

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tom Lüdde

Bedeutung der *Mitogen Activated Protein Kinase*
Activated Protein Kinase 2 (MK2) für die Regulation
von Hepcidin

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Anastasiya Borisovna Skryabin
2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Julia Reifenberger

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

In Posterbeiträgen:

Skryabin A, Hahnel MJ, Ehling C, Albrecht U, Bode JG. Bedeutung der Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 2 für die Regulation von Hepcidin.
Online Symposium der medRSD, Düsseldorf 2020

Zusammenfassung

Die Leber hat im menschlichen Organismus eine zentrale Bedeutung und ist unentbehrlich für das Überleben. Neben ihrer Bedeutung für Metabolismus und Detoxifikation kommt ihr auch eine Bedeutung in der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität zu. So spielt sie eine zentrale Rolle in der Induktion von Toleranz und ist als führender Syntheseort von Akute-Phase-Proteinen für die Produktion einer Vielzahl von Faktoren verantwortlich, die im Kontext der angeborenen Immunität wesentliche regulatorische Funktionen als auch Effektorinduktionen wahrnehmen. Ein wichtiges Akute-Phase-Protein ist in diesem Zusammenhang Hepcidin, welches beim Entzündungsgeschehen in seiner Funktion zu einer verminderten Eisenabgabe durch Enterozyten, Hepatozyten und Makrophagen an das Blut führt.

Die *Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 2* (MK2) ist eine der durch p38 aktivierten Effektorkinasen und spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Expression von Faktoren, die für die Kontrolle des Entzündungsgeschehens essentiell sind. Vorbefunde der Arbeitsgruppe an Tieren mit MK2 Defizienz legen nahe, dass die MK2 einen inhibitorischen Einfluss auf die LPS induzierte Expression von Hepcidin im Lebergewebe hat. Ziel der Arbeit war es somit zu der Aufklärung der Mechanismen beizutragen, wie die MK2 die Expression von Hepcidin und die damit assoziierten Signalkaskaden im Rahmen einer Entzündungsreaktion reguliert, wobei ein besonderes Augenmerk auf die möglichen Einflüsse der MK2 auf die transkriptionelle Regulation des Hepcidin Gens (*Hamp*) gerichtet wurde.

Dazu wurden primäre murine Wildtyp (WT), MK2^{-/-}, IL1R^{-/-} und IL6R^{-/-} Hepatozyten mit Überständen von mit LPS konditionierten Makrophagen behandelt und anschließend die *Hamp*-mRNA-Expression und TTP-mRNA-Expression in Hepatozyten analysiert. Weiterhin wurden primäre murine WT und MK2^{-/-} Hepatozyten in Zeit- und Konzentrationsreihen mit IL6 und IL1- β stimuliert und anschließend die *Hamp*-mRNA-Expression, *Hamp*-hnRNA-Expression und SOCS3-mRNA-Expression, sowie STAT3-Aktivierung auf Proteinebene quantifiziert. Außerdem wurden Decay-Experimente an primären murinen WT und MK2^{-/-} Hepatozyten mit anschließender *Hamp*-mRNA-Bestimmung durchgeführt. Die Versuche mit Zeit- und Konzentrationsreihen, sowie die Decay-Experimente wurden ebenfalls an der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 nachgestellt.

Dabei konnte nachgewiesen werden, dass im inflammatorischen Zusammenspiel zwischen Makrophagen und Hepatozyten die MK2 die *Hamp*-Induktion auf Ebene des Hepatozyten reguliert. Weiterhin geschieht die Modulation der *Hamp*-Induktion durch die MK2 auf Transkriptebeine, jedoch ohne Einfluss auf Transkriptstabilität von *Hamp*. IL6 und IL1- β wirken außerdem synergistisch auf die *Hamp*-Induktion, wobei sich bei der MK2 negativ modulierende Einflüsse auf diesen Synergismus nachweisen lassen. Im Gegensatz dazu scheint die MK2 auf den Synergismus von IL6 und IL1- β auf die Induktion von TTP einen positiv modulierenden Effekt zu haben. Außerdem hat die MK2 Einfluss auf die IL1- β abhängige SOCS3-Induktion.

Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Ergebnisse geben Einblick in den Wirkmechanismus der MK2 bei Regulation der Hepcidin-Expression. Weiteren Mechanismen der MK2 bei Regulation von Hepcidin und anderen Faktoren der damit assoziierten Signaltransduktionskaskade muss in weiterführenden Arbeiten nachgegangen werden.

Summary

The liver has a central role in the human organism and is essential for survival. Besides its significance for metabolism and detoxification it also has importance in regulating the innate and adaptive immune system. Thus it plays a central role in tolerance induction and being the leading synthesis site for acute-phase-proteins, it is responsible for producing a variety of factors bearing essential regulatory and effectorinductory functions in context of the innate immunity. One of the important acute-phase proteins in this regard is hepcidin, leading under inflammatory circumstances to a reduced iron emission from enterocytes, hepatocytes and macrophages to the blood.

The *Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 2* (MK2) is an effector kinase activated through p38 and plays a central role in regulating essential inflammatory controlling factors. Preceding results of our group regarding mice with MK2 deficiency suggested that the MK2 has an inhibitory effect on the LPS-induced expression of hepcidin in liver tissue. Thus the aim of this work was to contribute to the discovery of regulatory mechanisms concerning hepcidin and associated signal transduction via MK2 paying special attention to possible MK2 involvement in regulation of the hepcidin gene (*hamp*) on transcriptional level.

Therefore primary murine wild type (wt), MK2^{-/-}, IL1R^{-/-} and IL6R^{-/-} hepatocytes were treated with supernatants from LPS-conditioned macrophages and *hamp*-mRNA-expression and TTP-mRNA-expression in hepatocytes was analysed afterwards. Furthermore primary murine wt and MK2^{-/-} hepatocytes were stimulated with IL6 and IL1- β in concentration gradients over specific time periods and subsequently *hamp*-mRNA-expression, *hamp*-hnRNA-expression and SOCS3-mRNA-expression as well as STAT3-activation on protein level was analysed. Thereafter decay-experiments with primary murine wt and MK2^{-/-} hepatocytes with further determination of *hamp*-mRNA-expression were performed. Experiments with IL6 and IL1- β time- and concentration gradients as well as decay-experiments were also performed on the human hepatoma cell line HepG2.

The results show that during the inflammatory interaction between macrophages and hepatocytes MK2 regulates *hamp* induction on a hepatocytic level. Furthermore modulation of *hamp* induction via MK2 happens on a transcriptional level, however MK2 does not show influence on transcript stability of *hamp*. Moreover IL6 and IL1- β show a synergistic effect on *hamp* induction whereas MK2 also shows negative modulatory effects on the aforementioned synergism. In contrast MK2 might show a positive modulatory effect on IL6 and IL1- β synergism of TTP induction. Furthermore MK2 shows modulatory effects on IL1- β dependent SOCS3 induction.

The presented results in this work give insight in the working mechanisms of MK2 regulating hepcidin expression. Subsequent mechanisms of MK2 regulating hepcidin expression and other associated signal transducing factors should be investigated in further studies.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
ALK3	activin receptor-like kinase 3
APA	Akute-Phase-Antwort
APP	Akute-Phase-Protein
ARNT/HIF1 β	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein
AS	Aminosäure
BMP	bone morphogenetic protein
BMPR	BMP-Rezeptor
C/EBP δ	CCAAT-enhancer-binding protein δ
CD14	cluster of differentiation 14
CLC	cardiotrophin-like cytokine
cm	Zentimeter
CNTF	ciliary neurotrophic factor
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
CT1	Cardiotrophin 1
DAMP	damage-associated molecular pattern
EPO	Erythropoetin
Fpn	Ferroportin
g	Gramm
GDF15	growth differentiation factor 15
gp130	Glycoprotein 130
h	Stunde
Hamp	Hepcidin Gen
HFE	humanes Hämochromatose Protein
HIF	hypoxia-inducible factor
HJV	Hämojuvelin
hnRNP A0	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
HRE	hypoxia-responsive element
HSF1	heat-shock factor 1
HuR	human antigen R
IKK	inhibitor of nuclear factor B kinase
IL1- α	Interleukin 1- α
IL1- β	Interleukin 1- β
IL1RA	IL1 receptor antagonist
IL1RAcP	IL1 receptor accessory protein
IL6	Interleukin 6
IL6R- α	IL6 Rezeptor α
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRAK4	interleukin-1 receptor-activated protein kinase 4
IRF3	interferon regulatory factor 3
I κ B	inhibitor of nuclear factor B
JAK	Janus Kinasen
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KES	Kernexportsignal
KLS	Kernlokalisierungssignal

I	Liter
LBP	LPS bindendes Protein
LIF	leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MAP2K	MAP-Kinase-Kinase
MAP3K	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK2	MAPK-activated protein kinase 2
MD-2	lymphocyte antigen 96
MEK	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase
mg	Milligramm
min	Minute
MK2	MAPK-activated protein kinase 2
MK2 k.d.	MK2 knock down
MK3	MAPK-activated protein kinase 3
ml	Milliliter
mM	Millimol
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
n	Anzahl
NEMO	NF- κ B essential modifier
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
nm	Nanometer
NT	Inkubation mit Non-Targeting siRNA
OSM	Oncostatin M
p38^{MAPK}	p38 mitogen-activated protein kinase
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PHD	Propyldehydrogenase
PIAS1	protein inhibitor of activated STAT1
pM	Picomol
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
rpm	rotation per minute
s	Sekunde
SAA	Serum Amyloid A
SEM	Standartfehler
SH2	Src homology 2
sIL6-R	löslicher IL6-Rezeptor
SMAD	mothers against decapentaplegic homolog
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
STAT	signal transducers and activators of transcription
Tf	Transferrin
TFR	Transferrin-Rezeptor
TGF-β	transforming-growth-factor- β
TLR4	Toll-ähnlicher Rezeptor 4
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TRAF6	tumor necrosis factor-associated factor 6
TTP	Tristetraprolin
TWSG1	twisted gastrulation BMP signalling modulator 1

TYK2	non-receptor tyrosine-protein kinase 2
u	units
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	
Abb. 3.1	Die Hemmung der Induktion der Hamp-mRNA-Expression durch die MK2 findet auf Ebene des Hepatozyten statt.....	30
Abb. 3.2	Die Induktion der Hamp-mRNA-Expression in Hepatozyten durch konditionierte Überstände LPS-stimulierter Makrophagen setzt eine intakte Signalübertragung voraus.....	31
Abb. 3.3	Der hemmende Effekt der MK2 auf die Hamp-Expression ist sowohl unter IL6 oder IL1-β Stimulation, als auch unter IL6 und IL1-β Co-Stimulation vorhanden.....	33
Abb. 3.4	Die Hamp-mRNA-Expression wird von IL1-β stärker induziert, als von IL6, die Kombination beider Zytokine wirkt synergistisch.....	35
Abb. 3.5	Die MK2 hemmt die Genexpression von Hamp auf transkriptioneller Ebene.....	36
Abb. 3.6	Die MK2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität von Hamp.....	37
Abb. 3.7	In HepG2 Zellen ist unter IL1-β und IL6 Stimulation die Wirkung der MK2 auf die Hamp-Expression bedingt beurteilbar.....	39
Abb. 3.8	In HepG2 Zellen hat das Hamp-Transkript eine Halblebenszeit von 80 Minuten, die MK2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität.....	41
Abb. 3.9	Rolle der JNK bei der IL1-β/IL6-vermittelten Expression von Hamp.....	43
Abb. 3.10	Die MK2 hat keinen Einfluss auf die IL6-vermittelte STAT3-Aktivierung.....	44
Abb. 3.11	Die MK2 hat Einfluss auf die IL1-β abhängige SOCS3-Induktion.....	45
Abb. 3.12	Die MK2 hat Einfluss auf die synergistische Wirkung von IL1-β und IL6 bei der TTP-Induktion.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	
Tab. 2.1	Allgemeine Chemikalien und Reagenzien.....	10
Tab. 2.2	Zellkulturmedien und Reagenzien.....	10
Tab. 2.3	Reagenzien und Feinchemikalien.....	11
Tab. 2.4	Verwendete Kits.....	11
Tab. 2.5	Oligonukleotide für die Real Time qPCR (Sequenzangaben von 5' → 3').....	11
Tab. 2.6	Oligonukleotide für die Real Time qPCR (Sequenzangaben von 5' → 3').....	12
Tab. 2.7	Primärantikörper.....	12
Tab. 2.8	Sekundärantikörper.....	12
Tab. 2.9	Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	13
Tab. 2.10	Geräte, Software, spezielle Materialien.....	13
Tab. 2.11	Hanks-Puffer.....	14
Tab. 2.12	Hanks-Puffer I.....	14
Tab. 2.13	Hanks-Puffer II.....	14
Tab. 2.14	Adhäsionsmedium.....	14
Tab. 2.15	Pre-Starvation-Medium.....	15
Tab. 2.16	Starvation-Medium.....	15
Tab. 2.17	Spülmedium.....	15
Tab. 2.18	Kulturmedium.....	15
Tab. 2.19	Triton-Lysepuffer.....	15
Tab. 2.20	4x SDS-Lämmli-Puffer.....	16
Tab. 2.21	10x Elektrophoresepuffer.....	16
Tab. 2.22	Anodenpuffer I.....	16
Tab. 2.23	Anodenpuffer II.....	16
Tab. 2.24	Kathodenpuffer.....	17
Tab. 2.25	10x TBS Puffer.....	17
Tab. 2.26	TBST Puffer.....	17
Tab. 2.27	Stripping-Puffer.....	17
Tab. 2.28	Zellen, Zelllinien.....	17
Tab. 2.29	Stoffe und Reagenzien für die Transfektion.....	19
Tab. 2.30	Amplifikationsprogramm.....	26
Tab. 2.31	Zusammensetzung für 2 Sammelgele.....	27
Tab. 2.32	Zusammensetzung für 2 Trenngele.....	27

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Eisenresorption und Eisenhomöostase im menschlichen Organismus.....	1
1.2 Rolle von Hepcidin bei der Eisenhomöostase.....	2
1.3 Regulation der Hepcidinexpression in Hepatozyten.....	2
1.4 LPS induzierte Akute-Phase-Antwort.....	4
1.5 Interleukin 1.....	5
1.6 Interleukin 6.....	6
1.7 Die p38 ^{MAPK} -Kaskade im Kontext des Entzündungsgeschehens.....	7
1.8 Die MK2 im Kontext des Entzündungsgeschehens.....	8
1.9 Zusammenfassung der Fragestellung und Zielsetzung.....	9
 2. Material und Methoden.....	 10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	10
2.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien.....	10
2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien.....	11
2.1.4 Kits.....	11
2.1.5 Real Time qPCR Primer, human.....	11
2.1.6 Real Time qPCR Primer, murin.....	12
2.1.7 Primärantikörper.....	12
2.1.8 Sekundärantikörper.....	12
2.1.9 Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	13
2.1.10 Geräte, Software, spezielle Materialien.....	13
2.1.11 Lösungen und Puffer.....	14
2.1.12 Zellen, Zelllinien.....	17
2.1.13 Versuchstiere und Tierversuchsgenehmigung.....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Zellbiologische Arbeiten.....	19
2.2.2 Molekularbiologische Arbeiten.....	25
2.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten.....	27
2.2.4 Statistische Auswertung.....	29
 3. Ergebnisse.....	 30
3.1 Die Hemmung der Induktion der Hamp-mRNA-Expression durch die MK2 findet auf Ebene des Hepatozyten statt.....	30
3.2 Die Induktion der Hamp-mRNA-Expression in Hepatozyten durch konditionierte Überstände LPS-stimulierter Makrophagen setzt	31

	eine intakte Signalübertragung voraus.....	
3.3	Der hemmende Effekt der MK2 auf die Hamp-Expression ist sowohl unter IL6 oder IL1- β Stimulation, als auch unter IL6 und IL1- β Co-Stimulation vorhanden.....	32
3.4	Die Hamp-mRNA-Expression wird von IL1- β stärker induziert, als von IL6, die Kombination beider Zytokine wirkt synergistisch.....	34
3.5	Die MK2 hemmt die Genexpression von Hamp auf transkriptioneller Ebene.....	35
3.6	Die MK2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität von Hamp..	36
3.7	In HepG2 Zellen ist unter IL1- β und IL6 Stimulation die Wirkung der MK2 auf die Hamp-Expression bedingt beurteilbar.....	38
3.8	In HepG2 Zellen hat das Hamp-Transkript eine Halblebenszeit von 80 Minuten, die MK2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität.....	41
3.9	Rolle der JNK bei der IL1- β /IL6-vermittelten Expression von Hamp.	42
3.10	Die MK2 hat keinen Einfluss auf die IL6-vermittelte STAT3-Aktivierung.....	44
3.11	Die MK2 hat Einfluss auf die IL1- β abhängige SOCS3-Induktion.....	45
3.12	Die MK2 hat Einfluss auf die synergistische Wirkung von IL1- β und IL6 bei der TTP-Induktion.....	46
4.	Diskussion.....	49
5.	Literatur-und Quellenverzeichnis.....	53
6.	Danksagung.....	59

1. Einleitung

1.1 Eisenresorption und Eisenhomöostase im menschlichen Organismus

Die Leber hat im menschlichen Organismus eine zentrale Bedeutung und ist unentbehrlich für das Überleben. Zu ihren Aufgaben gehören der Stoffwechsel von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen; Biotransformation und Detoxifikation, die Biosynthese von zahlreichen Blutbestandteilen und von Gallensäuren, die Gallensäuresekretion und Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität. Ebenfalls spielt die Leber eine entscheidende Rolle bei der Eisenhomöostase.

Eisen ist ein für den Körper essentielles Spurenelement, welches in den für Sauerstofftransport und zum Elektronentransfer benötigten Proteinen als Co-Faktor fungiert. Es kommt zumeist gebunden an diverse Proteine in seiner oxidierten Form als Fe^{3+} vor. Die Eisenhomöostase unterliegt einem komplexen Zusammenspiel aus der Regulation unterschiedlicher Zellverbände, welche bei der Aufnahme, Speicherung und Verwendung von Eisen eine Rolle spielen. [1]

Die Eisenresorption geschieht im Darm und ist an der duodenalen Mukosazelle am stärksten. Speicherung erfolgt vor allem in Hepatozyten und Makrophagen, wobei letztere eine besondere Rolle bei der Wiederverwendung von Eisen aus dem Hämoglobin der durch sie verdauten seneszenten Erythrozyten spielen. Die Plasmaeisenkonzentration wird durch die Freisetzung von Eisen aus den oben genannten Zellen reguliert. [2-5]

Für den Transport im Blutplasma wird Eisen an das Protein Transferrin (Tf) gebunden; seine intrazelluläre Speicherung erfolgt an dem Protein Ferritin. [6, 7]

Nach Nahrungsaufnahme kann im Enterozyten Eisen als Hämeisen durch rezeptorvermittelte Endocytose resorbiert oder nach vorausgehender Umwandlung durch eine membranständige Ferroreduktase aus Fe^{3+} als freies Fe^{2+} durch den DMT1-Transporter in die Zelle gebracht werden. [2, 8] Dort wird das Fe^{2+} entweder wieder als Fe^{3+} an Ferritin gespeichert oder über die basolaterale Enterozytenmembran in den Blutkreislauf eingeschleust.

Die Aufnahme von Eisen aus dem Blut in den Hepatozyten erfolgt ebenfalls vornehmlich durch rezeptorvermittelte Endocytose, wobei nicht nur mit Eisen beladenes Tf, sondern auch Haptoglobin-Hämoglobin, Häm-Hämopectin und beladenes Ferritin erkannt und in die Zelle geschleust werden. [9]

Der Export des Fe^{2+} aus der Zelle geschieht durch den Transporter Ferroportin (Fpn), welcher der wichtigste, wenn nicht der einzige intestinale Eisenexporter ist. Er wurde nicht nur in intestinalen Mukosazellen, sondern ebenfalls in Hepatozyten, retikuloendothelialen Makrophagen und in plazentaren Syncytiotrophoblasten nachgewiesen. [5, 10, 11]

Die anschließende extrazelluläre Oxidation zu Fe^{3+} erfolgt an dem membrangebundenen Protein Hephaestin. [12] Danach wird das Fe^{3+} wieder an Tf gebunden und weiter im Blutkreislauf transportiert.

Bei der Regulation der Plasmaeisenkonzentration durch Freisetzung von Eisen aus intestinalen Mukosazellen, Hepatozyten und Makrophagen spielt Fpn somit eine entscheidende Rolle und ist Ansatzstelle für viele Regulationsmechanismen.

Mechanismen zur Hochregulation der mRNA- und Proteinsynthese von Fpn sind Eisenmangel und Hypoxie. [13] Zu seiner Internalisierung für den anschließenden intrazellulären lysosomalen Abbau führt das Peptidhormon Hephcidin. [14]

1.2 Rolle von Hepcidin bei der Eisenhomöostase

Das Peptidhormon Hepcidin wird durch das Hepcidin-Gen (*HAMP*) auf Chromosom 19 codiert, besitzt drei Exons und wird in Hepatozyten und Makrophagen synthetisiert. Es besteht aus 25 Aminosäuren (AS), von welchen acht die AS Cystein sind, und besitzt eine Haarnadelstruktur, welche durch vier Disulfidbrücken stabilisiert wird. [15-17] Hepcidin ist ein Akute-Phase-Protein (APP) und besitzt eine direkte antimikrobielle Aktivität. [18]

Hepcidin spielt eine wesentliche Rolle bei der Körpereisenregulation. Ein Mangel an Hepcidin ist Grund für systemische Eisenüberladung bei hereditärer Hämochromatose und β -Thalassämie, und Grund für hepatische Eisenüberladung bei Hepatitis C. Erhöhte Hepcidinkonzentrationen werden mit Infektanämien assoziiert und sind Hauptursache von Anämien bei chronischen Erkrankungen. [19-21]

Beim Infektionsgeschehen haben prokaryotische, eukaryotische und virale Pathogene diverse Mechanismen entwickelt, um das gespeicherte Eisen ihrer Wirte für den eigenen Stoffwechsel zu verwenden. Im Gegenzug versucht der infizierte Körper, sein internes Eisenangebot und die damit verbundene Zugänglichkeit für pathogene Erreger zu minimieren. Infektion und Entzündung, aber auch erhöhte Plasmaeisenkonzentration fördern für eine gesteigerte Eisenretention die vermehrte Hepcidinsynthese- und Freisetzung aus Hepatozyten, erhöhte Erythropoese und geringe Plasmaeisenkonzentration hemmen sie. [20-23]

Hepcidin vermindert den Eisenexport aus intestinalen Mukosazellen und Makrophagen, indem es mit dem Eisenexportprotein Ferroportin interagiert. Über seine Interaktion mit Fpn in Hepatozyten wird bislang noch diskutiert, wobei diese *ex vivo* unter speziellen Bedingungen möglich ist. [20, 24]

Hepcidin bindet an der Zelloberfläche als Ligand an Fpn und führt zu dessen Tyrosin-Phosphorylierung an Y302 oder Y303. Darauf folgend wird der Rezeptor-Ligand-Komplex aus Fpn und Hepcidin durch sogenannte *clathrin-coated pits* internalisiert, ubiquitiniert und mit Hilfe multivesikulärer Körper zum Lysosom gebracht. Dort wird dieser anschließend abgebaut. [14, 21, 25]

Durch die Förderung des Ferroportinabbaus inhibiert Hepcidin den Export von aufgenommenem, wiederverwendetem und gespeichertem Eisen und ist der Hauptregulator der Plasmaeisenkonzentration. [23]

1.3 Regulation der Hepcidinexpression in Hepatozyten

Die Hepcidinexpression wird durch vier Faktoren reguliert: die extra- und intrazelluläre Eisenkonzentration, die Erythropoese, die Hypoxie und die Inflammation.

Im Hepatozyten wird die extrazelluläre Eisenkonzentration durch die Interaktion von Holotransferrin mit den Proteinen: Transferrin-Rezeptor 1 (TFR1) und 2 (TFR2) und humanes Hämochromatose Protein (HFE) wahrgenommen und, wie Informationen über die intrazelluläre hepatische Eisenkonzentration, über den Signalweg der knochenmorphogenetischen Proteine (*bone morphogenetic protein*, BMP) BMP6/BMP vermittelt. [26]

Eisen im Blutplasma wird über Transferrin transportiert. Beladenes Tf kann an TFR1 und TFR2 binden, wobei TFR1 für die Resorption von Eisen wichtig ist und besonders

auf Erythrozyten, aber auch auf anderen Zellen exprimiert wird und TFR2 homolog dazu ist und sich vor allem auf Hepatozyten befindet. HFE bindet abhängig von der Transferrinkonzentration bei niedriger Konzentration an TFR1 und bei hoher Konzentration an TFR2 und stabilisiert dieses. [27] Daraufhin wird eine bislang noch wenig erforschte Signalkaskade aktiviert, die zur Synthese von BMP6 führt. Die BMP-Signalproteine gehören zur Suprafamilie der *transforming-growth-factor- β* (TGF- β) Zytokine. BMP6, welches ebenfalls bei erhöhter intrazellulärer Konzentration der Eisenspeicher vermehrt synthetisiert wird, bindet an die membranassoziierten BMP-Rezeptoren 1 und 2 (BMPRI, BMPRII) und deren Co-Rezeptor Hemojuvelin (HJV). Dies führt zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Signaltransduktionsproteine SMAD1/SMAD5/SMAD8 (*mothers against decapentaplegic homolog 1/5/8*), welche dann mit SMAD4 assoziieren. Der gebildete Komplex transloziert anschließend in den Nucleus, wo er als Transkriptionsfaktor für das Hamp-Gen wirkt, was zur Steigerung der Hepcidinproduktion führt. [21, 27-30]

Bei erhöhter Erythropoese steigt der Eisenbedarf, dementsprechend wird dabei, um eine normale Homöostase zu gewährleisten, Hepcidin negativ reguliert.

Zwei Faktoren, die hier eine Rolle spielen, sind der *growth differentiation factor 15* (GDF15) und der *twisted gastrulation BMP signalling modulator 1* (TWSG1), welcher in Erythroblasten produziert wird. GDF15 inhibiert Hepcidin direkt, wobei der Signalmechanismus noch nicht bekannt ist, und TWSG1 inhibiert den BMP/SMAD Signalweg. [31, 32]

Erythropoetin (EPO) reguliert Hamp ebenfalls negativ, jedoch nicht direkt. Der genaue Mechanismus ist hier noch unbekannt. [28]

Hypoxie stimuliert die Erythropoese und führt zu einer negativen Hepcidinregulation. Die genauen Regulationsmechanismen sind noch Element der Forschung, auch ist unklar, ob Hypoxie direkt oder indirekt durch Epo-Stimulation an der Hamp-Expression beteiligt ist.

Ein möglicher Regulationsmechanismus kann durch den Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor* (HIF) gesteuert werden. Dieser hat drei bekannte Untereinheiten: HIF1 α , HIF2 α und HIF3 α . In Gegenwart von Sauerstoff werden diese Untereinheiten von einer Propyldehydrogenase (PHD) modifiziert und anschließend im Proteasom abgebaut. Bei Sauerstoffmangel ist die PHD inaktiv und die Untereinheiten der HIF translozieren in den Nucleus, wo sie mit dem *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein* oder HIF1 β (ARNT/HIF1 β) ein Heterodimer bilden. Die Heterodimere binden an unterschiedliche Hypoxie-responsive Elemente (*hypoxia-responsive elements*) (HREs) in der DNA und regulieren Hypoxie-spezifische Gene, unter anderem *EPO*. Die HIF1 α -Untereinheiten können außerdem noch an HRE im Hamp-Promoter binden und die Hamp-Expression vermindern. [28, 33]

Inflammation führt zu einer Hochregulation der Hepcidinproduktion. Genauere Mechanismen der Entzündungsreaktion werden in den Abschnitten 1.4-1.6 thematisiert, der Folgende bezieht sich nur auf die inflammatorische Signalkaskade bezogen auf die Hamp-Expression.

Hepcidin ist ein Typ 2 Akute-Phase-Protein, da seine Induktion durch das Zytokin Interleukin 6 (IL6), aber nicht durch Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 1- α (IL1- α) hervorgerufen wird. [34] Beim Inflammationsgeschehen bindet IL6 an seinen Rezeptorkomplex, welcher aus dem IL6 Rezeptor α (IL6R- α) und der

Glycoprotein 130 (gp130) Untereinheit besteht. Die gp130-Untereinheit kommt ubiquitär vor und der IL6R- α ist nur auf der Zellmembran von Hepatozyten und Leukozyten lokalisiert. Die Rezeptor-Ligand Interaktion führt zu einer Dimerisierung von gp130 und nachfolgend zur Aktivierung von Janus Kinasen (JAK), welche die *signal transducers and activators of transcription* (STAT) Proteine, vor allem STAT3, durch deren *Src homology 2* (SH2) Domäne rekrutieren und phosphorylieren. STAT-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, so dimerisiert STAT3 nach seiner Phosphorylierung an Y705 und transloziert dann in den Nucleus, wo es beispielsweise an die Promotorregion von Hepcidin bindet und die Hamp-Expression fördert. [35-39]

Es lässt sich vermuten, dass es ebenfalls eine Interaktion zwischen dem JAK/STAT und dem BMP/SMAD Signalweg gibt, da bei Mäusen mit konditionalem SMAD4 *knockout* in Hepatozyten eine verminderte Hepcidin-mRNA-Konzentration nach Behandlung mit IL6 nachweisbar ist. [28, 40] Die genauen Mechanismen sind noch unklar, jedoch legen weitere Ergebnisse nahe, dass das Protein Activin B ein möglicher Ligand sein kann, der unter inflammatorischen Bedingungen an BMP-Rezeptoren bindet und die SMAD-Kaskade aktiviert. [41] Bekannt ist auch, dass für eine IL6-induzierte Hepcidinregulation die *activin receptor-like kinase 3* (ALK3), ein Rezeptor aus der Klasse der BMPR1, benötigt wird. [28, 42]

Für Interleukin 1- β (IL1- β) ist ebenfalls ein regulatorischer Einfluss auf die Expression von Hepcidin beschrieben. Zum einen induziert es den Transkriptionsfaktor *CCAAT-enhancer-binding protein δ* (C/EBP δ), welcher an eine Promotorregion des Hepcidin Gens bindet und zur vermehrten Hamp-Expression führt. [43] Zum anderen führt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), welcher in Makrophagen die IL6-Expression induziert; IL6 induziert in Hepatozyten wiederum die Hamp-Expression *in vitro* und *in vivo*. [34, 44, 45]

1.4 LPS induzierte Akute-Phase-Antwort

Die Akute-Phase-Antwort (APA) ist eine unspezifische komplexe systemische Reaktion des Organismus auf Trauma, Neoplasie, Infektion, Stress und Inflammation. Sie ist Bestandteil der angeborenen Immunantwort und stellt ein wichtiges Bindeglied zur angeborenen Immunität dar. Die Leber ist Hauptsyntheseort für APP, welche physikalische und molekulare Barrieren zur Verhinderung von Infektionen regulieren, potentielle Pathogene beseitigen können und Entzündungskaskaden, aber auch Heilungsprozesse initiieren. [46-48] Wichtige APP sind unter anderem C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen, α -1-Antitrypsin, α -2-Makroglobulin, Serum Amyloid A (SAA), Hepcidin und weitere. [49]

Die Akute-Phase-Antwort kann durch verschiedene Stimuli, wie unter anderem *damage-associated molecular patterns* (DAMP) und *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) aktiviert werden. Diese werden durch entsprechend spezialisierte Rezeptorstrukturen, die insbesondere auf Zellen der angeborenen Immunität exprimiert werden, erkannt. DAMP sind körpereigene Moleküle, die zumeist nicht extrazellulär vorliegen und durch Zellschaden freigesetzt werden, PAMP sind mit Pathogenen assoziierte Moleküle. Wichtige PAMP sind Lipopolysaccharide (LPS), welche auf der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien verankert sind. [50, 51]

Die LPS induzierte Stimulation der APA in dendritischen Zellen, Makrophagen und Lymphozyten. Sie erfolgt zunächst durch die Interaktion von LPS mit spezifischen Proteinen an der Oberfläche der Immunzellen. Zu diesen gehören LPS bindendes Protein (LBP), *cluster of differentiation 14* (CD14), *lymphocyte antigen 96* (MD-2) und Toll-ähnlicher Rezeptor 4 (TLR4). [52, 53] Nach Assoziation mit LPS dimerisiert TLR4 und induziert im Zytoplasma über das Adapterprotein *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) eine Signalkaskade, welche in Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL6, IL1 und TNF α führt. Eine MyD88 unabhängige Signalkaskade führt zu Produktion von Typ1 Interferonen. Jene und weitere Zytokine initiieren in Hepatozyten die Produktion der APP. [48]

Sowohl der MyD88 abhängige, als auch unabhängige Weg führen zur Aktivierung von NF- κ B. NF- κ B ist ein Heterodimer und besteht aus den Untereinheiten p65 und p50. An diese beiden Untereinheiten gebunden, befindet sich das Protein *inhibitor of nuclear factor B* (I κ B), bestehend aus den Untereinheiten IKK α und IKK β , welches das Kernlokalisierungssignal (KLS) von NF- κ B blockiert. Die Proteine *inhibitor of nuclear factor B kinase 1* (IKK1) und IKK2 bilden zusammen mit der regulatorischen Untereinheit *NF- κ B essential modifier* (NEMO) den IKK-Komplex. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert I κ B, welches ubiquitiniert wird, dann von NF- κ B dissoziiert und im Proteasom abgebaut wird. NF- κ B transloziert daraufhin in den Nucleus und führt zur Expression von zahlreichen entzündungsassoziierten Proteinen. [52-56] Ebenfalls führt LPS-Stimulation zur Aktivierung der *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38^{MAPK})-Kaskade, welche Thema in Abschnitt 1.7 sein wird. [57] Im Folgenden sollen die Zytokine IL1 und IL6 und ihre Signaltransduktion näher behandelt werden.

1.5 Interleukin 1

Die IL1-Zytokinfamilie besteht aus 11 Proteinen (IL1F1 bis IL1F11), die durch 11 verschiedene Gene codiert werden. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Kontrolle der durch PAMP und/oder DAMP induzierten proinflammatorischen Zellantwort. Sie ist einer der Hauptmodulatoren der angeborenen Immunantwort und streng reguliert. [55, 58] Ebenfalls ist die IL1-Signalgebung bei Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose involviert. [59, 60]

IL1- α und IL1- β stellen aufgrund ihrer Bedeutung in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen die am häufigsten untersuchten Mitglieder dieser Zytokinfamilie dar, insofern wird in folgender Darstellung das Augenmerk vornehmlich auf sie gerichtet. [55, 61]

Makrophagen, Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten können IL1- α und IL1- β produzieren. IL1- α ist vor allem membranassoziiert und leitet Signale parakrin und juxtakrin weiter und IL1- β wird in Folge von spezifischen Signalkaskaden von den Zellen sezerniert und kann parakrin oder systemisch wirken. Beide Subformen induzieren die mRNA-Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene, aber auch ihrer eigenen und regulieren somit ihre eigene Feedback-Schleife positiv. [62, 63]

IL1- α und IL1- β binden beide unabhängig voneinander an den Typ 1 IL1 Rezeptor (IL1-R1). Dies führt zu einer Konformationsänderung des IL1-R1 und ermöglicht die Bindung des Corezeptors *IL-1 receptor accessory protein* (IL-1RAcP), der ebenfalls für die Signaltransduktion benötigt wird. Ein weiterer Ligand, der *IL-1 receptor*

antagonist (IL-1RA) kann auch an den IL1-R1 binden, induziert jedoch keine Signalkaskade und wirkt somit kompetitiv antagonistisch. [64-66]

Der Komplex aus IL1, IL1-R1 und IL-1RAcP kann zwei intrazelluläre Signalproteine, MyD88 und *interleukin-1 receptor-activated protein kinase 4* (IRAK4), rekrutieren. IRAK4 wird dann (auto)phosphoryliert und phosphoryliert IRAK1 und IRAK2, dem folgt die Rekrutierung des *tumor necrosis factor-associated factor 6* (TRAF6). IRAK1, IRAK2 und TRAF6 fungieren als Adapterproteine, bzw. Kinasen für anschließende Signalkaskaden, welche unter anderem zur Aktivierung von NF- κ B, der *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und der p38^{MAPK}-Kaskade führen. Ebenfalls kann sich der Komplex aus IRAK1, IRAK2 und TRAF6 vom initialen Rezeptorkomplex lösen und Signalkaskaden induzieren. Ein Fehlen dieser Proteine zeigte eine verminderte Aktivierung von NF- κ B. [55, 67-70]

1.6 Interleukin 6

Die IL6-Zytokinfamilie besteht aus den Proteinen IL6, IL11, *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *leukemia inhibitory factor* (LIF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin 1 (CT1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) und IL27. Diese signalisieren über Rezeptorkomplexe, welche als Homo- oder Heterodimere aus der gp130-Untereinheit und/oder weiteren Molekülen zusammengesetzt sind. Sie spielen unter anderem eine Rolle in der Induktion und Regulation von APP, der Balance zwischen regulatorischen und Effektor T-Zellen, der B-Zell-Stimulation, der (Leber)-Regeneration und der metabolischen und neuronalen Regulation. [39, 71, 72]

IL6 kann sowohl an den in 1.3 beschriebenen membranassoziierten IL6R- α /gp130 Rezeptorkomplex, als auch an einen löslichen IL6-Rezeptor (sIL6-R) binden, dies wird als *IL6-trans-signaling* bezeichnet. Der IL6/sIL6-R-Komplex interagiert mit der ubiquitär exprimierten signal-transduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130 und kann hierdurch auch in Zellen, die keine alpha-Rezeptoruntereinheit exprimieren, eine entsprechende Signalübertragung initiieren. [73]

Die IL6-Signaltransduktion kann sowohl über den JAK/STAT Weg, als auch über die p38^{MAPK}-Kaskade und die Aktivierung von Erk-Typ MAP Kinasen erfolgen, welche in Abschnitt 1.7 thematisiert wird. [74]

Eine Hemmung der IL6R- α /gp130 Signaltransduktion kann über das Protein *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) erfolgen, dessen Expression als endogener Inhibitor der STAT-abhängigen Signalübertragung, unter anderem von IL6, induziert wird. Nach der IL6-Ligand-Rezeptor-Bindung und Dimerisierung von gp130 werden die Kinasen JAK1 und JAK2, welche anschließend in die STAT3-Phosphorylierung involviert sind, rekrutiert. SOCS3 assoziiert mit gp130, bindet an JAK1 und JAK2 und inhibiert ATP-unabhängig deren Kinaseaktivität, resultierend in einer Minderung der STAT3-Phosphorylierung. Außerdem inhibiert SOCS3 die *non-receptor tyrosine-protein kinase 2* (TYK2), welche auch in der IL6-Signalkaskade von Bedeutung ist. [39, 75]

Die IL6 induzierte APP-Produktion wird ebenfalls auf mehreren Wegen durch IL1 moduliert, wobei es z.B. zur Erhöhung der Synthese von Hepcidin, CRP und SAA und verminderter Produktion von α -2-Makroglobulin kommt. [48]

IL1- β hemmt die IL6 induzierte STAT3 Aktivierung, indem es beispielsweise die p38^{MAPK} induzierte Internalisierung und Degradierung der gp130-Untereinheit begünstigt. Außerdem verhindert IL1- β STAT3 Phosphorylierung, indem es die Bildung eines Komplexes aus der NF- κ B-Untereinheit p65 und STAT3 fördert,

wodurch sich resultierend die intrazelluläre Einlagerung und nachfolgend der Abbau von STAT3 ergeben. Ebenfalls stabilisiert IL1- β das Transkript von SOCS3 und führt somit zu einer verstärkten IL6 induzierten Autoinhibition. [48]

1.7 Die p38^{MAPK}-Kaskade im Kontext des Entzündungsgeschehens

Die MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*) sind spezifische Proteinkinasen, welche nur bei Eukaryoten vorhanden sind. Diverse MAPK-Signalkaskaden werden bei unterschiedlichen zellulären Antworten aktiviert, unter anderem als Antwort auf osmotischen Stress, Mitogene und proinflammatorische Zytokine, und sind bei der Regulation der Zellproliferation, Genexpression, Apoptose, Zelldifferenzierung und APA involviert. [76-78]

Die MAPK-Signalkaskade besteht aus mindestens drei oder mehr hintereinander geschalteten Kinasen, der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), MAP-Kinase-Kinase (MAP2K) und MAP-Kinase, welche in der aufgeführten Reihenfolge jeweils die nächste Kinase phosphorylieren und aktivieren. [79] Die Phosphorylierung der MAP3K und MAPK geschieht dabei immer dual an dem Threonin- und Tyrosin-Rest eines T-X-Y-Motivs und die der MAP2K an dem Threonin- und Serin-Rest eines T-X-S-Motivs, wobei X eine bei den jeweiligen Kinasen weitere spezifische AS ist. MAPK können indes sowohl Serin/Threonin-, als auch Tyrosin/Threonin-Reste je nach ihrer Spezifität phosphorylieren. [79, 80]

Die MAPK-Signalkaskaden lassen sich nach ihren Aktivierungsmustern einteilen: Wachstumsfaktoren, Mitogene, aber auch Inflammation führen über RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) (MAP3K) und MEK1/2 (*dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1/2*) (MAP2K) zu einer Aktivierung von ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) (MAPK). Ebenfalls führt eine separate Kinasekaskade zur Aktivierung der MAPK ERK5. Stress, osmotischer- und Hitze-, Schock, UV-Licht und inflammatorische Zytokine führen über zwischengeschaltete MAP3K und MAP2K sowohl zur Aktivierung der MAPK JNK, als auch der MAPK p38. [76, 79, 81, 82]

Die p38^{MAPK} Subfamilie besteht aus vier Isoformen: p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ , wobei diese zwar eine überlappende Substratspezifität aufweisen, jedoch in ihrer Expression und Aktivität nicht kongruent sind. In der Signaltransduktionskaskade von LPS/TLR4 wird primär p38 α aktiviert und spielt bei der Entzündungsantwort eine wichtige Rolle, jedoch haben alle Isoformen das Phosphorylierungsmotiv T-G-Y. [77, 83, 84]

Die p38^{MAPK} wurde in unterschiedlichen Kontexten nachgewiesen, wobei eine Vielzahl ihrer Funktionen und Substrate bekannt ist. Zum einen zeigt sich eine p38^{MAPK} -Aktivität als Antwort auf Zellstress, UV-Licht, Hitze, Wachstumsfaktoren und unter hyperosmolaren Bedingungen. [77, 84] Zum anderen ist sie Zielprotein von Pyridinylimidazol-Derivaten und inhibiert daraufhin die Produktion proinflammatorischer Zytokine, vor allem TNF α . [85] Unter Inflammationsbedingungen fungiert die p38^{MAPK} als Induktor der Cyclooxygenase 2 (COX-2), welche als essentielles Enzym in der Prostaglandinsynthese unter pathologischen Bedingungen die Reorganisation von Bindegewebe moduliert. [86] Darüber hinaus induziert die p38^{MAPK} die Expression von oxidativen Regulationsenzymen, wie der *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) und von Adhäsionsproteinen, wie des *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1). [84, 87] Außerdem ist sie bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Immunzellen involviert. [88] Eine wichtige Effektor kinase der p38^{MAPK}-vermittelten

Signalübertragung ist die *MAPK-activated protein kinase 2* (MK2), welche im Folgenden näher behandelt wird. [83, 89]

1.8 Die MK2 im Kontext des Entzündungsgeschehens

Die MK2 ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche aus 400 AS besteht. Diese sind in eine Prolin-reiche N-terminale Region, eine katalytische und regulatorische Region, wobei letztere in einer α -Helix-Struktur autoinhibitorisch vor dem katalytischen Zentrum liegt, ein KLS und ein Kernexportsignal (KES), sowie eine C-terminale Region, an welche auch die p38 α -Isoform bindet, aufgeteilt. [90, 91] Die p38^{MAPK} phosphoryliert die MK2 an T222, S272 und T334, dies hat zur Folge, dass das KLS verdeckt und das KES frei wird und der p38^{MAPK}/MK2-Komplex aus dem Nucleus in das Zytoplasma transportiert wird. Außerdem führt die Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung der MK2, bei welcher die α -Helix verlagert und das katalytische Zentrum zugänglich für Substrate wird. [92, 93]

Die Funktion der MK2 ist besonders unter Inflammationsbedingungen relevant. Studien mit MK2-defizienten (MK2^{-/-}) Mäusen konnten belegen, dass diese Tiere im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern eine größere Toleranz und verminderte Entzündungsreaktion gegenüber Behandlung mit LPS zeigen. Dabei wurde bei den MK2^{-/-} Tieren eine zu 90% verringerte Synthese von TNF α , aber auch verminderte Synthese von IFN γ , IL1- β , IL6 und IL10 festgestellt. [94, 95]

Die MK2 erhöht die Transkriptstabilität vieler entzündungsassoziiierter Zytokine, indem sie die Aktivität von transkriptstabilisierenden Proteinen verbessert und die Aktivität von transkriptdestabilisierenden Proteinen inhibiert. Die Regulation von TNF α ist hierbei von besonderer Bedeutung. Die MK2 phosphoryliert das transkriptstabilisierende Protein hnRNP A0 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0*) an S84 und verbessert seine Bindung an TNF α -prä-mRNA. Ebenfalls verbessert es die Bindung des transkriptstabilisierenden Proteins HuR (*human antigen R*) an die TNF α -mRNA. [95, 96]

Zu den transkriptdestabilisierenden Proteinen von TNF α gehört Tristetraprolin (TTP). TTP bindet an AU-reiche Elemente in 3'-untranslatierten Regionen der TNF α -mRNA und führt zu deren Degradierung. MK2 phosphoryliert TTP an S52 und S178, daraufhin wird das phosphorylierte TTP von 14-3-3-Proteinen gebunden und sequestriert. [95, 97, 98]

Ebenfalls wurde die Modulation der Transkriptstabilität von IL8, IL2, IL6, IL10 und IFN γ durch die MK2 durch Regulation von TTP, sowie der TTP-mRNA selbst nachgewiesen. [95, 99-102]

Weiterhin kann die MK2 Inflammationsantworten regulieren, indem sie bestimmte Transkriptionsfaktoren modifiziert. So phosphoryliert sie den *heat-shock factor 1* (HSF1) an S121, welcher daraufhin nicht mehr an spezielle Promotorelemente des für IL1- β codierenden Gens binden und dessen Transkription unterdrücken kann. [95, 103]

Außerdem kann die MK2 inflammatorische Signalkaskaden direkt modulieren. Im IL6-Signalweg phosphoryliert die MK2 die gp130-Untereinheit an S782 und führt zu deren Internalisierung und Degradierung. Dies hat eine verminderte STAT3-Aktivierung und damit assoziierte verminderte Gentranskription zur Folge. [104] Ebenfalls ist die MK2 für die Negativregulation von STAT3 dahin von Bedeutung, dass sie die TNF α -induzierte SOCS3-Expression positiv reguliert. [105]

Zudem kann die MK2 die NF- κ B-Aktivität regulieren, indem sie den Repressor *protein inhibitor of activated STAT1* (PIAS1), welcher an NF- κ B bindet und dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor vermindert, phosphoryliert und seine negative Regulation von NF- κ B aufhebt. [106]

In Makrophagen, welche mit LPS behandelt wurden, verhindert die MK2 ebenfalls eine negative Regulation der *interferon regulatory factor 3* (IRF3) Expression durch die *MAPK-activated protein kinase 3* (MK3). IRF3 und die NF- κ B-Untereinheit p65 sind wichtige Bestandteile eines Transkriptionskomplexes, der die Expression von IFN β , welches in einer weiterführenden Signalkaskade zur Induktion von STAT3 führt, verstärkt. Die Induktion von STAT3 führt hierbei jedoch zu einer Verminderung der Produktion proinflammatorischer Zytokine. Außerdem moduliert die MK2 eine konforme NF- κ B Kerntranslokation, indem sie die MK3 an der Induktion der Degradierung der inhibitorischen Untereinheit von NF- κ B, IKK β , hindert. [107]

1.9 Zusammenfassung der Fragestellung und Zielsetzung

Die MK2 ist in essentiellen Signaltransduktionskaskaden beim Inflammationsgeschehen involviert und spielt eine wesentliche Rolle bei der Modulation von Entzündungsantworten durch die Regulation von Transkriptstabilität, Modifikation von Transkriptionsfaktoren und Interaktion mit regulatorischen Proteinen. Die Bedeutung der MK2 für die Orchestrierung der Zytokinproduktion in Immunzellpopulationen und hierbei insbesondere in Monozyten und Makrophagen ist gut untersucht. Wenig hingegen ist bislang über die Zelltyp-spezifische Bedeutung der MK2 in Hepatozyten und der Regulation der hepatozytären Akute-Phase-Protein Synthese bekannt. Dr. Maximilian Hahnel konnte in seiner Forschungsarbeit (Dissertation): *Intrahepatische Charakterisierung der LPS induzierten Akute-Phase Reaktion unter dem Einfluss der MK2* basal und an LPS-stimulierten Wildtyp und MK2^{-/-} Mäusen einen Anstieg der Hepcidin-Konzentration im Blutserum der MK2^{-/-} Tiere im Vergleich zu Wildtyp Tieren nachweisen. [108] Dies lässt die Involvierung der MK2 in die basale und APP-induzierte Hepcidinregulation und daraus resultierende Eisenregulation beim Entzündungsgeschehen vermuten.

Ziel der Arbeit ist es, zur Aufklärung der Mechanismen beizutragen, wie die MK2 die Expression von Hepcidin im Rahmen einer Entzündungsreaktion reguliert, wobei ein besonderes Augenmerk auf die möglichen Einflüsse der MK2 auf die transkriptionelle Regulation des Hepcidin Gens gerichtet ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1: Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Firma	Sitz
Acrylamid	Applichem	Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva	Heidelberg
BSA	PAA-Laboratories	Linz, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie	München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich Chemie	München
Western Lightning Plus-ECL	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
EGTA (Triplex VI)	Merck	Darmstadt
Hanks-Puffer ohne Ca^{2+} Mg^{2+}	Biochrom	Berlin
Ketavet	Pfizer	New York, USA
Nuclease freies Wasser	Promega	Mannheim
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Biorad	München
Rompun	Bayer Healthcare	Leverkusen
SYBR Green PCR Master Mix	Promega	Darmstadt
TEMED	Sigma Aldrich Chemie	München
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie	München

Weitere Chemikalien, die nicht aufgelistet sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) oder Sigma Aldrich (München) bezogen und wiesen den Reinheitsgrad *pro analysi* auf.

2.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien

Tabelle 2.2: Zellkulturmedien und Reagenzien

Bezeichnung	Firma	Sitz
Collagen Typ I	Roche Diagnostics	Mannheim
Collagenase CLSII	Biochrom	Berlin
Dexamethason	Sigma Aldrich Chemie	München
DMEM 1000 g/L Glucose	Biochrom	Berlin
DMEM/Ham's F-12	Biochrom	Berlin
FCS	Gibco Life Technology	Karlsruhe
Glutamin	Gibco Life Technology	Karlsruhe
PBS ohne Ca^{2+} Mg^{2+}	Biofroxx	Einhausen
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technology	Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Cytogen	Sinn-Fleischbach

2.1.3 Reagenzien und Feinchemikalien

Tabelle 2.3: Reagenzien und Feinchemikalien

Bezeichnung	Firma	Sitz
5x siRNA Puffer	Dharmacon	Lafayette, USA
Actinomycin D	Sigma Aldrich Chemie	München
DharmaFECT 1	Dharmacon	Lafayette, USA
Humane MK2 (MAPKAPK2) siRNA	Dharmacon	Lafayette, USA
IKK2-Inhibitor	Merck	Darmstadt
JNK1-Inhibitor	Merck	Darmstadt
LPS (<i>E. coli</i>)	Sigma	Taufkirchen
Non-Targeting siRNA	Dharmacon	Lafayette, USA
OptiMEM	Gibco Life Technology	Karlsruhe
U0126 (MEK-Inhibitor)	Promega	Mannheim

2.1.4 Kits

Tabelle 2.4: Verwendete Kits

Bezeichnung	Firma	Sitz
Maxwell 16 KLEV simplyRNA Tissue Kit	Promega	Mannheim
QIAshredder	Qiagen	Hilden
QuantiTect Reverse Transkription Kit	Qiagen	Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden

2.1.5 Real Time qPCR Primer, human

Tabelle 2.5: Oligonukleotide für die Real Time qPCR (Sequenzangaben von 5' → 3')

Zielgen	Sequenz vorwärts	Sequenz rückwärts
Alpha-2-Makroglobulin (<i>A2M</i>)	CTGGTTCTTCTCCTCTTGGTCC	ACACAGCCCTTCTCAGTGGT
Beta-Actin (<i>ACTB</i>)	CAGCAAGCAGGAGTATGACG	AAAGCCATGCCAATCTCATC
Hepcidin (<i>HAMP1</i>)	CAACAGACGGGACAACCTTGC	AGCAGAAAATGCAGATGGGGA

2.1.6 Real Time qPCR Primer, murin

Tabelle 2.6: Oligonukleotide für die Real Time qPCR (Sequenzangaben von 5' → 3')

Zielgen	Sequenz vorwärts	Sequenz rückwärts
Hepcidin (<i>Hamp1</i>)	TTTGCACGGGGAAGAAAGCA	GTGGCTCTAGGCTATGTTTTGC
Hepcidin Intron-Exon-Spaning-Primer (<i>Hamp1</i>)	CCTCCCTGATCCCCAGCC	GTGGCTCTAGGCTATGTTTTGC
Succinat-Dehydrogenase (<i>Sdha</i>)	TGGGGAGTGCCGTGGTGTCA	GTGCCGTCCCCTGTGCTGGT
Suppressor of cytokine signaling 3 (<i>Socs3</i>)	GCTCCAAAAGCGAGTACCAGC	AGTAGAATCCGCTCTCCTGCAG
Tristetraprolin (<i>Ttp</i>)	TTTCCCCTTCTGCCTTCTCT	TGGTGCTGGGGGTAGTAGAC

2.1.7 Primärantikörper

Tabelle 2.7: Primärantikörper

Bezeichnung	Firma	Sitz
GAPDH	Biorbyt	Cambridge, Großbritannien
MAPKAPK2	Cell Signalling	Danvers, USA
Phospho-Tyr705-STAT3	Cell Signaling	Danvers, USA
STAT3 (C-20)	Santa Cruz	Santa Cruz, USA

2.1.8 Sekundärantikörper

Tabelle 2.8: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Firma	Sitz
Kaninchen anti Maus IgG, HRP	Dako	Hamburg
Ziege anti Kaninchen IgG, HRP	Dako	Hamburg

2.1.9 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Zytokine und Wachstumsfaktoren in Aliquotiermedium (DMEM inkl. 0,1 % BSA) angesetzt.

Tabelle 2.9: Zytokine und Wachstumsfaktoren

Bezeichnung	Firma	Sitz
IL6 human	Roche	Mannheim
IL1- β human	Roche	Mannheim
IL6 murin	PeproTech	Hamburg
IL1- β murin	PeproTech	Hamburg
M-CSF	PeproTech	Hamburg

2.1.10 Geräte, Software, spezielle Materialien

Tabelle 2.10: Geräte, Software, spezielle Materialien

Bezeichnung	Firma	Sitz
6-Well Platten	Falcon	Heidelberg
15 ml Falcon Tube	Falcon	Heidelberg
50 ml Falcon Tube	Falcon	Heidelberg
25 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner	Solingen
75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner	Solingen
175 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner	Solingen
Abbocath Kanülen	Venisystems, Hospira	München
Blottingkammer	Biorad	München
CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific	Schwerte
ChemiDoc MP Image-Station	Biorad	München
Elektrophoresekammer	Biorad	München
Eppendorf Tubes	Eppendorf	Hamburg
Hybond P 0.45 PVDF-Membran	GE Healthcare	Solingen
MicroAmp Optical 96-Well Reactions Platten	Thermo Scientific	Schwerte
Nanodrop	NanoDrop Technologies	Wilmington, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand	Wertheim
pH-Meter	WTW	Weilheim
Sterilfilter	Millipore	Eschborn
Thermoblock	Eppendorf	Hamburg
Ultrospec Photometer	Scintec Instruments	Amersham
ViiA7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems	Darmstadt
Whatman-Paper	Schleicher-Schuell	Dassel
Zellschaber	BD Falcon	Heidelberg
Zentrifugen	Eppendorf	Hamburg

2.1.11 Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders vermerkt, wurde für alle Lösungen destilliertes Wasser (H₂O) verwendet.

2.1.11.1 Hepatozytenpräparation

Tabelle 2.11: Hanks-Puffer

Hanks-Puffer	Menge	Konzentration	Stoff
	1 l		H ₂ O
	8 g	137 mM	NaCl
	0,4 g	5,4 mM	KCl
	3,57 g	15 mM	HEPES
	0,06 g	0,3 mM	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
	0,06 g	0,4 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,4; autoklaviert			

Tabelle 2.12: Hanks-Puffer I

Hanks-Puffer I	Menge	Konzentration	Stoff
	200 ml		Hanks-Puffer
	800 µl	8 µM	EGTA (2 mM)
	2 ml	0,0002 %	Glucose (0,1 %)

Tabelle 2.13: Hanks-Puffer II

Hanks-Puffer II	Menge	Konzentration	Stoff
	100 ml		Hanks-Puffer
	1 ml	50 µM	CaCl ₂ (5 mM)
	1 ml		Glucose (0,1 %)
	30 mg	≈40 u/ml	Collagenase CLSII
Steril filtriert			

Tabelle 2.14: Adhäsionsmedium

Adhäsionsmedium	Menge	Konzentration	Stoff
	500 ml		Williams Medium E
	50 ml	10 %	Hitzeinaktiviertes FCS
	500 µl	1 pM	Dexamethason (100 nM)
	5 ml	0,001 %	Penicillin/ Streptomycin (1 %)

Tabelle 2.15: Pre-Starvation-Medium

Pre-Starvation-Medium	Menge	Konzentration	Stoff
	500 ml		Williams Medium E
	500 µl	1 pM	Dexamethason (100nM)
	5 ml	0,001%	Penicillin/ Streptomycin (1 %)

Tabelle 2.16: Starvation-Medium

Starvation-Medium	Menge	Konzentration	Stoff
	500 ml		Williams Medium E
	5 ml	0,001 %	Penicillin/ Streptomycin (1 %)

2.1.11.2 Zellkulturmedium für *bone-marrow-derived* Makrophagen (BMDM)

Tabelle 2.17: Spülmedium

Spülmedium	Menge	Konzentration	Stoff
	500 ml		DMEM 1000 g/L Glucose
	5 ml	0,001 %	Penicillin/ Streptomycin (1 %)

Tabelle 2.18: Kulturmedium

Kulturmedium	Menge	Konzentration	Stoff
	500 ml		DMEM 1000 g/L Glucose
	50 ml	10 %	Hitzeinaktiviertes FCS
	5 ml	0,001 %	Penicillin/ Streptomycin (1 %)

Ab Tag 1 nach Knochenmarkspräparation wird dem Medium 10 ng/ml M-CSF pro Well-Kavität zugesetzt

2.1.11.3 Puffer und Lösungen für Proteinisolierung und Western Blot

Tabelle 2.19: Triton-Lysepuffer

Triton-Lysepuffer	Konzentration	Stoff
	136 mM	NaCl
	20 mM	Tris-HCl
	10 %	Glycerin
	2 mM	EDTA
	50 mM	β-Glycerophosphat

20 mM	Na-Pyrophosphat
0,2 mM Pefablock	Pefablock
5 µg/ml	Aprotinin
5 µg/ml	Leupeptin
4 mM	Benzamidin
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 %	Triton X100

pH 7,4; gelöst in H₂O; vor dem Gebrauch 0,2 % SDS dazugeben

Tabelle 2.20: 4x SDS-Lämmli-Puffer

4x SDS-Lämmli-Puffer	Menge	Konzentration	Stoff
	2 mg	0,002 %	Bromphenolblau
	40 ml	40 %	Glycerol
	50 ml	5 %	10 % SDS
	25 ml	250 mM	Tris/HCl (pH 6,8)

Gelöst in 100 ml H₂O; vor dem Gebrauch wurden 16 µl β -Mercaptoethanol je 100 µl 4x Lämmli-Puffer dazu gegeben

Tabelle 2.21: 10x Elektrophoresepuffer

10x Elektrophoresepuffer	Menge	Stoff
	25 g	SDS
	75,5 g	Tris
	470 g	Glycin

Gelöst in 5 l H₂O

Tabelle 2.22: Anodenpuffer I

Anodenpuffer I	Menge	Konzentration	Stoff
	72,68 g	0,3 M	Tris
	400 ml	20 %	Methanol

Gelöst in 2 l H₂O

Tabelle 2.23: Anodenpuffer II

Anodenpuffer II	Menge	Konzentration	Stoff
	6,057 g	0,025 M	Tris
	400 ml	20 %	Methanol

Gelöst in 2 l H₂O

Tabelle 2.24: Kathodenpuffer

Kathodenpuffer	Menge	Konzentration	Stoff
	10,4 g	0,04 M	6-Aminocaprinsäure
	400 ml	20 %	Methanol
Gelöst in 2 l H ₂ O			

Tabelle 2.25: 10x TBS Puffer

10x TBS	Menge		Stoff
	120 g		Tris
	435 g		NaCl
pH 7,6; gelöst in 5 l H ₂ O			

Tabelle 2.26: TBST Puffer

TBST	Menge	Konzentration	Stoff
	500 ml		10x TBS
	5 ml	0,1 %	Tween 20
Gelöst in 5 l H ₂ O			

Tabelle 2.27: Stripping-Puffer

Stripping-Puffer	Menge	Konzentration	Stoff
	6,25 ml	62,5 mM	1 M Tris-HCl
	20 ml	2 %	10 % SDS
pH 6,7; vor dem Gebrauch 39 µl β-Mercaptoethanol auf 5 ml Stripping-Puffer dazugeben			

2.1.12 Zellen, Zelllinien

Tabelle 2.28: Zellen, Zelllinien

Bezeichnung	Erhalten von	Sitz
Wildtyp-Makrophagen aus dem Knochenmark stammend	Mäuse aus Zentraltierhaltung Universität Düsseldorf	Düsseldorf
HepG2 Zellen	DSMZ	Braunschweig
Primäre murine IL1R ^{-/-} Hepatozyten	Mäuse aus ZETT Universität Düsseldorf	Düsseldorf
Primäre murine IL6R ^{-/-} Hepatozyten	Mäuse aus ZETT Universität Düsseldorf	Düsseldorf
Primäre murine MK2 ^{-/-} Hepatozyten	Mäuse aus ZETT Universität Düsseldorf	Düsseldorf
Primäre murine Wildtyp	Mäuse aus ZETT	Düsseldorf

2.1.13 Versuchstiere und Tierversuchsgenehmigung

Männliche C57BL/6J MK2-defiziente (MK2^{-/-}) Mäuse wurden von Prof. Gaestel (Institut für Biochemie; Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

Männliche C57BL/6J IL1R-defiziente (IL1R^{-/-}) Mäuse wurden erworben von der Firma Jackson Lab (Bar Harbor, ME USA).

Männliche C57BL/6J IL6R-defiziente (IL6R^{-/-}) Mäuse wurden von Prof. Scheller (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Männliche C57BL/6J Wildtyp-Mäuse wurden von der Firma Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) erworben. Ebenfalls wurden männliche C57BL/6J Wildtyp-Mäuse als Wurfgeschwister aus den MK2^{-/-} Stämmen bezogen.

Die Tierhaltung erfolgte unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in der Zentraltierhaltung der Universität Düsseldorf. Die Haltungsbedingungen entsprachen einem 12 Stunden Tag/Nacht- Zyklus, 22 °C Raumtemperatur, 50 % Luftfeuchtigkeit und freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Für die Hepatozyten- und Makrophagenpräparation wurden Tiere im Alter von 8-16 Wochen verwendet.

Die Teilnahme am Versuchstierkudkurs ist erfolgt und eine Tierversuchsgenehmigung (27.03.2014) ist vorhanden. Eine Ausnahmegenehmigung zum Einschluss in den laufenden Tierversuchsantrag ist ebenfalls vorhanden (Aktenzeichen der Ausnahmegenehmigung: 39/11-102_7 HHU; Aktenzeichen des Tierversuchsantrags: 84-02.04.2013.A464).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Arbeiten

2.2.1.1 Kultivierung von HepG2 Zellen

Die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2 (Tab. 2.28) ist eine hepatozelluläre Linie, welche eine Verdopplungszeit von 30-40 h besitzt. Nach Auftauen aus dem Kryolager, wo die Zellen bei -178 °C gelagert wurden, erfolgte die Kultivierung zuerst in 25 cm² Flaschen, dann in 75 cm² Flaschen und zuletzt 150 cm² Flaschen (Tab. 2.10) in DMEM/Ham's F-12 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin, ohne Antibiose mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) (Tab. 2.2) im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂-wassergesättigter Atmosphäre. Medienwechsel erfolgte alle 24 h.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90 %/Flasche bzw. einer Zellzahl von $18 \cdot 10^6$ Zellen/150 cm² Flasche kultiviert, anschließend 2-mal mit PBS ohne Ca²⁺ Mg²⁺ gewaschen und mit Trypsin/EDTA gelöst (Tab. 2.2). Durch Zugabe von DMEM/Ham's F-12 wird das Trypsin stark verdünnt, die Zellsuspension in ein 50 ml-Falcon Tube übertragen und bei 4 °C bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert (Tab. 2.10).

Das Medium wurde dann abgesaugt und das Pellet erneut zuerst in 1 ml und dann in 10-20 ml DMEM/Ham's F-12 resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Anfärbung mit Trypanblau und Auszählung der lebenden Zellen in einem Hämocytometer nach Neubauer (Tab. 2.10). Im Folgenden wurden die Zellen wieder auf 2-3 neue 150 cm² Flaschen zur weiteren Kultivierung oder auf 6-Well Platten (Tab. 2.10) zu $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Kavität für anschließende Versuche ausgesät.

2.2.1.2 siRNA Transfektion in HepG2 Zellen

Bei der Transfektion handelt es sich um beabsichtigtes Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen mittels nichtviraler Methoden.

Für das Einbringen der humanen MK2 (MAPKAPK2) siRNA in HepG2 Zellen wurde eine chemische Methode mit kationischen lipid- oder polymerbasierten Reagenzien DharmaFECT 1 (Tab. 2.29) gewählt. Diese können mit Nukleinsäuren Liposomen bilden, welche mit der Zellmembran interagieren, was zur Endocytose des Liposoms und somit zum Einschleusen der siRNA in die Zelle führt.

Da die anschließenden Versuche nach der Transfektion auf 6-Well-Platten erfolgten, wurde mit je $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Well-Kavität eine Endkonzentration von 25 nM siRNA benötigt. Die Reagenzien wurden somit in ihrer Menge je nach benötigter Menge vorbereitet bzw. vorgelegt.

Tabelle 2.29: Stoffe und Reagenzien für die Transfektion

Menge/Well-Kavität	Reagenz, Stoff
$3 \cdot 10^5$	HepG2 Zellen
10 µl	5 µM siRNA gelöst in 1x siRNA Puffer
2,5 µl	DharmaFECT 1
197,5 µl	OptiMEM im Falcon Tube (13 ml-Reaktionsgefäß)

190 µl	OptiMEM für siRNA im Eppendorf Tube (1,5 ml Reaktionsgefäß)
2000 µl	Endvolumen mit Zellsuspension in DMEM/Ham's F-12

Zuerst wurde je 5 µM MK2 (MAPKAPK2) siRNA gelöst in 1x siRNA Puffer und 5 µM Non-Targeting siRNA gelöst in 1x siRNA Buffer jeweils mit OptiMEM (Tab. 2.3) in Eppendorf Tubes vermengt und anschließend mit OptiMEM und DharmaFECT in 50 ml Falcon Tubes für 40 min inkubiert.

Während der Inkubationszeit der Transfektionsreagenzien wurden HepG2 Zellen wie oben beschrieben (Abschnitt 2.2.1.1) gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert und ihre Zellzahl wurde bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml mit DMEM/Ham's F-12 eingestellt.

Das Transfektionsreagenz mit OptiMEM, DharmaFECT und je MK2 siRNA oder Non-Targeting siRNA wurde nach Ablauf der 40 min im 50 ml Falcon Tube im Verhältnis 2:3 mit der Zellsuspension vermengt, sodass eine Endkonzentration von 3×10^5 Zellen/ml vorhanden war.

Anschließend wurde die Zellsuspension mit je MK2 siRNA oder der Non-Targeting siRNA auf unterschiedliche 6-Well Platten mit je 1 ml/Kavität verteilt. Dann wurde nochmals 1 ml DMEM/Ham's F-12 in jede Kavität hinzugefügt und die Zellsuspensionen in den 6-Well-Platten über 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach 6 h erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS ohne Ca^{2+} Mg^{2+} und darauffolgendem Medienwechsel zu DMEM/Ham's F-12.

Nach 24 h erfolgte ebenfalls ein Medienwechsel. Die Versuche wurden 48 h nach Transfektion durchgeführt. Ebenfalls wurden 48 h nach Transfektion Proteinlysate von mit MK2 siRNA und Non-Targeting siRNA transfizierten Zellen für eine spätere Analyse im Western Blot (Abschnitt 2.2.3) gesammelt.

2.2.1.3 Präparation primärer muriner Hepatozyten im Monolayer

Vor der Präparation wurden die Mäuse (Tab. 2.28) mit 2,5 µl Narkosemittel (Tab. 2.1) pro g Körpergewicht durch eine intraperitoneale Injektion sediert. Nach etwa 5 min wurde die Narkosetiefe durch das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes am Tier überprüft und danach mit der Präparation begonnen.

Die Mäuse wurden auf den Rücken gelegt und an den Pfoten fixiert, die Haut und das Peritoneum wurden zum Bauchraum hin mit einer Schere eröffnet. Das Schlauchsystem, bzw. der Katheter, durch welchen die Leber des Tieres später durchspült wurde, wurde mit dem ersten Perfusionspuffer HANKS-Puffer I (Tab. 2.12) luftblasenfrei gefüllt, um eine Luftembolie bei der Perfusion zu verhindern.

Nach Freilegung der *Vena portae hepatis* wurde diese mit einer Abbocath (24 G) Kanüle (Tab. 2.10) perfundiert, die mittels Klemme fixiert war. Ein Entlastungsschnitt wurde an der *Aorta abdominalis* gesetzt, damit das Perfusat ablaufen konnte und ein Druckanstieg verhindert wurde.

Die Perfusion wurde mit HANKS-Puffer I (37 °C, 8 ml/min) begonnen, bis jegliches Blut aus der Leber ausgespült wurde. Dann wurde die Perfusion mit HANKS-Puffer II (Tab. 2.13) (37 °C, 8 ml/min) fortgesetzt. Die im Puffer enthaltene Collagenase führt

zu einer Digestion der extrazellulären Matrix der Leber und somit zur Schwellung der jenen.

Die Leber wurde daraufhin entnommen und in einem 50 ml Falcon Tube mit auf 37 °C vorgewärmtem Attachment Medium (Tab. 2.14) für einige Minuten gelagert. Anschließend wurde die Leber mit Medium in eine sterile Kristallisierschale überführt, die Leberkapsel wurde mit einer Pinzette eröffnet und durch Schwenken der Schale wurden die Leberzellen ausgeschwemmt.

Die Zellsuspension wurde dann über ein Zellsieb mit 70 µm Porengröße in ein 50 ml Falcon Tube filtriert und daraufhin 3-mal bei Raumtemperatur bei 500 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Medium wurde stets abgesaugt und das Pellet erneut in 10 ml Attachment Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung durch Anfärbung mit Trypanblau und Auszählung der lebenden primären murinen Hepatozyten (PMH) in einem Häemocytometer nach Neubauer.

Die Subkultivierung erfolgte zu $3 \cdot 10^5$ Zellen auf collagenbeschichtete 6-Well-Platten. Diese wurden vor der Ausplattierung mit flüssigem Collagen Typ I (Verdünnung 1:100 mit sterilem Wasser) mit je 2-3 ml beschichtet, 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und bis zum Ausbringen der Zellen bei 4 °C gelagert.

Die Inkubation der Zellsuspension in den 6-Well-Platten erfolgte 3-4 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Dann wurden die Zellen 3 Mal mit PBS ohne Ca²⁺ Mg²⁺ gewaschen und in 2 ml/Kavität Pre-Starvation-Medium (Tab. 2.15) über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Versuche wurden 16 h nach der Präparation durchgeführt. 3 h vor Beginn des jeweiligen Versuchs wurden die Zellen nochmal 2-mal mit PBS gewaschen und dann in 1 ml bzw. 2 ml Starvation-Medium (Tab. 2.16) inkubiert.

2.2.1.4 Knochenmarkspräparation und Differenzierung von *bone-marrow-derived* Makrophagen

Vor der Präparation wurden die Mäuse (Tab. 2.28) wie oben beschrieben mit 2,5 µl Narkosemittel pro g Körpergewicht durch eine intraperitoneale Injektion sediert. Nach etwa 5 min wurde die Narkosetiefe durch das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes am Tier überprüft und danach mit der Präparation begonnen. Den Mäusen wurden die Haut und Muskeln an den Hinterbeinen mit einer Schere und Pinzette abpräpariert und die Beine aus dem Hüftgelenk herausgedreht und abgetrennt. Ober- und Unterschenkelknochen wurden durch Drehung separiert und in 6 cm Gewebekulturschalen mit PBS ohne Ca²⁺ Mg²⁺ gelagert. Anschließend wurden Ober- und Unterschenkelknochen unter sterilen Bedingungen 3 min mit 70 % Ethanol desinfiziert, in PBS gespült und wieder für 3 min in eine 6 cm Gewebekulturschale mit Spülmedium (Tab 2.2; Tab. 2.17) überführt. Dort wurde das Knochenmark mit einer 23 G Kanüle aus dem Knochen mit DMEM ausgespült.

Das Knochenmark wurde im Medium resuspendiert, die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon Tube überführt und bei 4 °C bei 1.200 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Medium wurde dann abgesaugt und das Pellet in 20 ml DMEM 1000 g/L Glucose mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 5 % Pen/Strep (Kulturmedium) (Tab. 2.18) resuspendiert. Die Zellsuspension mit den *bone-marrow-derived* Makrophagen (BMDM) wurde in 175 cm² Zellkulturflaschen überführt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Am nächsten Tag (Tag 1) wurden die nicht adhärenenten Zellen durch kräftiges Spülen resuspendiert, abpipettiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und in 15 cm² Zellkulturschalen mit einem Endvolumen von 20 ml Kulturmedium mit 10 ng/ml M-CSF (Tab. 2.2; Tab. 2.18) überführt. An Tag 3 fand ohne Medienwechsel pro 15 cm² Zellkulturschale eine Volumenverdopplung mit Kulturmedium und 10 ng/ml M-CSF auf insgesamt 40 ml und an Tag 7 eine Volumenerhöhung bis 45 ml mit 10 ng/ml M-CSF statt.

An Tag 8 wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA für 15-30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Die Zellsuspension wurde wie oben beschrieben zentrifugiert, resuspendiert und die Zellzahl durch Anfärbung mit Trypanblau und Auszählung der lebenden Zellen in einem Hämocytometer nach Neubauer bestimmt.

2.2.1.5 Stimulation primärer muriner Hepatozyten mit BMDM-Überstand

Zur Generierung des *bone-marrow-derived* Makrophagenüberstandes wurden die BMDM wie oben beschrieben (Abschnitt 2.2.1.4) präpariert, differenziert und auf 6-Well-Platten mit je 6*10⁵ Zellen/Kavität in 1 ml Kulturmedium mit 10 ng/ml M-CSF/Kavität kultiviert.

Alternativ wurden bis Tag 8 nach Präparation differenzierte und bei -178 °C gelagerte BMDM verwendet. Diese wurden nach dem Auftauen in 10 ml Kulturmedium überführt und bei 4 °C bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Lebendzellzählung und die Aussaat auf 6-Well-Platten mit je 6*10⁵ Zellen/Kavität in 1 ml Kulturmedium mit 10 ng/ml M-CSF/Kavität mit Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre.

3 h vor Beginn der Makrophagenstimulation erfolgte nochmals ein Medienwechsel mit Kulturmedium und 10 ng/ml M-CSF/Kavität.

Zur Versuchsdurchführung wurden die Makrophagen in 3 Kavitäten der 6-Well-Platten durch Zugabe von 10 ng/ml LPS (*E. coli*) (Tab. 2.3.) und Inkubation im Brutschrank über 16 h stimuliert. Die Makrophagen in den anderen 3 Kavitäten dienten der Kontrolle und wurden nicht mit LPS behandelt.

Anschließend wurde das Medium abgenommen, zusammengeführt, wie oben beschrieben zentrifugiert (das Pellet wurde verworfen), aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die primären murinen Hepatozyten in Monokultur (Abschnitt 2.2.1.3) wurden 3 h vor der Stimulation 2-mal mit PBS ohne Ca²⁺ Mg²⁺ gewaschen und anschließend wurde 1 ml Starvation-Medium zugesetzt. Bei dem Stimulationsversuch wurde dem Versuchsansatz ohne Medienwechsel 1 ml BMDM-Überstand von mit LPS stimulierten oder nicht stimulierten Makrophagen hinzugegeben und die Zellen über einen Zeitraum von 1 h, 3 h, 4 h, 6 h und 10 h inkubiert. Ebenfalls wurden Kontrollproben ohne jegliche Zugabe von Überstand generiert. Nach Beendigung des Versuches wurde das Medium abgesaugt und die RNA der primären murinen Hepatozyten isoliert (Abschnitt 2.2.2).

2.2.1.6 Stimulation primärer muriner Hepatozyten und HepG2 Zellen mit IL1- β und IL6

2.2.1.6.1 Stimulation primärer muriner Hepatozyten

Die primären murinen Hepatozyten wurden auf 6-Well-Platten zu $3 \cdot 10^5$ Zellen/Kavität in Monokultur (Abschnitt 2.2.1.3) ausgesät. 3 h vor der Stimulation wurden die Zellen 2-mal mit PBS ohne Ca^{2+} Mg^{2+} gewaschen und anschließend wurde Starvation-Medium zugesetzt.

Bei dem Stimulationsversuch wurden die Versuchsansätze ohne Medienwechsel mit 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml murinem IL1- β (Tab. 2.9) oder 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml murinem IL6 (Tab. 2.9) über einen Zeitraum von 1 h, 3 h und 6 h stimuliert. Zusätzlich wurden Proben ohne Medienwechsel mit 1 ng/ml murinem IL1- β über einen Zeitraum von 1 h, 3 h und 6 h stimuliert und mit murinem IL6 in einer variablen Konzentration von 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml über einen Zeitraum von 1 h, 3 h und 6 h costimuliert. Kontrollproben wurden nicht stimuliert. Nach Beendigung des Versuches wurde das Medium abgesaugt und die RNA der primären murinen Hepatozyten isoliert.

Außerdem wurden Proben ohne Medienwechsel mit 1 ng/ml murinem IL1- β oder 10 ng/ml murinem IL6 über einen Zeitraum von 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min und 80 min stimuliert. Kontrollproben wurden nicht stimuliert. Nach Beendigung des Versuches wurde das Medium abgesaugt und Protein aus den primären murinen Hepatozyten (Abschnitt 2.2.3) isoliert.

2.2.1.6.1.1 Stimulation primärer muriner Hepatozyten unter Verwendung von Inhibitoren

Die primären murinen Hepatozyten wurden auf 6-Well-Platten zu $3 \cdot 10^5$ Zellen/Kavität in Monokultur ausgesät. 3 h vor Behandlung mit Inhibitoren wurden die Zellen 2-mal mit PBS ohne Ca^{2+} Mg^{2+} gewaschen und anschließend wurde Starvation-Medium zugesetzt.

Den Versuchsansätzen wurde 10 μM in DMSO (Tab. 2.1) gelöster MEK-Inhibitor U0126, IKK2-Inhibitor oder JNK1-Inhibitor (Tab. 2.3) und/oder 2 μl DMSO als Kontrolle über einen Zeitraum von 1 h zugesetzt.

U0126 ist ein Inhibitor gegen MEK1/2 und blockiert somit die Aktivierung deren Downstream-Targets ERK1/2. IKK2 ist eine Protein-Untereinheit der I κ B-Kinase, welche im Kontext der Entzündungsantwort nach proteasomaler Degradation den Transkriptionsfaktor NF- κ B freisetzt. JNK1 gehört ebenfalls zur Familie der MAP-Kinasen und aktiviert bei der Signaltransduktion den Transkriptionsfaktor AP-1.

Anschließend wurden die Versuchsansätze ohne Medienwechsel mit 1 ng/ml murinem IL1- β oder 5 ng/ml murinem IL6 über einen Zeitraum von 3 h und 6 h stimuliert. Kontrollproben wurden nicht stimuliert. Nach Beendigung des Versuches wurde das Medium abgesaugt und die RNA der primären murinen Hepatozyten isoliert.

2.2.1.6.2 Stimulation von HepG2 Zellen

Der Stimulationsversuch erfolgte 48 h nach Transfektion der Zellen mit der MK2 (MAPKAPK2) siRNA bzw. Non-Targeting siRNA (Abschnitt 2.2.1.2).

Die Versuchsansätze wurden ohne Medienwechsel mit 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml humanem IL1- β (Tab. 2.9) oder 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml humanem IL6 (Tab. 2.9) über einen Zeitraum von 1 h, 3 h und 6 h stimuliert.

Zusätzlich wurden Proben ohne Medienwechsel mit 0,5 ng/ml humanem IL1- β über einen Zeitraum von 1 h, 3 h und 6 h stimuliert, sowie mit humanem IL6 in einer variablen Konzentration von 0,5 ng/ml, 1 ng/ml und 5 ng/ml über einen Zeitraum von 1 h, 3 h und 6h Stunden stimuliert. Kontrollproben wurden nicht stimuliert. Nach Beendigung des Versuches wurde das Medium abgesaugt und die RNA der HepG2-Zellen isoliert.

2.2.1.7 Decay-Experiment mit primären murinen Hepatozyten und HepG2 Zellen

2.2.1.7.1 Decay-Experiment mit primären murinen Hepatozyten

Bei Decay-Experimenten wird durch Zugabe bestimmter Reagenzien ein sofortiger Transkriptionsstopp in Zellen erreicht. Durch die Analyse der zum jeweiligen Zeitpunkt in den Zellen vorhandenen mRNA-Konzentrationen kann auf die Transkriptstabilität und jeweilige Einflüsse darauf rückgeschlossen werden.

Die primären murinen Hepatozyten wurden auf 6-Well-Platten zu $3 \cdot 10^5$ Zellen/Kavität in Monokultur (Abschnitt 2.2.1.3) ausgesät. 7 h vor der Stimulation wurden die Zellen 2-mal mit PBS ohne Ca^{2+} Mg^{2+} gewaschen und anschließend wurde Starvation-Medium zugesetzt.

Beim Decay-Versuch wurde den Versuchsansätzen über einen Zeitraum von 2 h 5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D (gelöst in Methanol) mit den Wirkungsabständen 20 min, 40 min, 60 min, 80 min, 120 min in 2 ml Starvation-Medium durch Medienwechsel hinzugesetzt.

Actinomycin D ist ein Cytostatikum, welches den sofortigen Transkriptionsstopp in den Zellen hervorruft.

Bei Kontrollproben wurde in denselben Wirkungsabständen ein Medienwechsel mit Starvation-Medium inkl. Methanol (1:2000) durchgeführt.

Parallel zum Decay-Experiment erfolgte ein Stimulationsversuch. Ein Teil der Ansätze wurde 4 h nach Medienwechsel mit 5 ng/ml murinem IL1- β vorbehandelt. Andere Proben wurden parallel zu den Zeitintervallen des Medienwechsels wie oben beschrieben mit 5 ng/ml IL1- β costimuliert. Weitere Proben wurden wie oben beschrieben mit 5 ng/ml IL1- β sowohl vorbehandelt, als auch costimuliert. Bei den Kontrollproben erfolgte keine Stimulation.

Nach Beendigung des Versuches wurde das Medium abgesaugt und die RNA der primären murinen Hepatozyten isoliert.

2.2.1.7.2 Decay-Experiment mit HepG2 Zellen

Der Decay-Versuch erfolgte entweder direkt nach Kultivierung der HepG2 Zellen (Abschnitt 2.2.1.1) oder 48 h nach Transfektion der Zellen mit der MK2 (MAPKAPK2) siRNA bzw. Non-Targeting siRNA (Abschnitt 2.2.1.2).

Direkt nach Kultivierung wurde den Versuchsansätzen über einen Zeitraum von 160 min 5 µg/ml Actinomycin D (gelöst in Methanol) mit den Wirkungsabständen 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 80 min, 100 min, 120 min, 140 min, 160 min, in 2 ml DMEM/Ham's F-12 durch Medienwechsel hinzugesetzt.

Nach erfolgter siRNA Transfektion wurde den Zellen nach 48 h über einen Zeitraum von 160 min 5 µg/ml Actinomycin D (gelöst in Methanol) mit den Wirkungsabständen 40 min, 80 min, 120 min, 160 min, in 2ml DMEM/Ham's F-12 durch Medienwechsel hinzugesetzt. Als Kontrollen dienten jeweils Ansätze, bei denen in denselben Wirkungsabständen ein Medienwechsel mit DMEM/Ham's F-12, welches als Lösungsmittelkontrolle zugesetztes Methanol (0,5 µl/ml Medium) enthielt, durchgeführt wurde. Nach Beendigung des jeweiligen Versuches wurde das Medium abgesaugt und die RNA der HepG2-Zellen isoliert.

2.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.2.1 RNA Isolierung und Quantifizierung

Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit oder das Maxwell 16 KLEV simplyRNA Tissue Kit (Tab. 2.4) verwendet.

Bei dem RNeasy Mini Kit wurden die Zellen in den 6-Well-Kavitäten nach Absaugen des Mediums in 300 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol aufgeschlossen und mit einem Zellschaber (Tab. 2.10) abgeschabt. Die Zellsuspension wurde auf QIAshredder-Säulen (Tab. 2.4) pipettiert und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen auf Säulen des RNeasy Mini Kits übertragen und die Zellen weiter gemäß der Herstellerangaben aufgearbeitet. Elution der RNA in Eppendorf Tubes erfolgte in 50 µl Nuclease freiem Wasser (Tab 2.1).

Bei dem Maxwell 16 KLEV simplyRNA Tissue Kit wurden die Zellen in den 6-Well-Kavitäten nach Absaugen des Mediums in 200 µl Homogenization Solution mit Thioglycerol aufgeschlossen und mit einem Zellschaber geerntet. Nach Zugabe von je 200 µl Lyse-Puffer wurden die Zellsuspensionen auf entsprechende Cartridges übertragen und die RNA im Maxwell RCS System (Tab. 2.10) nach Herstellerangaben extrahiert. Elution der RNA in Promega Tubes (0,5 µl Reaktionsgefäß) erfolgte in 30-50 µl Nuclease freiem Wasser.

Die RNA wurde bei -80 °C gelagert und die Quantifizierung der RNA erfolgte am Nanodrop (Tab. 2.10).

2.2.2.2 cDNA Synthese und Reverse Transkription

Für weitere Untersuchungen wurden jeweils 1 µg RNA mit dem QuantiTect Reverse Transkription Kit (Tab. 2.4) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Je eine Probe wurde zur Qualitätskontrolle (Prüfung der Spezifität der cDNA Synthese)

parallel ohne Zugabe von reverser Transkriptase nach dem Protokoll verarbeitet und anschließend im Real Time PCR System (Tab 2.10) mit den anderen Proben analysiert (Abschnitt 2.2.2.3). Die transkribierten Proben wurden mit Nuclease freiem Wasser auf ein Endvolumen von 120 µl aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Analyse mit dem Realtime quantitativen Polymerase-Kettenreaktionsverfahren

Zur Vervielfältigung und gleichzeitigen quantitativen Analyse von cDNA eignet sich das Realtime quantitative Polymerase-Kettenreaktionsverfahren (RT-qPCR), welches auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht. Die DNA wird in 40 Zyklen amplifiziert, gleichzeitig werden Fluoreszenz-Messungen zur quantitativen Analyse durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensität wurde mit dem Reagenz *SYBR Green* (Tab. 2.1) gemessen, welches sich, als interkalierender Farbstoff, in die DNA einlagert. Die Stärke des Signals pro Zyklus (ΔCT Methode) variiert somit in Abhängigkeit von der Menge der amplifizierten DNA in der Probe.

Die Anregung des Farbstoffes erfolgte bei der Wellenlänge λ 494 nm und das emittierte Licht wurde bei der Wellenlänge λ 521 nm im *ViiA7 Real Time* System (Tab. 2.10) in *MicroAmp Optical 96-Well Reactions* Platten (Tab. 2.10) gemessen.

Die Reaktion fand in einem Endvolumen von 25 µl mit einer cDNA-Konzentration von 10 ng (Abschnitt 2.2.2.2), und einer Konzentration des jeweiligen Primerpaares (Tab. 2.5 und 2.6) von je 400 nM statt.

Die Amplifikation im *ViiA7 Real Time* System erfolgte standardisiert wie in Tab. 2.30 dargestellt.

Tabelle 2.30: Amplifikationsprogramm

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenzahl	Phase
95	600	1	Beginn, Denaturierung
95	16	40	Denaturierung
60	60	40	Annealing, Elongation
Schmelzkurvenanalyse			

Zur Minimalisierung der Ungenauigkeiten, bedingt durch die Versuchsdurchführung, erfolgte die Quantifizierung stets im Verhältnis zu einem Referenzgen (*Succinat-Dehydrogenase (Sdha)* bei primären murinen Hepatozyten und *Beta Actin (ACTB)* bei HepG2 Zellen).

Durch die Verdopplung der Kopienzahl der Nukleinsäuren im jeweiligen Zyklus wurde über die Potenzierung des ΔCT -Wertes zur Basis 2 ($2^{\Delta CT}$) das Verhältnis der Zahl der Kopien des jeweiligen Genabschnitts in den Proben berechnet und dargestellt.

2.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

2.2.3.1 Protein Isolierung und Quantifizierung nach Bradford

Nach Beendigung der oben beschriebenen Versuche (Abschnitt 2.2.1.2 und 2.2.1.6.1) wurden die Proben in den 6-Well-Kavitäten nach Absaugen des Mediums in 250 µl Triton-Lysepuffer (Tab. 2.19) aufgeschlossen und mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf Tubes übertragen, 10 min auf Eis gehalten und dann bei 4 °C bei 10.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in neue Eppendorf Tubes überführt und das Pellet verworfen. Die Proteinlysate wurden bis zu weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford mit dem Protein Assay Dye Reagent (Tab 2.1) im Ultrospec Photometer (Tab. 2.10) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Messung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Säurefarbstoffes Coomassie-Brilliantblau nach Bindung an Proteine im sauren Milieu von der Wellenlänge λ 465 nm zu λ 595 nm. Somit wird die Extinktion ΔE_{595} gemessen und daraus die Proteinkonzentration quantifiziert.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine in vertikaler Führung nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wurden 45-60 µg Protein je Probe (Abschnitt 2.2.3.1) mit 4x SDS-Lämmli-Puffer (Tab. 2.20) im Verhältnis 3:1 vermengt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Proben mit 4x SDS-Lämmli-Puffer wurden dann 1 min auf Eis gehalten, bei Raumtemperatur bei maximaler Geschwindigkeit (13.200 rpm) für 10 s abzentrifugiert und bis zum Auftragen wieder auf Eis gehalten. Das Polyacrylamid-Gel besteht aus einem 5 % Sammelgel (Tab. 2.31), welches die Proteine zuerst durchlaufen müssen, um sich in einer Ebene zu konzentrieren, und einem 10 % Trenngel (Tab. 2.32), bei welchem die Proteine anschließend der Größe nach getrennt werden.

Das SDS im Puffer interagiert mit den Proteinen und fördert die Entstehung von Mizellen mit konstanter negativer Ladung, sodass in der Gelelektrophorese nur eine Auftrennung spezifisch nach Größe, aber nicht nach Ladung geschieht.

Tabelle 2.31: Zusammensetzung für 2 Sammelgele

Tabelle 10.1: Zusammensetzung für 2 Sammelgels			
5 % Sammelgel	Volumen	Konzentration	Stoff
	6,8 ml	30 %	H ₂ O
	1,7 ml		Acrylamid
	1,25 ml		Tris pH 6,8
	100 µl		10 % SDS
	100 µl		Ammonium Persulfat
Für die Polymerisation wurden 10 µl TEMED hinzugegeben			

Tabelle 2.32: Zusammensetzung für 2 Trenngele

10 % Trenngel	Volumen	Konzentration	Stoff
	11,8 ml		H ₂ O

10 ml	30 %	Acrylamid
7,6 ml		Tris pH 6,8
300 µl		10 % SDS
300 µl		Ammonium
		Persulfat

Für die Polymerisation 12 µl TEMED hinzugeben

Nach dem Zugabe des Elektrophoresepuffers (Tab. 2.21) in die Elektrophoresekammer (Tab. 2.10) wurden die Proben aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 V (Sammelgel) bzw. 120 V (Trenngel) über einen Zeitraum von ca. 4 h bis 5 h.

Anschließend wurde das Gel auf eine Hybond P 0.45 PVDF-Membran (Tab. 2.10) gelegt, welche zuvor 5 s in Methanol aktiviert/hydratisiert wurde. Das Gel und die PVDF-Membran wurden in einer Blotting-Kammer (Tab. 2.10) zwischen Whatman-Papieren (Tab. 2.10) platziert, wobei 6 Whatman-Papiere unter der Membran an der Anode in Anodenpuffer I, darüber 3 Papiere in Anodenpuffer II und über der PVDF-Membran und dem Gel an der Kathode 6 Papiere in Kathodenpuffer getränkt und gelegt wurden.

Durch die angelegte Stromstärke wurde das Protein aus dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen (1 h bei 0,8 mA/cm²). Danach wurde die Membran kurz in TBST-Puffer (Tab. 2.26) gewaschen und mögliche unspezifische Protein-Antikörper-Wechselwirkungen durch Waschen mit TBST-Puffer +5 % BSA (Tab. 2.1) für 30 min vermieden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tab. 2.7) erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Horizontalschüttler.

Die Membran wurde am nächsten Tag 3-mal für 20 min in TBST-Puffer gewaschen und mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (Tab. 2.8) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder 3-mal für 20 min in TBST-Puffer gewaschen.

Die Lumineszenzreaktion wurde durch Zugabe von je 1 ml der zwei ECL-Lösungen (Tab. 2.1) nach Angaben des Herstellers ausgelöst. Die Detektion erfolgte an der ChemiDoc MP Image-Station (Tab. 2.10).

Für Detektionen mit weiteren Primärantikörpern wurde die Membran 15 min bei 50 °C in Stripping-Puffer gewaschen und dann für 30 min mit TBST-Puffer +5% BSA gewaschen. Anschließend wurde sie 3-mal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper erfolgte wieder über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran wie oben beschrieben gewaschen und das Signal detektiert.

Die densitometrische Auswertung wurde mit dem Programm *ImageJ 1.52a* durchgeführt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm *GraphPad Prism 7* unter Zuhilfenahme des Mann-Whitney U Tests durchgeführt. Die Einstufung der Ergebnisse als signifikant erfolgte bei Erreichen einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Die Kenntlichmachung von Signifikanzen in die unten stehenden Grafiken erfolgte nur mit deren Relevanz für die zu unterstützenden Thesen.

3. Ergebnisse

3.1 Die Hemmung der Induktion der Hamp-mRNA-Expression durch die MK2 findet auf Ebene des Hepatozyten statt

Vorausgegangene Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe haben nachgewiesen, dass die LPS-induzierte Expression von Hamp im Rahmen der Akute-Phase-Antwort in MK2^{-/-} Mäusen verstärkt wird. In genannten Experimenten wurde WT und MK2^{-/-} Mäusen LPS injiziert und unter anderem die Transkriptmenge von Hamp in den Lebern der Tiere bestimmt. [108] Darüber hinaus legten bereits vorangehende Untersuchungen nahe, dass in WT Hepatozyten im Hinblick auf die Induktion der Expression von Hamp keine signifikanten Unterschiede zwischen Überständen bestehen, die durch LPS-stimulierte MK2^{-/-} Makrophagen oder WT Makrophagen konditioniert wurden. Diese Beobachtung legt nahe, dass LPS in Makrophagen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von MK2^{-/-} zur Freisetzung eines Mediatorprofils führt, das in Hepatozyten die Expression von Hamp auf vergleichbare Weise induziert.

Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde in folgenden Versuchen der Frage nachgegangen, ob die MK2 ihre hemmende Funktion auf Ebene des Makrophagen oder im Hepatozyten ausübt. Dafür wurden Makrophagen von WT Mäusen, wie im Materialien und Methoden Teil beschrieben isoliert und mit LPS stimuliert. Der Makrophagenüberstand wurde auf isolierte murine Wildtyp und MK2^{-/-} Hepatozyten gegeben und über verschiedene Zeiträume inkubiert.

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, führt die Deletion der MK2 in Hepatozyten, in Abhängigkeit von der Zeit, zu einer signifikanten Verstärkung der Expression der Hamp-mRNA in Reaktion auf durch LPS-stimulierte WT Makrophagen konditionierte Überstände. Diese Beobachtung legt nahe, dass die MK2 im intrazellulären Signalnetzwerk des Hepatozyten die Hamp-Expression moduliert.

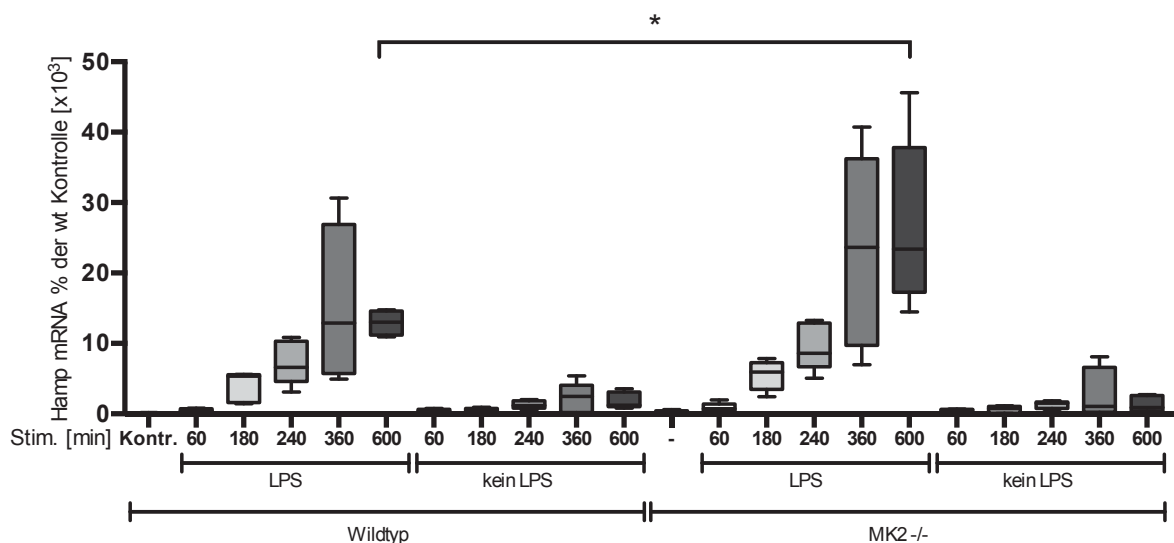


Abbildung 3.1 Die Hemmung der Induktion der Hamp-mRNA-Expression durch die MK2 findet auf Ebene des Hepatozyten statt

Makrophagen von WT Mäusen wurden über einen Zeitraum von 16 h mit LPS stimuliert bzw. dienten der Kontrolle (ohne Zugabe von LPS). WT oder MK2^{-/-} Hepatozyten wurden nachfolgend mit dem so konditionierten Medium über die Zeiträume 60 min, 180 min, 240 min, 360 min und 600 min 1:1

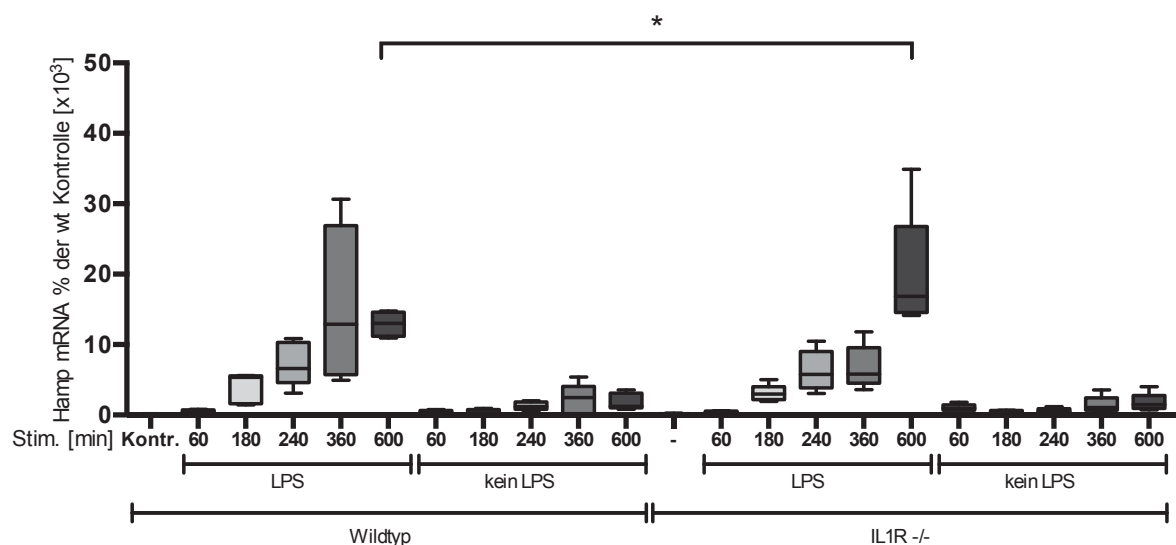
verdünnt inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Daten wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzberechnung erfolgte nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\text{ct}}$, $n=5 \pm \text{SEM}$).

3.2 Die Induktion der Hamp-mRNA-Expression in Hepatozyten durch konditionierte Überstände LPS-stimulierter Makrophagen setzt eine intakte Signalübertragung voraus

Im Rahmen des Inflammationsgeschehens sind bei der Regulation der Hepcidin Expression die Zytokine IL6 und IL1- β und der damit assoziierte JAK/STAT bzw. C/EBP δ oder NF- κ B Signalweg von besonderer Bedeutung (1.3-1.6), dementsprechend soll der Einfluss des Überstands von mit LPS behandelten Makrophagen auf die Hamp-Expression auch in Hepatozyten untersucht werden, die aus den Lebern von IL1R $^{-/-}$ bzw. IL6R $^{-/-}$ Mäusen isoliert wurden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen nahe, dass Signale, die über den IL1R vermittelt werden, in diesem Kontext keinen durchgreifenden modulierenden Einfluss auf die Hamp-mRNA Expression ausüben, da Fehlen des Rezeptors zu einer tendenziellen Reduktion der Hamp-Expression zu den Zeitpunkten 180 min und 360 min, jedoch anschließend zu einer Verstärkung der Expression zum Zeitpunkt 600 min führt. (Abb. 3.2 A) Die Deletion des IL6Ra in Hepatozyten führt zu einem annähernd vollständigen Erliegen der Hamp-Expression in Reaktion auf Überstände von mit LPS behandelten Makrophagen nicht nur in Vergleich zu Wildtyp Hepatozyten (Abb. 3.2 B), sondern auch zu IL1R $^{-/-}$ Hepatozyten. (Abb. 3.2 C) Dies legt nahe, dass die Aktivierung besonders der IL6-induzierten Signalübertragung für die Hamp-Expression in Hepatozyten in Reaktion auf Stimulation mit Überstand von mit LPS behandelten Makrophagen erforderlich ist.

A



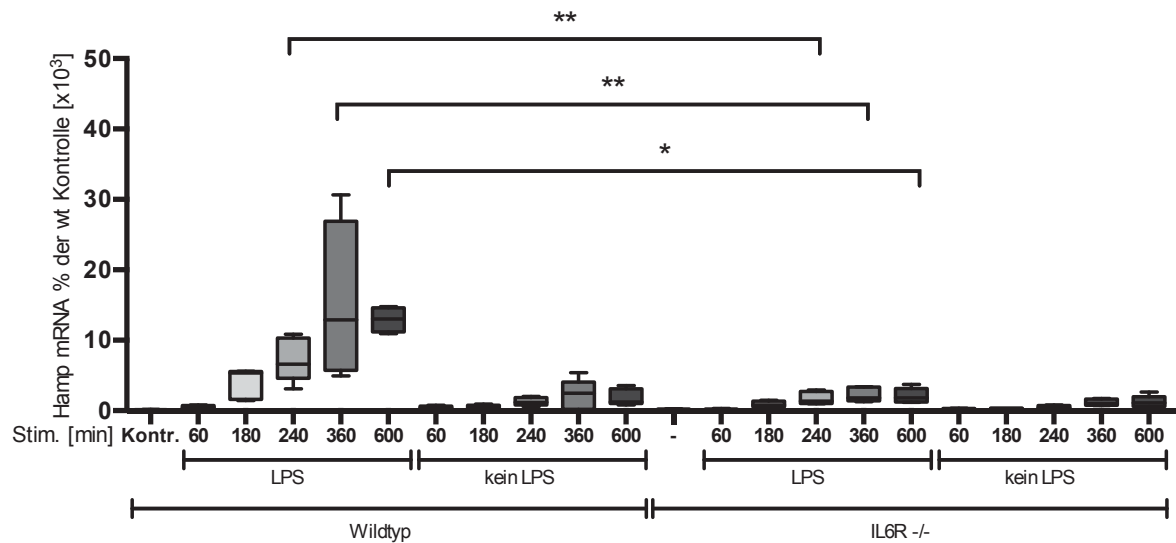
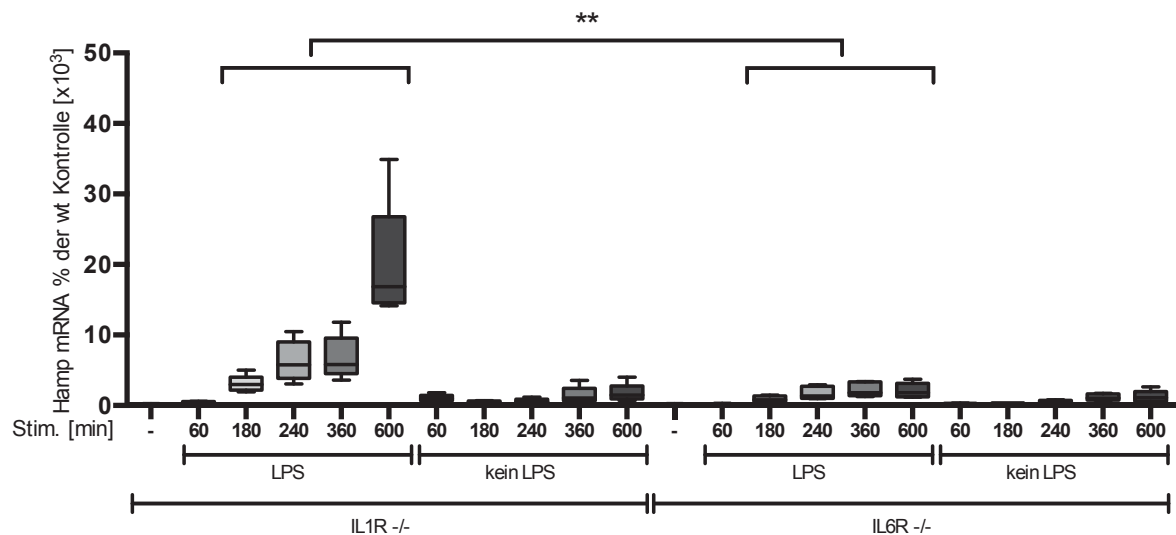
B**C**

Abbildung 3.2 Die Induktion der Hamp-mRNA-Expression in Hepatozyten durch konditionierte Überstände LPS-stimulierter Makrophagen setzt eine intakte Signalübertragung voraus

Makrophagen von WT Mäusen wurden über einen Zeitraum von 16 h mit LPS stimuliert bzw. dienten der Kontrolle (ohne Zugabe von LPS). WT (A, B), IL1R^{-/-} (A, C) oder IL6R^{-/-} (B, C) Hepatozyten wurden nachfolgend mit dem so konditionierten Medium über die Zeiträume 60 min, 180 min, 240 min, 360 min und 600 min inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Daten wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzberechnung erfolgte nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, $n=5 \pm \text{SEM}$).

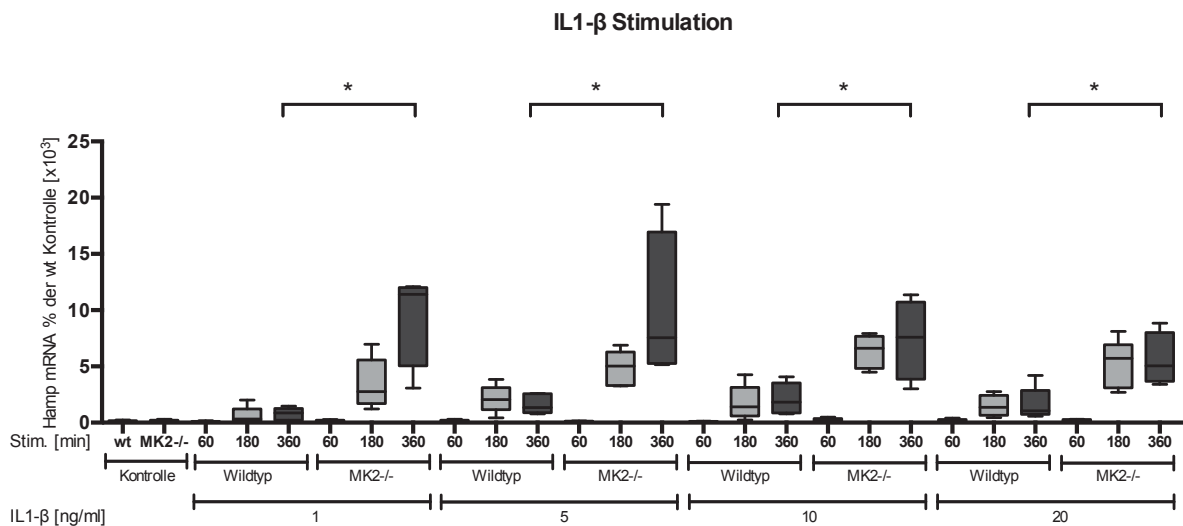
3.3 Der hemmende Effekt der MK2 auf die Hamp-Expression ist sowohl unter IL6 oder IL1- β Stimulation, als auch unter IL6 und IL1- β Co-Stimulation vorhanden

Unter Berücksichtigung der Folgerungen aus 3.1 sollte das Augenmerk vermehrt auf den isolierten Hepatozyten gelegt werden. Ebenfalls soll unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus 3.2 der Einfluss der MK2 auf die Hamp-Expression bei Stimulation mit

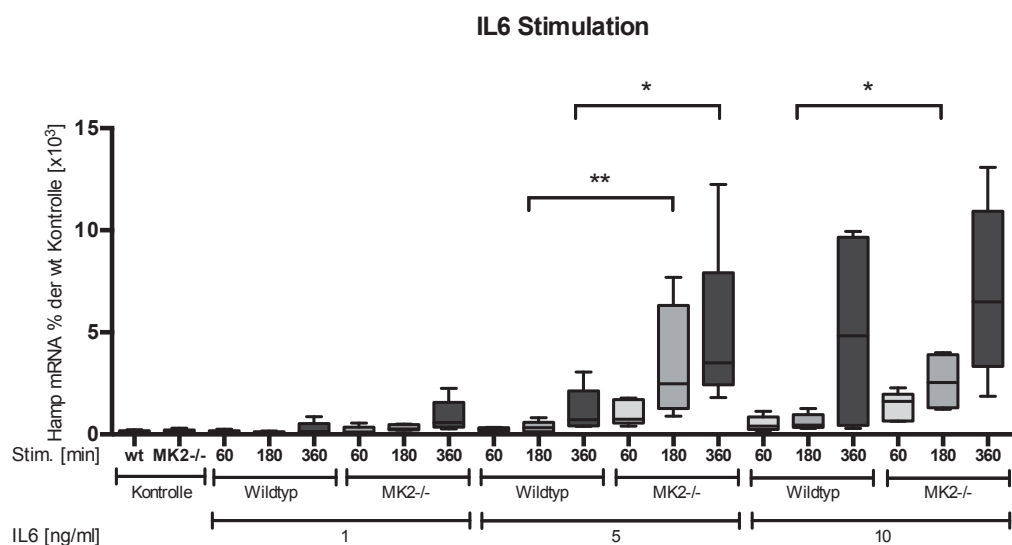
den Zytokinen IL1- β und IL6 untersucht werden. Für eine gezieltere Analyse im Hinblick auf ein Konzentrations- und Wirkungszeitoptimum der Zytokine wurden murine WT und MK2^{-/-} Hepatozyten isoliert und anschließend mit IL6, IL1- β oder beiden Zytokinen über unterschiedliche Zeiträume bei variierender Zytokinkonzentration stimuliert.

Sowohl unter der Stimulation von IL1- β (Abb. 3.3 A), als auch IL6 unter höheren Zytokinkonzentrationen (Abb. 3.3 B) und beider Zytokine gleichzeitig (Abb. 3.3 C) führt Deletion der MK2 zu einer signifikanten Verstärkung der Expression von Hamp. Anders als bei IL-6, unterliegt dieser Effekt im Falle von IL1- β einer gewissen Sättigung bei Zytokinkonzentrationen von 10 ng/ml und wird erst bei Verwendung niedrigerer Zytokinkonzentrationen deutlich. Diese Beobachtungen belegen, dass die Präsenz der MK2 inhibitorisch auf die IL-6-, IL1- β - bzw. IL-6 und IL1- β -induzierte Expression von Hamp im Hepatozyten wirkt, wobei insbesondere der inhibitorische Effekt auf die Signalübertragung von IL1- β deutlich wird.

A



B



C

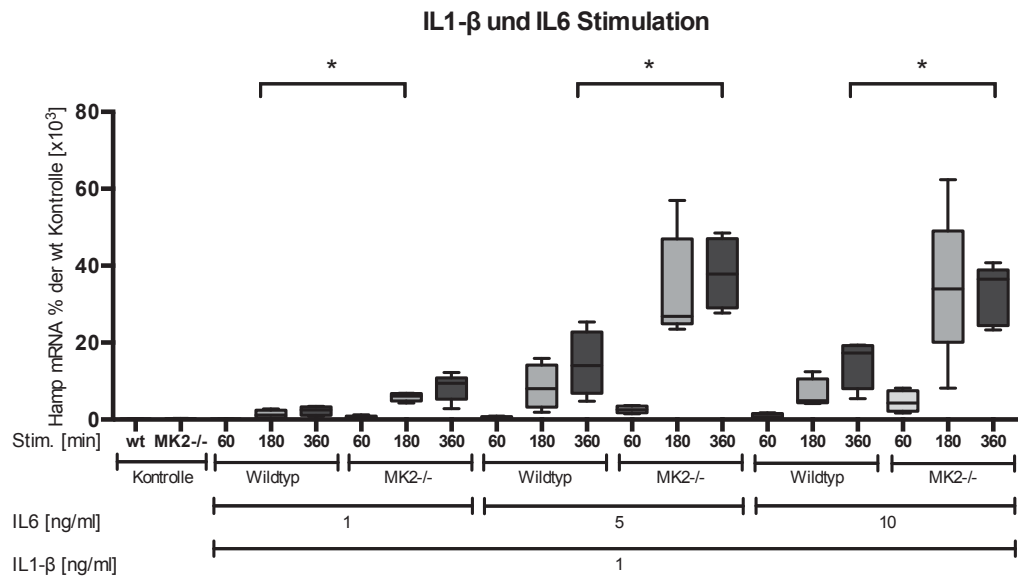


Abbildung 3.3 Der hemmende Effekt der MK2 auf die Hamp-Expression ist sowohl unter IL6 oder IL1- β Stimulation, als auch unter IL6 und IL1- β Co-Stimulation vorhanden

Hepatozyten von WT und MK2^{-/-} Mäusen wurden isoliert und über die angegebenen Zeiträume entweder mit 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml oder 20 ng/ml IL1- β (A), oder 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 (B) stimuliert. Eine Co-Stimulation erfolgte mit 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 und jeweils 1 ng/ml IL1- β (C). Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Daten wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzberechnung erfolgte nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, für IL1- β + IL6 n=4, sonst n=5 $\pm$ SEM).

3.4 Die Hamp-mRNA-Expression wird von IL1- β stärker induziert, als von IL6, die Kombination beider Zytokine wirkt synergistisch

Bereits aus den vorangehend ausgeführten Befunden in 3.3 wird deutlich, dass die Induktion des Hamp-Transkripts unter der Stimulation mit IL1- β und/oder IL6 unterschiedlich verläuft. Sowohl in WT Hepatozyten (Abb 3.4 A), als auch in MK2^{-/-} Hepatozyten (Abb 3.4 B) ist die Konzentration des Hamp-Transkripts unter IL1- β Stimulation gegenüber der IL6 Stimulation tendenziell erhöht. Hiervon abgesehen führt die simultane Stimulation mit beiden Zytokinen im Vergleich zur Stimulation mit jeweils nur einem der beiden Zytokine zu einem synergistischen Effekt, welcher in Abhängigkeit von der verwendeten IL6 Konzentration zunimmt und am ausgeprägtesten bei einer IL6 Konzentration von 5 ng/ml nachweisbar ist. Auch dieser Synergismus wird durch Deletion des MK2 Gens weiter verstärkt (Abb 3.4 A, B; Abb. 3.3 C). Aus diesem Ergebnis lässt sich eine synergistische Wirkung von IL1- β und IL6 bei der Induktion der Hamp-Expression ableiten.

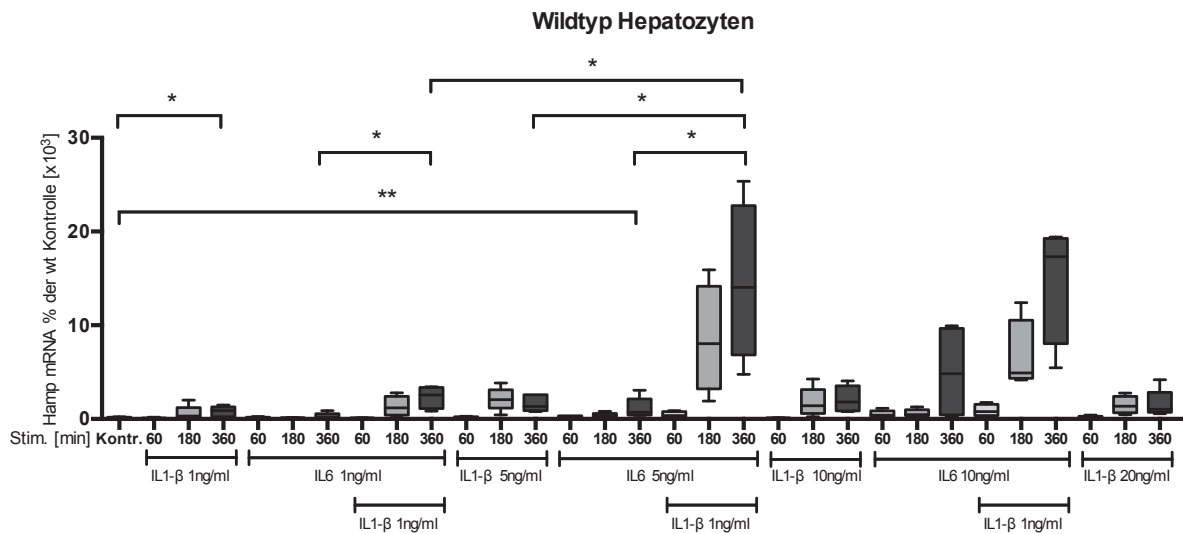
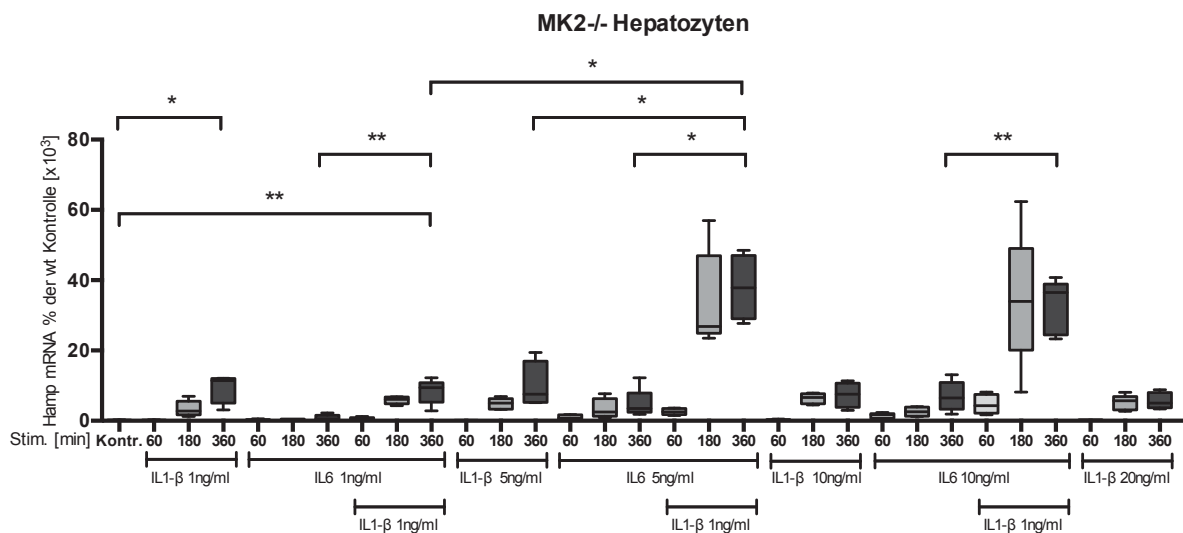
A**B**

Abbildung 3.4 Die Hamp-mRNA-Expression wird von IL1-β stärker induziert, als von IL6, die Kombination beider Zytokine wirkt synergistisch

Hepatozyten von WT (A) und MK2^{-/-} (B) Mäusen wurden isoliert und über die angegebenen Zeiträume entweder mit 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml oder 20 ng/ml IL1-β, oder 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 stimuliert. Eine Co-Stimulation erfolgte mit 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 und jeweils 1 ng/ml IL1-β (C). Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Daten wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzberechnung erfolgte nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\text{ct}}$, für IL1-β + IL6 n=4, sonst n=5 ±SEM).

3.5 Die MK2 hemmt die Genexpression von Hamp auf transkriptioneller Ebene

Bei Analyse der in 3.1-3.4 beschriebenen Ergebnisse, stellt sich die Frage, auf welcher Ebene die Hemmung der Induktion der Genexpression von Hamp durch die MK2 stattfindet. Zur Beurteilung der Involvierung der MK2 wurden die Proben aus den unter 3.3 und 3.4 dargestellten Experimenten ebenfalls unter Verwendung von Intron-Exon überspannenden Primern analysiert, um die Menge an primärem Transkripten zu bestimmen, um auf diese Weise Rückschlüsse auf die

transkriptionelle Regulation der entsprechenden Gene ziehen zu können. Es wurde nachgewiesen, dass unter IL1- β Stimulation (Abb. 3.5 A), unter IL6 Stimulation (Abb. 3.5 B) und unter simultaner Stimulation mit beiden Zytokinen (Abb. 3.5 C) ein deutlicher Unterschied in der hnRNA Menge zwischen WT Hepatozyten und MK2^{-/-} Hepatozyten besteht, wobei dieser in seiner Ausprägung bezogen auf das jeweilige Zytokin oder die Co-Stimulation nicht variiert.

Folgens wird die Genexpression von Hamp von der MK2 auf transkriptioneller Ebene gehemmt.

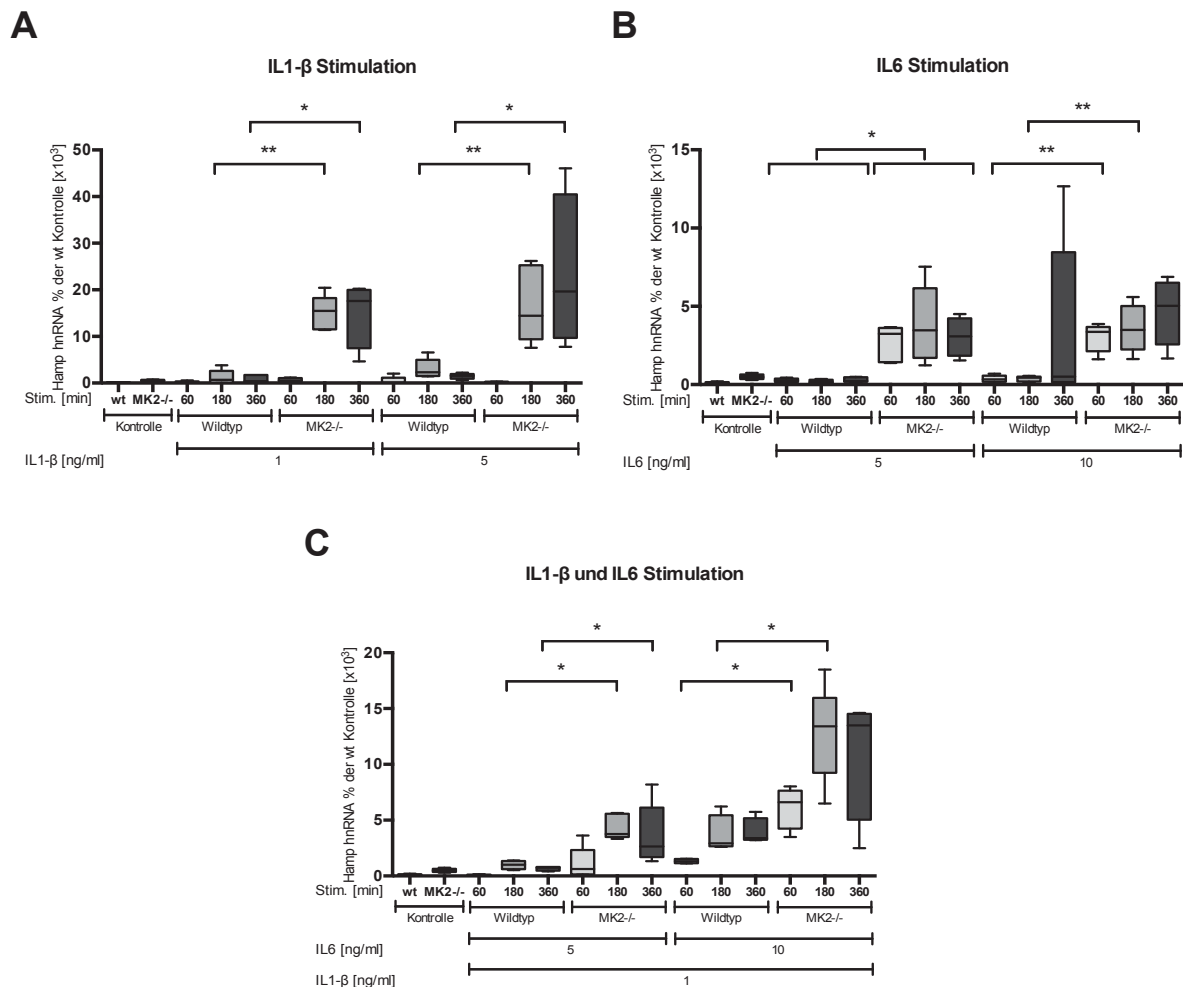


Abbildung 3.5 Die MK2 hemmt die Genexpression von Hamp auf transkriptioneller Ebene

Hepatozyten von WT (A, B, C) und MK2^{-/-} Mäusen (A, B, C) wurden isoliert und über die angegebenen Zeiträume entweder mit 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml oder 20 ng/ml IL1- β (A), oder 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 (B) stimuliert. Eine Co-Stimulation erfolgte mit 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 und jeweils 1 ng/ml IL1- β (C). Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR die Hamp-hnRNA quantifiziert. Die Daten wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen Hamp-hnRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzberechnung erfolgte nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, für IL1- β + IL6 n=4, sonst n=5 $\pm$ SEM).

3.6 Die MK2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität von Hamp

Die unter 3.5 ausgeführten Beobachtungen legen nahe, dass die MK2 die Hamp-Expression auf transkriptioneller Ebene reguliert. Wie bereits in der Einleitung

dargelegt, ist besonders für $\text{TNF}\alpha$, aber auch für diverse weitere Zytokine die MK2-abhängige Regulation der Expression über Regulation der Transkriptstabilität gut belegt. Insofern soll im Folgenden der Frage nach der Rolle der MK2 für die Regulation der Stabilität des Hamp-Transkripts nachgegangen werden. Dafür wird an WT und $\text{MK2}^{-/-}$ murinen Hepatozyten die Menge der Hamp-mRNA nach Durchführung eines Decay-Experiments mit Actinomycin D bestimmt. Actinomycin D induziert einen sofortigen Transkriptionsstopp in den Zellen und lässt so auf die momentane Menge von mRNA bis zu ihrer Degradierung und somit auf ihre Halblebenszeit zurückschließen.

Aus den Ergebnissen in 3.3 (Abb. 3.3 A) wird eine verstärkte Induktion der Hamp-Expression nach Stimulation mit $\text{IL1-}\beta$ in Abwesenheit der MK2 im Vergleich zum WT deutlich. Zur besseren Beurteilung des Einflusses der MK2 auf die Transkriptstabilität der Hamp-mRNA wurden die Versuche mit $\text{IL1-}\beta$ -Vorstimulation, $\text{IL1-}\beta$ -Co-Stimulation, sowie $\text{IL1-}\beta$ Vor-und-Co-Stimulation durchgeführt.

Die Ergebnisse aus Abbildung 3.6 lassen darauf schließen, dass die MK2 keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität von Hamp hat, da tendenziell kein Unterschied in der Hamp-mRNA Menge unter Einfluss von Actinomycin D zwischen WT Hepatozyten und $\text{MK2}^{-/-}$ Hepatozyten ersichtlich wird. Die genaue Halblebenszeit der Hamp-mRNA kann aufgrund der für diese Experimente gewählten Gesamtversuchsdauer nicht bestimmt werden. Tendenziell legen die in A, C und D abgebildeten Versuche jedoch nahe, dass insbesondere die Vorstimulation mit $\text{IL1-}\beta$ möglicherweise zu einer Verlängerung der Halblebenszeit und damit zu einer Stabilisierung des Transkripts führen könnte.

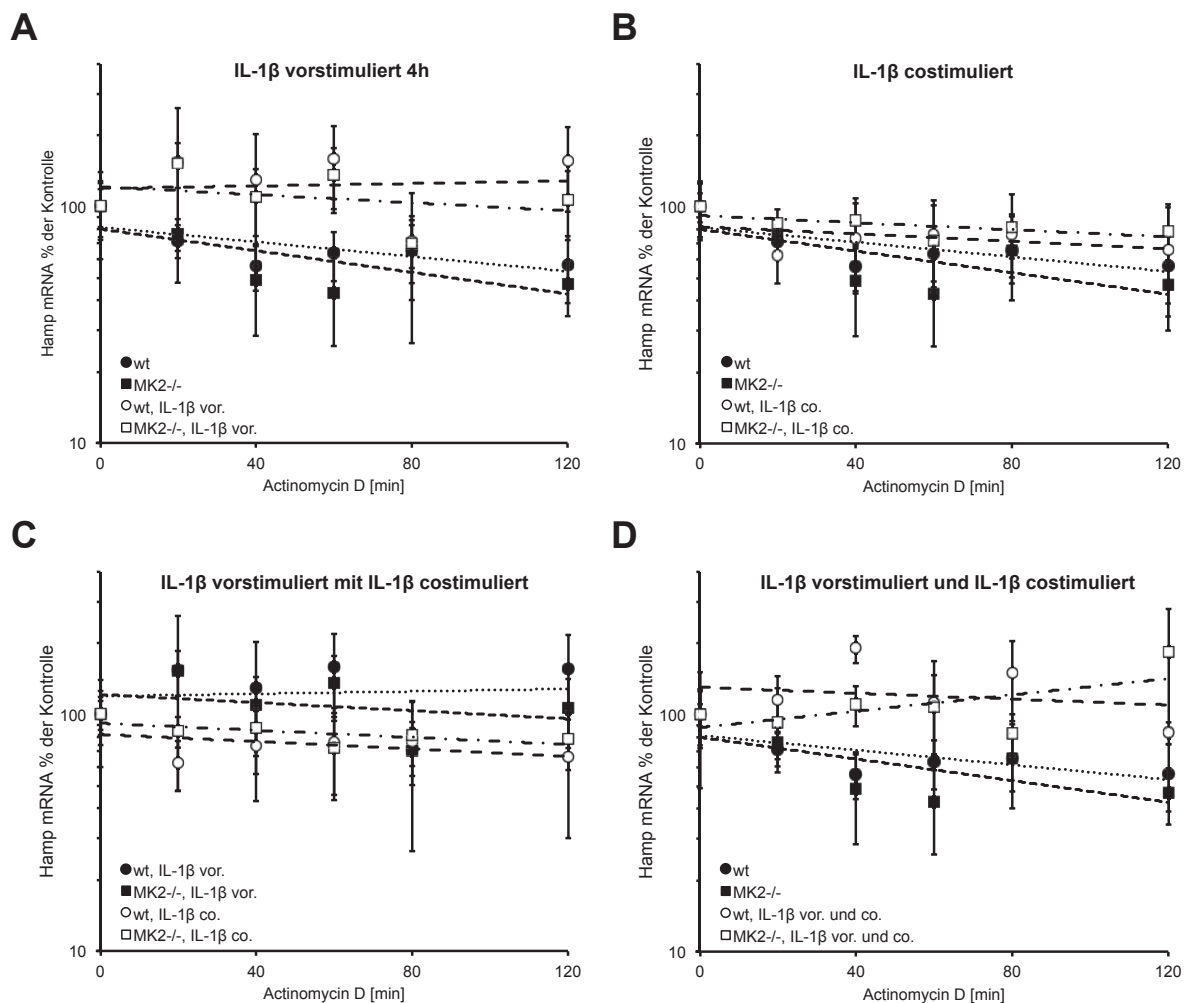


Abbildung 3.6 Die MK2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität von Hamp

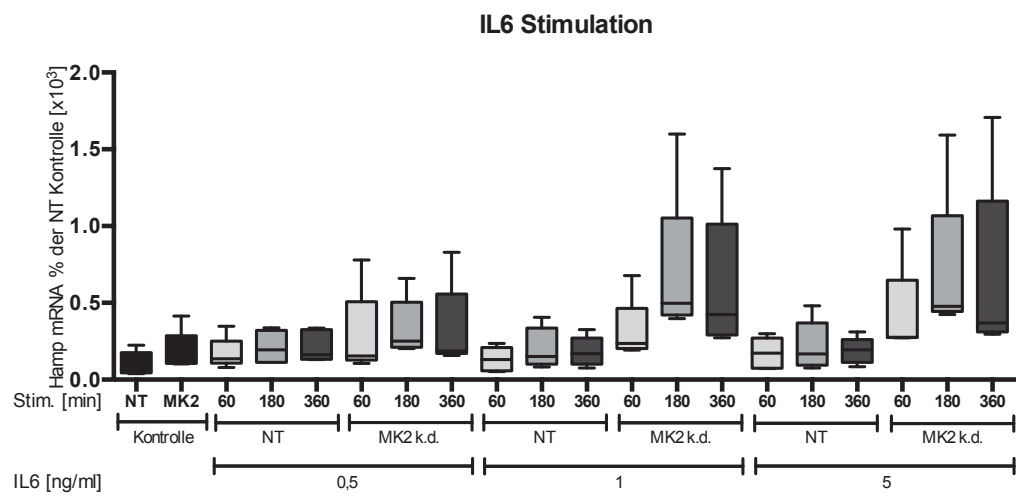
Hepatozyten von WT und MK2^{-/-} Mäusen wurden isoliert und anschließend wurde Actinomycin D in der Konzentration 5 µg/ml, gelöst in Methanol, durch Medienwechsel zu den Zeitpunkten 20 min, 40 min, 60 min, 80 min und 120 min zugesetzt (A, B, D). 4 h vor Beginn der Actinomycin D Zugabe wurden ebenfalls WT Hepatozyten und MK2^{-/-} Hepatozyten mit 5 ng/ml IL1-β stimuliert (A, C). Auch wurden weitere Proben mit WT Hepatozyten und MK2^{-/-} Hepatozyten parallel zur Zugabe von Actinomycin D mit 5 ng/ml IL1-β stimuliert (B, C). Zuletzt wurden WT Hepatozyten und MK2^{-/-} Hepatozyten sowohl mit 5 ng/ml IL1-β 4 h vor Beginn der Actinomycin D Zugabe vorstimuliert, als auch parallel zur Actinomycin D Zugabe mit 5 ng/ml IL1-β costimuliert (D). Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Datenpunkte wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in logarithmischer Darstellung in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. ($2^{-\Delta ct}$, ohne Stimulation n=4, vorstimuliert n=3, costimuliert WT n=4, MK2^{-/-} n=3, vor- und costimuliert n=3, ±SEM). Die Trendlinien für die Hamp-mRNA-Menge in WT Hepatozyten lassen sich durch die Funktionen $f(x)=81,677e-0,004x$ für unstimulierte (A, B, D), $f(x)=119,34e0,0006x$ für vorstimulierte (A, C), $f(x)=82,287e-0,002x$ für costimulierte (B, C) und $f(x)=130,38e-0,001x$ für vor- und costimulierte (D) Proben beschreiben. Die Trendlinien für die Hamp-mRNA-Menge in MK2^{-/-} Hepatozyten lassen sich durch Funktionen $f(x)=80,194e-0,005x$ für unstimulierte (A, B, D), $f(x)=121,27e-0,002x$ für vorstimulierte (A, C), $f(x)=91,776e-0,002x$ für costimulierte (B, C) und $f(x)=88,274e0,004x$ für vor- und costimulierte (D) Proben beschreiben.

3.7 In HepG2 Zellen ist unter IL1-β und IL6 Stimulation die Wirkung der MK2 auf die Hamp-Expression bedingt beurteilbar

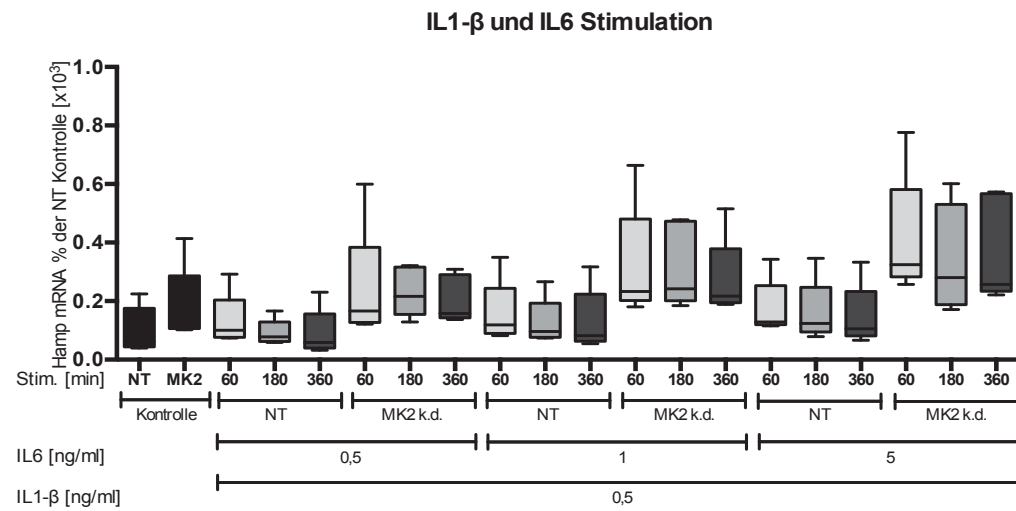
Ausgehend von den Ergebnissen in 3.3 und 3.4 soll die Wirkung der MK2 auf die Hamp-Expression unter IL1-β und/oder IL6 Stimulation nicht nur im murinen System, sondern unter der gleichen Versuchsdurchführung wie in 3.3 und 3.4 auch an einer Nachstellung des humanen Systems in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 untersucht werden. Dafür wurde mit MK2 siRNA ein *knock down* der MK2 in den HepG2 Zellen erreicht und der erfolgreiche *knock down* mittels Western Blot (Abb. 3.7 F) bestätigt. Kontrollproben wurden mit *Non-targeting* siRNA behandelt.

Wenn man die Ergebnisse aus Abbildung 3.7 A-E, analysiert, wird ebenfalls die erhöhte Hamp-Expression beim MK2 *knock down* ersichtlich. Trotzdem legen die Ergebnisse auch nahe, dass in HepG2 Zellen die Zytokineffekte von IL1-β und/oder IL6 zwar ebenfalls zu einer Induktion der Hamp-Expression führen, jedoch deren Synergismus weitaus geringer ausgeprägt ist, als in den primären murinen Hepatozyten. Da HepG2 Zellen Tumorzellen sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie sich nicht nur von primären murinen Hepatozyten, sondern auch von primären humanen Hepatozyten unterscheiden, sodass die beobachteten Differenzen möglicherweise auch durch die maligne Transformation der Zellen bedingt sind. So besteht beispielsweise die Möglichkeit, dass den HepG2 Zellen für die Signalübertragung von IL1-β oder IL6 wichtige Signalmoleküle fehlen oder nicht in einer Weise verschaltet sind, die der Situation in der nicht transformierten Zelle entspricht.

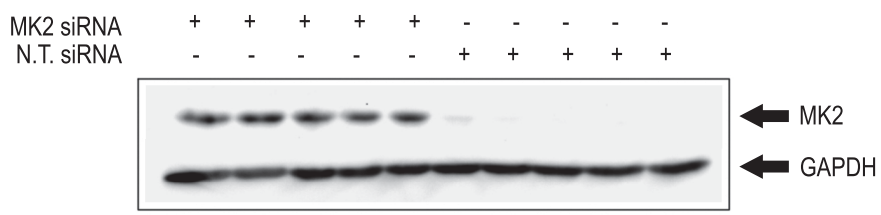
D



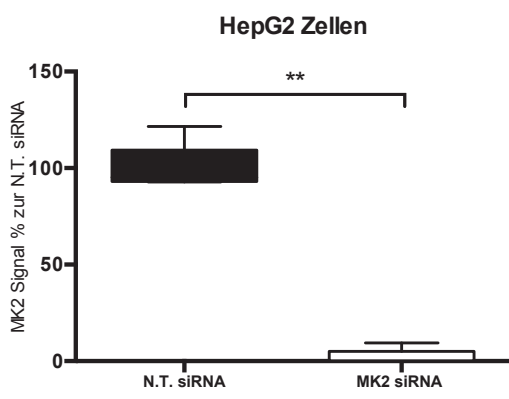
E



F.1



F.2



3.7 In HepG2 Zellen ist unter IL1- β und IL6 Stimulation die Wirkung der MK2 auf die Hamp-Expression bedingt beurteilbar

HepG2 Zellen wurden mit *Non-targeting* siRNA (A) und MK2 siRNA (B) zwecks Erzielung eines MK2 *knock down* (MK2 k.d.) transfiziert. Nach 48 h wurden sie über die angegebenen Zeiträume mit 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL1- β (C) oder 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, oder 5 ng/ml IL6 (D) stimuliert. Die Co-Stimulation erfolgte mit 0,5 ng/ml, 1 ng/ml oder 5 ng/ml IL6 und jeweils 0,5 ng/ml IL1- β (E). Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Datenpunkte wurden gegen bAct normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten NT-Kontrolle (*Non-targeting* siRNA-Kontrolle) in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der NT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Aus separaten Proben wurde Protein isoliert und der *knock down* per Western Blot bestätigt (F.1; F.2 als densitometrische Auswertung zu F1). Signifikanzproben (A-E) bzw. Signifikanzberechnung (F2) erfolgten nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\text{ct}}$, n=5 $\pm$ SEM). Keine relevanten Signifikanzen für A-E.

3.8 In HepG2 Zellen hat das Hamp-Transkript eine Halblebenszeit von 80 Minuten, die MK2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität

Ausgehend von den Ergebnissen aus 3.6 sollte in Decay-Experimenten die Stabilität der Hamp-mRNA in HepG2 Zellen, sowie der Einfluss der MK2 hierauf untersucht werden.

Es wurde bestimmt (Abb. 3.8.1), dass ein Abfall der Hamp-mRNA-Mengen unter Einfluss von Actinomycin D über die Zeit im Vergleich zur Kontrolle stattfindet, wobei sich die Halblebenszeit des Hamp-Transkripts auf etwa 80 Minuten (77,55 Minuten) errechnen lässt.

Im nächsten Schritt wurde ein MK2 *knock down* erzielt und die Hamp-mRNA-Mengen unter Einfluss von Actinomycin D gemessen (Abb. 3.8.2 A-C). Es wurde bestimmt, dass auch in HepG2 Zellen keine Involvierung der MK2 beim Einfluss auf die Transkriptstabilität von Hamp stattfindet.

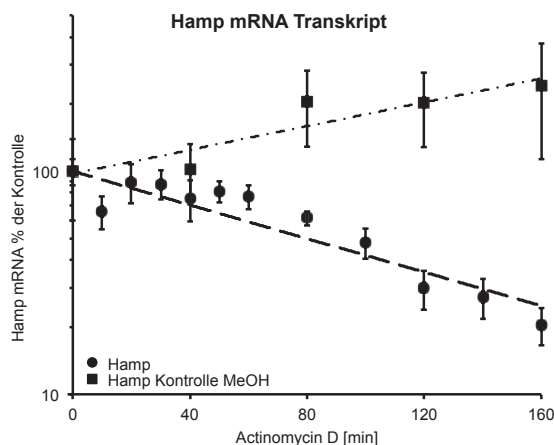
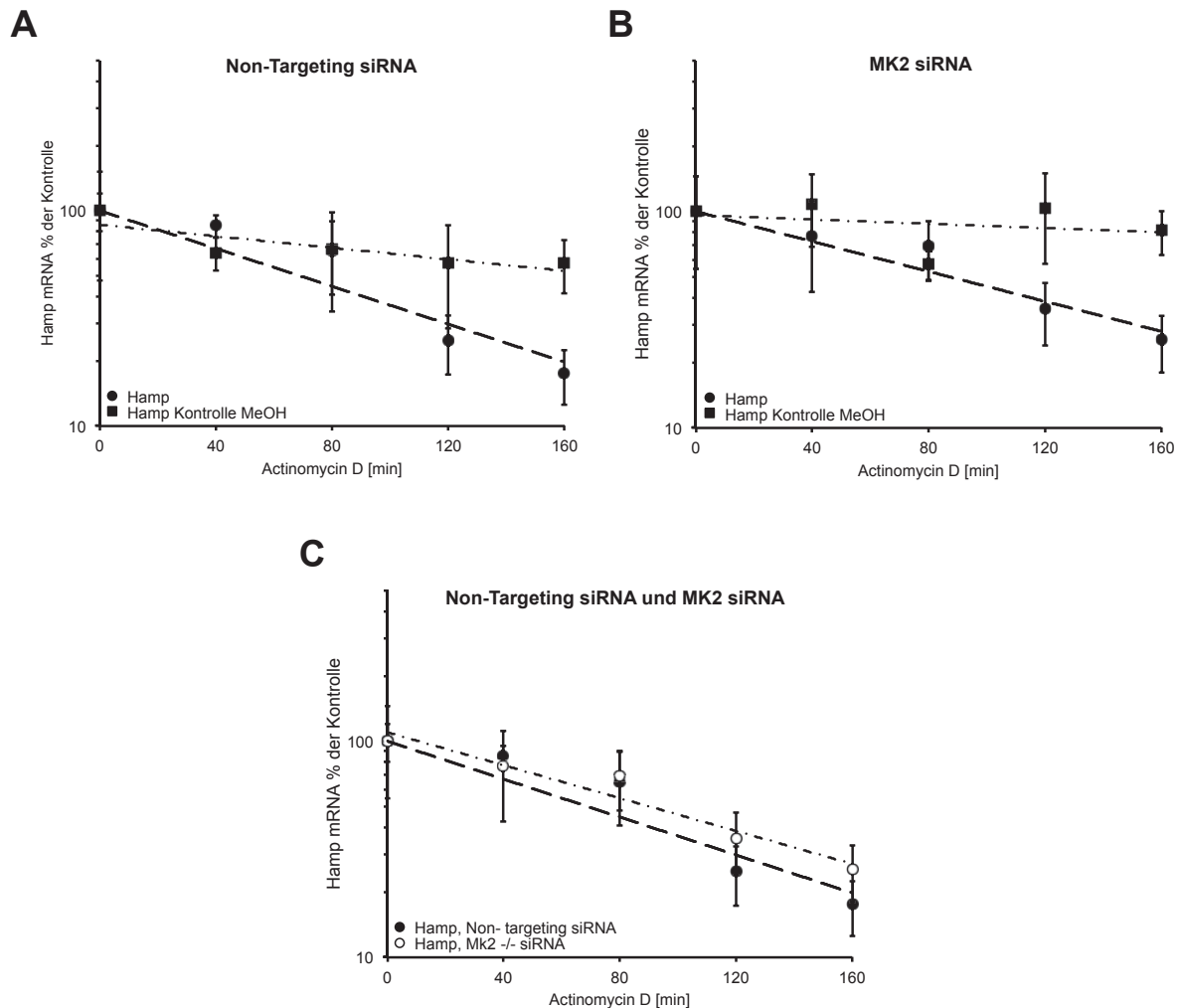


Abbildung 3.8 In HepG2 Zellen hat das Hamp-Transkript eine Halblebenszeit von 80 Minuten, die MK2 hat keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität

3.8.1 HepG2 Zellen wurden mit je 5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D, gelöst in Methanol, über die folgenden Zeiträume inkubiert: 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 80 min, 100 min, 120 min 140 min und 160 min. Kontrollproben wurde Methanol in der Konzentration 5 $\mu\text{l/ml}$ durch Medienwechsel über die Zeitpunkte 40 min, 80 min, 120 min und 160 min zugesetzt. Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben

und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Datenpunkte wurden gegen bAct normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten Kontrolle in logarithmischer Darstellung in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde ($2^{-\Delta\text{ct}}$, für Actinomycin D n=4, sonst n=3, $\pm$ SEM). Die Trendlinie unter Actinomycin D Einfluss lässt sich mit der Funktion $f(x)=100e-0,009x$ und für die Kontrolle mit $f(x)=97,346e0,0062x$ beschreiben.



3.8.2 A-C HepG2 Zellen wurden mit *Non-targeting* siRNA (A) und MK2 siRNA (B) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Actinomycin D in der Konzentration 5 µg/ml, gelöst in Methanol, durch Medienwechsel zu den Zeitpunkten 40 min, 80 min, 120 min und 160 min inkubiert. Kontrollproben wurde Methanol in der Konzentration 5 µl/ml durch Medienwechsel über die Zeitpunkte 40 min, 80 min, 120 min und 160 min zugesetzt. Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Datenpunkte wurden gegen bAct normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten Kontrolle in logarithmischer Darstellung in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Die Hamp-mRNA-Werte der mit MK2 siRNA behandelten und mit *Non-targeting* siRNA behandelten HepG2 Zellen wurden gegeneinander verglichen (C) ($2^{-\Delta Ct}$, $n=5$, $\pm$ SEM). Die Trendlinien für die Hamp-mRNA-Werte unter Actinomycin D Einfluss für die mit MK2 siRNA behandelten HepG2 Zellen lassen sich mit der Funktion $f(x)=100e^{-0,008x}$ und für die mit *Non-targeting* siRNA behandelten HepG2 Zellen mit $f(x)=100e^{-0,01x}$ beschreiben. Die Funktionen der Trendlinie für die Kontrollen mit Methanol lassen sich durch $f(x)=96,052e^{-0,001x}$ für die mit MK2 siRNA behandelten HepG2 Zellen und mit $f(x)=86,132e^{-0,003x}$ für die mit *Non-targeting* siRNA behandelten HepG2 Zellen beschreiben.

3.9 Rolle der JNK bei der IL1-β/IL6-vermittelten Expression von Hamp

Die Ergebnisse der unter 3.4 und 3.5 ausgeführten Experimente lassen annehmen, dass die MK2 die Hamp-Expression auf transkriptioneller Ebene reguliert. Wie in 1.3-1.7 beschrieben, sind neben der p38/^{MAPK} -Kaskade noch weitere für die Induktion der Hamp-Expression verantwortliche und miteinander interagierende Signalkaskaden beim Inflammationsgeschehen bekannt, unter anderem der NF-κB-

Weg, der MAPK/ERK-Weg und der JNK-Weg. Deren Relevanz wurde im nachfolgenden Versuch in murinen Hepatozyten durch Einsatz entsprechender Inhibitoren untersucht.

Es wurde bestimmt, dass bei Stimulation (Abb. 3.9 A-D) von WT Hepatozyten und MK2^{-/-} Hepatozyten eine erhöhte Hamp-Expression auch unabhängig der Inhibition im MAPK/ERK-Weg (Verwendung des Inhibitors UO126) vorhanden ist, dies lässt auf eine Kreuzinteraktion zwischen den verschiedenen Signalkaskaden schließen. Zusätzlich wurde bestimmt, dass der JNK-Signalweg eine Rolle in der positiven Regulation der Hamp-Expression zu spielen scheint, da bei seiner Inhibition in WT Hepatozyten und MK2^{-/-} Hepatozyten sowohl unter IL1- β -, als auch unter IL6 Stimulation die Hamp-mRNA-Expression tendenziell vermindert erscheint (Abb. 3.9 A-D).

Außerdem ist unter IL6 Stimulation in Abwesenheit der MK2 auch bei Inhibition von IKK2 die Hamp-Expression tendenziell vermindert, dies lässt auf die Involvement des IKK2-Signalwegs in die MK2-abhängige Hamp-Expression unter IL6 Stimulation schließen (Abb. 3.9 D). Die hier ausgeführten Daten legen nahe, dass die Aktivierung der JNK1-abhängigen Signalübertragung in die Regulation der Induktion der Hamp-Expression sowohl durch IL-1 β als auch durch IL-6 involviert ist und dass insbesondere in Abwesenheit der MK2 auch die Aktivierung von NF κ B eine gewisse Rolle zu spielen scheint.

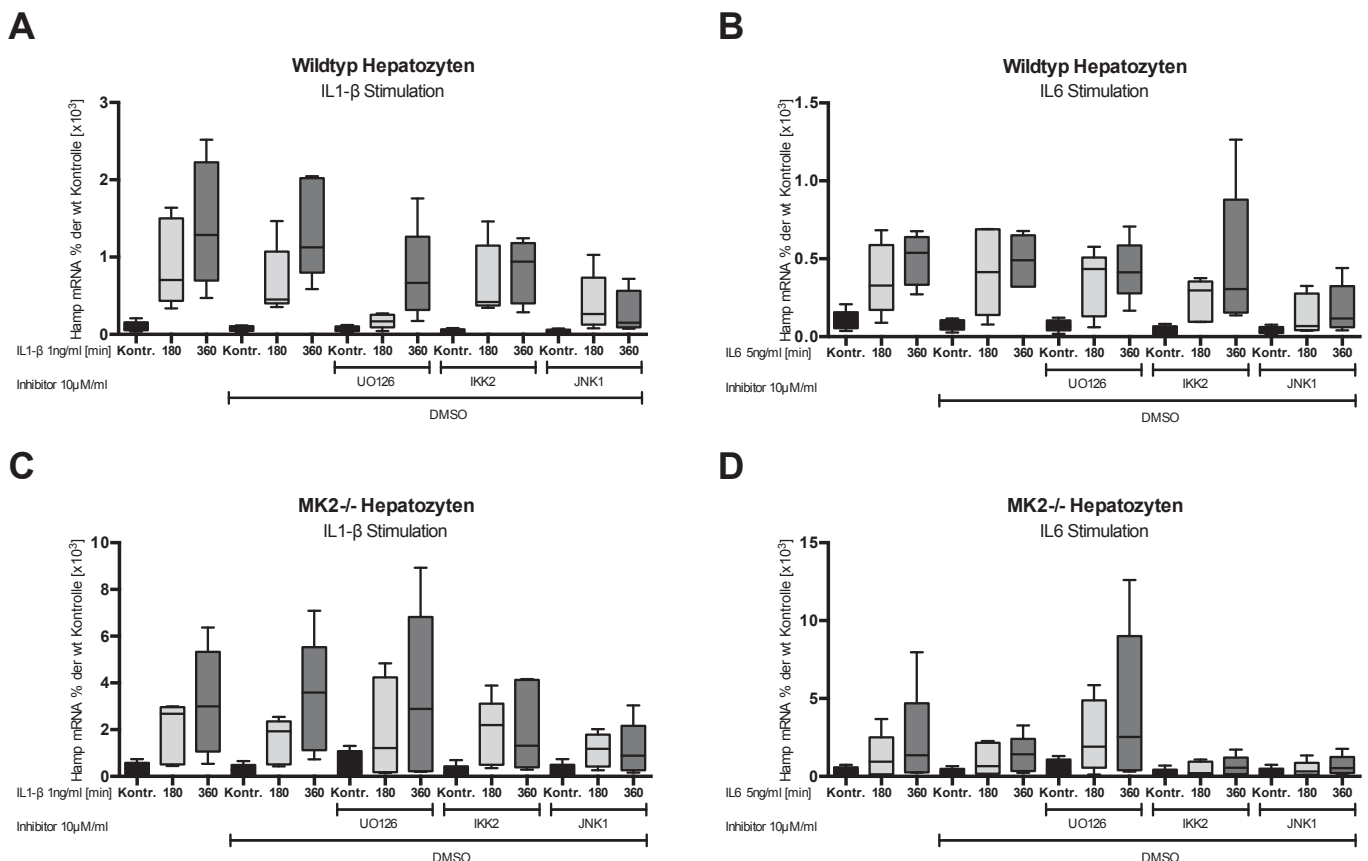


Abbildung 3.9 Rolle der JNK bei der IL1- β /IL6-vermittelten Expression von Hamp

Hepatozyten von WT (A, B) und MK2^{-/-} (C, D) Mäusen wurden isoliert und den Proben wurde 10 μ M/ml von dem Inhibitor UO126, sowie den Inhibitoren von IKK2 und JNK1 gelöst in DMSO und/oder 2 μ l DMSO als Kontrolle über einen Zeitraum von 60 min zugesetzt. Dann wurden die Proben über die Zeiträume von 180 min und 360 min mit 1 ng/ml IL1- β (A, C), oder 5 ng/ml (B, D) stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR

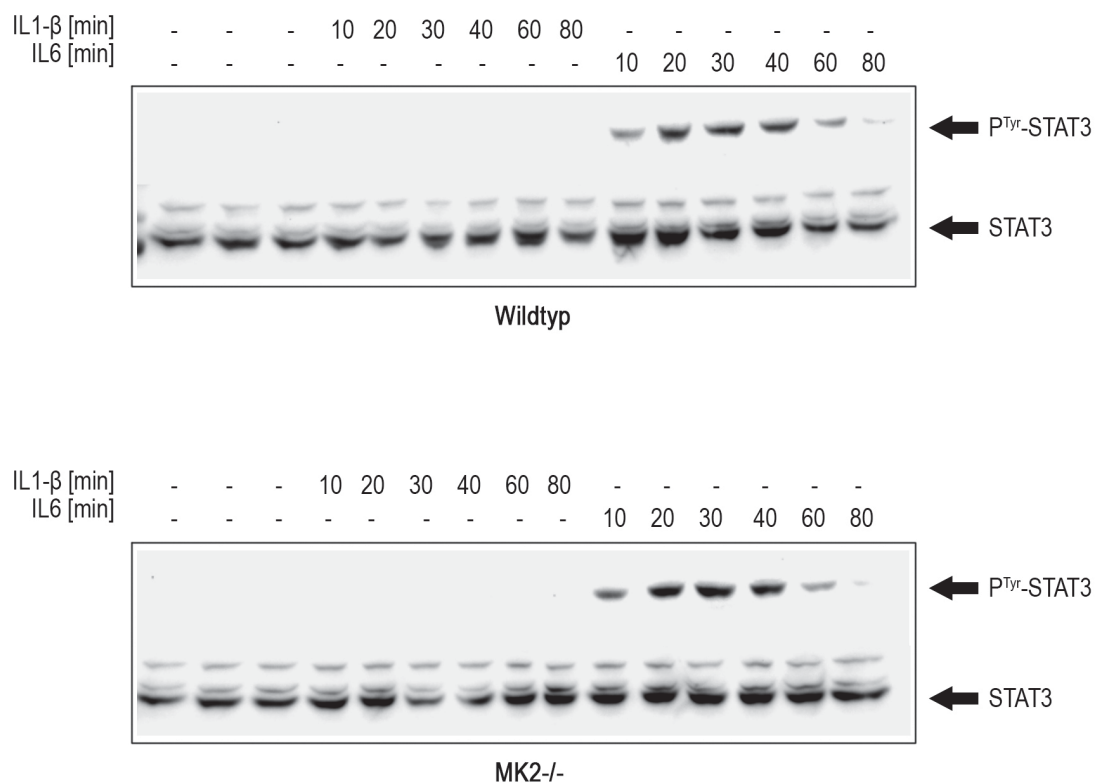
quantifiziert. Die Datenpunkte wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen Hamp-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzproben erfolgten nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, n=5 $\pm$ SEM). Keine relevanten Signifikanzen.

3.10 Die MK2 hat keinen Einfluss auf die IL6-vermittelte STAT3-Aktivierung

Eine gesteigerte Hamp-Expression durch STAT3-Aktivierung ist bereits bekannt und ausführlich beschrieben (1.3). Ebenfalls ist die Negativregulation von STAT3 unter IL1- β Stimulation (1.6) und durch die MK2 (1.8) bekannt. Im Folgenden soll die STAT3-Aktivierung bei IL1- β und IL6 Stimulation in murinen WT und MK2^{-/-} Hepatozyten untersucht werden.

Die STAT3-Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 (Abb. 3.10 A, B) erfolgt unter IL6 Stimulation, nicht aber unter IL1- β Stimulation. Eine signifikante Involvierung der MK2 in die STAT3-Aktivierung bei IL6 Stimulation ist nicht nachweisbar.

A



B

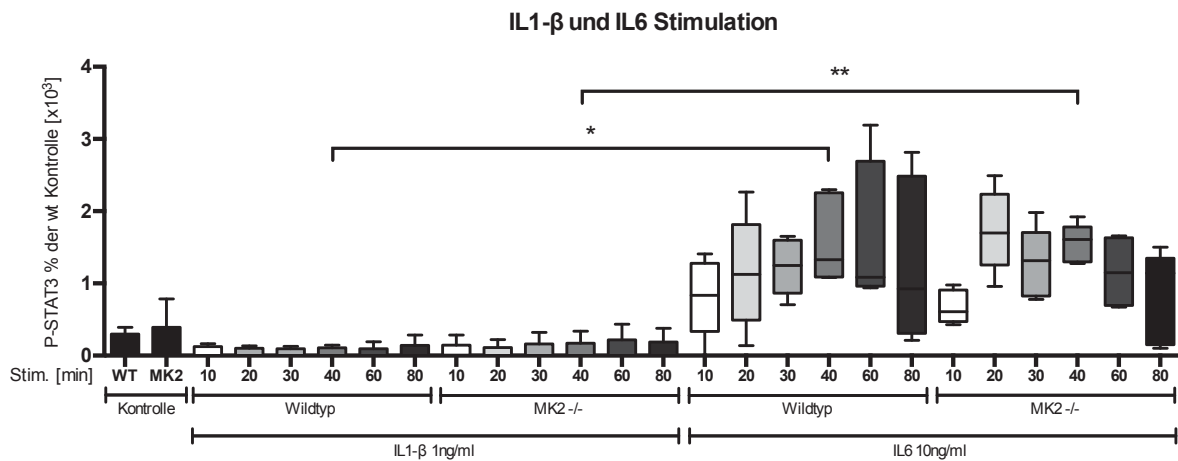


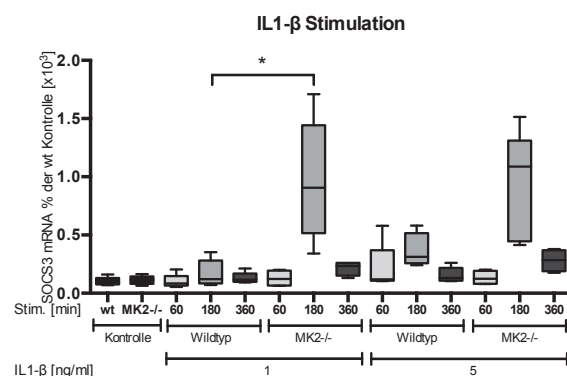
Abbildung 3.10 Die MK2 hat keinen Einfluss auf die IL6-vermittelte STAT3-Aktivierung

Hepatozyten von WT und MK2^{-/-} Mäusen wurden isoliert und über die Zeiträume von 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min und 80 min mit 1 ng/ml IL1- β oder 10 ng/ml IL6 stimuliert. Anschließend wurde Protein isoliert, quantifiziert und mittels Western Blot aufgetrennt. Unter Verwendung spezifischer Antikörper wurden STAT3-Tyr705 und STAT3 gesamt (Beladungskontrolle) nachgewiesen (A). Die Signale wurden mittels Densitometrie gegen STAT3 normalisiert. Die relativen P-STAT3-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde (B). Signifikanzberechnung erfolgte nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\text{ct}}$, $n=5 \pm \text{SEM}$).

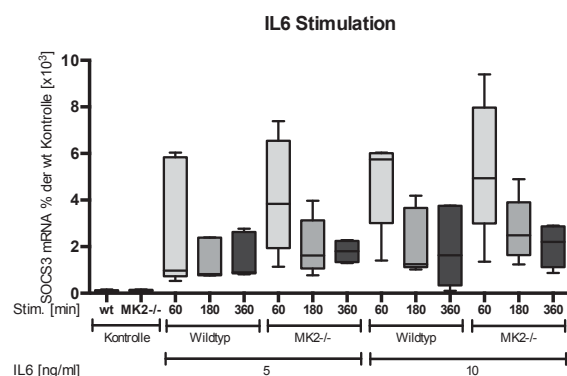
3.11 Die MK2 hat Einfluss auf die IL1- β abhängige SOCS3-Induktion

SOCS3 ist ein Negativregulierer des STAT3-Signalweges (1.6). Im Kontext der Fragestellung aus 3.10 wurde untersucht, ob die MK2 in primären murinen Hepatozyten IL1- β /IL6-vermittelt die SOCS3-mRNA-Expression beeinflusst. Wie bereits in 1.6 dargelegt, wird die SOCS3-Expression durch IL6 induziert (Abb. 3.11 B). Unter IL1- β Stimulation ist die SOCS3-Expression geringfügig induziert, lediglich zum Zeitpunkt 180 min (1 ng/ml IL1- β) konnte zwischen WT und MK2^{-/-} Hepatozyten ein Unterschied der SOCS3-mRNA-Expression nachgewiesen werden. (Abb. 3.11 A), welcher auch bei Co-Stimulation mit IL1- β und IL6 sichtbar wird (Abb. 3.11 C).

A



B



C

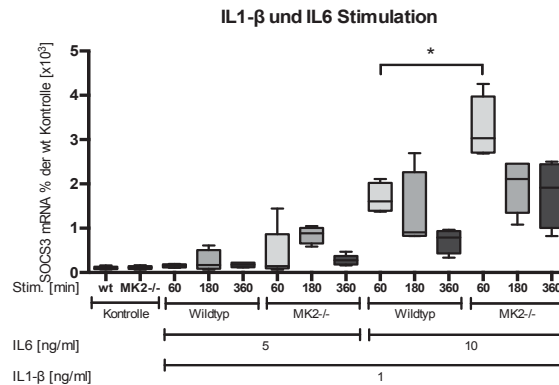


Abbildung 3.11 Die MK2 hat Einfluss auf die IL1-β abhängige SOCS3-Induktion

Hepatozyten von WT (A-C) und MK2^{-/-} (A-C) Mäusen wurden isoliert und über die Zeiträume von 60 min, 180 min und 360 min mit 1 ng/ml oder 5 ng/ml IL1-β (A) oder 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 (B) stimuliert. Eine simultane Stimulation erfolgte ebenfalls mit 1 ng/ml oder 5 ng/ml IL6 und jeweils 1 ng/ml IL1-β (C). Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Datenpunkte wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen SOCS3-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzberechnung erfolgte nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, für IL1-β + IL6 n=4, sonst n=5 ±SEM). Keine relevanten Signifikanzen für B.

3.12 Die MK2 hat Einfluss auf die synergistische Wirkung von IL1-β und IL6 bei der TTP-Induktion

TTP wird für die Aufhebung seiner Funktion als Transkriptdestabilisierer von der MK2 phosphoryliert (1.8). Im Kontext der Frage nach Modulation durch die MK2 unter inflammatorischen Bedingungen und Abhängigkeit von den IL1-β und IL6 Signalkaskaden wurde der Einfluss des Überstands von LPS-induzierten Makrophagen auf die TTP-Expression in WT, MK2^{-/-}, IL1R^{-/-} und IL6R^{-/-} Hepatozyten (Abb. 3.12.1) und der Einfluss von IL1-β oder IL6 Stimulation, sowie IL1-β und IL6 Co-Stimulation auf die TTP-Expression in WT und MK2^{-/-} Hepatozyten (Abb. 3.12.2) untersucht.

Im Vergleich zu WT Hepatozyten wurde bestimmt, dass sich kein Unterschied in der TTP-Expression bei MK2^{-/-}, IL1R^{-/-} und IL6R^{-/-} Hepatozyten ergibt, dies lässt auf keine signifikante Abhängigkeit von den genannten Signalkaskaden oder der MK2 schließen (Abb. 3.12.1).

Weiterhin wurde bestimmt, dass sich kein Unterschied in der TTP-Expression unter IL1-β oder IL6 Stimulation zwischen WT und MK2^{-/-} Hepatozyten ergibt, wohl aber bei Co-Stimulation mit beiden Zytokinen (bei jeweils 60 min Stimulationsdauer). Dies deutet auf den Einfluss der MK2 auf die synergistische Wirkung zwischen IL1-β und IL6 bei TTP-Induktion hin (Abb. 3.12.2).

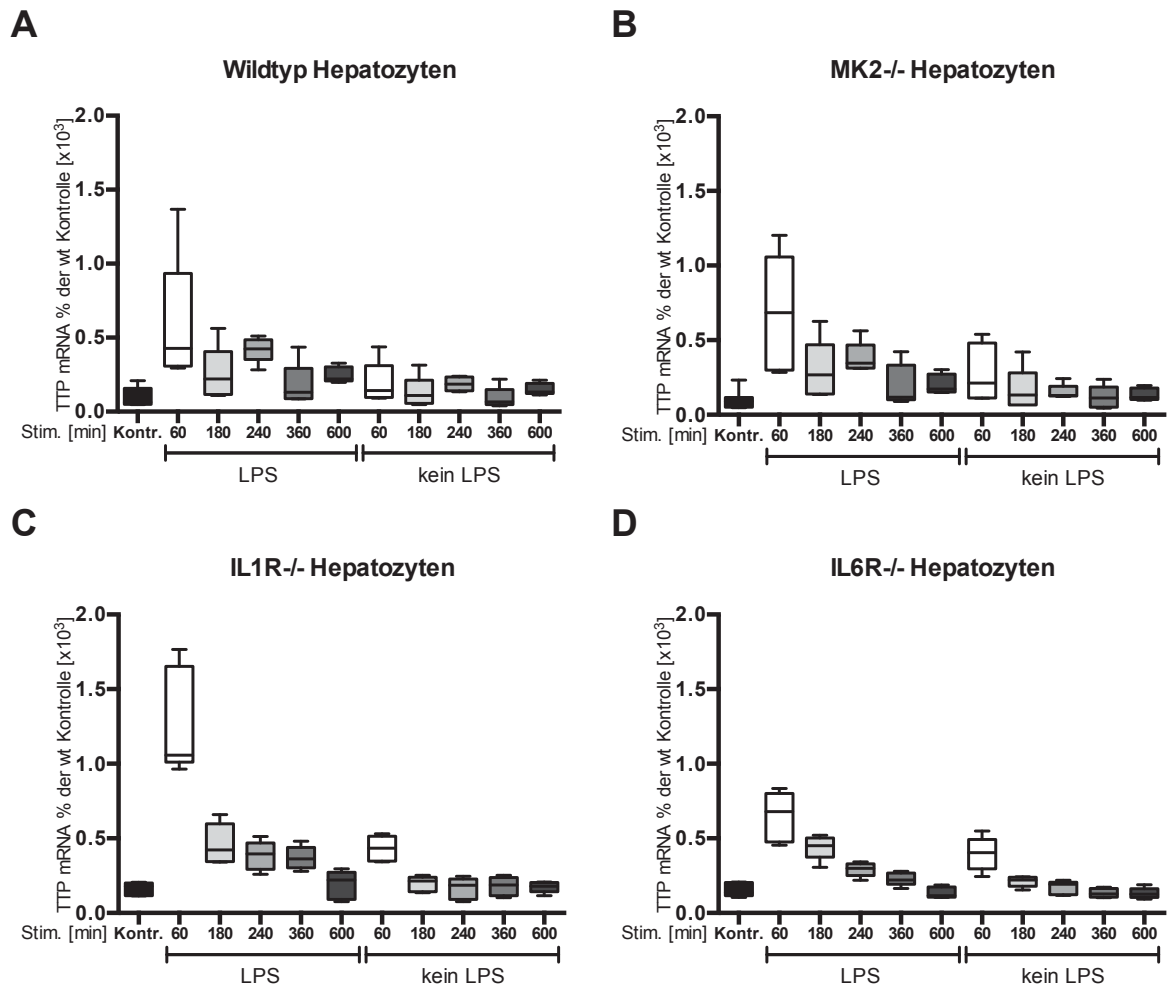
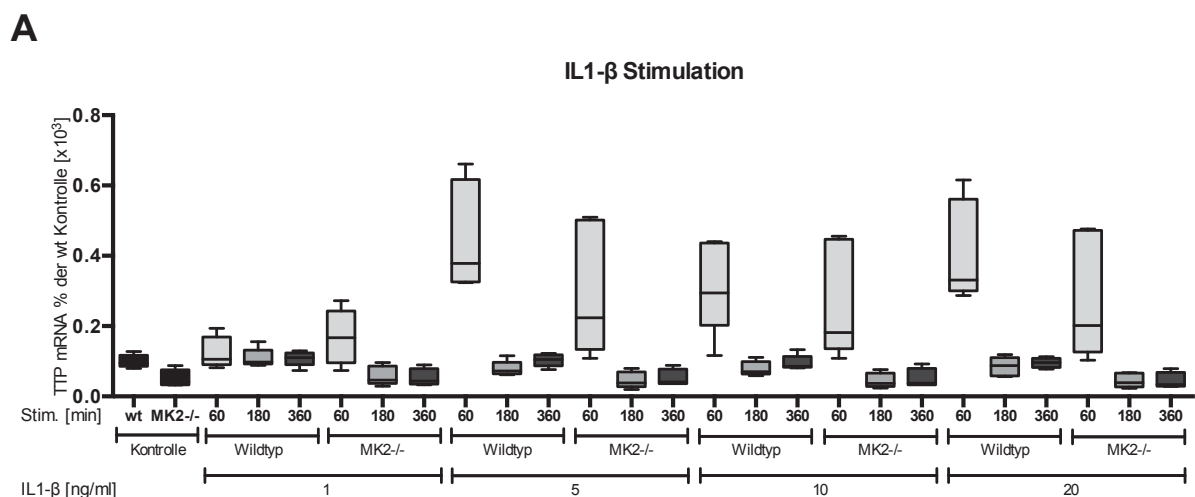
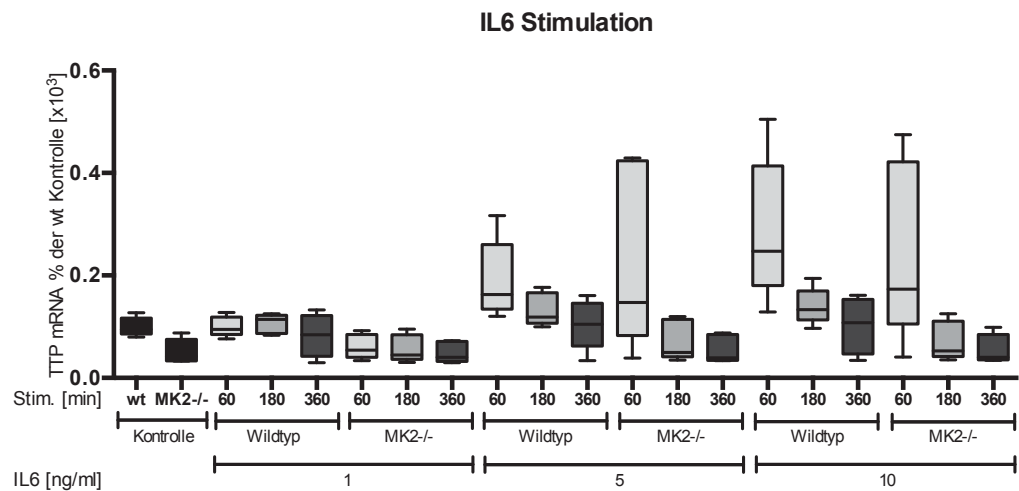


Abbildung 3.12.1 Die MK2 hat Einfluss auf die synergistische Wirkung von IL1- β und IL6 bei der TTP-Induktion

Makrophagen von WT Mäusen wurden über einen Zeitraum von 16 h mit LPS stimuliert bzw. dienten der Kontrolle (ohne Zugabe von LPS). WT (A), MK2^{-/-} (B), IL1R^{-/-} (C) oder IL6R^{-/-} (D) Hepatozyten wurden nachfolgend mit dem so konditionierten Medium über die Zeiträume 60 min, 180 min, 240 min, 360 min und 600 min 1:1 verdünnt inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Daten wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen TTP-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzproben erfolgten nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, $n=5 \pm \text{SEM}$). Keine relevanten Signifikanzen.



B



C

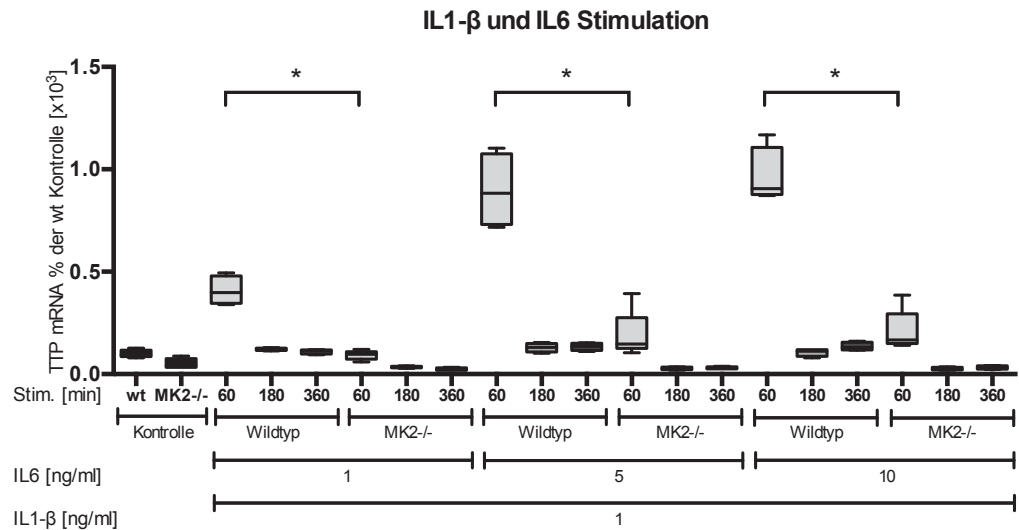


Abbildung 3.12.2 Die MK2 hat Einfluss auf die synergistische Wirkung von IL1- β und IL6 bei der TTP-Induktion

Hepatozyten von WT und MK2^{-/-} Mäusen wurden isoliert und über die Zeiträume von 60 min, 180 min und 360 min solitär mit 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml oder 20 ng/ml IL1- β (A) oder 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 (B) stimuliert. Eine simultane Stimulation erfolgte ebenfalls mit 1 ng/ml, 5 ng/ml oder 10 ng/ml IL6 und jeweils 1 ng/ml IL1- β (C). Anschließend wurde die RNA isoliert, mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR die TTP-mRNA quantifiziert. Die Datenpunkte wurden gegen SDHA normalisiert. Die relativen TTP-mRNA-Werte wurden prozentual zur unbehandelten WT-Kontrolle in Relation gesetzt, wobei der Datenpunkt der WT-Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde. Signifikanzproben erfolgten nach dem Mann-Whitney U Test ($2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$, für IL1- β + IL6 n=4, sonst n=5 $\pm$ SEM). Keine relevanten Signifikanzen für A, B.

4. Diskussion

Der Leber steht als zentralem Organ der Inflammationsreaktion eine besondere Rolle zu, so ist auch deren inter-und intrazelluläre Zellkommunikation von großer Wichtigkeit. Nach Stimulation von Makrophagen mit Zellstressoren, wie LPS, haben die Makrophagen während der Akute-Phase-Reaktion eine gesteigerte Effektorfunktion, welche sich in der Produktion von Zytokinen, Chemokinen und weiteren Kommunikationssignalen äußert. Diese sind für die Orchestrierung der Akute-Phase-Antwort von Bedeutung und aktivieren weitere Signaltransduktionskaskaden in Hepatozyten. Die p38^{MAPK}-Signaltransduktionskaskade und die ihr nachgeschaltete MK2 sind Teil des intrazellulären Kommunikationsmechanismus sowohl in Hepatozyten, als auch in Makrophagen, wenngleich ihr in den verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Aufgabenbereiche zugeschrieben werden. [95, 105, 107, 109]

Im Rahmen des Entzündungsgeschehens unterliegt die Regulation des Eisenstoffwechsels einem komplexen Mechanismus und wird durch das APP Hepcidin moduliert. Die Hepcidinregulation unter Einfluss diverser Faktoren wurde bereits in 1.3 dargelegt. Die Interkonnektivität zahlreicher Stimuli der Hepcidinregulation auf inter-und intrazellulärer Ebene lässt auf dessen komplexe Orchestrierung schließen.

Vorbefunde der Arbeitsgruppe an Tieren mit MK2 Defizienz legen nahe, dass die MK2 einen inhibitorischen Einfluss auf die LPS induzierte Expression des Hamp-Gens im Lebergewebe hat. [108] Darüber hinaus legten noch unveröffentlichte Ergebnisse aus Überstandstransferexperimenten und Co.-Kultur-Untersuchungen nahe, dass die MK2 die Expression des Hamp-Gens im Hepatozyten selbst hemmt. Zielsetzung der hier vorliegenden Untersuchungen war es, die hierfür relevanten Mechanismen weiter aufzuklären.

Die Hepcidinregulation im Rahmen der APA findet sowohl auf Hepatozyten-, als auch auf Makrophagenebene statt. Im Rahmen der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung der Hamp-Induktion im Hepatozyten durch die MK2 auf Ebene des Hepatozyten und nicht des Makrophagen stattfindet, da die Deletion der MK2 in Hepatozyten, in Abhängigkeit von der Zeit, zu einer signifikanten Verstärkung der Expression der Hamp-mRNA in Reaktion auf durch LPS-stimulierte WT Makrophagen konditionierte Überstände führt (Abb. 3.1).

Voraussetzung ist unter Inflammationsbedingungen jedoch eine intakte IL6-Signaltransduktionskaskade seitens des Hepatozyten. Dabei sind insbesondere die von Makrophagen unter Stimulation mit LPS freigesetzten Zytokine IL6 und IL1 für die Regulation des Hamp-Gens in Hepatozyten von Bedeutung. Insbesondere die Freisetzung von IL6 scheint essentiell zu sein, da Deletion des IL6-Rezeptors zu einem nahezu vollständigen Erliegen der Hamp-Expression unter Stimulation mit Überständen, die durch LPS-stimulierte Makrophagen konditioniert wurden, führt (Abb. 3.2).

So ist IL6 ein entscheidender Hepcidin-Induktor, wobei IL1- β eine modulatorische Rolle zugeschrieben wird. *Lee et al. (2005)* wies nach, dass bei mit Überstand von IL6-/- Makrophagen und mit IL6-Antikörpern inkubierten WT-Hepatozyten eine Hamp-Expression gemessen werden kann, wobei diese unter Zugabe von IL6-, IL1- α - und IL1- β -Antikörpern diminuiert wurde. [110] Die inflammationsassoziierte Regulation der Hamp-Expression wird somit vor allem von IL6 gesteuert, ist aber auch unter Einfluss von IL1- β über NF- κ B und anderen Entzündungsmediatoren. [36, 44]

Der hemmende Effekt der MK2 auf die Hamp-Expression in Hepatozyten konnte sowohl unter IL6 bzw. IL1- β Stimulation, als auch unter IL6 und IL1- β Co-Stimulation nachgewiesen werden. Sowohl unter der Stimulation mit IL1- β , als auch IL6 und beider Zytokine gleichzeitig, führt Deletion der MK2 zu einer signifikanten Verstärkung der Expression von Hamp. Anders als bei IL1- β , unterliegt jedoch dieser Effekt im Falle von IL1- β einer gewissen Sättigung und wird erst bei Verwendung niedrigerer Zytokinkonzentrationen deutlich (Abb. 3.3). So hat die MK2 sowohl im IL1- β -, als auch im IL6- und im gemeinsam verlaufenden Signalweg beider Zytokine, bestätigend der Daten von *Radtke et al. (2010)* [104], eine hemmende Funktion, welche bei längerer Stimulation noch verstärkt wird.

Bode et al. (2012) stellte heraus, dass zwar unter Stimulation mit IL1- β die Hamp-Expression in Hepatozyten verstärkt wird, im Gegensatz zu der Expression unter IL6 jedoch erst eine simultane Stimulation mit beiden Zytokinen eine vielfachgesteigerte Hamp-Expression hervorruft. IL1- β wurde als ein molekularer Schalter charakterisiert, welcher als Antwort auf IL6 zur verstärkten Expression von Hepcidin beiträgt. [48] Die modulatorische Funktion von IL1- β äußert sich dabei in einem über die Induktion des Transkriptionsfaktors C/EBP δ direkten [43] und über die Aktivierung von NF- κ B mit Folgen einer vermehrten IL6-Produktion von Makrophagen indirekten Weg [44, 111].

Anlehnend an diese Daten und mit besonderem Augenmerk auf die Involvierung der MK2 weisen die unter 3.4 aufgeführten Ergebnisse eine erhöhte Hamp-Expression in murinen Hepatozyten unter IL1- β oder IL6 Stimulation und eine deutlich höhere Hamp-Expression bei Co-Stimulation mit beiden Zytokinen nach, wobei dieser synergistische Effekt durch Deletion des MK2 Gens weiter verstärkt wird. (Abb. 3.4)

Dabei geschieht die negative Regulation der Hamp-Expression durch die MK2 auf Transkriptebene sowohl unter IL1- β , als auch IL6 Stimulation. Die weitere Bestimmung der primären Transkripte von Hamp durch Intron-Exon überspannende Primer [112] weist einen deutlichen Unterschied zwischen WT Hepatozyten und MK2^{-/-} Hepatozyten nach, wobei dieser bezogen auf das jeweilige Zytokin oder deren Co-Stimulation nicht variiert. (Abb. 3.5) Die regulatorische Funktion auf Transkriptebene ist für die MK2 bekannt und ebenfalls für weitere Zytokine und andere Signalfaktoren ausführlich beschrieben. So reguliert die MK2 die Transkriptstabilität von TTP [102], und basal und unter TNF α Stimulation von SOCS3 [105] positiv und direkt, aber auch indirekt über die Phosphorylierung von TTP als Modulator von IL8, IL2, IL6, IL10 und IFN γ . [95, 99-101]

Im Hinblick auf die Regulation der Hamp-Expression hat die MK2 jedoch anscheinend keinen Einfluss auf Transkriptstabilität. Im Rahmen von Decay-Experimenten unter Verwendung von Actinomycin D mit primären murinen WT und MK2^{-/-} Hepatozyten konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Halblebenszeit der mRNA bestimmt werden (Abb. 3.6). Die Vermutung liegt nahe, dass das Hamp-Transkript in primären Zellen eine größere Stabilität aufweist und von zusätzlichen Faktoren stabilitätsfördernd reguliert wird. In diesem Zusammenhang lies sich zwar eine Induktion von Hamp durch IL1- β Stimulation nachweisen, aber es konnte weiterhin kein nachweisbarer Einfluss der MK2 auf Transkriptstabilität gemessen werden. Jedoch lassen weitere Versuche mit der hepatozytären Zelllinie HepG2 mit MK2 *knock down* die Vermutung aufstellen, dass das Hamp-Transkript eine Halblebenszeit von 80 Minuten erreicht, die MK2 jedoch im Vergleich zu Kontrollproben keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität aufweist (Abb. 3.8). Insofern wäre die Annahme über eine nicht-Involvierung der MK2 beim Einfluss auf Transkriptstabilität von Hamp in primären Hepatozyten möglich.

Bestätigend der Ergebnisse von *Hahnel (2015)* [108], sowie anlehnend an eigene Daten aus primären murinen Hepatozyten (Abb. 3.4), weisen auch eigene Daten aus der hepatozytären Zelllinie HepG2 eine Erhöhung der Hamp-mRNA-Expression bei MK2 Defizienz basal und unter IL1- β - und/oder IL6-Stimulation nach. Jedoch sind gemessene stimulatorische Zytokineffekte weitaus geringer ausgeprägt, als in primären murinen Hepatozyten (Abb. 3.7). Es liegt die Vermutung nahe, dass das humane System eine nochmals der murinen abweichende Signaltransduktion für IL1- β und IL6 aufweist, wobei die Vermutung, dass die HepG2 als hepatozytäre Zelllinie nicht die vollständigen Mechanismen der IL1- β - und IL6 Signaltransduktion im Vergleich zu einem primären Hepatozyten besitzt, wahrscheinlicher ist.

Bei weiterer Untersuchung der Involvierung der IL1- β -, als auch der IL6 Signaltransduktion für die Hamp-Expression in murinen Wildtyp Hepatozyten und MK2^{-/-} Hepatozyten scheint auch der JNK-Signalweg von besonderer Bedeutung zu sein, da bei seiner Inhibition die Hamp-Expression vermindert ist. Weiterhin zeigt sich unter IL6 Stimulation in Abwesenheit der MK2 auch bei Inhibition von IKK2 die Hamp-Expression vermindert (Abb. 3.9). Wenngleich die IL6-abhängige Hamp-Expression mit Augenmerk auf den JNK-Weg noch wenig beschrieben wurde, hat *Kanamori et al. (2018)* ebenfalls den JNK-Weg über Stimulation mit IL1- β für die Hamp-Expression in seiner Bedeutung unterstrichen. [113] Die inhibitorische Funktion der MK2 auf I κ B wurde ebenfalls beschrieben, dabei lies sich eine verminderten Hamp-Expression über NF- κ B und STAT3 bei Abwesenheit der MK2 und simultaner Inhibition von IKK2 nachweisen. [107]

Des weiteren deuten die im Ergebnisteil aufgeführten Daten darauf hin, dass die MK2 nicht in die STAT3-Aktivierung unter IL6-Stimulation involviert ist, da die STAT3-Phosphorylierung bei MK2-Deprivation in primären murinen Hepatozyten auf Proteinebene keinen Unterschied zu stimulierten WT Hepatozyten nachweisen lässt (Abb. 3.10). Die Daten bestätigen aber ebenfalls den ersten Anstieg der STAT3-Phosphorylierung unter IL6 nach 40 Minuten, welchen auch *Wang et al. (2013)* in seiner Untersuchung zur STAT3-Phosphorylierung unter IL6 Stimulation in Zeitreihen auf Proteinebene in DLD1 Colonkarzinomzellen beschreibt. [114] *Radtko et al. (2010)* stellt sogar als eine der Funktionen der MK2 unter Stimulation mit IL1- β , TNF α oder weiteren Zellstressoren eine negative Regulation des IL6 abhängigen STAT3-Signalweges in primären murinen Hepatozyten heraus. [104] Im Gegensatz zu der weiter oben beschriebenen Funktion der MK2 als negativer Modulator des STAT3-Signalweges weist *Ehrling et al. (2011)* in murinen Makrophagen unter LPS-Stimulation nach, dass die MK2 als negativer Modulator die inhibitorische Wirkung der MK3 im IFN- β Signalweg zur weiteren STAT3-Aktivierung aufhebt und demzufolge positiv modulierend wirkt. [107] Insofern wirkt die MK2 vermutlich weniger unter singulärem Einfluss direkt STAT3 modulierend, sondern eingebunden in ein inter-und intramodulierendes Netzwerk.

Weiterhin hat den in 3.11 aufgeführten Daten zufolge die MK2 Einfluss auf die IL1- β abhängige SOCS3-Induktion, da sich unter IL1- β Stimulation von murinen WT und MK2^{-/-} Hepatozyten die SOCS3-mRNA-Expression bei MK2 Abwesenheit geringfügig erhöht darstellt (Abb. 3.11). In diesem Kontext wurde von *Ehrling et al. (2007)* die transkriptstabilisierende Funktion der MK2 von SOCS3 unter Stimulation mit TNF α in murinen Makrophagen und Fibroblasten herausgestellt. [105] Vergleichend mit den Ergebnissen aus 3.11 lässt sich vermuten, dass obgleich unter Stimulation TNF α die MK2 zur Stabilisierung des SOCS3-Transkripts beiträgt, sie doch unter Stimulation IL1- β und IL6 negativ regulierende Effekte auf die SOCS3-mRNA zu haben scheint.

Wenngleich unter 3.4 ein negativ modulierender Effekt der MK2 auf den Synergismus zwischen IL6 und IL1- β für die Hamp-Induktion festgestellt wurde, so lassen die Daten aus 3.12 auf eine positive Modulation seitens der MK2 auf den Synergismus zwischen IL6 und IL1- β zur TTP-Induktion schließen, da bei MK2-Abwesenheit in primären murinen Hepatozyten unter IL6- und IL1- β Stimulation die Menge der gemessenen TTP-mRNA signifikant erniedrigt ist (Abb. 3.12). Wie in 1.8 dargelegt, wurde die Interaktion von MK2 und TTP bislang vor allem im Hinblick auf die Beeinflussung der Transkriptstabilität untersucht, Arbeiten von *Ronkina et al. (2010)* lassen aber auch auf eine MK2-Regulation der *de novo* Synthese von TTP auf Transkriptebezug schließen. [115] Es lässt sich vermuten, dass im Kontext einer des Inflammationsgeschehens simulierenden Stimulation eine Vielzahl von modulatorischen Signalkaskaden aktiviert werden, welche diverse Effekte der MK2 auf TTP implizieren.

In der vorliegenden Untersuchung konnte belegt werden, dass die MK2 im Hepatozyten die Expression des Eisenregulators Hepcidin im Kontext einer Entzündungsreaktion, am ehesten auf Ebene der Transkription, inhibitorisch beeinflusst. Untersuchungen der interzellulären Kommunikation von Makrophagen und Hepatozyten unter Verwendung von Hepatozyten, die unter anderem aus IL1R bzw. IL6R-defizienten Tieren isoliert wurden, belegen ferner, dass im Kontext einer LPS-induzierten Entzündungsreaktion vor allem IL6 für die Induktion der Expression von Hepcidin essentiell ist, während IL1 eher eine verstärkende/modulierende Bedeutung zukommt. Ferner belegen sie, dass der MK2 im Makrophagen, trotz ihrer bekannten Bedeutung für die Produktion von Interleukinen und Chemokinen im Makrophagen, eine untergeordnete Bedeutung für die Regulation der Hepcidin-Expression im Hepatozyten zukommt. Diese Befunde sind insbesondere vor dem Hintergrund von Bedeutung, dass MK2-Inhibitoren im Rahmen klinischer Studien zur Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen eingesetzt werden. Entsprechend wäre denkbar, dass es unter einer Therapie mit MK2-Inhibitoren möglicherweise zu einer verstärkten Freisetzung von Hepcidin kommt und einer hierdurch bedingten Eisenverwertungsstörung mit den entsprechenden Konsequenzen. Ein Aspekt, der zumindest im Rahmen entsprechender Studien verstärkt kontrolliert werden sollte.

Die Regulation des Eisenhaushalts unter Entzündungsgeschehen ist von besonderer Wichtigkeit für den Organismus, welcher potentiell stetig inflammationsinduzierenden Umweltfaktoren ausgesetzt ist. Zahlreiche Mechanismen der so aktivierten inter- und intrazellulären Zellkommunikation und Modulation von Signalkaskaden sind bislang noch Element der Forschung und bedürfen der Aufklärung. In dieser Arbeit wurde mit Hinblick auf die regulatorische Funktion der MK2 von Hepcidin unter entzündungsassoziierten Signalfaktoren zur Aufklärung der diversen Transduktionsmechanismen in der Regulation des Eisenstoffwechsels beigetragen.

5. Literatur-und Quellenverzeichnis

1. Donovan, A., C.N. Roy, and N.C. Andrews, *The ins and outs of iron homeostasis*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 115-23.
2. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004. **117**(3): p. 285-97.
3. Gitlin, D. and A. Cruchaud, *On the kinetics of iron absorption in mice*. J Clin Invest, 1962. **41**: p. 344-50.
4. Muir, A. and U. Hopfer, *Regional specificity of iron uptake by small intestinal brush-border membranes from normal and iron-deficient mice*. Am J Physiol, 1985. **248**(3 Pt 1): p. G376-9.
5. Donovan, A., et al., *The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 191-200.
6. Laurell, C.B., *What is the function of transferrin in plasma?* Blood, 1951. **6**(2): p. 183-7.
7. Torti, F.M. and S.V. Torti, *Regulation of ferritin genes and protein*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3505-16.
8. Gunshin, H., et al., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
9. Morgan, E.H. and E. Baker, *Iron uptake and metabolism by hepatocytes*. Fed Proc, 1986. **45**(12): p. 2810-6.
10. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 776-81.
11. Abboud, S. and D.J. Haile, *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19906-12.
12. Harris, Z.L., et al., *Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10812-7.
13. McKie, A.T., et al., *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 299-309.
14. De Domenico, I., et al., *The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(7): p. 2569-78.
15. Krause, A., et al., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 147-50.
16. Hunter, H.N., et al., *The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37597-603.
17. Sow, F.B., et al., *Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(4): p. 934-45.
18. Park, C.H., et al., *Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7806-10.
19. Roy, C.N., et al., *Hepcidin antimicrobial peptide transgenic mice exhibit features of the anemia of inflammation*. Blood, 2007. **109**(9): p. 4038-44.
20. Abreu, R., F. Quinn, and P.K. Giri, *Role of the hepcidin-ferroportin axis in pathogen-mediated intracellular iron sequestration in human phagocytic cells*. Blood Adv, 2018. **2**(10): p. 1089-1100.
21. Nemeth, E. and T. Ganz, *The role of hepcidin in iron metabolism*. Acta Haematol, 2009. **122**(2-3): p. 78-86.

22. Braun, V. and H. Killmann, *Bacterial solutions to the iron-supply problem*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(3): p. 104-9.
23. Drakesmith, H. and A.M. Prentice, *Hepcidin and the iron-infection axis*. Science, 2012. **338**(6108): p. 768-72.
24. Ramey, G., et al., *Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes*. Haematologica, 2010. **95**(3): p. 501-4.
25. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
26. Ganz, T., *Hepcidin and iron regulation, 10 years later*. Blood, 2011. **117**(17): p. 4425-33.
27. Goswami, T. and N.C. Andrews, *Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 28494-8.
28. Rishi, G., D.F. Wallace, and V.N. Subramaniam, *Hepcidin: regulation of the master iron regulator*. Biosci Rep, 2015. **35**(3).
29. Andriopoulos, B., Jr., et al., *BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 482-7.
30. Camaschella, C. and L. Silvestri, *Molecular mechanisms regulating hepcidin revealed by hepcidin disorders*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 1357-66.
31. Tanno, T., et al., *High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1096-101.
32. Tanno, T., et al., *Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells*. Blood, 2009. **114**(1): p. 181-6.
33. Peyssonnaud, C., et al., *Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1926-32.
34. Nemeth, E., et al., *Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2461-3.
35. Carbia-Nagashima, A. and E. Arzt, *Intracellular proteins and mechanisms involved in the control of gp130/JAK/STAT cytokine signaling*. IUBMB Life, 2004. **56**(2): p. 83-8.
36. Wrighting, D.M. and N.C. Andrews, *Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3204-9.
37. Verga Falzacappa, M.V., et al., *STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation*. Blood, 2007. **109**(1): p. 353-8.
38. Pietrangelo, A., et al., *STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 294-300.
39. J. G. Bode, P.C.H., *Interleukin-6 signaling during the acute-phase response of the liver*. 4 ed. The Liver: Biology and Pathobiology. 2001, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 16.
40. Wang, R.H., et al., *A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression*. Cell Metab, 2005. **2**(6): p. 399-409.
41. Besson-Fournier, C., et al., *Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling*. Blood, 2012. **120**(2): p. 431-9.
42. Mayeur, C., et al., *The type I BMP receptor Alk3 is required for the induction of hepatic hepcidin gene expression by interleukin-6*. Blood, 2014. **123**(14): p. 2261-8.

43. Kanamori, Y., et al., *Interleukin-1beta (IL-1beta) transcriptionally activates hepcidin by inducing CCAAT enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) expression in hepatocytes*. J Biol Chem, 2017. **292**(24): p. 10275-10287.
44. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2327-34.
45. Nemeth, E., et al., *IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1271-6.
46. Cray, C., J. Zaias, and N.H. Altman, *Acute phase response in animals: a review*. Comp Med, 2009. **59**(6): p. 517-26.
47. Baumann, H. and J. Gauldie, *The acute phase response*. Immunol Today, 1994. **15**(2): p. 74-80.
48. 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.
49. Jain, S., V. Gautam, and S. Naseem, *Acute-phase proteins: As diagnostic tool*. J Pharm Bioallied Sci, 2011. **3**(1): p. 118-27.
50. Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000414.
51. Seong, S.Y. and P. Matzinger, *Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 469-78.
52. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-151.
53. Palsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. Immunology, 2004. **113**(2): p. 153-62.
54. Mercurio, F., et al., *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. Science, 1997. **278**(5339): p. 860-6.
55. Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht, *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. Sci Signal, 2010. **3**(105): p. cm1.
56. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
57. Weinstein, S.L., et al., *Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14955-62.
58. Sims, J.E., et al., *A new nomenclature for IL-1-family genes*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 536-7.
59. Vela, J.M., et al., *Interleukin-1 regulates proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells*. Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(3): p. 489-502.
60. Friedlander, R.M., et al., *Functional role of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 717-24.
61. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 519-50.
62. Keller, M., et al., *Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion*. Cell, 2008. **132**(5): p. 818-31.

63. Dinarello, C.A., et al., *Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro.* J Immunol, 1987. **139**(6): p. 1902-10.
64. Schreuder, H., et al., *A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist.* Nature, 1997. **386**(6621): p. 194-200.
65. Greenfeder, S.A., et al., *Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex.* J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 13757-65.
66. Casadio, R., et al., *Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex.* FEBS Lett, 2001. **499**(1-2): p. 65-8.
67. Cao, Z., et al., *TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1.* Nature, 1996. **383**(6599): p. 443-6.
68. Kawagoe, T., et al., *Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2.* Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 684-91.
69. Cao, Z., W.J. Henzel, and X. Gao, *IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor.* Science, 1996. **271**(5252): p. 1128-31.
70. Huang, Q., et al., *Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3.* Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 98-103.
71. Rose-John, S., *Interleukin-6 Family Cytokines.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(2).
72. Schmidt-Arras, D. and S. Rose-John, *IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy.* J Hepatol, 2016. **64**(6): p. 1403-15.
73. Rose-John, S., *IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6.* Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1237-47.
74. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.* Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
75. Babon, J.J., L.N. Varghese, and N.A. Nicola, *Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3.* Semin Immunol, 2014. **26**(1): p. 13-9.
76. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.* Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
77. Ono, K. and J. Han, *The p38 signal transduction pathway: activation and function.* Cell Signal, 2000. **12**(1): p. 1-13.
78. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.* Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 320-44.
79. Alberts B, J.A., Lewis J, et al., *Signaling through Enzyme-Linked Cell-Surface Receptors.* 4 ed. Molecular Biology of the Cell 2002, New York: Garland Science.
80. Cuenda, A. and S. Rousseau, *p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1358-75.
81. Chang, F., et al., *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention.* Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1263-93.
82. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.* Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(1): p. 50-83.
83. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling.* Biochem J, 2010. **429**(3): p. 403-17.
84. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway.* Cell Res, 2005. **15**(1): p. 11-8.

85. Lee, J.C., et al., *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 739-46.
86. Badger, A.M., et al., *SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 467-73.
87. Pietersma, A., et al., *p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(1): p. 44-8.
88. Kummer, J.L., P.K. Rao, and K.A. Heidenreich, *Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20490-4.
89. Freshney, N.W., et al., *Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1039-49.
90. Singh, R.K., A.K. Najmi, and S.G. Dastidar, *Biological functions and role of mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 2 (MK2) in inflammatory diseases*. Pharmacol Rep, 2017. **69**(4): p. 746-756.
91. White, A., et al., *Molecular basis of MAPK-activated protein kinase 2:p38 assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6353-8.
92. Ben-Levy, R., et al., *Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2*. EMBO J, 1995. **14**(23): p. 5920-30.
93. Ben-Levy, R., et al., *Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2*. Curr Biol, 1998. **8**(19): p. 1049-57.
94. Kotlyarov, A., et al., *MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(2): p. 94-7.
95. 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.
96. Rousseau, S., et al., *Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs*. EMBO J, 2002. **21**(23): p. 6505-14.
97. Stoecklin, G., et al., *MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay*. EMBO J, 2004. **23**(6): p. 1313-24.
98. Carballo, E., W.S. Lai, and P.J. Blackshear, *Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin*. Science, 1998. **281**(5379): p. 1001-5.
99. Stoecklin, G., et al., *Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin*. J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11689-99.
100. Ogilvie, R.L., et al., *Tristetraprolin mediates interferon-gamma mRNA decay*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11216-23.
101. Zhao, W., et al., *Tristetraprolin regulates interleukin-6 expression through p38 MAPK-dependent affinity changes with mRNA 3' untranslated region*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(8): p. 629-37.
102. Hitti, E., et al., *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(6): p. 2399-407.
103. Wang, X., et al., *Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 782-91.

104. Radtke, S., et al., *Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 6): p. 947-59.
105. Ehlting, C., et al., *Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2813-26.
106. Heo, K.S., et al., *Phosphorylation of protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) by MAPK-activated protein kinase-2 inhibits endothelial inflammation via increasing both PIAS1 transrepression and SUMO E3 ligase activity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(2): p. 321-9.
107. Ehlting, 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*. J Biol Chem, 2011. **286**(27): p. 24113-24.
108. Hahnel, M., *Intrahepatische Charakterisierung der LPS induzierten Akut-Phase Reaktion unter dem Einfluss der MK2*. 2015, unveröffentlichte Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
109. Bode, J.G., C. Ehlting, and D. Haussinger, *The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis*. Cell Signal, 2012. **24**(6): p. 1185-94.
110. Lee, P., et al., *Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 1906-10.
111. Lawrence, T., *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a001651.
112. Ponzio, T.A., C. Yue, and H. Gainer, *An intron-based real-time PCR method for measuring vasopressin gene transcription*. J Neurosci Methods, 2007. **164**(1): p. 149-54.
113. Kanamori, Y., et al., *JNK facilitates IL-1beta-induced hepcidin transcription via JunB activation*. Cytokine, 2018. **111**: p. 295-302.
114. Wang, Y., et al., *STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. 16975-80.
115. Ronkina, N., et al., *MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 1915-20.

6. Danksagung

Zunächst einmal gilt mein außerordentlicher Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Johannes G. Bode, dem Stellvertretenden Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Vielen Dank für Deine Betreuung, für die Ausgabe meines Themas, für die langen intensiven Besprechungen meiner Arbeit bis in die späten Abendstunden hinein. Für die Beibringung der akribischen Datenanalyse und für die vielen Lehrstunden, der Diskussion und Erörterung meiner Experimente und des sie umfassenden Gesamtkonzepts. Für den Ansporn zur stets fortlaufenden Tätigkeit und anschließend für die kritische Begutachtung und Korrektur meiner Arbeit. Ich danke Dir, dass Du trotz jeglicher schwierigen Zeit stets ein Ohr für meine Anliegen und ein Auge für meine Arbeit hattest. Und egal, wie groß die Flut der anstürmenden Herausforderungen war, dass ich bei Dir als Doktorvater immer das Licht eines sicheren Hafens sehen konnte.

Natürlich bedanke ich mich auch für die schönen gemeinsamen Grill- und Weihnachtsabende mit Dir und Deiner Arbeitsgruppe. Ob während eines Happens Käsefondue, Tiramisu oder beim Grillen im Garten: es war immer eine sehr offene, einladende und freundschaftliche Atmosphäre und ich habe mich stets gefreut, mit Euch gemeinsam in den unterschiedlichsten, spannenden, lustigen, dem Labor auch oft so fernen Gesprächsthemen teilzuhaben. Das Wort „Gemeinschaft“ wird in Deiner Arbeitsgruppe besonders groß geschrieben und ich war froh, auch wenn für einen kurzen Moment, Teil dieses Kollektivs zu sein.

Bedanken möchte mich auch bei Frau PD Dr. med. Julia Reifenberger, Oberärztin in der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf für Ihre Tätigkeit als Co-Betreuerin. Vielen Dank für die Begutachtung meiner Arbeit und somit für die Ermöglichung meiner Promotion an der medizinischen Fakultät.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. rer. nat. Christian Ehlting, dem Leiter der AG Bode in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Lieber Christian, vielen Dank Dir für die ausführliche und genaue Einweisung in alle Arbeitsvorgänge, für die Aufsicht über meine Experimente und für jegliche Form von Hilfe in der für uns Studenten doch so neuen Welt im Labor. Bei jedem kleinsten Problem konnten wir uns an Dich wenden, angefangen bei der Herstellung von Pufferlösungen bis zur Anleitung zur Datenauswertung bei Excel. Egal, welches Anliegen wir hatten, Du warst immer da und konntest uns mit einem Rat bei Seite stehen und für künftige Versuche anleiten.

Außerdem möchte ich Frau Dr. rer. nat. Ute Albrecht, wissenschaftlicher Mitarbeiterin der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf danken. Liebe Ute, vielen Dank Dir für Deine ausführlichen und wichtigen Korrekturen meiner Arbeit, welche mir geholfen haben, mein Manuskript nochmals zu verbessern.

Weiterhin gilt mein Dank Marijana Suzanji und Theresa Ohly für Eure tagtägliche Hilfe bei der Meisterung des Laboralltags. Vielen Dank für das Zeigen und Erklären sämtlicher Arbeitsabläufe, für das Anleiten, für Eure Zeit und Geduld und die Hilfsbereitschaft, mit welcher Ihr uns Studenten begegnet seid. Immer konnten wir euch Fragen stellen und immer konnten wir uns auf Eure Hilfe verlassen.

Natürlich gilt mein Dank nicht nur der ganzen AG Bode mit Christian, Steffi, Sabine und Marijana, sondern allen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie in den Laborräumen von Gebäude 23.12. Danke Euch für das warme Willkommen, für die schöne, aufregende, arbeitsintensive und lustige Zeit, welche ich gemeinsam mit Euch verbracht habe. Danke für die Waffelnachmittage, für das Mini-Golfen im Schwarzlicht, für das gemeinsame Kuchenessen im „großen Büro“, für das gesellige Miteinander, für die Experimente voller Fleiß und Konzentration und die fröhlichen, lauten, musikalischen und bunten Karnevalsfeiern. Es war eine unglaubliche Zeit mit Euch mit vielen nuancierten Erfahrungen, mit Wolken und Sonnenschein, Hepatozyten und Makrophagen, Pipetten und Petrischalen, Keksen und Kuchen. Ich werde diese Zeit mit Euch nie vergessen und wünsche Euch allen alles Gute für die Zukunft.

Mein wichtigster Dank gilt meiner Familie. Ihr habt mich zu jeder Zeit unterstützt, seien es Höhen oder Tiefen. Ihr habt mir immer zugehört, wenn ich ein offenes Ohr brauchte, Ihr habt mir weise Ratschläge gegeben, Ihr wart da, als ich die erste Probe pipettiert habe und den letzten Buchstaben der Diskussion zu Ende getippt habe. Wenn jemand meine liebevollste Dankbarkeit verdient, dann seid Ihr das. Ihr, wie Ihr so selbstlos mit mir zusammen diesen Weg gegangen seid. Und dafür gilt mein allergrößter, innigster und herzlichster Dank.