000. **12**(1): p. 1-13.
 42. Makino, C., et al., *Sin1 binds to both ATF-2 and p38 and enhances ATF-2-dependent transcription in an SAPK signaling pathway*. Genes to Cells, 2006. **11**(11): p. 1239-1251.

-
43. Vlahopoulos, S.A., et al., *The role of ATF-2 in oncogenesis*. *Bioessays*, 2008. **30**(4): p. 314-327.
 44. Ronkina, N., et al., *The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK*. *Molecular and cellular biology*, 2007. **27**(1): p. 170-181.
 45. Lehner, M.D., et al., *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection*. *The Journal of Immunology*, 2002. **168**(9): p. 4667-4673.
 46. Fu, X.Y., *STAT3 in immune responses and inflammatory bowel diseases*. *Cell research*, 2006. **16**(2): p. 214-219.
 47. Gerhartz, C., et al., *Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130 I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(22): p. 12991-12998.
 48. Heinrich, P., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway1*. *Biochem. J*, 1998. **334**: p. 297-314.
 49. Bode, J.G., et al., *Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling*. *Eur J Cell Biol*, 2012. **91**(6-7): p. 496-505.
 50. Kawashima, T., et al., *A Rac GTPase-activating protein, MgcRacGAP, is a nuclear localizing signal-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors*. *Molecular and cellular biology*, 2009. **29**(7): p. 1796-1813.
 51. Marg, A., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1*. *The Journal of cell biology*, 2004. **165**(6): p. 823-833.
 52. Hilton, D.J., *Negative regulators of cytokine signal transduction*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(12): p. 1568-77.
 53. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(6): p. 454-65.
 54. Finbloom, D., et al., *Growth hormone and erythropoietin differentially activate DNA-binding proteins by tyrosine phosphorylation*. *Molecular and cellular biology*, 1994. **14**(3): p. 2113-2118.
 55. Chung, J., et al., *STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and-independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation*. *Molecular and Cellular Biology*, 1997. **17**(11): p. 6508-6516.

-
56. Ceresa, B.P., C.M. Horvath, and J.E. Pessin, *Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Serine Phosphorylation by Insulin Is Mediated by a Ras/Raf/MEK-Dependent Pathway 1*. *Endocrinology*, 1997. **138**(10): p. 4131-4137.
 57. Lang, R., et al., *Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10*. *J Immunol*, 2002. **169**(5): p. 2253-63.
 58. Howard, M., et al., *Biological properties of interleukin 10*. *Journal of clinical immunology*, 1992. **12**(4): p. 239-247.
 59. Berg, D.J., et al., *Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(5): p. 2339-47.
 60. Lang, R., *Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection*. *Immunobiology*, 2005. **210**(2-4): p. 63-76.
 61. Riley, J.K., et al., *Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 16513-21.
 62. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. *Cell*, 1993. **75**(2): p. 263-74.
 63. Le Page, C., et al., *Interferon activation and innate immunity*. *Reviews in immunogenetics*, 1999. **2**(3): p. 374-386.
 64. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. *Immunol Rev*, 2004. **202**: p. 8-32.
 65. Uze, G., et al., *The receptor of the type I interferon family*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007. **316**: p. 71-95.
 66. May, L.T., et al., *Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(16): p. 7760-7766.
 67. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus, *Interleukin-6 and the acute phase response*. *Biochemical Journal*, 1990. **265**(3): p. 621.
 68. Travar, M., M. Petkovic, and A. Verhaz, *Type I, II, and III Interferons: Regulating Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infection*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2016. **64**(1): p. 19-31.
 69. Perry, A.K., et al., *The host type I interferon response to viral and bacterial infections*. *Cell research*, 2005. **15**(6): p. 407-422.
 70. Zhai, J., et al., *Characterization of a novel isoform of murine interferon regulatory factor 3*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2008. **377**(2): p. 384-388.

71. Palmer, H. and P. Libby, *Interferon-beta. A potential autocrine regulator of human vascular smooth muscle cell growth*. Lab Invest, 1992. **66**(6): p. 715-21.
72. Bochtler, P., et al., *Type I IFN-induced, NKT cell-mediated negative control of CD8 T cell priming by dendritic cells*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1633-43.
73. Gobl, A.E., K. Funai, and G.V. Alm, *Different induction patterns of mRNA for IFN-alpha and -beta in human mononuclear leukocytes after in vitro stimulation with herpes simplex virus-infected fibroblasts and Sendai virus*. J Immunol, 1988. **140**(10): p. 3605-9.
74. Kurane, I., J. Janus, and F. Ennis, *Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN- β , IL-6 and GM-CSF*. Archives of virology, 1992. **124**(1-2): p. 21-30.
75. Fujisawa, H., et al., *The expression and modulation of IFN-alpha and IFN-beta in human keratinocytes*. J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**(12): p. 721-5.
76. Nagarajan, U.M., et al., *Chlamydia trachomatis induces expression of IFN-gamma-inducible protein 10 and IFN-beta independent of TLR2 and TLR4, but largely dependent on MyD88*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 450-60.
77. Tong, Y., et al., *Enhanced TLR-induced NF-kappaB signaling and type I interferon responses in NLRC5 deficient mice*. Cell Res, 2012. **22**(5): p. 822-35.
78. Wang, L., et al., *Signaling mechanism for Aspergillus fumigatus tolerance in corneal fibroblasts induced by LPS pretreatment*. Innate Immun, 2014. **20**(6): p. 563-73.
79. Waibler, Z., et al., *Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components*. Journal of virology, 2009. **83**(4): p. 1563-1571.
80. Kim, M.Y. and G.N. Wogan, *Mutagenesis of the supF gene of pSP189 replicating in AD293 cells cocultivated with activated macrophages: roles of nitric oxide and reactive oxygen species*. Chemical research in toxicology, 2006. **19**(11): p. 1483-1491.
81. Duraisamy, S., et al., *MK2: a novel molecular target for anti-inflammatory therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2008. **12**(8): p. 921-36.
82. Fitzgerald, K.A., et al., *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1043-55.
83. Tsitoura, E., et al., *Infection with herpes simplex type 1-based amplicon vectors results in an IRF3/7-dependent, TLR-independent activation of the*

-
- innate antiviral response in primary human fibroblasts*. Journal of General Virology, 2009. **90**(9): p. 2209-2220.
84. Sunderkotter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
 85. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(12): p. 953-964.
 86. Tacke, F., *Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases*. J Hepatol, 2017. **66**(6): p. 1300-1312.
 87. Frevet, U., et al., *Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver?* Cell Microbiol, 2006. **8**(10): p. 1537-46.
 88. Tacke, F., T. Luedde, and C. Trautwein, *Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury*. Clin Rev Allergy Immunol, 2009. **36**(1): p. 4-12.
 89. Yung, S.C. and P.M. Murphy, *Antimicrobial chemokines*. Frontiers in immunology, 2012. **3**.
 90. Tidball, J.G., *Inflammatory processes in muscle injury and repair*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2005. **288**(2): p. R345-R353.
 91. Thomas, K.E., et al., *Contribution of interferon- β to the murine macrophage response to the Toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(41): p. 31119-31130.
 92. Fan, Y.-Y., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is time-dependently expressed in distinct cell types during skin wound healing in mice*. Histochemistry and cell biology, 2011. **135**(4): p. 375-387.
 93. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiological reviews, 2003. **83**(3): p. 835-870.
 94. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
 95. Zhang, S., et al., *Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines*. PLoS neglected tropical diseases, 2010. **4**(3): p. e648.
 96. Van Dyken, S.J. and R.M. Locksley, *Interleukin-4-and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease*. Annual review of immunology, 2013. **31**: p. 317.
 97. Famulski, K., et al., *Alternative Macrophage Activation-Associated Transcripts in T-Cell-Mediated Rejection of Mouse Kidney Allografts*. American Journal of Transplantation, 2010. **10**(3): p. 490-497.

-
98. Kohase, M., et al., *A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor, and interleukin-1*. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(1): p. 273-80.
 99. Bianchetti, L., et al., *Extracellular matrix remodelling properties of human fibrocytes*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2012. **16**(3): p. 483-495.
 100. Reitamo, S., et al., *Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts*. *Journal of Clinical Investigation*, 1994. **94**(6): p. 2489.
 101. Nolte, S.V., et al., *Diversity of fibroblasts--a review on implications for skin tissue engineering*. *Cells Tissues Organs*, 2008. **187**(3): p. 165-76.
 102. Duffield, J.S., et al., *Host responses in tissue repair and fibrosis*. *Annu Rev Pathol*, 2013. **8**: p. 241-76.
 103. Helfgott, D.C., et al., *Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts*. *The Journal of experimental medicine*, 1987. **166**(5): p. 1300-1309.
 104. Le, T.T., et al., *Blockade of IL-6 Trans signaling attenuates pulmonary fibrosis*. *J Immunol*, 2014. **193**(7): p. 3755-68.
 105. Choe, J.Y., et al., *Regulatory effect of calcineurin inhibitor, tacrolimus, on IL-6/sIL-6R-mediated RANKL expression through JAK2-STAT3-SOCS3 signaling pathway in fibroblast-like synoviocytes*. *Arthritis Res Ther*, 2013. **15**(1): p. R26.
 106. Jung, Y.O., et al., *Toll-like receptor 2 and 4 combination engagement upregulate IL-15 synergistically in human rheumatoid synovial fibroblasts*. *Immunology letters*, 2007. **109**(1): p. 21-27.
 107. Reitsma, J.M., et al., *Human cytomegalovirus IE1 protein disrupts interleukin-6 signaling by sequestering STAT3 in the nucleus*. *J Virol*, 2013. **87**(19): p. 10763-76.
 108. Wong, Y., et al., *Lipopolysaccharide regulation of toll-like receptor-4 and matrix metalloprotease-9 in human primary corneal fibroblasts*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2011. **52**(5): p. 2796-2803.
 109. Seitz, M., et al., *Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts*. *European journal of immunology*, 1995. **25**(4): p. 1129-1132.
 110. Powell, D.W., et al., *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(1 Pt 1): p. C1-9.
 111. Liu, J., J. Mi, and B.P. Zhou, *Metabolic rewiring in cancer-associated fibroblasts provides a niche for oncogenesis and metastatic dissemination*. *Mol Cell Oncol*, 2016. **3**(1): p. e1056331.
 112. Capecchi, M.R., *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007 Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans, Oliver Smithies*.

-
113. Pålsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. *Immunology*, 2004. **113**(2): p. 153-162.
 114. Shiryaev, A. and U. Moens, *Mitogen-activated protein kinase p38 and MK2, MK3 and MK5: menage a trois or menage a quatre?* *Cellular signalling*, 2010. **22**(8): p. 1185-1192.
 115. Menon, M.B., et al., *p38 MAP kinase and MAPKAP kinases MK2/3 cooperatively phosphorylate epithelial keratins*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(43): p. 33242-33251.
 116. Ronkina, N., et al., *Stress induced gene expression: a direct role for MAPKAP kinases in transcriptional activation of immediate early genes*. *Nucleic acids research*, 2010: p. gkq1178.
 117. Moens, U., S. Kostenko, and B. Sveinbjornsson, *The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation*. *Genes (Basel)*, 2013. **4**(2): p. 101-33.
 118. Kother, K., et al., *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*, 2014.
 119. Colonna, M., *TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own*. *European journal of immunology*, 2007. **37**(2): p. 306-309.
 120. Marson, A., R.M. Lawn, and T. Mikita, *Oxidized low density lipoprotein blocks lipopolysaccharide-induced interferon β synthesis in human macrophages by interfering with IRF3 activation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(27): p. 28781-28788.
 121. Sasai, M., et al., *Cutting edge: NF- κ B-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation*. *The Journal of Immunology*, 2005. **174**(1): p. 27-30.
 122. Reimer, T., M. Schweizer, and T.W. Jungi, *Type I IFN induction in response to *Listeria monocytogenes* in human macrophages: evidence for a differential activation of IFN regulatory factor 3 (IRF3)*. *The Journal of Immunology*, 2007. **179**(2): p. 1166-1177.
 123. Marsh, B., et al., *Systemic lipopolysaccharide protects the brain from ischemic injury by reprogramming the response of the brain to stroke: a critical role for IRF3*. *The Journal of Neuroscience*, 2009. **29**(31): p. 9839-9849.
 124. Nilausen, K. and H. Green, *Reversible arrest of growth in G1 of an established fibroblast line (3T3)*. *Experimental Cell Research*, 1965. **40**(1): p. 166-168.

-
125. Carl, V.S., et al., *Role of endogenous IL-10 in LPS-induced STAT3 activation and IL-1 receptor antagonist gene expression*. Journal of leukocyte biology, 2004. **76**(3): p. 735-742.
 126. Grozdanov, P.N. and C.C. MacDonald, *Generation of plasmid vectors expressing FLAG-tagged proteins under the regulation of human elongation factor-1alpha promoter using Gibson assembly*. J Vis Exp, 2015(96).
 127. Lu, B., et al., [*Construction, expression and location of eukaryotic expression vector CMV-FLAG-RB in human prostate cancer PC-3 cells*]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010. **30**(3): p. 422-5.
 128. Ehling, C., et al., *Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) mRNA Stability by TNF- Involves Activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 Cascade*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(5): p. 2813-2826.
 129. Grumbach, I.M., et al., *Activation of the Jak-Stat pathway in cells that exhibit selective sensitivity to the antiviral effects of IFN-beta compared with IFN-alpha*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(7): p. 797-801.
 130. Haselow, K., et al., *Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(6): p. 1253-64.
 131. Ehling, C., et al., *MAPKAP kinase 2 regulates IL-10 expression and prevents formation of intrahepatic myeloid cell aggregates during cytomegalovirus infections*. J Hepatol, 2016. **64**(2): p. 380-9.
 132. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF- κ B in immunobiology*. Cell research, 2011. **21**(2): p. 223-244.
 133. Hirose, N., et al., *ATF-2 regulates lipopolysaccharide-induced transcription in macrophage cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **385**(1): p. 72-7.
 134. Laszlo, G.S. and N.M. Nathanson, *Src family kinase-independent signal transduction and gene induction by leukemia inhibitory factor*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27750-7.
 135. Ehling, C., D. Haussinger, and J.G. Bode, *Sp3 is involved in the regulation of SOCS3 gene expression*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 3): p. 737-45.
 136. Hendriks, B.S., K.M. Seidl, and J.R. Chabot, *Two additive mechanisms impair the differentiation of 'substrate-selective' p38 inhibitors from classical p38 inhibitors in vitro*. BMC Syst Biol, 2010. **4**: p. 23.
 137. Bode, J.G., et al., *LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages*. FEBS Lett, 1999. **463**(3): p. 365-70.
 138. Khwaja, F.S., et al., *Carprofen induction of p75NTR-dependent apoptosis via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(11): p. 3539-45.

-
139. Zhang, L., et al., *Nonradioactive assay of FLAG[®]-tagged MAPK using ANTI-FLAG[®] antibody-coated multiwell plates*. *Biotechniques*, 2002. **32**(2): p. 442-447.

7. Danksagung

Großer Dank geht in erster Linie an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Johannes G. Bode, unter dessen Leitung diese Dissertation entstanden ist. Ich danke ihm für die kontinuierliche Unterstützung und stetige Diskussionsbereitschaft während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Danken möchte ich ihm auch für die zahlreichen wertvollen Anregungen und die sorgfältigen Korrekturen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Ich danke Prof. Dr. med. Dieter Häussinger für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in den Laboratorien der Experimentellen Hepatologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchzuführen. Ich bedanke mich für die umfassende Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe.

Besonders herzlich danke ich Dr. rer. nat. Christian Ehlting, der mich während der gesamten Zeit mit seiner fachlichen Kompetenz und seinen kritischen Ratschlägen gefordert hat. Ich danke ihm für die zuverlässige, kontinuierliche Begleitung und Unterstützung in jeder Phase der Doktorarbeit.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter der Experimentellen Hepatologie, insbesondere danke ich Marijana Suzanj für die technische Herstellung des Plasmids.

Dank geht an meinen Onkel Werner Weitz für das Korrekturlesen der Arbeit. Ich danke meinem Vater Dr. rer. nat. Heinz Selic für jegliche Unterstützung bis zu seinem Tode; leider konnte er den Abschluss meiner Promotion nicht mehr miterleben. Ich danke meinem Bruder Benjamin Selic für die technischen Ratschläge und Hinweise.

Nicht zuletzt danke ich meiner geliebten Ehefrau Christa Graalman für den seelischen Beistand und die liebevolle Unterstützung vor allem während der letzten Phase dieser Arbeit, als unsere neugeborenen Zwillinge Constantin und Lennardt uns Tag und Nacht forderten.

Der größte Dank gilt meiner Mutter Barbara Hoven. Ihre liebevolle und unermüdliche Unterstützung ermöglichte mir das lang ersehnte Medizinstudium. Sie gab mir immer wieder Kraft und Mut, große Ziele zu verwirklichen. Vielen Dank.