

*Regulation des Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in
Entzündungsprozessen:
Mechanismen und funktionelle Bedeutung*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät NT
Bioinformatik, Biotechnologie, Chemie, Human- und Molekularbiologie,
Materialwissenschaft, Werkstofftechnik und Pharmazie
der Universität des Saarlandes

von

Nina Hachenthal

Saarbrücken, 2017

Tag des Kolloquiums:

12.12.2017

Dekan:

Prof. Dr. Guido Kickelbick

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Luzhetskyy

Vorsitz:

Prof. Dr. Schneider

Akademischer Mitarbeiter:

Dr. Stefan Boettcher

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, den

(Nina Hachenthal)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Abstract	6
Zusammenfassung	7
Einleitung	8
1. Glucocorticoid-induced leucine zipper	9
2. Toll-like Rezeptoren	13
3. Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen	16
Kapitel 1	
Nanopartikuläre Strukturen aktivieren die GTPase Rac1 in humanen Makrophagen	25
Einleitung	26
Ergebnisse	29
Diskussion	37
Kapitel 2	
Eine verminderte Expression des Glucocorticoid-induced leucine zipper verstärkt vaskuläre Entzündungen in Endothelzellen	45
Einleitung	46
Ergebnisse	48
Diskussion	56
Kapitel 3	
Die Induktion des Glucocorticoid-induced leucine zipper durch den anti-inflammatorischen Naturstoff Curcumin in Makrophagen	62
Einleitung	63
Ergebnisse	66
Diskussion	73
Anhang zu Kapitel 3	79
Kapitel 4	
Regulation des Glucocorticoid-induced leucine zipper über miRNAs in Makrophagen	89
Einleitung	90
Ergebnisse	98

Diskussion.....	119
Anhang zu Kapitel 4	129
Materialien und Methoden.....	135
Materialien.....	136
Zellkultur	137
Plasmid-Generierung	139
Bakterienkultur	144
Zell-Transfektion.....	145
Zellbehandlung.....	148
RNA-Isolierung und Reverse Transkription.....	151
Real-time RT-PCR	154
HuR-Immunopräzipitation mit magnetischen Beads	159
Northern Blot	164
Rac-1 Aktivitäts Assay / pulldown Assay	165
SDS-PAGE und Western Blot.....	172
Statistik	175
Referenzen.....	176
Publikationen.....	194
Danksagungen	196

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AGO	Argonaut
AMs	Alveolarmakrophagen
Amp	Ampicillin
AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATA	aurintricarboxylic acid
atto	10^{-18}
ARE	AU-rich element
AS	Aminosäuren
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Bp	base pairs
BP	binding protein
BSA	bovine serum albumin
CCL2	chemokine C-C motif ligand 2
CLR	C-type lectin receptor
CMV	cytomegalo virus
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
DAMP	danger-associated molecular pattern
DEPC	diethyl dicarbonate
DLS	dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DNA	deoxyribonucleic acid
Dnase	deoxyribonuclease
DUSP1	dual-specificity protein phosphatase 1

ECs	Endothelzellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELAV	embryonic lethal abnormal vision
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FCS	fetal calf serum
<i>x g</i>	<i>x</i> -fold gravitational force
G	Gramm
G	Guanin
GC	Glucocorticoid
GILZ	Glucocorticoid-induced leucine zipper
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GR	glucocorticoid receptor
GREs	glucocorticoid responsive elements
h	Stunde
HEK cells	human embryonic kidney cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
HuR	human antigen R
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IFN	Interferon
IκB	Inhibitory protein κB
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
IP10	IFNγ inducible protein 10
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	infrarot
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRES	Internal ribosome entry site
ISS	immunstimulatory sequences

kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
LZ	leucine zipper
m	Milli (10^{-3})
M	molar
MAL	MyD88-adapter-like
MAPK	mitogen-activated protein kinase
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
MW	molecular weight
μ	micro (10^{-6})
miR	micro RNA
miRISC	miRNA-RISC-Komplex
miRNA	micro RNA
Min	Minute
MKP-1	mitogen kinase phosphatase-1
MΦs	Macrophagen
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymal stem cells
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	myeloid differentiation factor 88
N	nano (10^{-9})
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ncRNA	non coding RNA
NF-κB	nuclear factor-κB

NLR	Npd-like receptor
NP	Nanopartikel
Nrf2	nuclear factor erythroid 2
ODN	oligodeoxynucleotide
PABP	poly(A)-binding protein
PACT	kinase R-activating protein
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
p-bodies	Processsing bodies
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PIC	polyinosinic:polycytidylic acid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO-ODN	phosphodiester olegonucleotide
pre-miRNA	precursor-miRNA
pri-miRNA	primary-miRNA
PRR	pattern recognition receptor
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
Rnase	Ribonuclease
ROS	Reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRE	RNA regulatory elements
RT	reverse transcription
SARM	sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein
SDS	sodium dodecyl sulfate
SELE	E-Selektin

SEM	standard error of the mean
SiNP	Silica Nanopartikel
Tab	Tabelle
TAMs	tumor-associated macrophages
TBE	tris borate EDTA buffer
TE	tris EDTA buffer
TIR	toll/interleukin-1 receptor
TK	thymidine kinase
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRAF	tumor necrosis factor receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRBP	transactivating response RNA-binding protein
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
Tris	α,α,α -tris-(hydroxymethyl)-methylamine
TTP	Tristetraprolin
U	unit
UTR	untranslated region
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
ZFP36	zinc finger protein 36

Abstract

Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) is an anti-inflammatory mediator which is intimately involved in the effects of glucocorticoids. The aim of this work was to examine the regulation mechanisms of GILZ in inflammation.

Because of the great importance of TLR-stimulation in inflammatory reactions, we analysed the hypothesis that GILZ levels are regulated in TLR-mediated inflammatory processes. We indicated a regulation of GILZ *via* the mRNA-BP ZFP36 upon treatment of macrophages and endothelial cells with the inflammatory cytokine TNF- α . However, in case of the GILZ regulation after stimulation of the TRIF-dependent pathway, our results suggest that the expression of GILZ-regulating miRNAs plays a role. They probably have an inhibiting effect on *GILZ* mRNA translation.

Anti-inflammatory processes regarding GILZ regulation were analysed as well. We could demonstrate that the natural compound curcumin can upregulate GILZ, independently of a GR-activation as well as a transcriptionell induction or protein- or mRNA stabilisation. GILZ induction is mediated by an induced *GILZ* mRNA translation through the mRNA-BP HuR instead.

All these investigations to clarify the GILZ regulation pathways are highly important for the understanding and treatment of inflammatory diseases, where GILZ could act as a novel target.

Zusammenfassung

Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) ist ein anti-inflammatorischer Mediator, der wesentlich an den Wirkungen von Glukokortikoiden beteiligt ist. Das Ziel dieser Arbeit war die Regulation von GILZ in Entzündungsmodellen zu untersuchen.

Aufgrund der zentralen Rolle einer *Toll-like receptor* (TLR)-Aktivierung in Entzündungsprozessen wurde die Hypothese überprüft, dass GILZ-Spiegel in TLR-vermittelten Entzündungsreaktionen reguliert werden. Es wurde gezeigt, dass in Makrophagen und Endothelzellen GILZ nach Behandlung mit dem Zytokin TNF- α über das mRNA-BP ZFP36 reguliert wird.

In dem Prozess der GILZ-Regulation nach Anstoß des TRIF-abhängigen Signalweges hingegen weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Expression von GILZ-regulierenden miRNAs, die vermutlich einen Translations-hemmenden Effekt auf die *GILZ* mRNA ausüben, eine Rolle spielt.

Daneben wurden auch anti-inflammatorische Prozesse im Hinblick auf die GILZ-Regulation untersucht. Es wurde gezeigt, dass durch den Naturstoff Curcumin GILZ hochreguliert wird, was weder abhängig von einer GR-Aktivierung, noch von einer transkriptionellen Induktion oder einer Protein- oder mRNA-Stabilisierung verläuft. Stattdessen wird die GILZ-Induktion über das mRNA-BP HuR mittels einer vermehrten *GILZ* mRNA-Translation vermittelt.

Diese Untersuchungen zur Aufklärung der Regulationsmechanismen von GILZ sind von großer Bedeutung für das Verständnis und die Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, in denen GILZ als neues Target dienen könnte.

Einleitung

1. Glucocorticoid-induced leucine zipper

Struktur von GILZ

GILZ wurde erstmals 1997 von D'Adamio et al. identifiziert und als ein durch Glukokortikoide induzierbares, anti-inflammatorisches Protein in T-Lymphozyten beschrieben (D'Adamio et al., 1997). Das humane GILZ Protein besteht aus 135 Aminosäuren (AS) und ist stark homolog zu murinem GILZ (137 AS). Beide weisen eine ungefähre molare Masse von 17 Kilodalton (kDa) auf. Murines GILZ besteht aus einer C-terminalen Prolin- und Glutamin-reichen Region (PER, AS 98-137), einer N-terminalen (AS 1-75) und einer Leucin Zipper (LZ) Domäne (AS 76-97). Basierend auf diesem speziellen Strukturmotiv zählt GILZ zu der LZ-Familie, bei der an jeder siebten Position eine periodische Wiederholung von Leucinen auftritt (Cannarile, Zollo et al., 2001, Marco, Massetti et al., 2007). Aufgrund dieser Struktur können sich die α -Helices zweier LZ-Proteine zusammenlagern und eine linksgängige Superhelix ausbilden, was GILZ sowohl zur Homo-, als auch zur Heterodimerisierung befähigt (Abb. 1) (Marco et al., 2007b; Rasmussen et al., 1991).

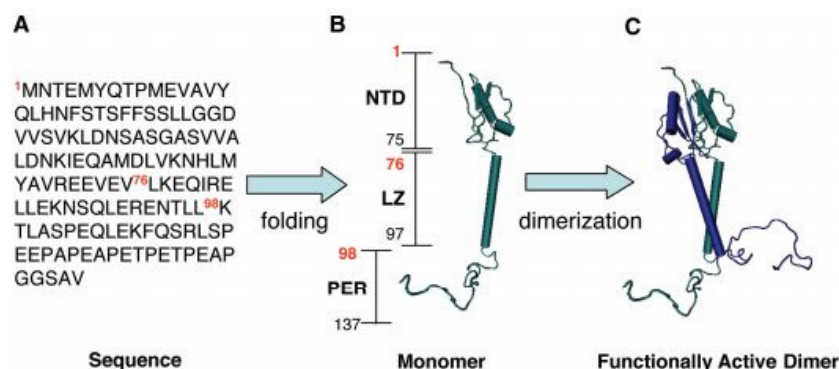


Abb. 1: Murine GILZ Protein Sequenz und dessen strukturabhängige Homodimerisierung.
Nach Di Marco et al., 2007. NTD: *N-terminal domain*, LZ: *leucine zipper*, PER: *proline and glutamic acid rich region*

Das *Tsc22d3* Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Ayroldi & Riccardi, 2009, Cannarile et al., 2001). Nach Charakterisierung der humanen *GILZ* Promotorsequenz konnte festgestellt werden, dass sechs *glucocorticoid responsive elements* (GREs) im *GILZ* Promotor lokalisiert sind (Asselin-Labat et al., 2004; Wang et al., 2004), die eine wichtige Voraussetzung für die Induktion von *GILZ* durch Glukokortikoide darstellen (Ayroldi and Riccardi, 2009).

Für den Menschen sind drei verschiedene Spleißvarianten bekannt, wobei Variante 2 überwiegend exprimiert wird, was für Makrophagen, Epithelzellen und Endothelzellen gezeigt wurde (Hoppstädter et al., 2012).

Induktion von *GILZ*

Glukokortikoide (GCs) können durch Interaktion mit dem Glukokortikoidrezeptor (GR) genomische und nicht-genomische Effekte induzieren. Einigen Effekten liegt dabei zugrunde, dass der GR als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor agieren kann, der entweder die Genexpression direkt durch Bindung an DNA oder indirekt durch Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren reguliert (Di Marco et al., 2007). Im ersten Fall kann der GR nach Hormonbindung homodimerisieren, in den Nukleus translozieren, an spezifische Sequenzen in der Promotorregion der DNA, den *GC-response elements* (GREs), binden und somit die Expression regulieren (Aoyagi and Archer, 2011). Diese Art des Wirkmechanismus bezeichnet man als Transaktivierung. Auf diese Weise wird die Expression einiger anti-inflammatorischer Proteine, wie zum Beispiel inhibierender Faktor $\kappa\text{B}\alpha$ ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), *mitogen-activated protein kinase phosphatase 1* (MKP-1) und auch *GILZ* induziert. Die Transaktivierung von verschiedenen Genen ist vermutlich auch für die meisten Nebenwirkungen der GCs verantwortlich (Ayroldi et al., 2014).

Die Transrepression hingegen beschreibt einen Mechanismus, bei dem monomere GC-GR-Komplexe mit Transkriptionsfaktoren interagieren und so zum Beispiel die Expression von inflammatorischen Faktoren, wie dem Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (*nuclear factor- κ B*, NF- κ B), hemmen (Auphan et al., 1995; Ayroldi et al., 2014). Diese Art der GR-Aktivität liegt wohl den meisten anti-inflammatorischen Effekten der GCs zugrunde (Ayroldi et al., 2014).

Anti-inflammatorische Funktion von GILZ

GILZ ist in einer Vielzahl von Zellen, sowohl im Menschen, als auch in der Maus konstitutiv exprimiert. Darunter zählen Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, B- und T-Lymphozyten, Endothelzellen und Epithelzellen (Ayroldi et al., 2001; Ayroldi and Riccardi, 2009; Bruscoli et al., 2015; Cohen et al., 2006; Eddleston et al., 2007; Godot et al., 2006; Hahn et al., 2014; Hoppstädter et al., 2012). Eine Hochregulation der GILZ Expression kann *in vivo* und *in vitro* durch eine Behandlung mit GCs erreicht werden (Cannarile et al., 2001; Ronchetti et al., 2015), aber auch durch IL-10 (Berrebi, Bruscoli et al., 2003, Godot et al., 2006), was eine Abschwächung der Inflammation zur Folge hat. Die Fähigkeit von GILZ, immunstimulatorische Prozesse abzuschwächen, liegt vor allem in der Interaktion mit dem proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B begründet (Ayroldi & Riccardi, 2009, Berrebi et al., 2003, Ronchetti, Migliorati et al., 2015). NF- κ B ist ein Komplex bestehend aus mehreren Untereinheiten (p50, p52, p65, RelB und c-Rel), die sich zu unterschiedlichen Dimeren zusammenlagern können und als Folge entweder Homo- oder Heterodimere bilden. In nicht inflammatorisch-aktivierten Zellen liegt NF- κ B gebunden an seinen inhibitorischen Faktor *inhibitor of kappa B* (I κ B) vor. Sobald eine entzündliche Stimulation stattfindet, kann die I κ B-Kinase (IKK) I κ B phosphorylieren,

so dass dieses polyubiquitinyliert wird und zum proteasomalen Abbau freigegeben ist. NF- κ B kann folglich in den Zellkern translozieren und dort die Expression seiner Target-Gene induzieren (Ayroldi et al., 2014; Cannarile et al., 2006; Riccardi et al., 2000). Studien konnten belegen, dass GILZ, wenn es z.B. durch GCs induziert wird oder *via* Transfektion überexprimiert wird, mit der p65 Untereinheit von NF- κ B interagieren kann und so dessen transkriptionelle Aktivität in T Lymphozyten und Makrophagen hemmt (Ayroldi et al., 2001a, Berrebi et al., 2003, Cannarile, Fallarino et al., 2006, Di Marco et al., 2007, Marco et al., 2007, Riccardi, Zollo et al., 2000). Dieser Effekt von GILZ verläuft komplett unabhängig von der Expression von I- κ B, dessen Phosphorylierung, Degradation und Bindung an NF- κ B (Di Marco et al., 2007). Stattdessen scheint eine Homodimerisierung von GILZ, sowie das Vorhandensein der PER-Domäne für die hemmende Wirkung von GILZ auf NF- κ B, das heißt für die Interaktion von GILZ mit dessen Untereinheit p65, notwendig (Marco et al., 2007a).

2. Toll-like Rezeptoren

Die Rezeptorfamilien der angeborenen Immunantwort dienen als hoch konservierte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) zur ersten Abwehr des Körpers gegen Mikroorganismen (De Nardo, 2015). Sie erkennen deren charakteristische Strukturmuster, auch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) genannt oder körpereigene Pathogene, sogenannte *danger-associated molecular patterns* (DAMPs). Neben den *C-type lectin* Rezeptoren (CLRs), den *Nod-like* Rezeptoren (NLRs) und einigen weiteren, gehören auch die *toll-like* Rezeptoren (TLRs) zu den PRRs (Takeuchi and Akira, 2010). Gegenwärtig sind 10 humane (TLR1-10) und 12 murine (TLR1-9, TLR11-13) TLRs bekannt (O'Neill et al., 2013). Alle TLRs sind transmembranäre Proteine, die entweder an der Zelloberfläche oder in den endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind (Ntoufa et al., 2016). Sie agieren als Homodimere, außer TLR2, welches zusammen mit TLR1 oder TLR6 heterodimere Komplexe ausbildet (Opitz et al., 2010). Die verschiedenen TLRs reagieren auf unterschiedliche mikrobielle Liganden, wie zum Beispiel Membranlipide, bakterielle Proteine oder Nukleinsäuren (Tab. 1).

Nachdem ein TLR aktiviert wurde, werden *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR) Domänenenthaltende Adaptoren rekrutiert, damit diese den Rezeptor mit *downstream* liegenden Effektorproteinen verknüpfen können. Fünf Adaptoren spielen im TLR-*Signalling* eine wichtige Rolle: MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), MAL (*MyD88-adaptor-like*, auch TIRAP genannt), TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing Interferon- β*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) und SARM (*sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein*) (O'Neill and Bowie, 2007).

Tab. 1: TLR-Expression, -Lokalisation und -Liganden; übernommen aus (De Nardo, 2015).

TLR	Spezies	Lokalisation	Mikrobielle Liganden	Endogene Liganden	Synthetische Liganden
TLR1	Mensch und Maus	Plasmamembran	Triacyllipoproteine	Unbekannt	Pam ₃ CSK ₄
TLR2	Mensch und Maus	Plasmamembran	Lipoproteine, Zymosan, Mannan, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure	Versikan	Pam ₃ CSK ₄ , Pam ₂ CSK ₄
TLR3	Mensch und Maus	Endolysosomale Membran	Virale dsRNA	mRNA	PolyI:C, PolyA:U
TLR4	Mensch und Maus	Plasmamembran und Endolysosomale Membran	Lipopolysaccharide (LPS)	Oxidiertes low-density Lipoprotein, Amyloid beta	Lipid A Derivate
TLR5	Mensch und Maus	Plasmamembran	Flagellin	Unbekannt	Rekombinantes Flagellin
TLR6	Mensch und Maus	Plasmamembran	Diacyllipoproteine, Lipoteichonsäure, Zymosan	Oxidiertes low-density Lipoprotein, Amyloid beta, Versikan	<i>Macrophage-activating lipopeptide 2</i> , synthetische diacylierte Lipoproteine, Pam ₂ CSK ₄
TLR7	Mensch und Maus	Endolysosomale Membran	Virale und bakterielle ssRNA	Immunkomplexe, eigene RNA	Thiazoquinolin- und Imidazoquinolin-Verbindungen (z.B. R848 Imiquimod)
TLR8	Mensch und Maus	Endolysosomale Membran	Virale und bakterielle ssRNA	Immunkomplexe, eigene RNA	Thiazoquinolin- und Imidazoquinolin-Verbindungen (z.B. R848 Imiquimod)
TLR9	Mensch und Maus	Endolysosomale Membran	Virale und bakterielle CpG DNA; DNA:RNA Hybride	Chromatin IgG Immunkomplex, eigene DNA	Lasee A, B und C CpG Oligodesoynukleotide
TLR10	Mensch	Plasmamembran	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt
TLR11	Maus	Endolysosomale Membran	Profilin und Flagellin	Unbekannt	Unbekannt
TLR12	Maus	Endolysosomale Membran	Profilin	Unbekannt	Unbekannt
TLR13	Maus	Endolysosomale Membran	Bakterielle 23S ribosomale RNA (rRNA)	Unbekannt	Oligoribonukleotide von 23S rRNA

MyD88- und TRIF-abhängige TLR-Signalwege

Mit der Ausnahme von TLR3 vermitteln alle anderen TLRs ihren Signalweg über das Adapterprotein MyD88 (Abb. 2). Während die TLRs 5, 7, 8 und 9 direkt mit MyD88 interagieren, benötigen TLR2 und 4 zusätzlich MAL (Opitz et al., 2010). Der TRIF-

abhängige Signalweg wird über TLR3 und über TLR4 vermittelt. Im Gegensatz zu TLR3 benötigt TLR4 TRAM zur Weiterleitung des Signals (Yamamoto et al., 2003b).

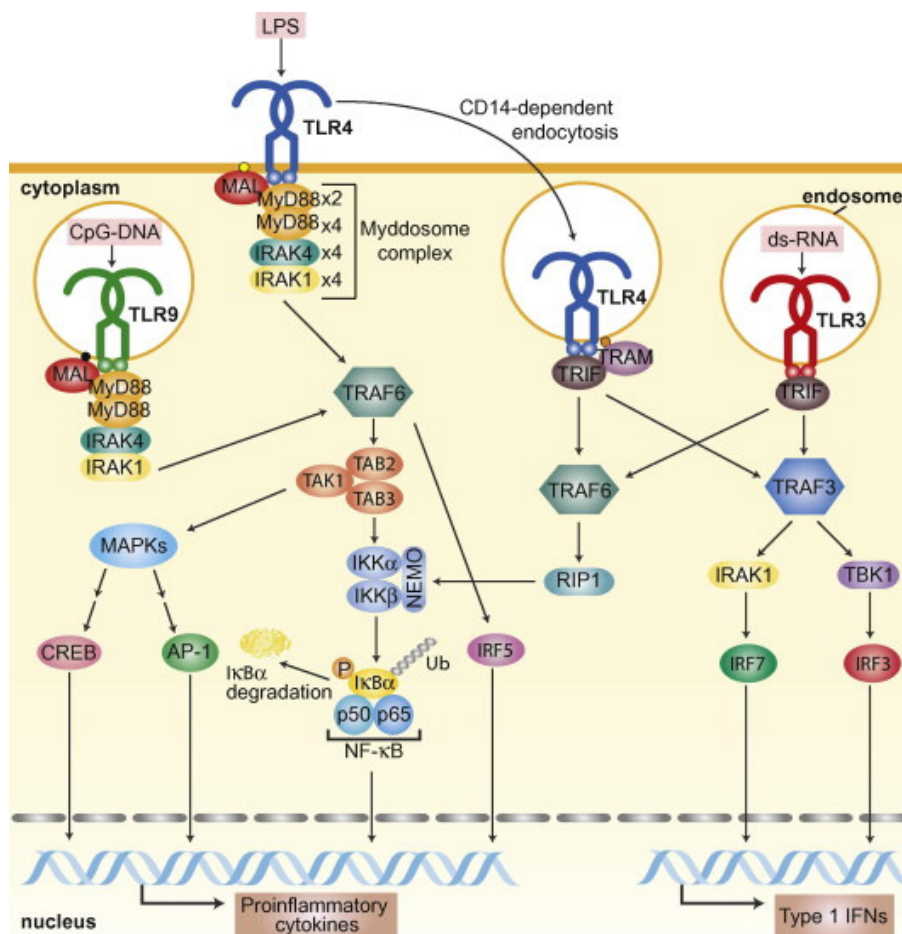


Abb. 2: Überblick einer Auswahl an TLR-Signalwegen. (Abbildung und Beschreibung übernommen aus (De Nardo, 2015).)

Die Aktivierung von TLR4 an der Zelloberfläche oder von TLR9 in Endosomen führt zu einer Rekrutierung des Adaptermoleküls MyD88 zur Einleitung der MyD88-abhängigen Signalkaskade. MAL bindet an spezifische Lipid-Mikrodomänen in den Membranen, um die MyD88-Interaktionen zu stabilisieren und das Zusammenfinden aller Komponenten des Myddosoms zu initiieren. Dieses besteht aus vier Komponenten: (1) 2× MyD88, (2) 4× MyD88, (3) 4× IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*) und (4) 4× IRAK2 (oder IRAK1). Im Folgenden führt die Bildung des Myddosoms zu einer Kinase-Aktivierung der IRAKs und anschließender TRAF (*tumor necrosis factor receptor associated factor*) 6 Aktivierung. Diese Kaskade induziert die Aktivierung von wichtigen pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, IRF5 (interferon regulating factor 5), AP-1 (*activator protein 1*) und CREB (*cAMP response element-binding protein*) und führt so zur Zytokin-, Chemokin- und Adhäsionsmolekül-Produktion. Die Aktivierung von TLR3 in Endosomen führt zur Rekrutierung des TIR Adaptors, TRIF und vermittelt eine spezifische TRIF-abhängige Signalkaskade. TLR4 kann auch diesen Weg aktivieren, nachdem es CD14-abhängig endozytiert wurde. Hier assoziiert es mit TRIF über das an die Endosomenmembran gebundene TRAM. Das TRIF-abhängige Signal führt zu einer TRAF3/TBK-1 vermittelten Aktivierung von IRF3, um vor allem Typ I Interferone (IFNs) zu induzieren. Der TRIF-Signalweg kann auch die Interaktion der RIP1 Kinase mit TRAF6 induzieren, was zu einer NF-κB Aktivierung und ebenfalls zu einer Zytokinproduktion führt.

3. Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen

Unter der posttranskriptionellen Regulation versteht man unterschiedliche Mechanismen, die an der mRNA nach Transkription und Prozessierung vollzogen werden und deren Translationseffizienz, Stabilität oder Lokalisation beeinflussen (Mignone et al., 2002). Diese Art der Regulation der Genexpression ist ein komplexer Prozess, der durch mRNA-bindende-Proteine (mRNA-BPs, RBPs) und nicht kodierende RNAs (ncRNAs), die mit mRNA regulatorischen Elementen (RREs) interagieren, kontrolliert wird (Mukherjee et al., 2014).

AU-reiche Elemente

AU-reiche Elemente (AREs) sind konservierte Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von mRNAs, auch als *cis-acting factors* bezeichnet, die meistens eine Degradation der Transkripte durch Bindung entsprechender *trans-acting factors* vermitteln (Vlasova-St. Louis and Bohjanen, 2014). AREs können in drei Klassen eingeteilt werden basierend auf ihrer Sequenz und Zerfall-Kinetik, also die Art der Deadenylierung (Abdelmohsen et al., 2008; Chen and Shyu, 1995; Gratacós and Brewer, 2010; Ivanov and Anderson, 2013; Li et al., 2012a; Stumpo et al., 2010; Vlasova-St. Louis and Bohjanen, 2014; von Roretz et al., 2011). Klasse I AREs enthalten 1 bis 3 Kopien von verteilten AUUUA Pentameren, die in einer U-reichen Region zu finden sind. Klasse II AREs bestehen aus mindestens 2 überlappenden (U/A)AUUUA(U/A) Nonameren, ebenfalls in einer U-reichen Region. Klasse III AREs sind U-reiche Regionen mit weniger genau definierten Sequenz-Kopien ohne AUUUA Pentamere (Hoppstädter et al., 2012, Ivanov & Anderson, 2013, Mukherjee et al., 2014, Vlasova-St. Louis & Bohjanen, 2014).

mRNA-bindende Proteine

mRNA-bindende Proteine (mRNA-BPs, RBPs) stellen eine wichtige Gruppe posttranskriptioneller Regulatoren dar, die durch Bindung an AREs ihrer Target mRNA diese entweder stabilisieren, deren Translation induzieren oder unterdrücken oder ihren Abbau induzieren können (Tiedje, Diaz-Muñoz et al., 2016, Vlasova-St. Louis & Bohjanen, 2014). mRNA-BPs existieren in großer Anzahl und werden für viele verschiedene Zelltypen beschrieben, wo sie die mRNA-Prozessierung, den Transport, die intrazelluläre Lokalisation oder die Translation regulieren (Abdelmohsen, Kuwano et al., 2008, Gratacós & Brewer, 2010, Li, Lin et al., 2012a, Stumpo, Lai et al., 2010, von Roretz, Marco et al., 2011).

Tristetraprolin

Unter den mRNA-BPs spielt Tristetraprolin (TTP, Zinc-finger protein 36, ZFP36) eine entscheidende Rolle in der posttranskriptionellen Kontrolle in der angeborenen Immunantwort (Carpenter et al., 2014). ZFP36 gehört zur TIS11 Familie der RBPs und bindet an die mRNA pro-inflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel an *TNF*, wo es deren Degradation induziert oder ihre effiziente Translation verhindert (Brooks and Blackshear, 2013). ZFP36 ist ein *shuttling* Protein, das sich hauptsächlich im Zytoplasma befindet (Phillips et al., 2002), wo es als negativer *feedback* Inhibitor wirkt (Tiedje et al., 2016). ZFP36 wird in einer MyD88-abhängigen Weise nach entzündlicher Stimulation in Makrophagen hochreguliert (Hoppstädter et al., 2012). Danach hat es die wichtige Aufgabe, eine pro-inflammatorische Zellantwort zu hemmen, um eine chronische Entzündung zu vermeiden (Ronkina et al., 2010; Ross et al., 2015; Schott et al., 2014; Shah et al., 2015; Stoecklin et al., 2008; Zhang et al., 2013). Wie wichtig ZFP36 als anti-inflammatorischer *feedback* Inhibitor ist, zeigt die

Vielzahl an Daten zu dem entzündlichen Phänotyp von ZFP36-Knockout-Mäusen (Ronkina, Menon et al., 2010, Ross, Smallie et al., 2015, Shah, Mostafa et al., 2015, Zhang, Taylor et al., 2013). Dennoch kann ZFP36 ebenso anti-entzündliche Mediatoren wie GILZ oder Interleukin-10 inhibieren (Hahn et al., 2014, Stoecklin, Tenenbaum et al., 2008). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ZFP36 neben seiner RNA-destabilisierenden Funktion auch als transkriptionaler Corepressor von NF- κ B dienen kann, beziehungsweise dessen Translokation in den Zellkern durch direkte Bindung an p65 blockieren kann (Liang et al., 2009; Schichl et al., 2009).

Human Antigen R

Ein weiteres RBP ist *Human antigen R* (HuR), ein Mitglied der *human embryonic lethal abnormal vision* (ELAV) Proteinfamilie. Während HuR in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, werden weitere Proteine der ELAV-Familie, HuB, HuC und HuD, nur in neuronalem Gewebe exprimiert (Wurth and Gebauer, 2015). HuR ist ein *shuttling* Protein, welches überwiegend im Kern lokalisiert ist. Nach Zellstimulation transloziert HuR vom Kern in das Zytoplasma, wo es an die AREs seiner Target mRNAs binden und im Gegensatz zu ZFP36 hauptsächlich stabilisierende oder translationsfördernde Effekte auslösen kann (Mukherjee et al., 2014; Srikantan et al., 2012; Yu et al., 2013). Ein möglicher Effekt von HuR ist zum Beispiel die Stabilisierung der mRNA, was vor allem darin begründet liegt, dass HuR mit destabilisierenden RBPs, insbesondere ZFP36, um Bindestellen konkurrieren kann (Mukherjee et al., 2014, Srikantan, Tominaga et al., 2012, Wurth & Gebauer, 2015, Yu, Rao et al., 2013). HuR kann nicht nur mit mRNA-BPs konkurrieren, sondern auch mit miRNAs. Beispielsweise induziert HuR die Translation der mRNA *CAT-1* durch Konkurrenz mit miR-122, die die *CAT-1* Translation blockiert (Bhattacharyya et al., 2006). HuR kann jedoch auch auf andere Art mit miRNAs interagieren. So bindet es

zum Beispiel an die 3'-UTR des Transkripts der kleinen GTPase RhoB und induziert dadurch die Rekrutierung von miR-19, was dann zu einer Unterdrückung der Translation führt (Braun et al., 2012; Chapman and Pekow, 2015; Fabian and Sonenberg, 2012; Fabian et al., 2010; Glorian et al., 2011; Huntzinger and Izaurralde, 2011; Kullmann et al., 2002; Lal et al., 2005; Leandersson et al., 2006; Lee et al., 1993; Mazan-Mamczarz et al., 2008; Meng et al., 2005; Vrijens et al., 2015; Wightman et al., 1993; Zhou et al., 2016). Desweiteren wurde schon mehrfach eine translationssteigernde Wirkung von HuR durch Bindung an die 3'UTR seiner Target-mRNA belegt (Lal, Kawai et al., 2005, Mazan-Mamczarz, Hagner et al., 2008, Zhou, Chang et al., 2016). Aber auch unterdrückende Effekte bezüglich der Translation konnten bei HuR beobachtet werden, teilweise über Bindung an die 5'-UTR der entsprechenden Transkripte (Kullmann, Göpfert et al., 2002, Leandersson, Riesbeck et al., 2006, Meng, King et al., 2005). Weiterhin wird vielfach beschrieben, dass miRNAs den Initiierungsschritt der Translation hemmen können (Braun, Huntzinger et al., 2012, Fabian & Sonenberg, 2012, Fabian, Sonenberg et al., 2010, Huntzinger & Izaurralde, 2011).

micro-RNAs

Micro-RNAs (miRNAs, miRs) sind einzelsträngige, endogene, 18-24 Nukleotide lange, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren (Chapman & Pekow, 2015, Vrijens, Bollati et al., 2015). Seit der ersten Entdeckung von miRNAs 1993 in *Caenorhabditis elegans* (Lee, Feinbaum et al., 1993, Wightman, Ha et al., 1993) wurden tausende von weiteren miRNAs in Eukaryonten identifiziert. Sie machen ca. 3% des humanen Genoms aus, regulieren allerdings ungefähr 90% aller humanen Gene (Cullen, 2004;

Marques-Rocha et al., 2015; Marques-Rocha et al., 2016; Miranda et al., 2006; Muhonen and Holthofer, 2009).

miRNA Prozessierung

Die Biogenese einer miRNA startet im Nukleus, wo DNA in *primary* (pri-) miRNA Transkripte, die sich haarnadelförmig zusammenlagern, transkribiert wird. Diese pri-miRNAs werden dann enzymatisch verdaut von einem Mikroprozessorkomplex, der unter anderem die nukleäre RNase III namens Drosha beinhaltet (Cullen, 2004, Muhonen & Holthofer, 2009). So entsteht eine ungefähr 70 Nukleotide lange, haarnadelförmige *precursor* (pre-) miRNA. Die pre-miRNA assoziiert mit Exportin 5 und gelangt durch Kernporen in das Zytoplasma (Chendrimada et al., 2005; Davidson and McCray, 2011; MacRae et al., 2006; Maniataki and Mourelatos, 2005; Muhonen and Holthofer, 2009; Ohtsuka et al., 2015). Im nächsten Schritt prozessiert ein Komplex mit dem cytoplasmatischen Enzym Dicer, einer RNase III Endonuklease, zusammen mit dem *transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) und dem *Kinase R-activating protein* (PACT) die pre-miRNA in miRNA-miRNA*-Duplexe. Der so erhaltene miRNA Duplex besteht aus dem *guide*-Strang, als miRNA bezeichnet, und dem *passenger*-Strang, als miRNA* bezeichnet (MacRae, Zhou et al., 2006, Muhonen & Holthofer, 2009, Ohtsuka, Ling et al., 2015). Der guide-Strang wird im Folgenden auf den RNA-induced silencing complex (RISC) geladen. Dieser Komplex enthält neben Dicer, TRBP und PACT ein Argonaut (AGO) Protein, welches die katalytische Komponente von RISC darstellt (Chendrimada, Gregory et al., 2005, Maniataki & Mourelatos, 2005, Muhonen & Holthofer, 2009, Ohtsuka et al., 2015). In Säugetieren können alle vier AGO Proteine (AGO1-4) im miRNA Signalweg eine Rolle spielen (Ipsaro and Joshua-Tor, 2015). Der RISC-

miRNA-Komplex (miRISC) dient als Effektor im miRNA Signalweg und führt nun die miRNA zu der 3'-UTR ihrer Target-mRNA (Ohtsuka et al., 2015).

Mechanismen der post-transkriptionellen Regulation durch miRNAs

Über RISC können zwei grundsätzlich verschiedene Modelle des *gene silencing* initiiert werden: mRNA-Abbau und translationelle Unterdrückung (Abb. 3) (Ameres and Zamore, 2013).

Der Abbau einer mRNA kann durch endonucleolytisches Zerschneiden durch RISC induziert werden, da AGO2, im Gegensatz zu AGO1, -3 und -4, auch eine RNase H-Funktion hat. Wenn die miRNA Sequenz nahezu komplett komplementär ist, dann schneidet RISC die Target-mRNA im Zentrum der miRNA-mRNA-Bindungssequenz, ein Wirkungsmodus, der häufig in Pflanzen vorzufinden ist und als RNA Interferenz (RNAi) bezeichnet wird (Chapman and Pekow, 2015; Filipowicz et al., 2008; Iwakawa and Tomari, 2015; Kaleem et al., 2008).

In Säugetieren hingegen ist die Bindungssequenz der miRNA häufig nicht komplett komplementär zu ihrer Target-mRNA, sondern geht nur partiell Basenpaarungen ein. Ein Bereich mit starker Komplementarität ist die *seed sequence* der miRNA, die typischerweise in den Basen 2-8 liegt (Chapman & Pekow, 2015, Kaleem, Hoessli et al., 2008). Im Fall einer solchen partiellen Komplementarität zeigt der RISC keine „Schneideaktivität“, sondern induziert eine translationelle Unterdrückung (Iwakawa and Tomari, 2015). Die miRNA-vermittelte Unterdrückung der Translation wird auf verschiedene Effekte zurückgeführt. Zum einen kann eine Deadenylierung der mRNA zur Unterdrückung der Translation führen mit anschließendem Zerfall der mRNA. In diesem Prozess spielt vor allem das Protein GW182 eine Schlüsselrolle (Fabian et al., 2010; Iwakawa and Tomari, 2015; Nolte-'t Hoen et al., 2015). GW118 fungiert als Angelpunkt und rekrutiert weitere Faktoren zur mRNA-Prozessierung, wie zum

Beispiel das *poly(A)-binding protein* (PABP) und Deadenylase-Komplexe (Iwakawa & Tomari, 2015, Nolte-'t Hoen, Van Rooij et al., 2015). Desweiteren kann der Mechanismus des *decapping* stattfinden, welcher vermutlich nur als Folge der Deadenylierung auftritt (Iwakawa and Tomari, 2015).

Ein weiterer möglicher Mechanismus nach Bindung des miRISC an die Target-mRNA ist deren Kompartimentalisierung in sogenannten *processing (P-) bodies* (Nolte-'t Hoen et al., 2015). *P-bodies* oder die dazu sehr ähnlichen *GW-bodies* (der Name ergibt sich auf Grund der Anwesenheit von GW182) (Patel et al., 2016) sind zytoplasmatische Kompartimente, die in allen eukaryotischen Zellen zu finden sind und in denen viele Proteine zur mRNA Degradation, Katabolismus und zum miRNA-assoziierten *gene silencing* lokalisiert sind (Aizer et al., 2014; Filipowicz et al., 2008). Es wird beschrieben, dass die dorthin transportierte mRNA dort verweilen kann ohne translatiert zu werden bis sie entweder auch deadenyliert wird oder wieder zur Translation in Polysomen eintreten kann (Kedde et al., 2007; Muhonen and Holthofer, 2009; Parasramka et al., 2012).

Einige Studien belegen, dass mRNA-BP die miRNA-vermittelte Unterdrückung der mRNA-Translation modulieren können (Bhattacharyya et al., 2006, Kedde, Strasser et al., 2007).

Ob miRNAs einen Translations-aktivierenden oder -hemmenden Effekt zeigen, kann aber auch von anderen Faktoren abhängen. Orom et al. zeigte in seiner Studie, dass miR-10a mit der 5'-UTR einiger mRNAs interagiert und somit deren Translation erhöht (Orom et al., 2008). Vasudevan et al. berichtete, dass es vom Status des Zellzyklus abhängen kann, ob eine miRNA translationell unterdrückend oder aktivierend wirkt (Griffiths-Jones et al., 2008; Vasudevan et al., 2007; Vrijens et al., 2015).

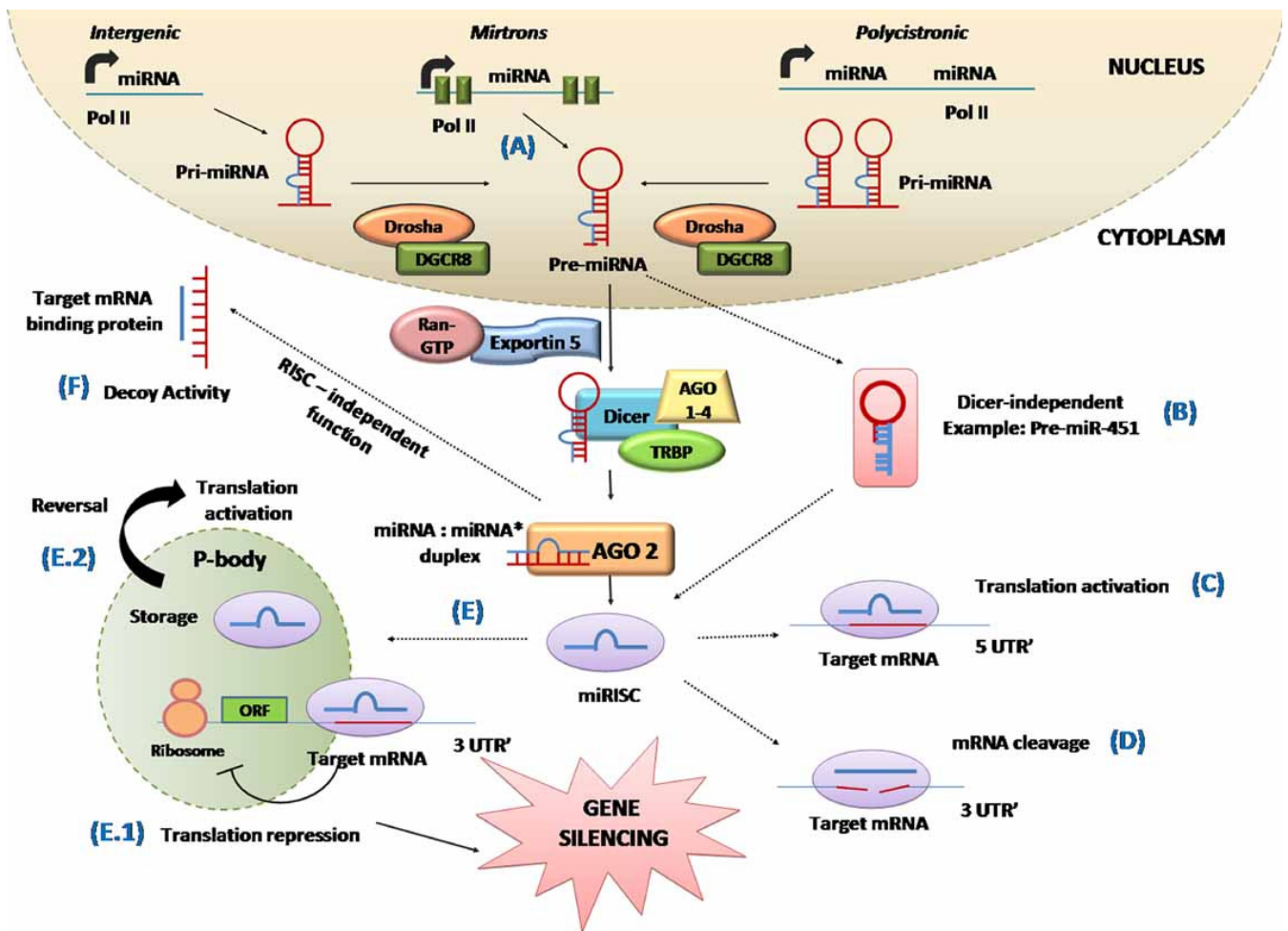


Abb. 3: MicroRNA Biogenese und mögliche regulatorische Signalwege (Abbildung und Erklärung entnommen aus Parasramka et al., 2012). Pri-miRNAs werden von RNA-Polymerase II-spezifischen miRNA Genen transkribiert, entweder aus Intron-Regionen von Protein-kodierenden-Genen oder von polycistronischen Transkripten. (A) Einige wenige pre-miRNAs werden direkt aus kurzen Introns, sogenannten *mirtrons*, prozessiert, ohne den Drosha-Schritt zu durchlaufen. (B) Bei einem Dicer-unabhängigen Mechanismus wird die pre-miRNA von AGO2 zur reifen miRNA geschnitten. (C) Einige miRNAs binden an die 5'-UTR Ihrer Target mRNA, was zur translationellen Aktivierung führt. (D) Annähernd komplette Komplementarität zwischen miRNA und mRNA führt zum Zerschneiden und somit zur Degradation der Target-mRNA durch miRISC. (E) Bei geringerer Komplementarität der Sequenzen kommt es zu verschiedenen Formen der translationellen Unterdrückung. (E.1) Diese Unterdrückung kann vor oder nach der Initiation der Translation geschehen und zur Geninaktivierung führen. (E.2) Bis zur Aufhebung der Unterdrückung und dem Eintritt in Polysomen zur Translation kann die Target-mRNA auch in *P-bodies* aufbewahrt werden. (F) In einer RISC-unabhängigen Köder-Funktion kann die miRNA direkt an mRNA-bindende Proteine binden und diese unverfügbar für ihre mRNA Targets machen.

Nomenklatur von miRNAs

MicroRNAs werden mit dem Präfix „miR“ bezeichnet und einer die miRNA identifizierenden Nummer, zum Beispiel „miR-1“. Dabei wird die Nummer nach der Sequenz vergeben, was bedeutet, dass gleiche miRNAs die gleiche Nummer haben, auch wenn sie aus unterschiedlichen Organismen stammen. Zur besseren Unterscheidung kann daher ein weiteres Präfix angehängt werden: zum Beispiel hsa-miR-10 für die humane miRNA und mmu-miR-10 für die murine miRNA (Griffiths-Jones, Saini et al., 2008, Vrijens et al., 2015). Bei paralogen Sequenzen, deren reife miRNAs sich nur in ein oder zwei Positionen unterscheiden, setzt man Kleinbuchstaben als Suffixe dazu, zum Beispiel miR-10a und miR-10b. Steht dagegen eine weitere Zahl am Ende des Namens, zum Beispiel miR-219-1 und miR-219-2, dann haben die precursor-miRNAs verschiedene Ausgangsgene im Genom, ergeben aber identische reife miRNAs (Vrijens et al., 2015). Früher wurden die beiden *mature* miRNAs, die aus einer pre-miRNA entstehen können in den guide-Strang, als miR-XY bezeichnet, und den passenger-Strang, als miR-XY* bezeichnet, unterschieden, wobei miR-XY* die reife miRNA bezeichnen sollte, die weniger exprimiert wurde oder inaktiv war (Griffiths-Jones, 2004). Da sich das Ausmaß der Expression aber in verschiedenen Geweben oder Spezies durchaus unterscheiden kann, ist diese Bezeichnung teilweise irreführend. Unmissverständlich ist hingegen die Symbolisierung mit -5p oder -3p am Ende des Namens, die angibt von welchem Ende der hairpin pre-miRNA die *mature* miRNA jeweils stammt (Aderem and Ulevitch, 2000; Beutler, 2004; Das et al., 2014; Desvignes et al., 2015; Erridge, 2009; Fukui et al., 2014; Hofmann et al., 2014; Kawai and Akira, 2010; Latz et al., 2004; Leifer et al., 2004; Mangtani et al., 2014; Rauta et al., 2014).

Kapitel 1

Nanopartikuläre Strukturen aktivieren die GTPase Rac1 in
humanen Makrophagen

Einleitung

Die Familie der Toll-like Rezeptoren spielt eine fundamentale Rolle in der Erkennung von Pathogenen und der Aktivierung des angeborenen Immunsystems. TLRs erkennen konservierte Motive von Pathogenen, sogenannte PAMPs, die man nicht in höheren Eukaryonten finden kann (Aderem & Ulevitch, 2000, Kawai & Akira, 2010, Rauta, Samanta et al., 2014). Die verschiedenen TLRs unterscheiden sich in der Lokalisation in der Zelle, aber vor allem hinsichtlich ihrer Ligandenspezifität. So werden zum Beispiel Lipoproteine von den TLR-Dimeren 1/2 und 1/6 erkannt, Lipopolysaccharide von TLR4 und bakterielles Flagellin von TLR5. TLR3, 7 und 8, welche im Gegensatz zu den zuvor genannten nicht auf der äußeren Zellmembran, sondern in der endosomalen Membran sitzen, erkennen virale RNA. Auch TLR9 ist intrazellulär lokalisiert und reagiert auf bakterielle beziehungsweise nicht methylierte CpG DNA (Beutler, 2004, Erridge, 2009, Hofmann, Dunger et al., 2014, Leifer, Kennedy et al., 2004). Der Unterschied von bakterieller DNA zu DNA von Säugetieren ist deren sehr viel höherer Gehalt an 5'-CG-3' Sequenzen, die allgemein als CpG Sequenzen bezeichnet werden. Dazu kommt, dass in Säugetier-DNA die meisten CpG Motive methyliert sind, während in bakterieller DNA fast alle CpG Sequenzen unmethyliert vorliegen (Das, Ghosh et al., 2014, Latz, Schoenemeyer et al., 2004). Die in dieser Arbeit verwendete bakterielle DNA stammt aus dem *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Dabei handelt es sich um einen attenuierten Bakterienstamm, der durch wiederholte Züchtung aus dem Wildtyp-Stamm *Mycobacterium bovis* entstand und als abgeschwächt-virulenter Lebendimpfstoff verwendet wird (Fukui, Umemura et al., 2014, Mangtani, Abubakar et al., 2014).

CpG Oligodesoxynukleotide (CpG ODNs) sind synthetisch hergestellte kürzere DNA Moleküle, die ein partielles oder komplettes Phosphorothioat-Rückgrat anstatt eines Phosphodiester-Rückgrats besitzen. Diese Modifizierung dient dazu, die CpG ODNs resistenter gegen den Abbau durch Nukleasen zu machen (Castellano et al., 2000; Dalpke et al., 2002; Hanna and El-Sibai, 2013; Hodge and Ridley, 2016; Latz et al., 2004). Auch CpG-ODNs können an den intrazellulären TLR9 binden und so immunstimulatorische Signalkaskaden auslösen (Latz et al., 2004, Leifer et al., 2004).

Bevor mikrobielle Liganden überhaupt vom TLR9 erkannt werden können, müssen sie durch phagozytotische Prozesse in die Zelle aufgenommen werden. Diese Fähigkeit stellt einen wesentlichen Bestandteil der angeborenen Immunfunktion von Neutrophilen, Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen dar. Bei der Regulation der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts während der Phagozytose spielen Rho GTPasen eine wichtige Rolle (Castellano, Montcourrier et al., 2000, Hanna & El-Sibai, 2013, Hodge & Ridley, 2016). Die Familie der Rho GTPasen umfasst Mitglieder der Rho, Rac und Cdc42 Unterfamilien. Zur Regulation verschiedenster Zellfunktionen, zum Beispiel Veränderungen und Bewegungen im Zytoskelett, transkriptionelle Vorgänge, Vesikel-Transport, Zellwachstum oder Apoptose, dienen Rho GTPasen als „molekulare Schalter“, wobei sie durch die Bindung von GTP und dessen Hydrolyse aktiviert werden (Arbibe et al., 2000; Bokoch, 2005; Cuadrado et al., 2014; Elnakish et al., 2013; Hanna and El-Sibai, 2013; Mostowy and Shenoy, 2015; Roberts et al., 2005; Teusch et al., 2004; Tong and Tergaonkar, 2014). Neben den genannten Funktionen spielen Rho GTPasen auch eine wichtige Rolle in der Immunantwort, im speziellen im TLR-Signalling (Arbibe, Mira et al., 2000, Mostowy & Shenoy, 2015, Teusch, Lombardo et al., 2004, Tong & Tergaonkar, 2014). So trägt vor allem *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) seinen Teil zur

Aktivierung von NF- κ B und zur Regulation der NADPH Oxidase bei (Bokoch, 2005, Cuadrado, Martín-Moldes et al., 2014, Elnakish, Hassanain et al., 2013).

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit war zum einen zu prüfen, ob nanopartikuläre Strukturen die inflammatorische Zellantwort von humanen Makrophagen verändern und zum anderen herauszufinden, welches die zugrunde liegenden Signalwege sind. Dabei konnte Rac1 als wichtiges Schlüsselmolekül in der durch Nanopartikel ausgelösten inflammatorischen Zellaktivierung über TLR9 sowie der Änderungen im Zytoskelett identifiziert werden.

Ergebnisse

Die Aktivierung von Makrophagen durch nanopartikuläre BCG DNA verläuft über Veränderungen des Zytoskeletts und eine Aktivierung von Rac1

Aus verschiedenen Arbeiten war bereits bekannt, dass Makrophagen durch genomische bakterielle DNA sehr stark aktivierbar sind (Kiemer, Senaratne et al., 2009, Roberts, Dunn et al., 2005). Diese DNA wird durch TLR9 erkannt. Zunächst wurde die Ansprechbarkeit von THP-1 Makrophagen auf BCG DNA mit der Antwort auf die Stimulation mit CpG ODNs (ISS 1018, ISS = Immunstimulatorische Sequenz) verglichen. Als *readout* wurde die *TNF* mRNA gemessen (Abb. 4). Während die Behandlung mit ISS keine Aktivierung der Makrophagen hervorrief, zeigte die Behandlung mit BCG DNA eine signifikante inflammatorische Aktivierung.

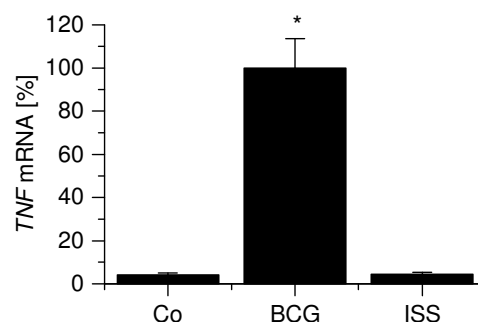


Abb. 4: BCG DNA induziert *TNF* mRNA in THP-1 Makrophagen.

Die Zellen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden für 3 h mit ISS 1018 (ISS; 10 µg/ml) oder BCG DNA (BCG; 10 µg/ml) behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der *TNF* mRNA mittels Real-time RT-PCR. Die Werte wurden normalisiert auf *ACTB*. Die Daten der Stimulation mit BCG DNA sind als 100% ± SEM dargestellt. Die angegebenen Daten wurden aus zwei Experimenten mit Werten in Duplikaten erhalten. Zellen behandelt mit Pam₃CSK₄ (10 µg/ml) dienten als Positivkontrolle (289% ± 128).

Weiterführende Untersuchungen bestätigten die hier gezeigten Daten auch auf Proteinebene (Diesel et al., 2013).

Eine Charakterisierung der ISS 1018 Oligonukleotide und der genomischen BCG DNA mit Hilfe der *atomic force microscopy* und des *dynamic light scattering (DLS)* zeigte, dass die längeren DNA Moleküle nanopartikelähnliche Strukturen bilden, wozu kurze ISS Moleküle nicht in der Lage sind. Geiser et al. konnten zeigen, dass die Aufnahme von partikulären Strukturen durch Makrophagen zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führt (Geiser, 2010). Daher lag die Vermutung nahe, dass auch die Aufnahme von DNA durch Makrophagen eine Veränderung des Zytoskeletts hervorruft. Tatsächlich konnte in Alveolarmakrophagen gezeigt werden, dass die durch Cytochalasin D inhibierte Aktin-Polymerisation zu einer abgeschwächten Reaktion auf BCG DNA führt (Abb. 5 A aus Diesel et al., 2013). Außerdem konnte eine vermehrte Aktinpolymerisation nach Stimulation mit BCG DNA beobachtet werden. Im Unterschied dazu waren ISS 1018 Oligonukleotide nicht in der Lage nanopartikelähnliche Strukturen zu bilden und somit Veränderungen im Zytoskelett hervorzurufen (Abb. 5 B aus Diesel et al., 2013). Diese Experimente bestätigen die Vermutung, dass bei der Reaktion auf eine Stimulation mit DNA tatsächlich das Zytoskelett beteiligt ist.

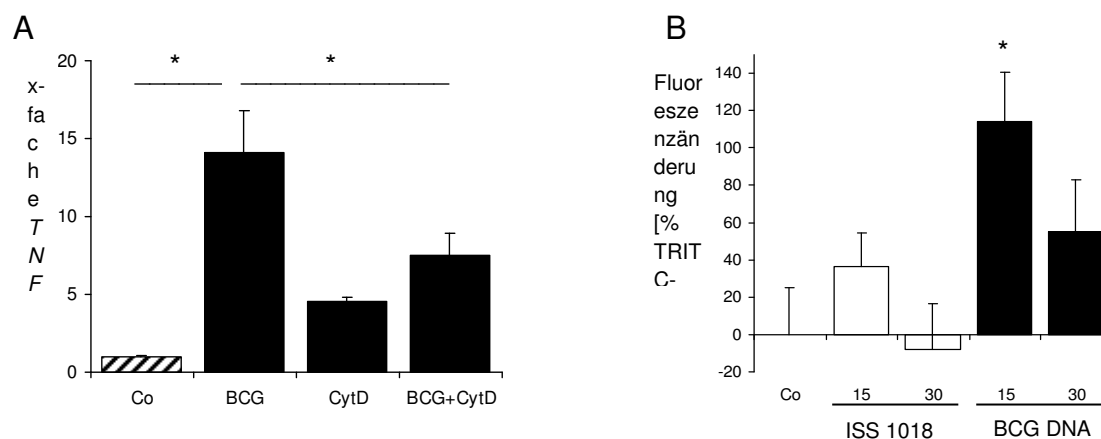


Abb. 5: Makrophagen-Aktivierung durch nanopartikuläre BCG DNA benötigt Aktin-Polymerisation. (A) Alveolarmakrophagen blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit BCG DNA (BCG; 10 $\mu\text{g/ml}$) für 2 h behandelt, entweder mit oder ohne Vorbehandlung mit dem Aktin-Polymerisationsinhibitor Cytochalasin D (CytD, 10 μM , 30 min). Darauf folgte die Messung der *TNF* mRNA mittel Real-time RT-PCR. Die Werte wurden auf *ACTB* normalisiert. Die Daten werden gezeigt als x-fache Induktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Das Experiment wurde durchgeführt von Dr. Jessica Hopstädter. (B) THP-1 Makrophagen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit ISS 1018 (10 $\mu\text{g/ml}$) oder BCG DNA (10 $\mu\text{g/ml}$) für die angegebenen Zeiträume (min) behandelt. Darauf folgte ein Phalloidin –TRITC-Assay. Das Experiment wurde durchgeführt von Dr. Robert Zarbock. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von einem oder zwei Experimenten durchgeführt in Oktuplikaten oder Triplikaten. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Co.

Die GTPase Rac1 spielt eine wichtige Rolle in der Partikelaufnahme von Makrophagen, insbesondere im Prozess der Aktinpolymerisation (Bokoch, 2005; McGarry et al., 2012; McGarry et al., 2015). Mittels *pull-down assay* konnte gezeigt werden, dass in BCG DNA-behandelten Makrophagen tatsächlich vermehrt aktiviertes Rac1 zu finden war (Abb. 6). Dabei war das Ausmaß der Rac1 Induktion nach BCG DNA vergleichbar mit dem nach Behandlung mit der Positivkontrolle Pam₃CSK₄ (McGarry, Connolly et al., 2012, McGarry, Veale et al., 2015). Diese Aktivierung war bereits nach 8 min Behandlung zu erkennen. Nach Stimulation der Makrophagen mit ISS 1018 jedoch konnte keine Aktivierung von Rac1 detektiert werden.

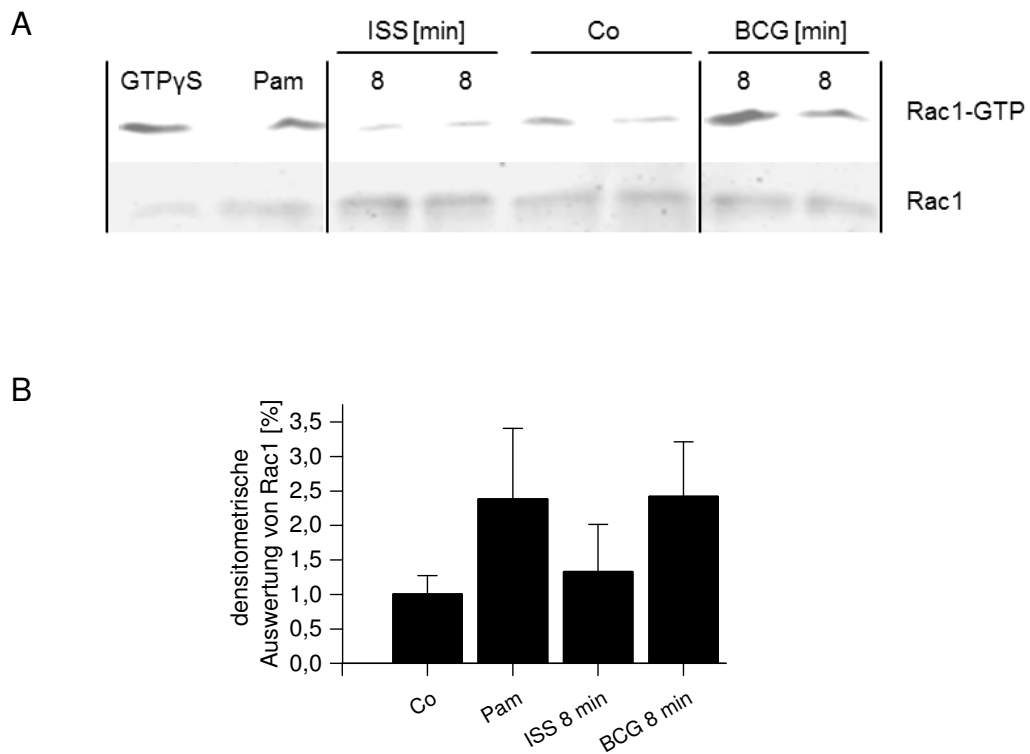


Abb. 6: Aktivierung von Rac1 in Makrophagen nach Stimulation mit BCG DNA. THP-1 Makrophagen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit Pam₃CSK₄ (Pam; 10 µg/ml), ISS 1018 (ISS; 10 µg/ml) oder BCG DNA (BCG; 10 µg/ml) über den angegebenen Zeitraum behandelt. Anschließend folgte ein Rac1-GTP *pull-down assay* mit GTPγS als interne Positivkontrolle. Die Proteinspiegel wurden danach mittels SDS-PAGE und Western Blot gemessen. (A) Die unteren Banden zeigen einen ähnlich starken Gehalt an Gesamt-Rac1. Gezeigt ist ein Experiment aus zwei, durchgeführt in Duplikaten. (B) Gezeigt sind die Mittelwerte aus den densitometrischen Auswertungen aus zwei Rac1-Pulldown Blots. Co wurde als 100% gesetzt.

Außerdem führte sowohl eine Behandlung mit BCG DNA, als auch mit Silica Nanopartikeln (SiNP) in Makrophagen neben einer Aktivierung von Rac1 zu einer vermehrten Aktin-Polymerisation (Abb. 7 aus Diesel et al., 2013).

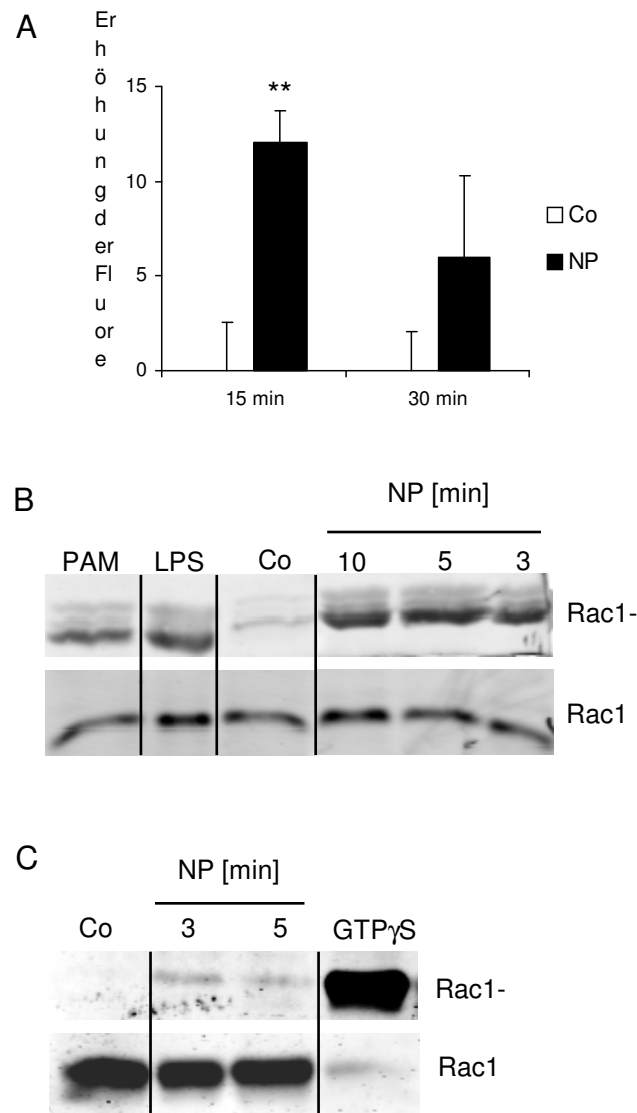


Abb. 7: Die Aktivierung von Makrophagen durch Silica Nanopartikel beeinflusst deren Zytoskelett und aktiviert Rac1.

(A) Quantifizierung des Phalloidin-TRITC gefärbten F-Aktin mittels Mikroskopie. THP-1 Makrophagen blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit Silica Nanopartikeln (NP; S5; 50 µg/ml) für die angegebene Zeit in Medium mit 10% FCS behandelt. Gezeigt ist der durchschnittliche Anstieg der Fluoreszenz relativ zu unbehandelten Zellen (100%) von zwei Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. (B und C) *pull-down assays* von Rac1-GTP in THP-1 Makrophagen (B: NP: S4 50 µg/ml) und AMs (C: NP; S5; 142,5 µg/ml). Die Zellen blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit Silica Nanopartikeln behandelt wie angegeben. Pam₃CSK₄ (Pam, 100 ng/ml) und LPS (1 µg/ml) dienen als Kontrollen für die Rac1 Aktivierung und GTPγS diente als interne Positivkontrolle. Die unteren Banden zeigen die Gleichförmigkeit des gesamten Rac1 Gehalts. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus bis zu vier Blots. **p < 0,01 im Vergleich zu Co. Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Robert Zarbock.

Die für diese Arbeit verwendeten Nanopartikel wurden umfassend physikalisch-chemisch charakterisiert (Tab. 2). Eine ausführliche Beschreibung dazu findet sich bei Diesel et al., 2013. Viabilitäts-Tests zeigten außerdem keine signifikante Zytotoxizität für THP-1 Zellen, L929 Zellen und Makrophagen in Konzentrationen bis zu 50 µg/ml (Diesel et al., 2013).

Tab. 2: Physikalisch-chemische Charakterisierung der SiNPs und DNA-Proben, die in den Experimenten verwendet wurden (Diesel et al., 2013).

Probe	Hydrodynamischer Durchmesser (nm)			Feststoffgehalt (w%)	pH	Zetapotenzial (mV)	Label	Partikelkonzentration (nM)
	PBS	Wasser	Medium					
S4		91,7 ± 34,2	197,9 ± 131,7	0,20	6,7	-42	Atto590	0,25
S5		81,6 ± 27,1	100,4 ± 65,2	0,57	8,2	-49	Atto647N	0,35
S6		96,0 ± 33,5	198,4 ± 68,7	0,70	6,0	-43 ± 9	Atto647N	0,21
BCG DNA	268 ± 104	-	-	-	-	-	-	-

Eine nanopartikelähnliche Struktur erhöht die Ansprechbarkeit von TLR9 auf rezeptorspezifische Struktur motive wie ISS 1018

In weiteren Versuchen sollte nun untersucht werden, ob eine inflammatorische Zellaktivierung durch Behandlung mit SiNP oder ISS 1018 oder einer Kombination aus SiNP und ISS 1018 möglich ist. Als *readout* wurden TNF- α -Spiegel auf mRNA Ebene untersucht (Abb. 8). Tatsächlich konnte eine Kombination beider Behandlungen eine wesentlich stärkere Zellaktivierung hervorrufen als ISS oder NP alleine. Ähnliche Effekte konnten auch auf Proteinebene mittels eines L929 Zytotoxizitätsassays gezeigt werden (Bauer et al., 2001; Biswas et al., 2015; Diesel et al., 2013; Hoppstädter et al., 2015; Latz et al., 2004; Miller et al., 2005; Sepulveda et al., 2009).

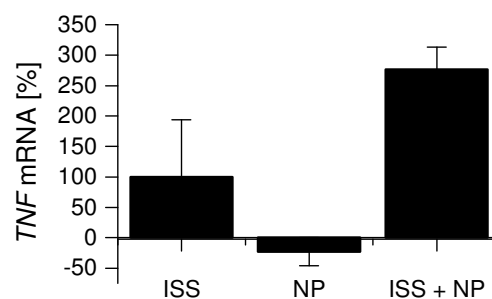


Abb. 8: Auswirkungen von ISS, NPs und einer Kombination aus ISS und NPs auf *TNF* mRNA in THP-1 Makrophagen.

Die Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit ISS 1018 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und/oder mit Silica Nanopartikeln (NP; S6; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über einen Zeitraum von 3 h behandelt. Anschließend wurde *TNF* mRNA mittels Real-time RT-PCR gemessen und alle Werte auf *ACTB* normalisiert. Die Daten zeigen die durch die Behandlung induzierte Differenz im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Werte der ISS 1018 Induktion wurden als 100% gesetzt. Als Positivkontrolle wurden mit Pam₃CSK₄ behandelte Proben gemessen (Differenz: 9.209 ± 615). Die Daten zeigen eines von zwei repräsentativen Experimenten \pm SEM, durchgeführt in Duplikaten.

Auswirkungen einer Stimulation mit Nanopartikeln oder nanopartikelähnlichen Strukturen auf die *GILZ* mRNA-Expression

In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *GILZ* mRNA in inflammatorischen Prozessen in Makrophagen herabreguliert ist (Hoppstädter et al., 2012, Hoppstädter, Kessler et al., 2015). Daher sollte untersucht werden, inwieweit die Behandlung von THP-1 Makrophagen mit BCG DNA, ISS, NPs und einer Kombination aus ISS und NPs eine Auswirkung auf die *GILZ*-Expression haben (Abb. 9). Die vorliegenden Daten zeigen, dass *GILZ* tatsächlich nach Stimulation mit BCG DNA signifikant downreguliert wird. Eine Veränderung der *GILZ* mRNA-Spiegel nach Behandlung mit ISS oder NPs oder einer Kombination aus beidem konnte allerdings nicht beobachtet werden.

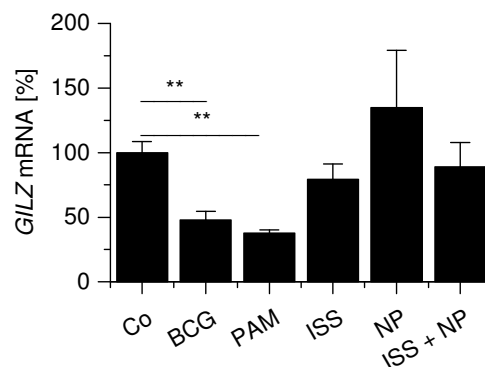


Abb 9: Auswirkungen von BCG DNA, ISS, NPs und einer Kombination aus ISS und NPs auf *GILZ* mRNA in THP-1 Makrophagen.

Die Zellen blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden für 3 h mit BCG DNA (BCG; 10 µg/ml), ISS 1018 (10 µg/ml), Silica Nanopartikeln (NP; S6; 50 µg/ml) oder einer Kombination aus ISS und NPs behandelt. Als Positivkontrolle wurden mit Pam₃CSK₄ (10 µg/ml) behandelte Proben gemessen. Die Messung von *GILZ* mRNA erfolgte mittels Real-time RT-PCR. Die Werte wurden normalisiert auf *ACTB*. Die Daten der unbehandelten Zellen wurden als 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten im Duplikat.

Diskussion

TLR9 gehört zur Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die transmembranäre Proteine darstellen (Bauer, Kirschning et al., 2001). Während einige TLRs, wie zum Beispiel TLR4, in der äußeren Zellwand sitzen und Bestandteile bakterieller Zellwände wie Lipopolysaccharide (LPS) erkennen, ist TLR9 intrazellulär in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und kann von dort zu lysosomalen Kompartimenten in der Zelle wandern, wo er Nukleinsäuren wie CpG DNA erkennt (Biswas, Rao et al., 2015, Latz et al., 2004, Miller, Ernst et al., 2005, Sepulveda, Maschalidi et al., 2009). Roberts et al. konnten feststellen, dass einzelsträngige CpG-enthaltende Phosphodiester-Oligonukleotide (PO-ODNs) zwar die Aktivierung von Makrophagen, ähnlich wie bakterielle DNA, bewirken können, aber dennoch eine um einiges geringere immunstimulatorische Antwort auslösen. Der Grund für das höhere Potential zur Aktivierung der Makrophagen wurde damit begründet, dass die im Vergleich zu kurzen ODNs sehr viel längere DNA aus *E.coli* vermutlich eine bessere Aufnahme und ein Crosslinking der Rezeptoren ermöglicht (Roberts et al., 2005). Desweiteren lässt sich in der Literatur finden, dass die Zelle zwischen Fremd- und Eigen-DNA hauptsächlich deshalb unterscheiden kann, weil bakterielle DNA in höheren Mengen aufgenommen werden kann und dass grundsätzlich TLR9 auch CpG-unabhängig aktiviert werden kann (Li et al., 2012b; Yasuda et al., 2006). Daraus ergibt sich die Frage, ob CpG Motive überhaupt eine strukturelle Voraussetzung zur TLR9-Aktivierung durch Phosphodiester-DNA, also natürliche, bakterielle DNA darstellen (Li, Berke et al., 2012b, Yasuda, Rutz et al., 2006). Grundsätzlich jedoch sind die CpG-Struktur motive essentiell für ODNs (Takeshita et al., 2004). Weiterhin werden CpG ODNs in Typ A und Typ B

unterschieden. Dabei bezeichnen CpG Typ A ODNs ein zentrales palindromisches CpG Motiv mit einem Phosphodiester-Rückgrat umgeben von thioatstabilisierten Polyguanosin-Sequenzen am 3'- und 5'- Ende der DNA. CpG Typ B ODNs hingegen haben ein komplettes Phosphothioat-Rückgrat und keine Poly-G-Enden. Neben den sequenzbasierten Unterschieden zeigte sich auch, dass CpG Typ A ODNs eine stärkere Aktivierung von dendritischen Zellen hervorrufen können, was allerdings nicht auf eine gesteigerte DNA-Aufnahme zurückgeführt werden kann, sondern eher auf eine veränderte räumliche Konfiguration (Kerkmann et al., 2005; Wagner, 2004). Hierzu konnten Kerkmann et al. zeigen, dass CpG A ODNs nanopartikuläre Strukturen ausbilden, die virusähnliche Größe haben und als Konsequenz auch eine mit Viren vergleichbare inflammatorische Zellantwort hervorrufen (Abb. 10) (Kerkmann et al., 2005).

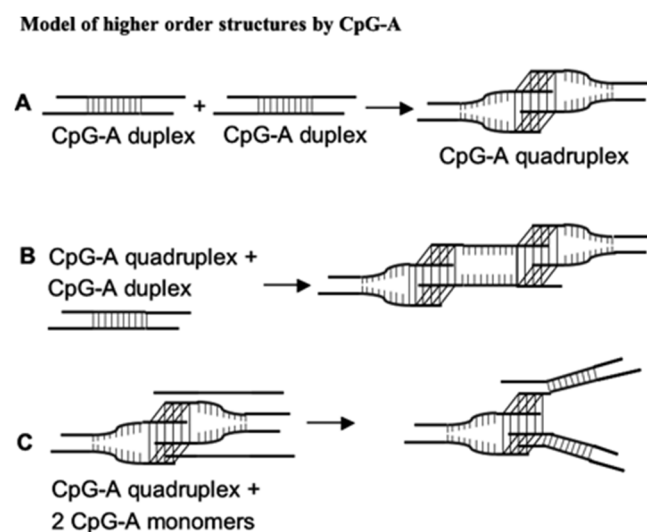


Abb. 10: Modell für spontane Nanopartikel-Formation von CpG A ODNs. (Abbildung und Beschreibung übernommen aus (Kerkmann et al., 2005).)

(A) Zwei CpG A Moleküle bilden einen Duplex mittels Watson-Crick Basenpaarung ihrer Palindrome. Zwei CpG A Duplexe bilden über G-Tetraden Formierung von vier Poly-G-Enden einen Quadruplex. (B) Die Verknüpfung eines Quadruplexes mit einem weiteren CpG A Duplex führt zu einer linearen Struktur bestehend aus drei Duplexen verknüpft über eine G-Tetrade. (C) Die Formation der G-Tetrade destabilisiert den CpG A Duplex des Quadruplexes. Zwei andere CpG A Monomere ersetzen den Original Duplex unter Bildung von zwei neuen Duplexes. So formt sich eine Gabelstruktur mit drei Enden, wobei sich an jedem Ende wieder eine neue G-Tetrade bilden kann. Die Polymerisation von bivalenten Strukturen (A und B) führt zu linearen CpG A Multimeren und die Polymerisation von trivalenten Strukturen (C) führt zu kugelförmigen CpG A Multimeren (Nanopartikel).

Wir stellten fest, dass auch genomische bakterielle DNA spontan nanopartikelartige Strukturen ausbildet und somit Makrophagen stark aktivieren kann. Im Gegensatz dazu konnten die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ODNs vom CpG B Typ, d.h. ISS 1018, ähnlich wie bei Kerkmann et al. keine nanopartikelartigen Strukturen bilden und auch keine wesentliche Makrophagenaktivierung hervorrufen.

Es stellte sich heraus, dass die erhöhte Makrophagenaktivierung durch BCG DNA von der Polymerisation von Aktin-Fasern abhängt (Diesel et al., 2013). Hierfür ist sehr wahrscheinlich die nanopartikelartige Struktur der BCG DNA verantwortlich. Auch in plasmazytoiden dendritischen Zellen riefen nanopartikelartige CpGs eine stärkere inflammatorische Antwort hervor (Kerkmann et al., 2005). Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass Polystyren-Nanopartikel, die mit CpG ODNs von geringer Aktivität beladen wurden, einen ähnlichen Effekt zeigten (Kerkmann et al., 2005). Dieser Sachverhalt verdeutlicht also, dass die räumliche Konfiguration der aufzunehmenden DNA eine wichtige Rolle spielt. Was die Prozessierung von Nukleinsäuren angeht, so ist es möglich, dass DNA Nanopartikel länger im Endosom verbleiben als lineare DNA. Dieser Mechanismus wurde zumindest für CpG Typ A Nanopartikel in plasmazytoiden dendritischen Zellen diskutiert (Arbibe et al., 2000; Bokoch and Knaus, 2003; Brown et al., 2007; D'Ambrosi et al., 2014; Frey et al., 2006; Fürst et al., 2005; Hordijk, 2006; Kerkmann et al., 2005; Lee et al., 2004; Roberts et al., 2005; Stow and Condon, 2016).

Versucht man die erhöhte inflammatorische Aktivität bei Aufnahme von BCG DNA unter anderen Gesichtspunkten zu erklären, zum Beispiel über die Länge der Sequenz der DNA, so könnte zum Beispiel eine Multimerbildung der TLR9 Liganden oder eine TLR9 Dimerisierung mit anschließender Formation von größeren Rezeptor-Ligand-Aggregaten mögliche Ursachen dafür sein (Li et al., 2012b, Roberts et al., 2005, Wu, Lee et al., 2004).

Zusammengenommen bedeutet dies, dass die Fähigkeit von TLR9-Liganden Zellen inflammatorisch zu aktivieren von mehreren Faktoren abhängt.

In diesem Zusammenhang stellt die kleine Rho GTPase einen interessanten Bezugspunkt dar, da sie sowohl bei der Partikelaufnahme von Makrophagen, als auch bei der TLR-abhängigen Entzündungsreaktion eine Rolle spielt (Arbibe et al., 2000, Bokoch, 2005, Stow & Condon, 2016). Unsere Daten deuten darauf hin, dass die inflammatorische Aktivierung durch nanopartikuläre genomische DNA von einer vorangehenden Aktivierung der kleinen Rho GTPase Rac1 mit anschließenden Veränderungen des Zytoskeletts abhängt. Kleine Rho GTPasen haben starke regulatorische Effekte auf Aktin-bindende oder -regulierende Proteine. Es liegt nun nahe, dass eine Aktinpolymerisation und die damit verbundene Veränderung des Zytoskeletts nicht nur ein struktureller Prozess ist, sondern auch eine starke Verlinkung zu inflammatorischen Signalwegen hat (Brown, Kamal et al., 2007, D'Ambrosi, Rossi et al., 2014). Als Beispiel dafür lässt sich anmerken, dass Rac1 wichtig für die Aktivierung der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) Oxidase und somit für die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ist (Bokoch & Knaus, 2003, Fürst, Brueckl et al., 2005, Hordijk, 2006). Ein weiteres Beispiel stellt der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF- κ B dar, von dem bekannt ist, dass er über eine Aktivierung der NADPH Oxidase induziert wird, die wiederum von der Aktivierung durch PI3-K abhängt, welche Rac1 nachgeschaltet ist (Arbibe et al., 2000, Frey, Gao et al., 2006). Zusätzlich wurde auch schon eine direkte Interaktion zwischen F-Aktin und der NF- κ B Untereinheit p65 gezeigt (Bolshakova et al., 2015; Fazal et al., 2007; Kustermans et al., 2008), sowie der indirekte Zusammenhang zwischen dem Aktin Zytoskelett und der Aktivierung von NF- κ B über verschiedene Signalwege (Bolshakova, Magnusson et al., 2015, Kustermans, Piette et al., 2008). Aus diesem Grund postulieren wir eine durch Nanopartikel induzierte Aktivierung des

Zytoskeletts und von Rac1, was im Anschluss eine inflammatorische Aktivierung der Zelle auslöst.

Der von Sanjuan et al. für Typ A ODNs vorgestellte Mechanismus verdeutlicht ebenfalls, wie eine Behandlung mit nanopartikulärer DNA in einem Zytoskelett-abhängigen Prozess zur Zellaktivierung führen kann (Sanjuan et al., 2006). Die Arbeitsgruppe präsentierte einen Mechanismus, dem zwei aufeinander folgende Aktivierungsschritte zugrunde liegen.

Im ersten TLR9-unabhängigen Schritt wird ausgehend von der Plasmamembran das Aktinzytoskelett reorganisiert, gefolgt von einem zweiten Schritt, bei dem CpG DNA mit TLR9 im Endosom interagiert (Sanjuan et al., 2006). Auch unsere Daten weisen stark darauf hin, dass bakterielle genomische DNA als natürlicher TLR9-Ligand beide Signalwege induziert.

Auch technisch hergestellte Nanopartikel haben die Eigenschaft, Rac1-Signalwege zu stimulieren. So ist bekannt, dass die Aufnahme von SiNPs in HeLa und A549 Zellen über eine GTPase-abhängige Macropinozytose verläuft. Außerdem wurde festgestellt, dass dieser Aufnahmeprozess und das Ausmaß der Rac1-Aktivierung vom Größenverhältnis der Partikel abhängt (Meng et al., 2011). Unseren Daten zufolge aktivieren sphärische Partikel Rac1 in primären humanen Alveolarmakrophagen und in THP1 Makrophagen (Albrecht et al., 2007; Diesel et al., 2013; Haberzettl et al., 2008; Kasper et al., 2011; Lee et al., 2011). Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass lungengängige Quartzpartikel Rac1 und Cdc42 in Ratten-Alveolarmakrophagen aktivieren. Ihre Aufnahme könnte sogar eine Rolle in der Entwicklung einer Lungenentzündung spielen (Albrecht, Höhr et al., 2007, Haberzettl, Schins et al., 2008). Auch für Silica Nanopartikel wurde bereits berichtet, dass sie Makrophagen inflammatorisch stimulieren können (Kasper, Hermanns et al., 2011, Lee, Yun et al., 2011). Silica Nanopartikel mit positiv geladener Oberfläche

können vermutlich an negativ geladene Membranmoleküle binden, die dann mit Aktinfilamenten interagieren (Orr et al., 2007). Dagegen spricht jedoch, dass oberflächengeladene Quarzpartikel die geringste inflammatorische Stimulation in der Lunge *in vivo* hervorriefen, obwohl sie im Vergleich am stärksten von Ratten-Alveolarmakrophagen aufgenommen wurden (Albrecht et al., 2007).

In einer weiteren Studie, in der mit Titanoxid- und Quarz-Nanopartikeln gearbeitet wurde, konnte wiederum keine Abhängigkeit zwischen der Aufnahmemenge und der potentiellen inflammatorischen Aktivität festgestellt werden (Höhr et al., 2002). Für oberflächenmodifizierte magnetische Nanopartikel wurden sogar eher gegenteilige Effekte beobachtet, was die Korrelation zwischen Partikelaufnahme und Zellaktivität angeht (Gupta and Gupta, 2005). Aus all diesen Studien lässt sich also schlussfolgern, dass es immer noch keine einheitliche Meinung darüber gibt, ob Nanopartikel überhaupt von der Zelle aufgenommen werden müssen, um eine inflammatorische Antwort auszulösen. Womöglich reicht eine Aktivierung der Rho GTPasen aus, um inflammatorische Signalwege anzustoßen, auch ohne Aufnahme der Partikel in die Zelle.

In unseren Experimenten konnten wir feststellen, dass endotoxinfreie Silica Nanopartikel, die die Aktinpolymerisation aktivieren konnten, keine Inflammation in Makrophagen induzierten. Die gleichen Nanopartikel, kombiniert mit dem TLR9 Agonist ISS 1018, riefen allerdings sehr wohl eine entzündliche Reaktion in Makrophagen hervor. Hierbei konnte auch festgestellt werden, dass nicht nur Partikel der Größe 100 nm, sondern auch wesentlich kleinere Silica Nanopartikel der Größe 15 nm in Kombination mit ISS 1018 TLR9 aktivieren und somit eine Inflammation in Makrophagen hervorrufen können (L929 Bioassay, Diesel et al., 2013). Basierend auf dieser Erkenntnis ist es sehr wahrscheinlich, dass zur vollen inflammatorischen Aktivierung der Zellen zwei Voraussetzungen eine wichtige Rolle spielen: Zum einen

die durch Rac1 induzierte Reorganisation des Zytoskeletts und zum anderen die TLR-spezifische Aktivierung der Zelle (Sanjuan et al., 2006). Interessanterweise zeigen unsere Versuche, dass BCG DNA ein stärkeres inflammatorisches Potential hat als die Kombination aus Nanopartikeln und ISS 1018. Die geringere Immunantwort von ISS und NPs alleine ist daher auch vermutlich, im Gegensatz zu der Antwort auf BCG DNA, ein zu schwacher Stimulus, um *GILZ* mRNA herab zu regulieren. Auch Köberle et al. konnten beobachten, dass eine Überexpression von Rac1 im Vergleich zu anderen Rho GTPasen die *GILZ*-Promotoraktivität nicht signifikant herabregulierte (Köberle et al., 2012).

Generell scheint es so, dass der Anstoß beider Signale ausgehend von einem Molekül eine stärkere entzündliche Antwort hervorruft. Möglicherweise sind hier der zeitliche und der räumliche Aspekt entscheidend (Hanagata, 2012; Malyala et al., 2009; Misra et al., 2011; Roberts et al., 2005).

Der Transport von natürlichen ODNs zusammen mit Nanopartikeln stellt möglicherweise eine vielversprechende Strategie für eine verbesserte Aufnahme von DNA-Liganden dar. Die Kombination mit Nanopartikeln könnte sowohl die DNA vor frühzeitigem Abbau schützen als auch sich positiv auf deren Transport auswirken (Hanagata, 2012, Malyala, O'Hagan et al., 2009). Dieser Mechanismus könnte z.B. für den Einsatz als Adjuvanz bei Impfungen, als auch bei Behandlungen von Krankheiten, wie zum Beispiel Tuberkulose sprechen (Malyala et al., 2009, Misra, Hickey et al., 2011).

Generell bleibt festzustellen, dass die Wirkung von Nanopartikeln auf den Aktivierungsstatus des Immunsystems und deren toxische Konzentrationen einen Gegenstand der aktuellen Forschung darstellt (Giovanni et al., 2015; Go et al., 2013; Libby et al., 2011; Moreno and Teresa Mitjavila, 2003). Unsere Ergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung dieser Wirkung im Hinblick auf das

immunstimulatorische Potential von Nanopartikeln, insbesondere in Kombination mit TLR-Agonisten.

Anmerkung: Alle Daten und Schlussfolgerungen aus Kapitel 1 stammen aus beziehungsweise beziehen sich auf die Veröffentlichung „Activation of Rac1 GTPase by nanoparticulate structures in human macrophages“, Diesel et al., 2013.

Kapitel 2

Eine verminderte Expression des *Glucocorticoid-induced leucine zipper* verstärkt vaskuläre Entzündungen in Endothelzellen

Einleitung

Arteriosklerose ist eine komplexe multifaktorielle chronisch entzündliche Erkrankung und aufgrund des erhöhten Risikos für Herzstillstand oder Schlaganfall einer der Haupt-Mortalitätsgründe in Industriestaaten (Go, Mozaffarian et al., 2013). Mehrere Prozesse spielen bei der Entwicklung von Arteriosklerose eine wichtige Rolle: Zum einen werden Fette akkumuliert, was bedeutet, dass zum Beispiel Cholesterin extrazellulär in den Wänden der arteriellen Blutgefäße, genauer gesagt in der *Tunica intima* angelagert wird. Zum anderen zeigen Endothelzellen (ECs) und Makrophagen (MΦs) eine entzündliche Reaktion. Das Endothel wird aktiviert, was zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen führt. MΦs lagern Fette ein und entwickeln sich zu Schaumzellen, welche die Entzündungsreaktion weiter verstärken und vaskuläre glatte Muskelzellen und Immunzellen anlocken (Libby, Ridker et al., 2011, Moreno & Teresa Mitjavila, 2003). Alle Vorgänge in Kombination führen zu Verdickungen der inneren Blutgefäßwände, sogenannten „Plaques“ (Roy et al., 2009).

Eine pro-inflammatorische Aktivierung von MΦs durch TLR-Aktivierung löst eine Herabregulation von GILZ aus und wird über eine *GILZ* mRNA-Destabilisierung durch das mRNA-bindende Protein Tristetraprolin (TTP, zinc finger protein-36, ZFP36) vermittelt. Funktionell führt dies zu einer verminderten Hemmung von zum Beispiel NF-κB und *activator protein* (AP)-1, das heißt zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort (Ayroldi & Riccardi, 2009, Hahn et al., 2014, Hoppstädter et al., 2012).

Die Expression von ZFP36 kann durch die anti-inflammatorische *dual-specificity protein phosphatase 1* (DUSP1, *mitogen kinase phosphatase-1*, MKP-1) über eine

Inhibierung des Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) p38-Signalweges gehemmt werden (Huotari et al., 2012; Imaizumi et al., 2010; Kiemer et al., 2002a; Kiemer et al., 2002b; Kim et al., 2015; Prabhala et al., 2015; Shen et al., 2010; Zakkar et al., 2008). MKP-1 ist eine nukleäre Phosphatase, deren Expression durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel Zytokine, LPS oder Glukokortikoide induziert wird und generell die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen abschwächt (Huotari et al., 2012). Außerdem hemmt MKP-1 über eine Dephosphorylierung die p38 MAPK (Kiemer, Baron et al., 2002a, Kiemer, Weber et al., 2002b, Prabhala, Bunge et al., 2015).

Welche Rolle MKP-1 in der Arteriosklerose spielt, wird allerdings noch diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass MKP-1 atheroprotektiv wirkt (Kim, Tavakoli et al., 2015, Zakkar, Chaudhury et al., 2008). Allerdings wurden auch Daten veröffentlicht, die das Gegenteil postulieren (Imaizumi, Grijalva et al., 2010, Shen, Chandrasekharan et al., 2010).

Befunde aus dem eigenen Arbeitskreis zeigten, dass humane ECs und Venenbypässe unter entzündlichen Bedingungen eine verringerte Expression von GILZ aufweisen (Hahn et al., 2014). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die verminderten GILZ-Spiegel mit ZFP36-Leveln im Zusammenhang stehen, und ob dadurch die Entzündungsreaktion insgesamt verstärkt wird.

Ergebnisse

Inflammatorische Antwort in Endothelzellen und Makrophagen

In früheren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass GILZ in ECs und MΦs exprimiert wird (Cheng et al., 2013; Hoppstädter et al., 2012). Es wurde beobachtet, dass eine Behandlung mit TNF- α in humanen Nabelschnurendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) zu einer erhöhten Menge an ZFP36 führt, das bereits als GILZ-destabilisierender Faktor beschrieben wurde (Hoppstädter et al., 2012). Interessanterweise zeigte sich dabei, dass kurz nach der Behandlung zunächst das nichtphosphorylierte, aktive, instabile ZFP36 vermehrt vorhanden ist, nach zwei bis vier Stunden jedoch das phosphorylierte, inaktive, stabile ZFP36 dominiert (Abb. 11, Hahn et al., 2014). Dabei wurde der inflammatorische Status der TNF-behandelten HUVEC über den Nachweis der Induktion von *TLR2* mRNA und *chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2, monocyte chemoattractant protein 1, MCP1)* mRNA bestätigt (Hahn et al., 2014).

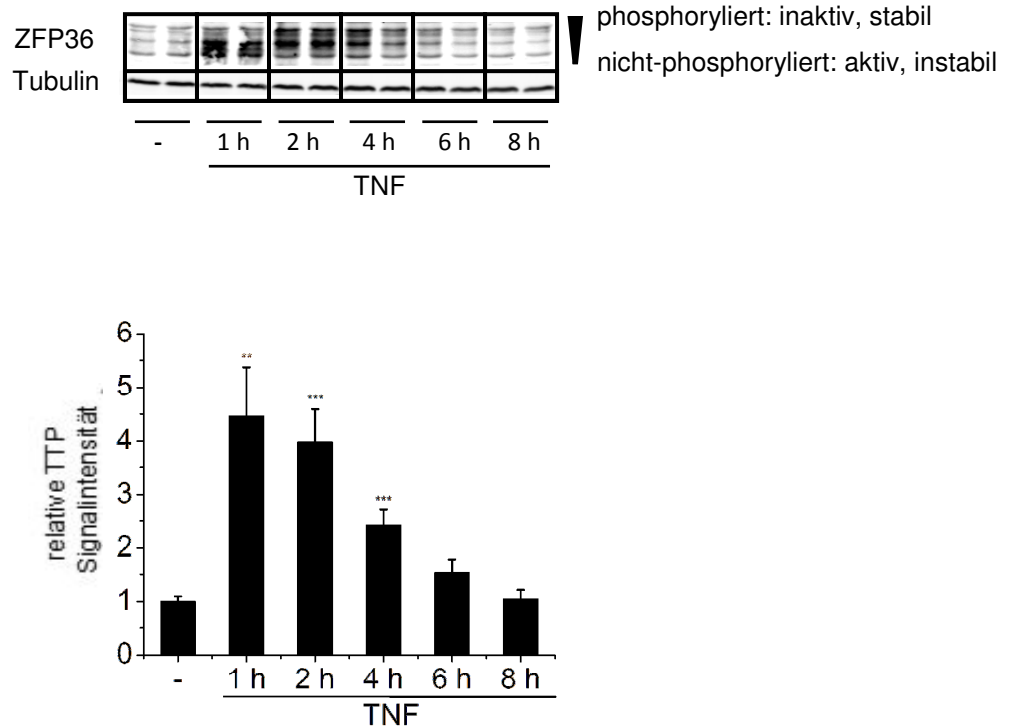


Abb. 11: ZFP36 Induktion durch TNF- α .

HUVEC wurden mit TNF- α (10 ng/ml) für die angegebenen Zeiträume behandelt. Die ZFP36-Proteinspiegel (TTP) wurden mittels Western Blot bestimmt und auf die Ladekontrolle Tubulin bezogen (n = 3 in Duplikaten). Die Werte für die unbehandelten Zellen wurden als 100% gesetzt, **p < 0,01; ***p < 0,001 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Durchgeführt von Dr. Rebecca Hahn.

Vorarbeiten von Dr. Rebecca Hahn und Dr. Jessica Hoppstädter zeigten, dass die GILZ-Expression sowohl in Makrophagen, als auch in HUVEC unter entzündlichen Bedingungen, z.B. durch Behandlung mit TNF- α , herunterreguliert wird, und zwar sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene (Hahn et al., 2014).

Um den funktionellen Zusammenhang zwischen GILZ und ZFP36 in Endothelzellen besser zu verstehen, wurde ein ZFP36 *knockdown* durchgeführt. Im Anschluss wurde die Veränderung der Protein-Expression von ZFP36 sowie von GILZ betrachtet. Dazu wurden HUVEC entweder mit Kontroll-siRNA (siCo) oder siZFP36 transfiziert und die Zelllysate mittels Western Blot untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nach siCo Transfektion eine TNF- α Behandlung die ZFP36-

Spiegel stark erhöht und gleichzeitig GILZ Protein vermindert exprimiert wird. Der ZFP36 Knockdown nach siZFP36-Behandlung wurde auf Proteinebene bestätigt. Hierbei blieb die TNF-vermittelte GILZ-Abnahme vollkommen aus (Abb. 12).

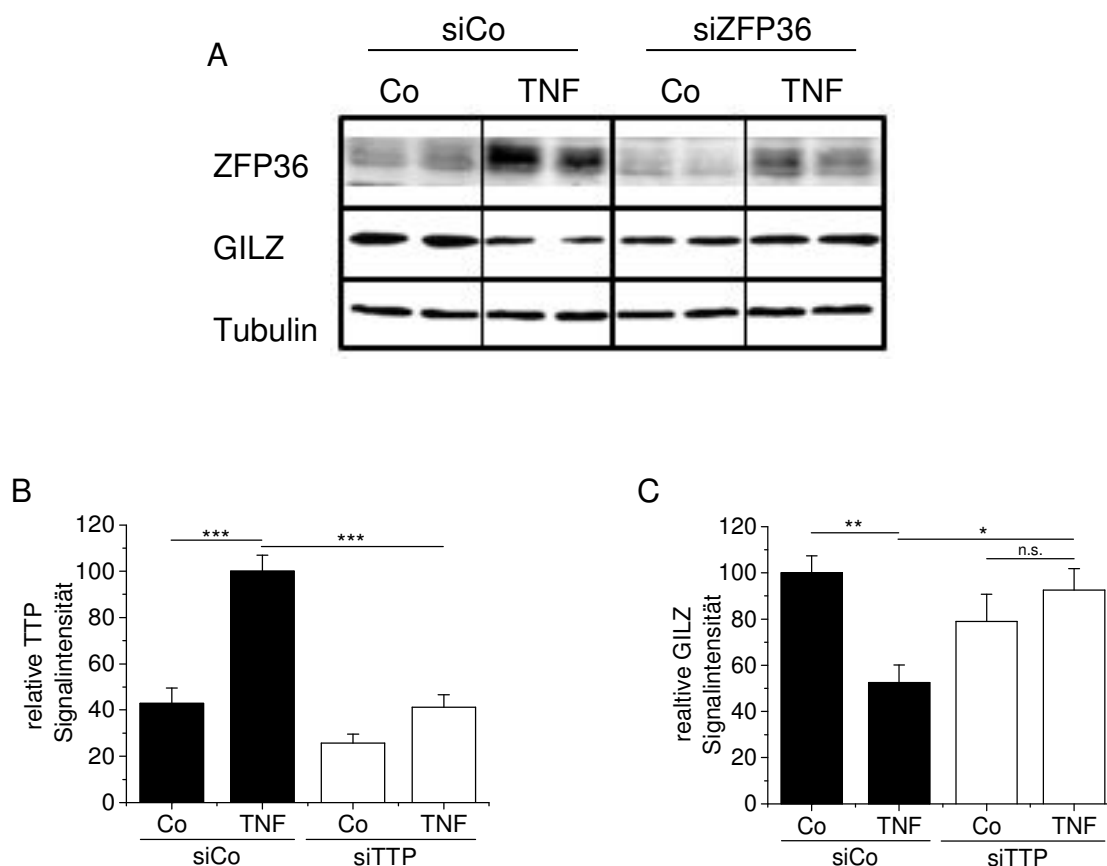


Abb. 12: Einfluss von ZFP36 *knockdown* auf die TNF- α -induzierte GILZ-Abnahme. HUVEC wurden mit ZFP36 siRNA (siTTP) oder Kontroll siRNA (siCo) transfiziert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit TNF- α (10 ng/ml) behandelt. Die TTP und GILZ Protein-Expression wurden mittels Western Blot analysiert unter der Nutzung von Tubulin als Ladekontrolle. Die Werte der unbehandelten Zellen, die mit siCo transfiziert wurden, wurden als 100% gesetzt. Es werden ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten (A) und Daten von drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten gezeigt (B-C). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Um zu überprüfen, ob nicht nur weniger ZFP36 zu mehr GILZ, sondern auch umgekehrt mehr ZFP36 zu weniger GILZ führt, wurde auch eine transiente ZFP36-Überexpression in HUVEC durchgeführt.

Mit diesem Experiment konnte der Zusammenhang zwischen der Expression von GILZ und ZFP36 untermauert werden, da eine ZFP36-Überexpression zu einer signifikanten GILZ-Abnahme führte (Abb. 13).

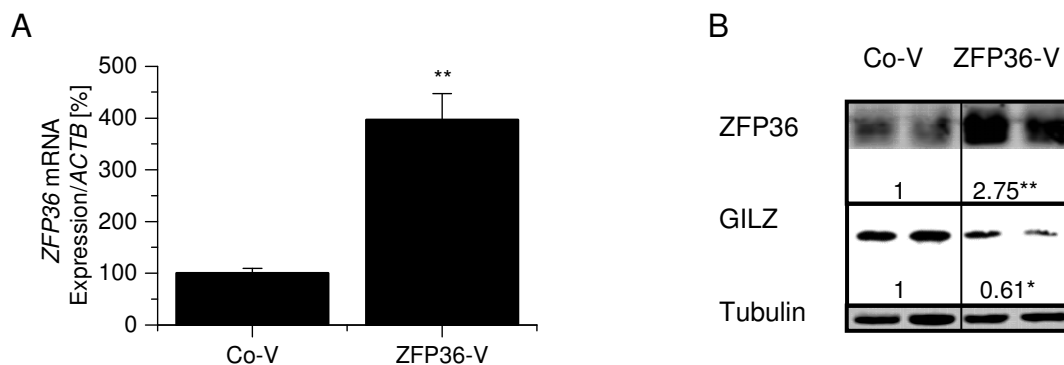


Abb. 13: Einfluss einer ZFP36-Überexpression auf die GILZ-Expression. HUVEC wurden entweder mit einem Antisense ZFP36 Vektor (Co-V) oder einem ZFP36 Expressionsvektor (ZFP36-V) transfiziert und nach 24 h geerntet. (A) Die Überexpression von *ZFP36* mRNA wurde mittels Real-time RT-PCR bestätigt. Die Werte wurden auf *ACTB* mRNA bezogen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten im Duplikat mit Co-V als 100%. (B) Die Expression von ZFP36 und GILZ Protein wurden mittels Western Blot bestimmt, wobei Tubulin als Ladekontrolle diente. Die Zahlenwerte zeigen die Signalintensitäten von drei unabhängigen Experimenten an, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert. Die Mittelwerte für Co-V wurden als 1 gesetzt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, im Vergleich zu Co-V transfizierten Zellen.

Zusammengenommen weisen diese Daten auf eine wichtige Schlüsselfunktion von ZFP36 bei der Regulation von GILZ in Endothelzellen hin.

Mechanismen der GILZ-Downregulation im Entzündungsgeschehen

Die Expression und Aktivität von ZFP36 kann unter anderem durch die *MAP Kinase Phosphatase 1 (MKP-1)* über deren Interaktion mit p38 MAPK reguliert werden (Huotari et al., 2012; Kiemer et al., 2002b).

Um zu überprüfen, in wie weit die Aktivierung der p38 MAPK einen Einfluss auf die ZFP36- und GILZ-Expression hat, wurde die Aktivierung durch Einsatz des p38 MAPK Inhibitors SB203580, der mit ATP um die Bindung in der ATP-Bindetasche von p38 MAPK konkurriert, unterbunden (Young et al., 1997). Dazu wurden HUVEC mit SB203580 und anschließend mit TNF- α behandelt, und im Folgenden ZFP36 und GILZ auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Die durch TNF- α hervorgerufene ZFP36-Induktion konnte tatsächlich mit Hilfe des p38 MAPK Inhibitors signifikant abgeschwächt werden (Abb. 14). Auch die Verminderung von GILZ Protein nach TNF- α -Behandlung wurde durch Anwendung des Inhibitors deutlich reduziert. Gleiches konnte auch auf *GILZ* mRNA-Level festgestellt werden. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass der Mechanismus der verstärkten GILZ-Expression nach p38-Hemmung tatsächlich über reduzierte ZFP36-Spiegel verläuft.

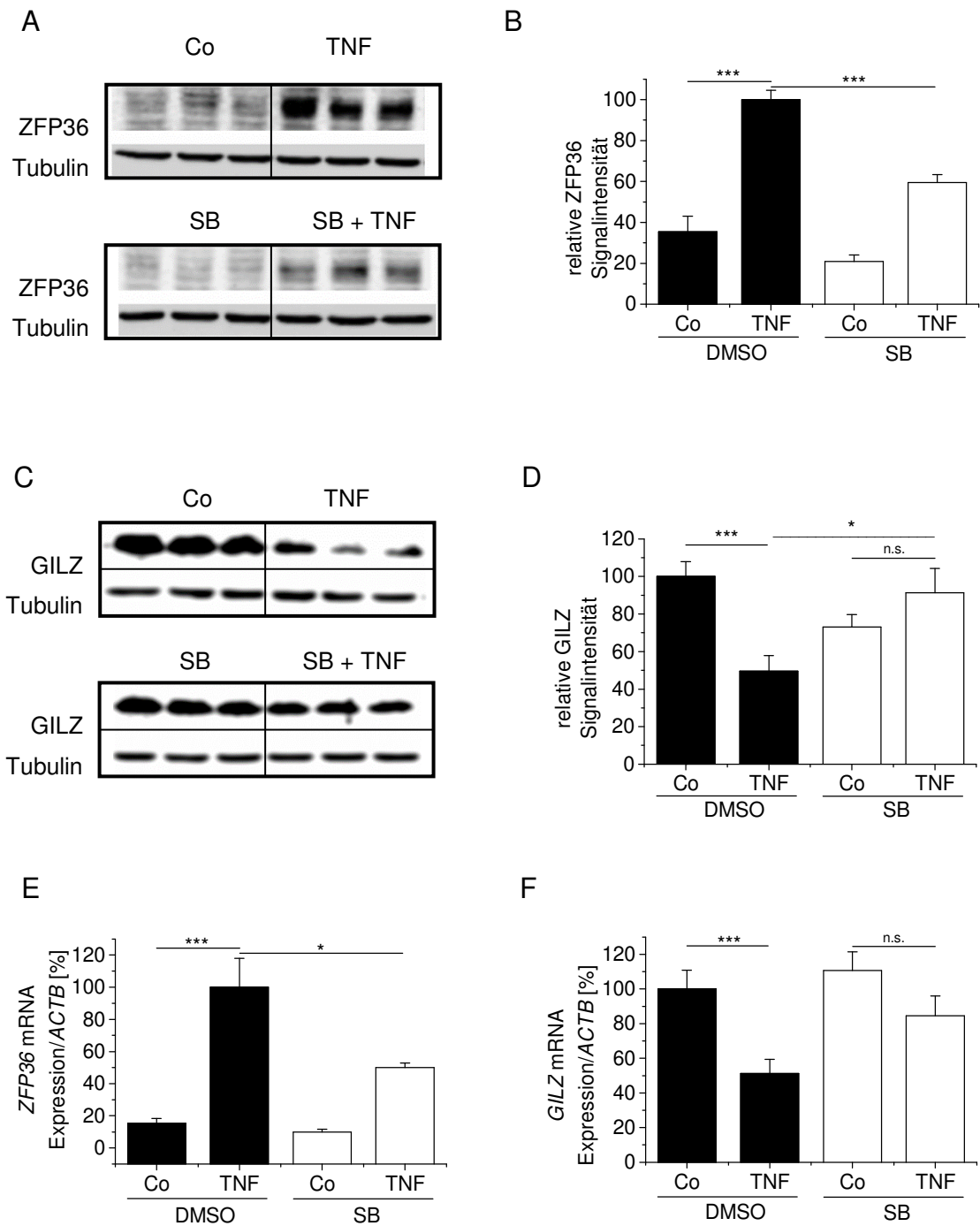


Abb. 14: ZFP36- und GILZ-Expression nach Hemmung der p38 MAPK-Aktivität.

HUVEC wurden mit der Lösemittelkontrolle DMSO oder mit SB203580 (10 μ M) vorbehandelt, gefolgt von der Behandlung mit TNF- α (10 ng/ml) für 2 h (A-B, E-F) oder 4 h (C-D). Die Proteinmengen wurden mittels Western Blot mit Tubulin als Ladekontrolle bestimmt (A-D). Die mRNA Spiegel wurden mittels Real-time RT-PCR bestimmt und *ACTB* zur Normalisierung genutzt (E-F). Die Werte für die Zellen, die mit der Lösemittelkontrolle DMSO behandelt wurden, entweder in Anwesenheit (B und E) oder in Abwesenheit (D und F) von TNF- α , wurden als 100 % gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte von drei (A-D) oder zwei (E-F) unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, n.s.: nicht signifikant.

Funktionelle Auswirkungen der GILZ-Downregulation

In früheren Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass ein *GILZ-knockdown* eine LPS-vermittelte M Φ -Aktivierung erhöht und zum Beispiel die Aktivität von NF- κ B amplifiziert (Hoppstädter et al., 2012). Eine GILZ-Überexpression in Endothelzellen führt stattdessen zu einer Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung (Cheng et al., 2013). Nachdem nun eine Erklärung für den Mechanismus der GILZ-Downregulation in Endothelzellen gefunden wurde, sollte noch geklärt werden, welche funktionellen Auswirkungen dies nach sich zieht. Dafür wurde ein *GILZ-knockdown* mittels siRNA in HUVEC durchgeführt (Hahn et al., 2014). Tatsächlich führte das Ausschalten von GILZ zu einer verstärkten Translokation und Aktivität des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B (Hahn et al., 2014). Daraufhin wurde untersucht, ob eine GILZ Downregulation auch einen Einfluss auf die Expression von TLR2 und Adhäsionsmolekülen hat, welche als durch NF- κ B induzierbar beschrieben sind (Erridge, 2009). TLR2 ist ein wichtiger Faktor im Entzündungsgeschehen und auch speziell bei der Pathogenese von Atherosklerose (Diesel et al., 2012; Erridge, 2009). Adhäsionsmoleküle, wie *intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)*, *vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)* und E-Selektin sind stark in die verstärkte Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe involviert (Bruscoli et al., 2010; Cohen et al., 2006; Gimbrone et al., 1997; Godot et al., 2006; Gomez et al., 2010; Hamdi et al., 2007; Kiemer et al., 2002b; Soundararajan et al., 2005). Tatsächlich zeigte sich nach Stimulation mit TNF- α in den siGILZ-transfizierten HUVEC eine erhöhte Expression sowohl von *TLR2*, als auch von *ICAM1*, *VCAM1* und *SELE* (E-Selektin) (Abb. 15), was wiederum verdeutlicht, dass die Abwesenheit von GILZ eine pro-inflammatorische Antwort fördert.

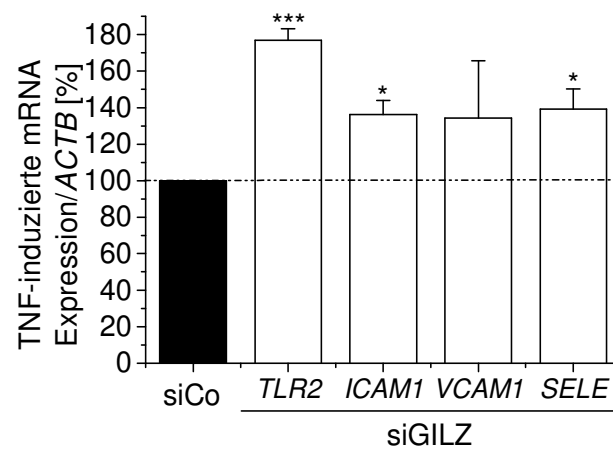


Abb. 15: Der Einfluss von GILZ-*knockdown* in HUVEC auf die TNF- α -induzierte Expression von *TLR2* und Adhäsionsmolekülen.

HUVEC wurden mit siGILZ oder siCo transfiziert. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 4 h mit TNF- α stimuliert. Die mRNA-Expression wurde quantifiziert mit Real-time RT-PCR und auf *ACTB* normalisiert. Die Werte, die für die siCo transfizierten Zellen erhalten wurden, wurden als 100 % gesetzt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu siCo-transfizierten Zellen.

Diskussion

Die Rolle von GILZ in inflammatorischen Erkrankungen

Die Expression des anti-inflammatorisch wirkenden GILZ wurde in verschiedenen Zelltypen beschrieben, wie z.B. dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, Epithelzellen, Mastzellen und Muskelzellen (Ayroldi & Riccardi, 2009, Bruscoli, Donato et al., 2010, Cohen et al., 2006, Godot et al., 2006, Gomez, Raju et al., 2010, Hamdi, Bigorgne et al., 2007, Soundararajan, Zhang et al., 2005). Auch in ECs und MΦs, zwei Zelltypen, die in der Entstehung der Atherosklerose eine zentrale Rolle spielen, konnte GILZ detektiert werden (Hoppstädter et al., 2012). Zuvor veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass in primären humanen MΦs und in Lungengewebe von LPS-behandelten Mäusen eine Aktivierung von TLRs zu einer Verminderung von GILZ führt (Beaulieu and Morand, 2011; Berrebi et al., 2003; Blankenberg et al., 2003; Cannarile et al., 2009; Hoppstädter et al., 2012; Kim et al., 2008; Libby et al., 2011; Szmítko et al., 2003; Zhang et al., 2009; Zhu et al., 2013).

Die Abwesenheit von GILZ wurde als Begleiterscheinung verschiedener inflammatorischer Erkrankungen, wie zum Beispiel alkoholischer Hepatitis, chronischer Rhinosinusitis, rheumatoider Arthritis oder Tuberkulose in der Literatur beschrieben (Beaulieu & Morand, 2011, Berrebi et al., 2003, Hamdi et al., 2007, Zhang, Lu et al., 2009). Auch in verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass GILZ anti-inflammatorisch wirkt, auch wenn diese Effekte meistens in Zusammenhang mit der Funktion von Leukozyten beobachtet wurden (Beaulieu & Morand, 2011, Cannarile, Cuzzocrea et al., 2009).

In der Arteriosklerose spielen neben Leukozyten auch ECs eine wichtige Rolle in der Entzündungsentwicklung in den Gefäßwänden (Hahn et al., 2014, Szmítko, Wang et

al., 2003). Wenn ECs inflammatorisch aktiviert werden, exprimieren sie vermehrt Selektine, VCAM-1 und ICAM-1, was zur Anlockung von Monozyten führt (Blankenberg, Barboux et al., 2003, Kim, Bae et al., 2008, Zhu, Shen et al., 2013). Anschließend wandern diese in die *tunica intima*, die innerste Schicht der Arterienwand, ein, angezogen von einem MCP-1 Konzentrationsgradienten, wo sie zu Makrophagen differenzieren und zum Beispiel modifizierte Lipoproteine aufnehmen können (Libby et al., 2011, Szmitko et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnten Cheng et al. zeigen, dass eine GILZ-Überexpression die inflammatorische Aktivität der ECs nach TNF- α -Stimulation, die sich wie bereits erwähnt unter anderem in dem Anlocken der Leukozyten äußert, reduziert (Cheng et al., 2013).

ZFP36-abhängige GILZ-Downregulation in ECs

Bereits zuvor veröffentlichte Daten zeigten einen Zusammenhang zwischen einer GILZ-Downregulation und einem ZFP36-Anstieg in Makrophagen (Hoppstädter et al., 2012). Ebenso konnte in dieser Arbeit in HUVEC eine starke ZFP36-Zunahme mit gleichzeitiger GILZ-Verminderung nach TNF-Behandlung gezeigt werden, was auf eine mögliche Rolle von ZFP36 bei der GILZ-Regulation in ECs schließen ließ. Sowohl eine ZFP36-Überexpression als auch ein *knockdown* bestätigten diesen vermuteten Zusammenhang. Außerdem konnte ein Anstieg von ZFP36 in atherosklerotischen Gefäßen beziehungsweise in degenerierten entzündeten Venenbypässen sowohl von unserer, als auch von einer anderen Arbeitsgruppe detektiert werden (Hahn et al., 2014; Phillips et al., 2004; Ronkina et al., 2010; Ross et al., 2015; Sedlyarov et al., 2016; Shah et al., 2015; Taylor et al., 1996; Zhang et al., 2013). Allerdings inhibiert ZFP36 die Expression von pro-inflammatorischen Transkripten, wie zum Beispiel TNF- α , was dem mRNA-bindenden Protein demnach einen anti-inflammatorischen Effekt zuschreibt (Ronkina et al., 2010, Ross et al.,

2015, Shah et al., 2015, Zeng, Sachdev et al., 2009, Zhang et al., 2013). Viele Literaturstellen beschreiben außerdem den inflammatorischen Phänotyp von ZFP36-Knockout-Mäusen, was zeigt, dass ZFP36 entzündungshemmend wirkt (Phillips, Kedersha et al., 2004, Sedlyarov, Fallmann et al., 2016, Taylor, Carballo et al., 1996). Unseren Daten zufolge inhibiert ZFP36 das atheroprotektiv wirkende GILZ (Hahn et al., 2014). Letztendlich lässt sich dazu sagen, dass es ein weites Spektrum an ZFP36-Target-mRNAs gibt, wozu zum Beispiel auch das anti-entzündliche Interleukin-10 zählt (Delfino et al., 2011; Huotari et al., 2012; Stoecklin et al., 2004; Stoecklin et al., 2008). Außerdem blieb laut unseren Experimenten ein ZFP36-Anstieg unter anti-inflammatorischen Bedingungen, wie zum Beispiel laminarem *shear stress*, aus und das anti-inflammatorische Protein GILZ wurde verstärkt exprimiert (Hahn et al., 2014). Es lässt sich also nicht konkret entscheiden, ob die Wirkung von ZFP36 in diesem Zusammenhang eher anti- oder pro-inflammatorisch einzustufen ist. Fest steht aber, dass ZFP36 in der Inflammation erhöht ist. Abgesehen davon könnte eine Einstufung auch noch von weiteren mRNA-bindenden-Proteinen, wie zum Beispiel HuR (siehe Kapitel 3), wie auch von miRNAs (siehe Kapitel 4) abhängen. Zusätzlich können weitere, die GILZ-Expression beeinflussende Mechanismen, wie proteasomaler Abbau, nicht ausgeschlossen werden (Delfino, Spinicelli et al., 2011).

Zusammenhang zwischen MKP-1, p38 MAPK, ZFP36 und GILZ

Es ist bereits bekannt, dass MKP-1 die Expression von ZFP36 in Makrophagen negativ reguliert (Abb. 16). Dies geschieht über eine Hemmung der p38 MAPK, die selbst wiederum ZFP36 induziert (Huotari et al., 2012, Stoecklin, Stubbs et al., 2004). Unsere Daten belegen erstmals, dass eine Hemmung von p38 MAPK auch in HUVEC zu verminderten ZFP36-Spiegeln führt. Die Überprüfung der Hypothese,

dass p38 MAPK die GILZ-Expression über ZFP36 regulieren kann, zeigte nach einer Hemmung von p38 tatsächlich ein Ausbleiben der GILZ Abnahme nach Zusatz von TNF- α .

Die Inaktivierung von p38 MAPK wird über seine Dephosphorylierung durch die Phosphatase MKP-1 erreicht (Kierner et al., 2002b). Huotari et al. konnten mit Experimenten an M Φ s von MKP-1 knockout Mäusen beziehungsweise über einen siRNA-induzierten *knockdown* in Zelllinien bestätigen, dass ein inverser Zusammenhang zwischen MKP-1 und ZFP36 Expression besteht. Ihre Versuche zeigten, dass ein MKP-1-*knockdown* zu höheren ZFP36-Spiegeln führt. Entsprechend zeigte eine Hemmung der p38 MAPK erniedrigte ZFP36-Spiegel (Huotari et al., 2012). Daher lässt sich schlussfolgern, dass ZFP36 durch MKP-1 herabreguliert wird, indem MKP-1 die p38 MAPK hemmt, einen positiven Regulator von ZFP36. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte mit weiteren Experimenten gezeigt werden, dass nach Anlegen von anti-inflammatorischem laminarem *shear stress* eine MKP-1 Induktion mit einer ZFP36-Downregulation und erhöhten GILZ-Spiegeln einhergeht (Collins and Cybulsky, 2001; Eddleston et al., 2007; Hahn et al., 2014; Malgor et al., 2014; Marco et al., 2007b; Yang et al., 2015). Außerdem konnten in weiterführenden Versuchen vermehrt MKP-1 Protein in gesunden Venen im Vergleich zu entzündeten Venenbypässen detektiert werden (Hahn et al., 2014). Alle diese Befunde lassen auf den gleichen mechanistischen Zusammenhang zwischen MKP-1, p38 MAPK, ZFP36 und GILZ schließen.

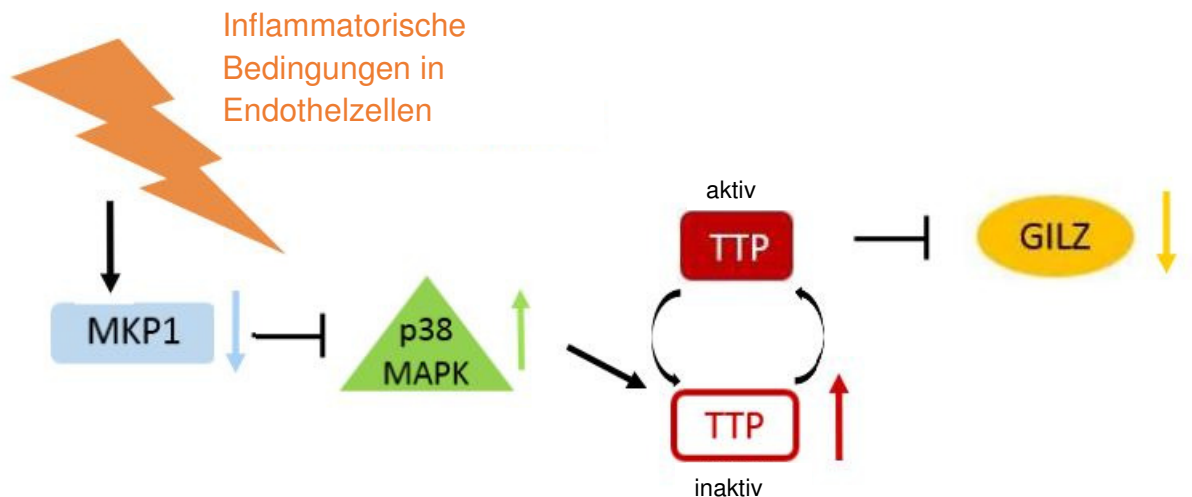


Abb. 16: Mechanismus der Regulation von GILZ und ZFP36 (TTP) durch p38 MAPK und MKP-1

Funktionelle Bedeutung von GILZ in atherosklerotischen Gefäßen

Nachdem die Mechanismen der GILZ Regulation in ECs beschrieben werden konnten, sollte die funktionelle Bedeutung der GILZ-Verminderung in entzündeten Gefäßen untersucht werden. Dazu wurde ein siRNA-vermittelter *GILZ-knockdown* in ECs durchgeführt.

In der Folge zeigte sich eine verstärkte Expression von TLR2 und verschiedenen Adhäsionsmolekülen, also von Genen, von denen bekannt ist, dass sie im atherosklerotischen Prozess eine wichtige Rolle spielen und dass sie von NF- κ B reguliert werden (Collins & Cybulsky, 2001, Malgor, Bhatt et al., 2014, Yang, Chu et al., 2015). Entsprechend wiesen die Zellen nach siGILZ-Behandlung eine verstärkte NF- κ B-Aktivität auf. Diese Befunde stehen im Einklang mit denen in der Literatur bereits beschriebenen Beobachtungen. Hier konnte nach GILZ-Überexpression in verschiedenen Zelltypen die NF- κ B-Aktivität herabreguliert werden (Ayroldi et al., 2001a, Marco et al., 2007) beziehungsweise nach *GILZ-knockdown* eine verstärkte NF- κ B-Aktivität gezeigt werden (Eddleston et al., 2007). Dazu findet man jedoch auch konträre Daten, in denen nach *GILZ-knockdown* mittels siRNA- und TNF- α -

Behandlung keine Veränderung in der inflammatorischen Aktivität vorliegt (Cheng et al., 2013). Die Daten von Cheng et al. lassen sich jedoch nur schwer mit unseren Daten vergleichen, da ein völlig anderer *readout* gezeigt wird. In unseren siGILZ-transfizierten HUVEC waren deutlich erhöhte Spiegel an pro-inflammatorischen, pro-atherosklerotischen Markern, wie TLR2, ICAM, VCAM und E-Selektin detektierbar, was eine wichtige Funktion von GILZ beziehungsweise dessen Verminderung im atherosklerotischen Entwicklungsprozess impliziert.

Anmerkung: Alle Daten und Schlussfolgerungen aus Kapitel 2 stammen aus beziehungsweise beziehen sich auf die Veröffentlichung „Downregulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes vascular inflammation“, Hahn et al., 2014.

Kapitel 3

Die Induktion des *Glucocorticoid-induced leucine zipper* durch den anti-inflammatorischen Naturstoff Curcumin in Makrophagen

Einleitung

Curcumin ist ein Inhaltsstoff des Rhizoms der Pflanze Kurkuma (lat.: *Curcuma longa*), auch Gelbwurz genannt, und wurde zum ersten Mal von Vogel und Pelletier im Jahr 1815 isoliert und beschrieben. Es wird sowohl als Gewürz, genauer gesagt als wesentlicher Bestandteil des Curry-Pulvers, als auch seit langem in der traditionellen Medizin wegen seiner entzündungshemmenden Eigenschaften genutzt (Aggarwal et al., 2013; Aggarwal and Sung, 2009; Gao et al., 2015; Gupta et al., 2013; Gupta et al., 2012; Huang et al., 1994; Rao et al., 1995; Shishodia et al., 2005). Sein großes therapeutisches Potential beinhaltet weiterhin eine hypoglykämische, antioxidative, wundheilende, antimikrobielle, proapoptotische und anti-karzinogene Wirkung (Aggarwal & Sung, 2009, Huang, Lou et al., 1994, Rao, Rivenson et al., 1995). Vor allem aber wegen seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften wird Curcumin ein hohes therapeutisches Potenzial zur Behandlung von entzündlichen Pathologien wie kardiovaskulären Erkrankungen, Arthritis, Asthma, Kolitis, Atherosklerose, entzündlichen Darmerkrankungen und sogar in manchen Krebserkrankungen zugesprochen (Aggarwal, Gupta et al., 2013, Gupta, Patchva et al., 2013, Gupta, Patchva et al., 2012, Shishodia, Sethi et al., 2005). Zudem ist seine Sicherheit und gute Verträglichkeit auch in hohen Dosen in humanen klinischen Studien belegt (Gao, Zhou et al., 2015, Gupta et al., 2012).

Die Literatur belegt die *in vivo* Wirksamkeit von Curcumin als anti-inflammatorisches Agens in verschiedenen Tierversuchen. So war der pflanzliche Inhaltsstoff in der Lage, in einem Ratten-Modell zur experimentellen autoimmunen Myokarditis die Anzahl an anti-inflammatorischen M2 Makrophagen im Herzmuskel zu erhöhen (Gao et al., 2015; Zeng et al., 2015).

Zeng et al. präsentierten in einer kürzlich publizierten Studie an *high fat diet*-Mäusen, dass die therapeutische Gabe von Curcumin in der Behandlung von Herz-Hypertrophie, induziert durch Übergewicht, wirksam ist. Die Wirksamkeit von Curcumin wurde in diesem Zusammenhang mit seiner Fähigkeit, die Expression von *nuclear factor erythroid 2* (Nrf2) zu erhöhen und gleichzeitig NF-κB zu inhibieren, begründet (Zeng, Zhong et al., 2015).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die orale Gabe von Curcumin in einer Nano-Emulsion in einem Peritonitis-Maus-Modell die Rekrutierung von Makrophagen und damit die entzündliche Reaktion verminderte (Young et al., 2014).

Diese Studie macht deutlich, wie wichtig passende Formulierungen für die therapeutische Nutzung von Curcumin sind, da es sich um einen wenig bioverfügbaren Naturstoff handelt, der zudem schnell metabolisiert und eliminiert wird (Anand et al., 2007).

Es ist bekannt, dass Curcumin mit verschiedenen molekularen Targets, zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Protein-Kinasen, interagieren kann (Ayroldi et al., 2001; Kim et al., 2005; Mittelstadt and Ashwell, 2001; Zhou et al., 2011; Ziaei et al., 2015). Die anti-inflammatorischen Effekte von Curcumin kommen vor allem durch eine Hemmung von NF-κB zustande (Kim, Kim et al., 2005, Shishodia, Singh et al., 2007, Zhou et al., 2011, Ziaei, Hoppstädter et al., 2015).

Auch GILZ zeigt seine anti-inflammatorische Aktivität vor allem durch Inhibierung der pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF-κB und *activator protein-1* (AP-1) (Ayroldi, Migliorati et al., 2001b, Di Marco et al., 2007, Mittelstadt & Ashwell, 2001). Der Mechanismus der Hemmung verläuft im Fall von NF-κB über eine Bindung von GILZ-Homodimeren an die beiden Untereinheiten des Transkriptionsfaktors, p52 und

p65. Dadurch wird eine Translokation von NF- κ B in den Kern und somit auch seine transkriptionelle Aktivität inhibiert (Ayroldi et al., 2001).

GILZ wurde zum ersten Mal über eine Studie zu GC-induzierbaren Genen identifiziert (Ayroldi et al., 2007; Berrebi et al., 2003; D'Adamio et al., 1997; Hamdi et al., 2007; Hoppstädter and Kiemer, 2015) und wurde in den folgenden Jahren mit einigen Funktionen der Glukokortikoide in Zusammenhang gebracht (Ayroldi et al., 2001b, Ayroldi, Zollo et al., 2007).

In Monozyten und Makrophagen kann GILZ durch anti-inflammatorische Stimuli, wie zum Beispiel Glukokortikoide, IL-4 oder IL-10 aktiviert werden (Berrebi et al., 2003, Hamdi et al., 2007, Hoppstädter & Kiemer, 2015). Eine Überexpression von GILZ in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie THP-1 löst Glukokortikoid-ähnliche Effekte aus, wie z.B. reduzierte Chemokin-Expression oder verringerte NF- κ B Aktivität nach TLR4-Aktivierung durch LPS (Berrebi et al., 2003).

Darauf basierend ergab sich die Hypothese, dass GILZ vermutlich eine Rolle in der anti-inflammatorischen Funktion von Curcumin spielt. Im folgenden Kapitel sollte überprüft werden, ob und wenn ja über welche Mechanismen Curcumin die GILZ-Expression in Makrophagen potenziell beeinflusst.

Ergebnisse

Beeinflussung der GILZ-Expression durch Curcumin

In den ersten Experimenten sollte überprüft werden, ob Curcumin in der Lage ist, die GILZ-Expression in den Makrophagen-ähnlichen murinen RAW264.7 und humanen U937 Zellen zu beeinflussen. Tatsächlich konnte nach Behandlung mit Curcumin in der nicht-toxischen Konzentration von 6,25 μM ein Anstieg der GILZ Protein-Expression detektiert werden (Abb. 17).

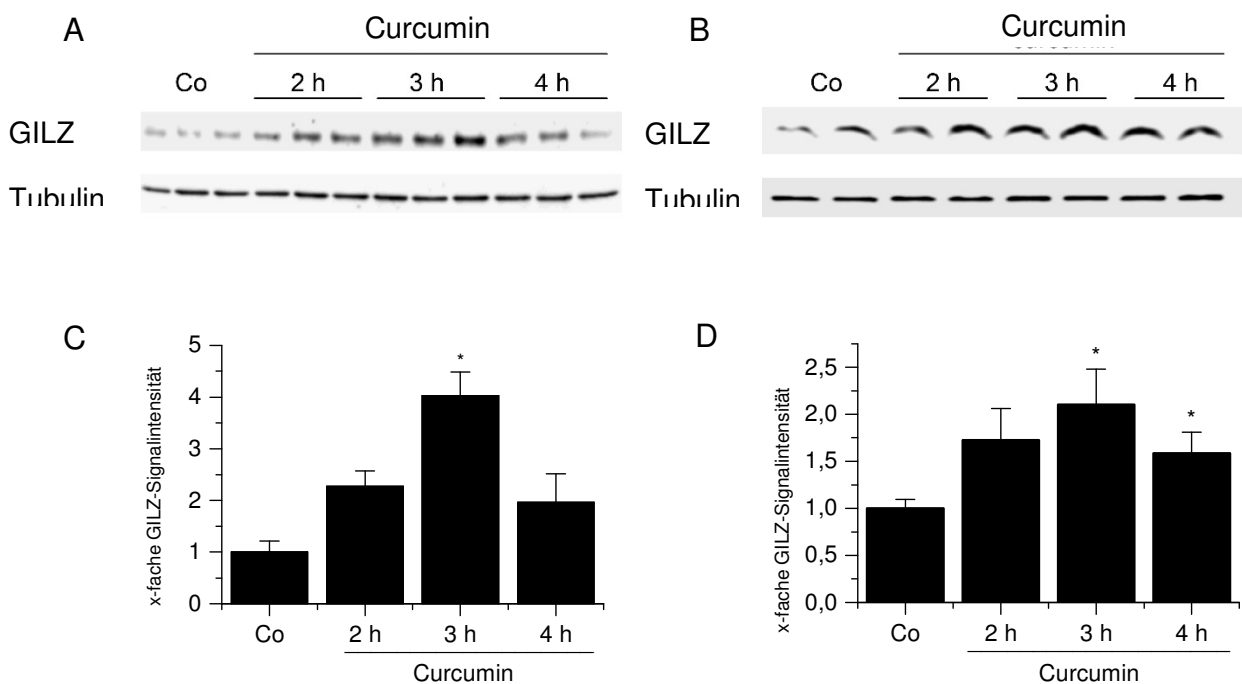


Abb. 17: Curcumin induziert GILZ.

Die GILZ Protein-Expression in RAW264.7 (A, C) und U937 (B, D) wurde nach Behandlung mit Curcumin (6,25 μM) oder der Lösemittelkontrolle DMSO (0,2%, Co) mittels Western Blot bestimmt. (A, C) Repräsentativer Blot von zwei (A) oder von 5 (B). (C, D) Die Signalintensitäten wurden quantifiziert, auf Tubulin normalisiert und als x-fache der Lösemittelkontrolle dargestellt (Co). Die Daten werden dargestellt als Mittelwerte + SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Lösemittelkontrolle.

Mögliche molekulare Mechanismen der Curcumin-vermittelten GILZ-Induktion

Um zu überprüfen, ob Curcumin die *GILZ* mRNA-Expression beeinflusst, wurden RAW264.7 und U937 Zellen mit Curcumin behandelt und *GILZ* mRNA-Spiegel gemessen. Da in beiden Zelllinien keine Änderung in der *GILZ* mRNA-Expression zu erkennen war (Abb. 18 A und B), kann man davon ausgehen, dass weder Transkription noch Stabilität von *GILZ* durch Curcumin beeinflusst werden. Nach Behandlung der Zellen mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D konnte bei Untersuchung der *GILZ* mRNA nach Co-Behandlung mit Curcumin kein Unterschied zu Proben, die nur mit Actinomycin D und einer Lösemittelkontrolle behandelt wurden, festgestellt werden (Abb. 18 C). Dies bestätigt, dass Curcumin keinen Effekt auf die mRNA-Stabilität ausübt.

Als nächstes wurde der Einfluss von Curcumin auf die GILZ Protein-Stabilität näher betrachtet. Dazu wurden RAW264.7 Zellen mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid mit oder ohne Curcumin inkubiert (Abb. 18 D). Man kann erkennen, dass sich die Abnahme der GILZ Protein-Menge mit und ohne Curcumin-Zugabe gleich verhält. Das bedeutet, dass Curcumin auch die Proteinstabilität nicht beeinflusst.

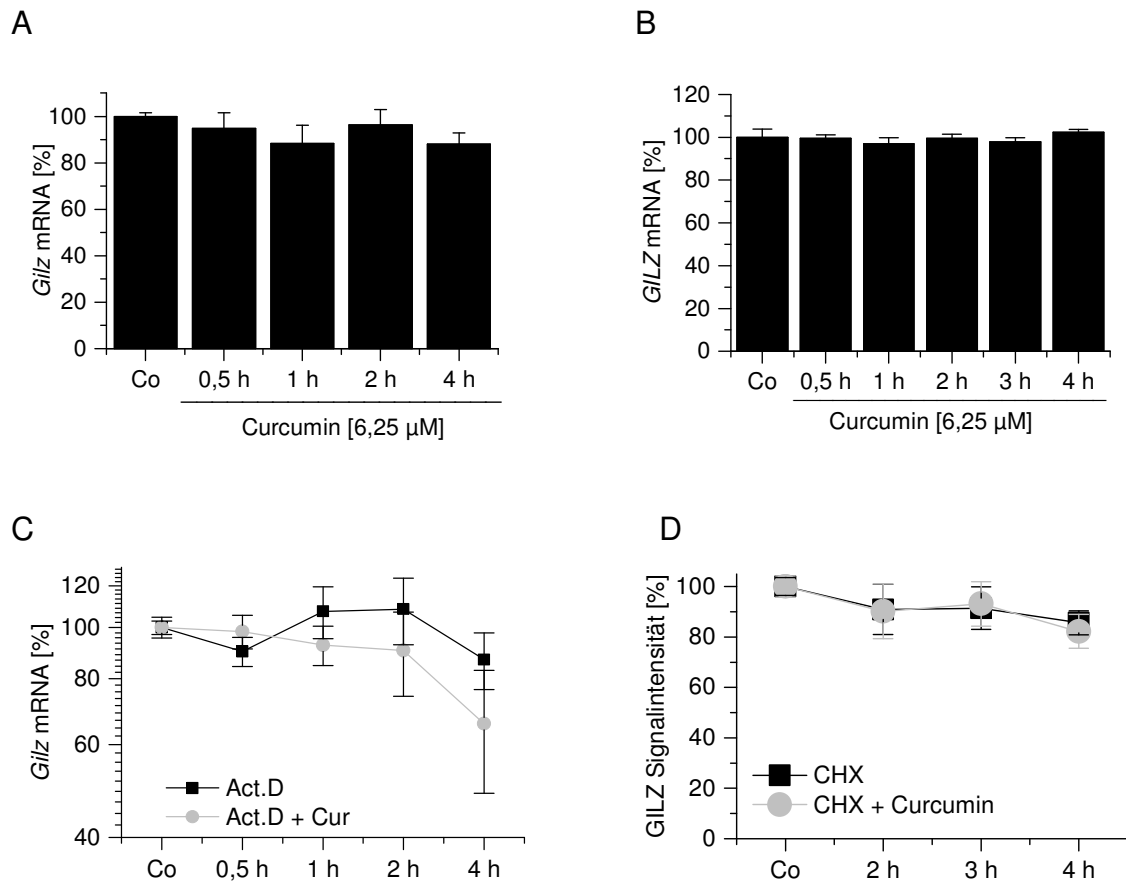


Abb. 18: Die GILZ-Induktion durch Curcumin verläuft nicht über Veränderung der Transkription, mRNA- oder Proteinstabilität.

(A, B) RAW264.7 (A) und U937 (B) wurden mit Curcumin (6,25 μM) oder mit der Lösemittelkontrolle DMSO (0,15%; Co) für die angegebenen Zeitpunkte behandelt. Anschließend wurden *GILZ* mRNA-Spiegel mittels Real-time RT-PCR bestimmt und auf *Ppia* (A) oder *ACTB* (B) normalisiert. Der Mittelwert der Co-Werte wurde jeweils als 100% gesetzt. Die Daten werden gezeigt als Mittelwerte + SEM (n = 3, Duplikate). (C) RAW264.7 Zellen wurden mit Actinomycin D (5 μg/ml, ActD) in An- oder Abwesenheit von Curcumin (6,25 μM) behandelt. Die RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und anschließend mittels Real-time RT-PCR auf *Gilz* überprüft. Die Daten wurden auf *Ppia* normalisiert und zeigen die Mittelwerte ± SEM (n = 3, Duplikate). (D) RAW264.7 Zellen wurden mit Cycloheximid (5 μg/ml, CHX) und der Lösemittelkontrolle DMSO (0,07%; Co) oder mit CHX und Curcumin (6,25 μM) für die angegebenen Zeitpunkte behandelt. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot bestimmt. Die GILZ-Signalintensitäten wurden dargestellt als Prozentangabe in Bezug auf Co ± SEM (n = 4, Triplikate).

Curcumin induziert GILZ über erhöhte HuR-Spiegel

Nachdem Curcumin weder eine GR-Aktivierung hervorruft noch die Transkription induziert oder die mRNA- oder Proteinstabilität von GILZ beeinflusst, vermuteten wir, dass ein Effekt auf die Translation vorliegt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Brüne (Biochemisches Institut der medizinischen Fakultät, Frankfurt) wurde dies mittels einer Polysomenfraktionierung bestätigt (Hoppstädter et al., 2016).

Literaturrecherchen bestätigen, dass die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der *GILZ* mRNA sowohl ein AU-reiches Element (ARE) enthält, also eine konservierte Adenin-Uracil-Folge, als auch eine U-reiche Region, die als Klasse III ARE definiert werden könnte (siehe Einleitung; (Barreau et al., 2005; Hollams et al., 2002; Hoppstädter et al., 2012). Solche AREs bilden oft Elemente, die Prozesse der Translation regulieren. Das mRNA-bindende Protein (mRNA-BP) HuR bindet üblicherweise an AREs in den entsprechenden Target-mRNAs, vor allem an U-reiche Stellen, wodurch es dann zur Stabilisierung oder anderweitigen Translationsregulation beiträgt (Abdelmohsen and Gorospe, 2010; Yu et al., 2013; Zhou et al., 2016).

Um die Hypothese, dass Curcumin über eine HuR-Induktion die GILZ-Translation erhöht, zu überprüfen, sollte im folgenden Experiment zunächst überprüft werden, ob Curcumin die HuR-Expression grundsätzlich beeinflusst.

Nach einer Behandlung mit Curcumin in U937 Zellen konnte tatsächlich eine HuR-Induktion mit einem Maximum nach einer dreistündigen Inkubationszeit beobachtet werden (Abb. 19 A und B).

Um festzustellen, ob HuR *GILZ* mRNA binden kann, wurde eine HuR-Immunopräzipitation durchgeführt, gefolgt von einer Quantifizierung der an HuR gebundenen mRNA mittels Real-time RT-PCR. Tatsächlich konnte damit gezeigt werden, dass *GILZ* mRNA durch Bindung an HuR Protein in einem ähnlichen Maß

angereichert werden konnte wie die Positivkontrolle *CCNB1* (Abb. 19 C) (Wang et al., 2000), was belegt, dass HuR *GILZ* mRNA bindet.

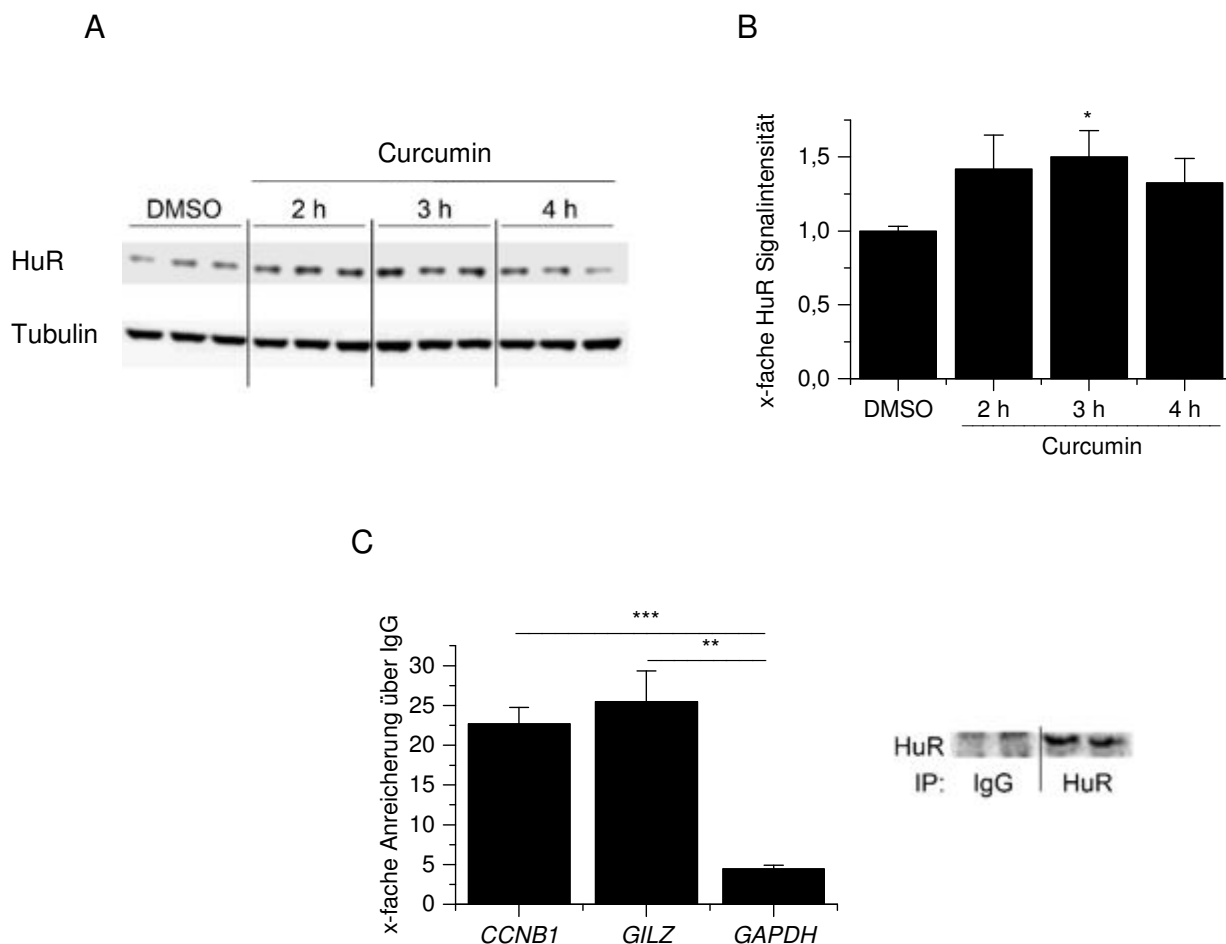


Abb. 19: (A, B) Curcumin induziert die HuR-Expression.

U937 Zellen wurden mit der Lösemittelkontrolle DMSO (0,07%) für 4 h oder mit Curcumin (6,25 μ M) für die angegebenen Zeitpunkte behandelt. Die HuR-Expression wurde mittels Western Blot bestimmt und Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. (A) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. (B) Die Signalintensitäten wurden quantifiziert, auf Tubulin normalisiert, und als x-faches der Lösemittelkontrolle DMSO ausgedrückt (n = 5, Triplikate). (C) HuR bindet *GILZ* mRNA. U937 Zellen wurden lysiert, gefolgt von einer IP mit IgG- oder HuR-Antikörpern. Die co-präzipitierten mRNAs wurden mittels Real-time RT-PCR quantifiziert und als x-fache Anreicherung aus den HuR-präzipitierten Proben gegenüber den IgG-präzipitierten Proben dargestellt. *CCNB1*: Cyclin B1, Positivkontrolle für HuR-bindende mRNAs; *GAPDH*: Negativkontrolle (n = 4, Duplikate). Als Kontrolle für das Funktionieren der IP wurden die immunopräzipitierten Proben mittels Western Blot aufgetrennt und auf das Vorhandensein von HuR untersucht. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 verglichen mit der Lösemittelkontrolle oder wie anders angegeben.

Um die Auswirkungen einer verstärkten HuR-Expression zu bestimmen, wurde HuR in HEK293 T Zellen überexprimiert und GILZ mRNA- sowie Protein-Spiegel untersucht. Während *GILZ* mRNA nach HuR-Überexpression nicht vermehrt vorlag, konnte ein deutlicher Anstieg an GILZ Protein detektiert werden (Abb. 20 A-C). Diese Beobachtung bestätigte die Vermutung, dass Curcumin die *GILZ* mRNA-Translation über eine HuR-Induktion verstärkt. In einem weiteren Experiment wurden HEK293 T-Zellen mit einem Luciferase-Reporter-Gen-Vektor mit nachgeschalteter *GILZ*-3'UTR und einem HuR-Überexpressions-Vektor transfiziert und anschließend sowohl die *Luciferase* mRNA, als auch die Luciferase-Aktivität als Maß für die Menge an *GILZ* mRNA und GILZ Protein betrachtet (Abb. 20 D). Der Versuch bestätigte, dass tatsächlich eine funktionelle Interaktion von HuR mit der *GILZ*-3'UTR stattfindet, da nur dieser Bereich der *GILZ* mRNA in den Vektor kloniert wurde. Außerdem ist aus den vorliegenden Daten ersichtlich, dass eine Interaktion von HuR mit der *GILZ*-3'UTR zu einer erhöhten Luciferase-Aktivität, jedoch nicht zu erhöhten mRNA-Spiegeln führte, was eine Translations-induzierende Wirkung von HuR an der *GILZ* mRNA bestätigt.

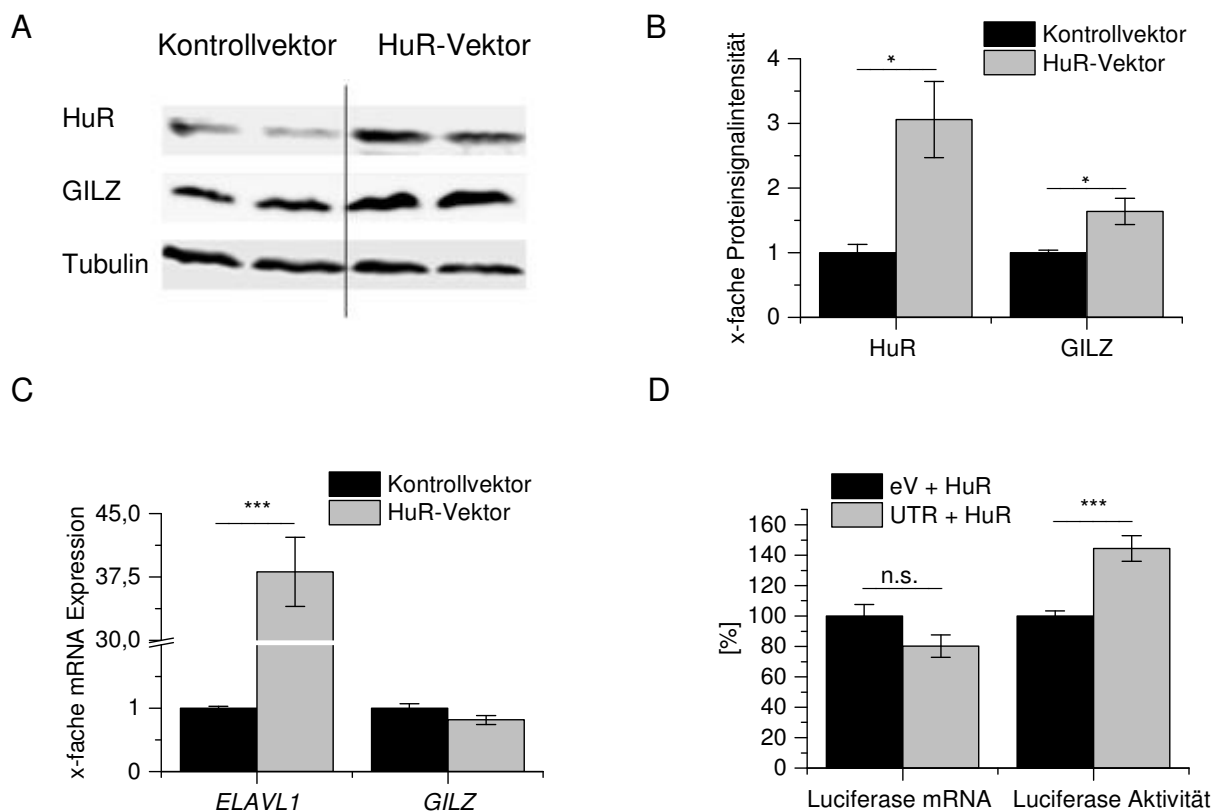


Abb. 20: HuR erhöht die Translation von *GILZ*.

(A, B) HEK293 T Zellen wurden entweder mit einem Kontrollvektor oder mit einem HuR-Überexpressionsvektor transfiziert, gefolgt von einer Western Blot Analyse. (A) Es wird ein repräsentatives Experiment aus drei gezeigt. (B) Die Signalintensitäten wurden auf die Ladekontrolle Tubulin normalisiert und als x-faches der Kontrollvektor-transfizierten Zellen ausgedrückt \pm SEM ($n = 3$, Duplikate). (C) Es wurden die *ELAVL1* (HuR) und *GILZ* mRNA-Spiegel in Kontrollvektor- oder HuR-Vektor transfizierten HEK293 T Zellen mittels Real-time RT-PCR bestimmt. Die Werte wurden auf *ACTB* normalisiert und als x-faches der Kontrollvektor transfizierten Zellen präsentiert ($n = 3$, Triplikate). (D) HEK293 T Zellen wurden mit einem Firefly-Luciferase-Vektor mit (UTR) oder ohne (empty Vektor, eV) nachgeschalteter *GILZ*-3'UTR, einem HuR-Überexpressionsvektor (HuR) und einem Renilla-Luciferase-Vektor transfiziert. Im Anschluss wurden entweder die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivitäten in einem Luciferase-Reportergen-Assay bestimmt oder die *Firefly*- und *Renilla-Luciferase* mRNA mittels Real-time RT-PCR gemessen. Die Firefly-Luciferase-Werte wurden auf die Renilla-Luciferase-Werte normalisiert und die Werte der mit eV transfizierten Zellen wurden als 100% gesetzt (für mRNA-Bestimmung: $n = 3$, Triplikate; Für Reportergen-Assay: $n = 4$, Septuplikate). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ verglichen mit der Lösemittelkontrolle oder wie anders angegeben.

Diskussion

Anti-inflammatorische Aktivität von Curcumin und GILZ

Die Regulationsmechanismen, die den verschiedenen anti-inflammatorischen Eigenschaften von Curcumin zugrunde liegen, reichen von der Regulation von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen bis zu Proteinkinasen (Aggarwal et al., 2006; Singh and Aggarwal, 1995; Soetikno et al., 2011; Zhou et al., 2011). Als zentraler Mechanismus gilt vor allem die Inhibierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B. Curcumin kann die TNF-induzierte Translokation von p65 in den Zellkern und dessen Phosphorylierung hemmen, die wichtig ist für dessen transkriptionelle Aktivität (Aggarwal, Ichikawa et al., 2006). Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt wäre, dass Curcumin die TNF-abhängige Phosphorylierung und Degradierung von I κ B α hemmt (Singh & Aggarwal, 1995, Soetikno, Sari et al., 2011). Dies geschieht durch eine Curcumin-abhängige Inhibierung der TNF-induzierten I κ B Kinase (IKK)-Aktivität (Aggarwal et al., 2006). Ein weiterer Mechanismus könnte den Daten dieser Arbeit zufolge die durch Curcumin induzierte GILZ-Expression sein, da auch GILZ mit der p65 Untereinheit von NF- κ B interagieren und dessen Translokation in den Kern hemmen kann (Ayroldi et al., 2001; Berrebi et al., 2003; Cannarile et al., 2006; Di Marco et al., 2007; Marco et al., 2007b; Riccardi et al., 2000). Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Curcumin GILZ induziert. GILZ agiert anti-inflammatorisch über eine direkte Bindung an NF- κ B, wodurch die Translokation in den Nukleus verhindert wird (Ayroldi et al., 2001). Unsere Daten lassen darauf schließen, dass die NF- κ B Hemmung durch Curcumin in Makrophagen stark mit einer GILZ-Induktion zusammenhängt. Eine Behandlung mit Curcumin in RAW264.7 Zellen konnte die NF-

κ B-Aktivität in einem Reporter-gen-Assay erniedrigen. Diesem Effekt konnte durch ein *GILZ-knockout* wieder entgegengewirkt werden (Ayroldi et al., 2002; Hoppstädter et al., 2016). Außerdem ist bekannt, dass GILZ in die Signalkaskaden der MAPKs eingreift, zum Beispiel durch Bindung an Ras/Raf, was zu einer Hemmung der *downstream* liegenden MAPKs, wie ERK, führt (Ayroldi et al., 2007, Ayroldi, Zollo et al., 2002, Hoppstädter et al., 2015).

Auch für Curcumin konnte kürzlich gezeigt werden, dass es nicht nur die NF- κ B-Aktivität beeinflusst, sondern auch in weitere inflammatorische Signalwege, wie zum Beispiel den durch LPS-induzierten *extracellular-signal regulated kinases* (ERK)-Signalweg, eingreift (Zhou et al., 2015).

Experimente in *bone-marrow derived macrophages* (BMMs) aus Wildtyp- und *GILZ-knockout*-Mäusen aus der eigenen Arbeitsgruppe bestätigen, dass Curcumin in der Lage ist, die ERK-Aktivität zu hemmen, und dass GILZ hierfür eine wesentliche Rolle spielt. Zusätzlich vermindert Curcumin die NO- und TNF-Produktion, was ebenfalls mit einer GILZ-Induktion in Zusammenhang steht (Hoppstädter et al., 2016).

Die Rolle von GILZ in Makrophagen

Bezüglich der Rolle von GILZ in Makrophagen konnten Hoppstädter et al. bereits zeigen, dass durch verringerte GILZ-Spiegel die pro-inflammatorische Antwort von Makrophagen auf entzündliche Stimuli amplifiziert wird. Die hohen GILZ-Spiegel in menschlichen Lungen-Makrophagen sowie *in vivo* in Mäuselungen waren nach TLR-Aktivierung deutlich vermindert (Hoppstädter et al., 2012, Hoppstädter et al., 2015). Auch ein siRNA-vermittelter *GILZ-knockdown* in humanen Makrophagen und ein *GILZ-knockout* in BMMs erhöhte die Ansprechbarkeit auf LPS (Hoppstädter et al., 2012, Hoppstädter et al., 2015).

Eine Induktion von GILZ in MΦs kann neben einer Behandlung mit Curcumin auch durch eine Behandlung mit Glukokortikoiden oder anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 erreicht werden (Berrebi et al., 2003). Hamdi et al. berichten, dass ein siRNA-vermittelter *GILZ-knockdown* die antiinflammatorische Eigenschaft von GCs abschwächt. Insbesondere wurde eine verminderte Hemmung von GCs auf die Produktion von Zytokinen und Chemokinen gezeigt (Hamdi et al., 2007), woraus man schlussfolgern kann, dass GILZ essentiell für die Wirkung von GCs ist.

Passend zu diesen Erkenntnissen führte eine GILZ-Überexpression in der Makrophagen-Zelllinie THP-1 zu Glukokortikoid-ähnlichen Effekten nach LPS-Behandlung (Berrebi et al., 2003). Des Weiteren zeigten Makrophagen, die aus dem LPS-resistenten Mausstamm SPRET/Ei gewonnen wurden, einen sehr hohen GILZ-Gehalt und demnach auch nach LPS-Behandlung vergleichsweise niedrige Spiegel an IL-6 und IL-12. Nach *GILZ-knockdown* mittels siRNA stiegen die Interleukin-Spiegel nach LPS-Behandlung wieder an, was bedeutet, dass GILZ eine inflammatorische Antwort in Makrophagen unterbinden kann (Pinheiro et al., 2013).

Eine spezifische GILZ-Induktion hätte den Vorteil, dass man einige Nebenwirkungen einer GC-Behandlung umgehen könnte, da GILZ und GCs gegenteilige Effekte auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) hat. Während Glukokortikoide vor allem zur Adipozytendifferenzierung beitragen und die Osteoblastendifferenzierung unterdrücken, führt eine GILZ-Überexpression zur Induktion der Osteoblastengenerierung (Abdelmohsen et al., 2008; Sengupta et al., 2003; Shi et al., 2003; Wang et al., 2000; Zhang et al., 2008).

HuR als positiver Regulator von GILZ

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das mRNA-bindende Protein HuR, welches durch Curcumin induzierbar ist, einen bisher noch nicht beschriebenen Regulator von GILZ darstellt.

Die Effekte von HuR umfassen verschiedene Wirkungsweisen, wie zum Beispiel die Funktion als Promotor der mRNA-Stabilität (Abdelmohsen et al., 2008, Sengupta, Jang et al., 2003, Wang et al., 2000) oder die Induktion der Translation durch Konkurrenz um entsprechende Bindestellen mit anderen RBPs (Yu et al., 2013) oder miRNAs (Bhattacharyya et al., 2006; Kuwano et al., 2008; Levy, 1998).

Im Gegensatz zu vielen anderen RBPs, die ihre mRNA-Targets destabilisieren, wirken die stabilisierenden Hu-Proteine vorrangig an U-reichen Bereichen. In der Literatur findet man zahlreiche Belege für die Erhöhung der mRNA-Stabilität von diversen mRNAs, wozu *vascular endothelial growth factor A (VEGFA)*, *DUSP1* und die Cycline *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNE* und *CCND1* zählen (Kuwano, Kim et al., 2008, Levy, 1998, Wang et al., 2000). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig charakterisiert. Außerdem könnte HuR mit destabilisierenden RBPs, die dazu führen, dass die Target-mRNA über unterschiedliche Mechanismen abgebaut wird, z.B. über Exosomen oder *processing (P-) bodies*, konkurrieren und dadurch seine Target-mRNA stabilisieren (Abdelmohsen and Gorospe, 2010).

Es gibt allerdings auch Hinweise in der Literatur für eine Translations-unterdrückende Funktion von HuR, was vermutlich über die Interaktion mit *internal ribosome entry sites (IRESs)* geschieht, die in der 5'UTR der Target-mRNAs lokalisiert sind (Kullmann et al., 2002; Leandersson et al., 2006).

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Daten lassen darauf schließen, dass HuR nicht die Stabilität der *GILZ* mRNA beeinflusst. Außerdem bleibt noch unklar,

inwieweit es neben GILZ weitere HuR-Targets gibt, über die ebenfalls die anti-inflammatorischen Effekte von Curcumin vermittelt werden.

Therapeutische Rolle von Curcumin als GILZ-Induktor

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass Curcumin GILZ in Makrophagen durch eine Regulation auf Translationsebene induziert (Hoppstädter et al., 2016). Da die GILZ-Induktion einer von mehreren Wegen ist, wie Curcumin seine anti-inflammatorischen Eigenschaften zeigt, wäre eine Behandlung mit Curcumin ein interessanter Ansatz zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, bei denen eine Minderung des Ausmaßes der inflammatorischen Antwort, insbesondere in Makrophagen (Hoppstädter et al., 2016), nutzen könnte. Dagegen spricht zum jetzigen Zeitpunkt immer noch die geringe Bioverfügbarkeit und schlechte Löslichkeit des Naturstoffs. Aus diesem Grund sind neue Strategien zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit Gegenstand der aktuellen Forschung, z.B. die Nutzung von einer Kombination aus Curcumin mit nicht-curcuminoiden Komponenten aus der Kurkuma (Antony et al., 2008), der Einsatz von Hilfsstoffen, die den metabolischen Abbau blockieren können (Shoba et al., 1998) oder die Verwendung moderner Formulierungen wie Nanopartikel (Sasaki et al., 2011), Liposomen (Gota et al., 2010) oder Phospholipidkomplexen (Cuomo et al., 2011). Als Beispiel hierfür sei noch eine aktuelle Studie von Krausz et al. genannt, die Curcumin in ein Silan-Hydrogel-nanopartikuläres Vehikel einbrachten, und somit eine neue Formulierung für den Einsatz als anti-mikrobielles Agens zur besseren Wundheilung präsentieren (Krausz et al., 2015). Alternativ könnte Curcumin auch als Vorlage für Curcumin-ähnliche Derivate mit GILZ-induzierenden Effekten und verbesserter Bioverfügbarkeit dienen. Für die Zukunft stellt dies ein interessantes Feld für weiterführende Studien zur Verbesserung der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen dar.

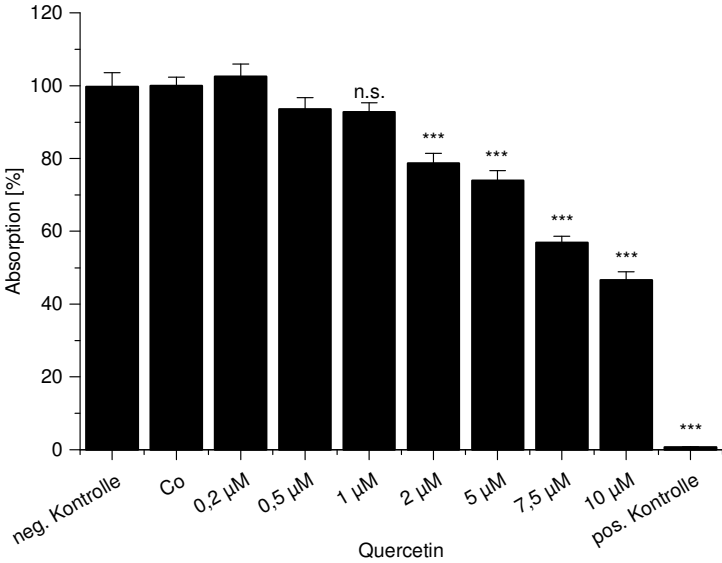
Anmerkung: Alle Daten und Schlussfolgerungen aus Kapitel 3 stammen aus beziehungsweise beziehen sich auf die Veröffentlichung „Induction of Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) contributes to anti-inflammatory effects of the natural product curcumin in macrophages“ (Hoppstädter et al., 2016).

Anhang zu Kapitel 3

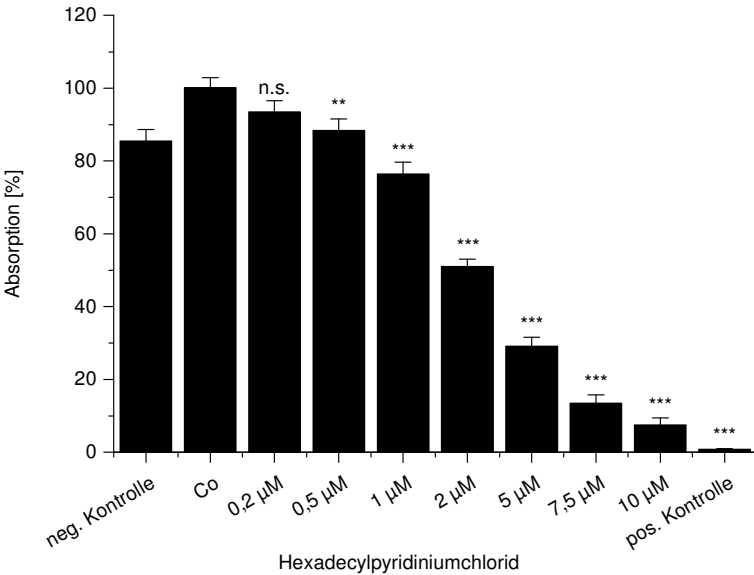
Inhibierung von HuR und dessen Effekt auf die GILZ-3'UTR

Mit den Experimenten sollte überprüft werden, ob HuR mit der GILZ-3'UTR interagiert und sich dieser Einfluss durch den Einsatz der in der Literatur beschriebenen HuR-Inhibitoren Quercetin, Hexadecylpyridiniumchlorid und Mitoxantron aufheben lässt (Zucal et al., 2015). Dazu wurden zunächst MTT-Assays mit den HuR-Inhibitoren durchgeführt, um eine für HEK293T Zellen untoxische Konzentration zu bestimmen (Abb. 21). Für Quercetin wurde anhand der Daten eine nicht-toxische Konzentration von 1 μM und für Hexadecylpyridiniumchlorid von 0,2 μM gefunden. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen aus der Literatur, wo Quercetin auch bei 10 μM noch keinen toxischen Effekt nach 24 h zeigt. Geringere Konzentrationen wurden im MTT-Assay hier nicht getestet (Soohyoung et al., 2009). Für Mitoxantron wurde ebenfalls eine Konzentration von 0,2 μM für weitere Experimente ausgewählt. Diese zeigte zwar einen toxischen Effekt nach 24 h, aber nur im Vergleich zur Nullkontrolle mit DMSO und nicht im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Behandlung.

A



B



C

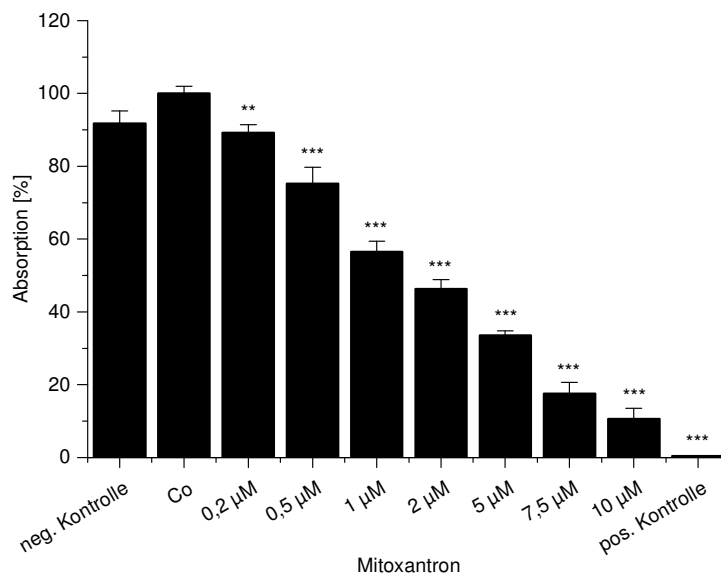


Abb. 21: MTT Assays mit HuR-Inhibitoren.

HEK293T Zellen wurden mit den Inhibitoren Quercetin (A), Hexadecylpyridiniumchlorid (B) und Mitoxantron (C) in den angegebenen Konzentrationen für 24 h behandelt. In der Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Medium behandelt, in der Lösemittelkontrolle (Co) mit der maximal verwendeten Lösemittelkonzentration (für A: 0,6% EtOH; für B: 0,36% H₂O; für C: 0,25% DMSO) und in der Positivkontrolle mit 20% EtOH. Die Daten zeigen die Mittelwerte + SEM. Der Mittelwert der Lösemittelkontrolle Co wurde als 100% gesetzt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils in Sextuplikaten) mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whitney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten. Der Mittelwert der Lösemittelkontrolle Co wurde als 100% gesetzt.

Als weiteres Experiment schloss sich ein Dual-Luciferase-Assay an, bei dem HEK293T Zellen mit Renilla-Luciferase, Firefly-Luciferase und einem HuR-Überexpressionsvektor (HuR), respektive dem entsprechenden Leervektor (LV), transfiziert wurden. Im Anschluss an die Transfektion erfolgte eine Behandlung mit verschiedenen HuR-Inhibitoren in den HuR-überexpressierenden Zellen. Zunächst ließ sich tatsächlich in allen Experimenten ohne Behandlung mit Inhibitoren (Co) nach der üblichen Datenauswertung, bei der man die Firefly-Daten auf die Renilla-Daten normalisiert, ein signifikanter Anstieg der Lumineszenz beobachten (LV + Co

im Vergleich zu HuR + Co). Dies ließe auf einen posttranskriptionalen Effekt von HuR schließen. Unerwartet war jedoch das Ergebnis der Proben mit Inhibitor. Hier zeigte sich bei Einsatz des Inhibitors bei allen Substanzen eine ebenfalls signifikante Erhöhung der Lumineszenz (LV + Co im Vergleich zu HuR + Inhibitor). Der inhibitorische Effekt der Substanzen Quercetin, Hexadecylpyridiniumchlorid und Mitoxantron konnte demnach nicht bestätigt werden. Nach genauerer Analyse der vorliegenden Daten fiel auf, dass die signifikant erhöhte Lumineszenz nach Inhibitorbehandlung tatsächlich überwiegend durch einen noch nicht näher definierten hemmenden Einfluss von HuR auf die Renilla Expression, die zur Normalisierung verwendet wurde, zustande kam. Interessant ist jedoch, dass Real-time RT-PCR-Experimente von HEK293T-Proben, ebenfalls transfiziert mit Renilla-Vektor, Firefly-Vektor inklusive der GILZ-3'UTR und dem HuR-Expressionsvektor respektive dem entsprechenden Leervektor, keinen solchen „systemischen“ Fehler aufwiesen. Die gemessenen *Renilla* mRNA-Werte blieben in demselben Maße konstant wie die *ACTB* mRNA-Werte (Abb. 22). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Einfluss von HuR auf Renilla vor allem translationshemmend ist. Der Aktivitätsunterschied der beiden Promotoren *thymidine kinase* (TK) - Promotor im Renilla-Vektor und *cytomegalo virus* (CMV) - Promotor im Firefly-Vektor (Damdindorj et al., 2014) sollte für diesen Einfluss eher keine Rolle spielen, da der Effekt alleine in den Renilla-Daten sichtbar war. Da Renilla-Luciferase als Kontrollreportergen von den experimentellen Bedingungen unbeeinflusst bleiben sollte (Sherf et al., 1996), kann sie in diesem Fall nicht als Kontrolle verwendet werden.

Die Firefly-Lumineszenz zeigte bei Auswertung ohne Bezug auf Renilla nur bei zwei Experimenten (Abb. 23 E und Abb. 25 B) eine signifikante Erhöhung durch eine HuR-Überexpression im Vergleich zum LV.

Zusammengefasst ergab sich durchaus ein Effekt von HuR durch dessen Interaktion mit der GILZ-3'UTR (Abb. 26), jedoch keine Hemmung durch den Einsatz der HuR-Inhibitoren. Eine Ausnahme bildet nur Mitoxantron, dessen Effekt aber sehr wahrscheinlich über eine noch zu hohe Konzentration und demnach zu starke Zelltoxizität über den gewählten Behandlungszeitraum (24 h und 44 h) zustande kam (Abb. 25). Diese würde auch erklären, warum vor allem nach dem langen Behandlungszeitraum von 44 h der toxische Einfluss von Mitoxantron deutlich wird. Außerdem zeigt sich der vermeintlich hemmende Effekt auch in den Zellen ohne HuR-Überexpression.

Diese Experimente sind demnach kein Beleg für einen Translations-steigernden oder mRNA-stabilisierenden Effekt von HuR durch Interaktion mit der GILZ-3'UTR.

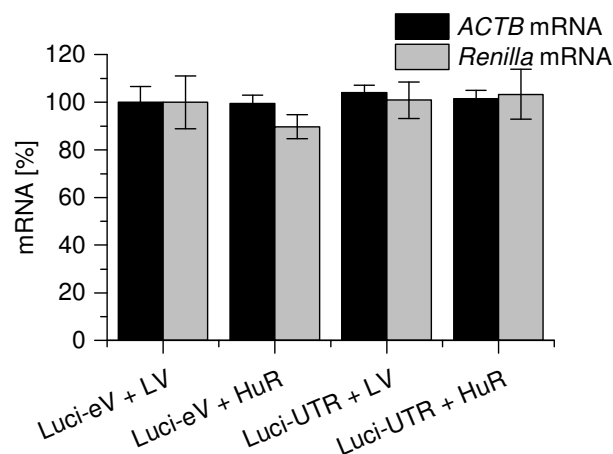


Abb. 22: Untersuchung auf gleichbleibende mRNA-Expression von *ACTB* und *Renilla* in transfizierten HEK293T Zellen.

HEK293T Zellen wurden mit Renilla-Vektor, Firefly-Vektor \pm GILZ-3'UTR (Luci-eV beziehungsweise Luci-UTR) und entweder HuR-Expressionsvektor (HuR) oder dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die *ACTB* und *Renilla* mRNA Spiegel mittels Realtime RT-PCR bestimmt. Luci-eV + LV wurde jeweils als 100% gesetzt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus drei Experimenten in Triplikaten \pm SEM mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ verglichen mit „LV + Co“, berechnet mit Mann Whitney Test. Alle Mittelwerte zeigen keinen signifikanten Unterschied zueinander.

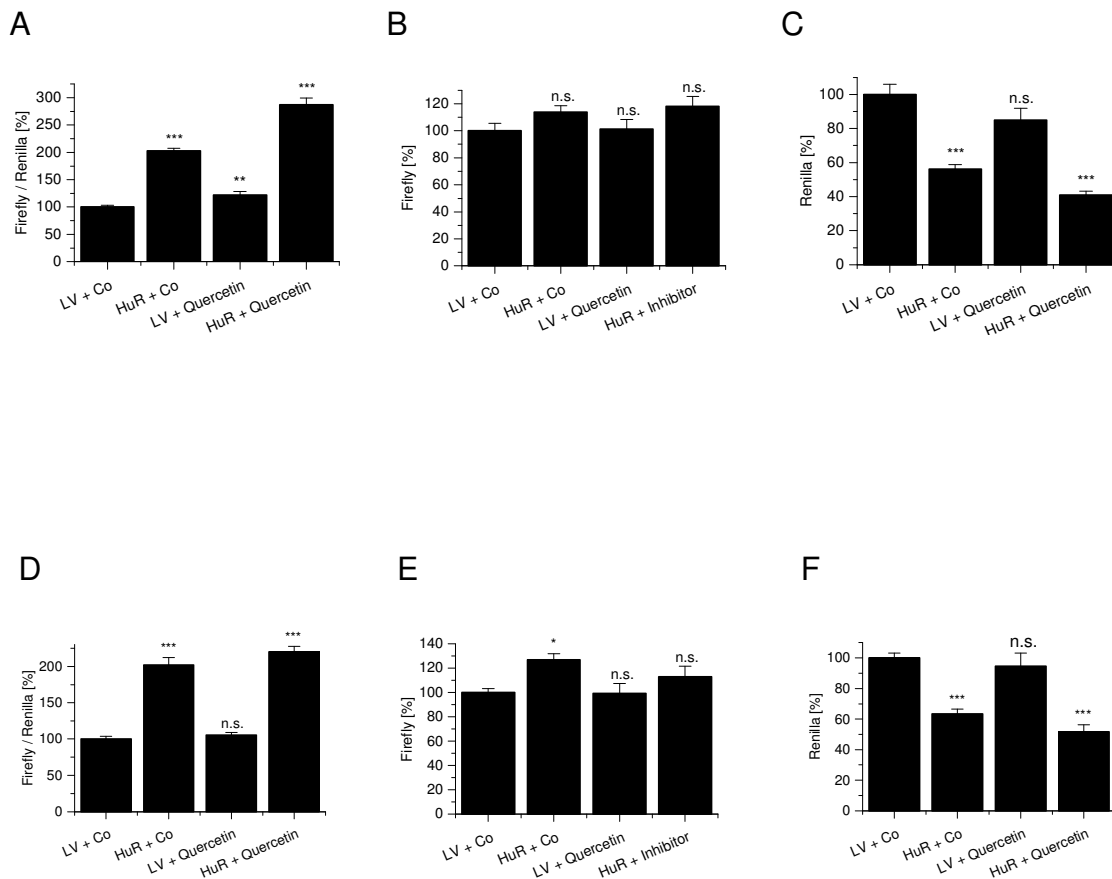


Abb. 23: Effekt von HuR ± Inhibitor Quercetin.

HEK293T Zellen wurden mit Renilla-Vektor, Firefly-Vektor inklusive der GILZ-3'UTR und entweder HuR-Expressionsvektor (HuR) oder dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert. Die Zellen wurden entweder 4 h (A, B, C) oder 24 h (D, E, F) nach der Transfektion mit Quercetin (1 μ M in Ethanol; „Quercetin“) oder mit der Lösemittelkontrolle (0,6% Ethanol in Medium; „Co“) behandelt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz der Firefly- und Renilla-Luciferase gemessen. Die Firefly-Daten wurden auf die Renilla-Daten normalisiert (A, D) oder jeweils für sich dargestellt (B, C, E, F). LV + Co wurde als 100% gesetzt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der angegebenen Lumineszenzen aus einem Experiment in Octuplikaten + SEM mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ verglichen mit „LV + Co“, berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whitney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten.

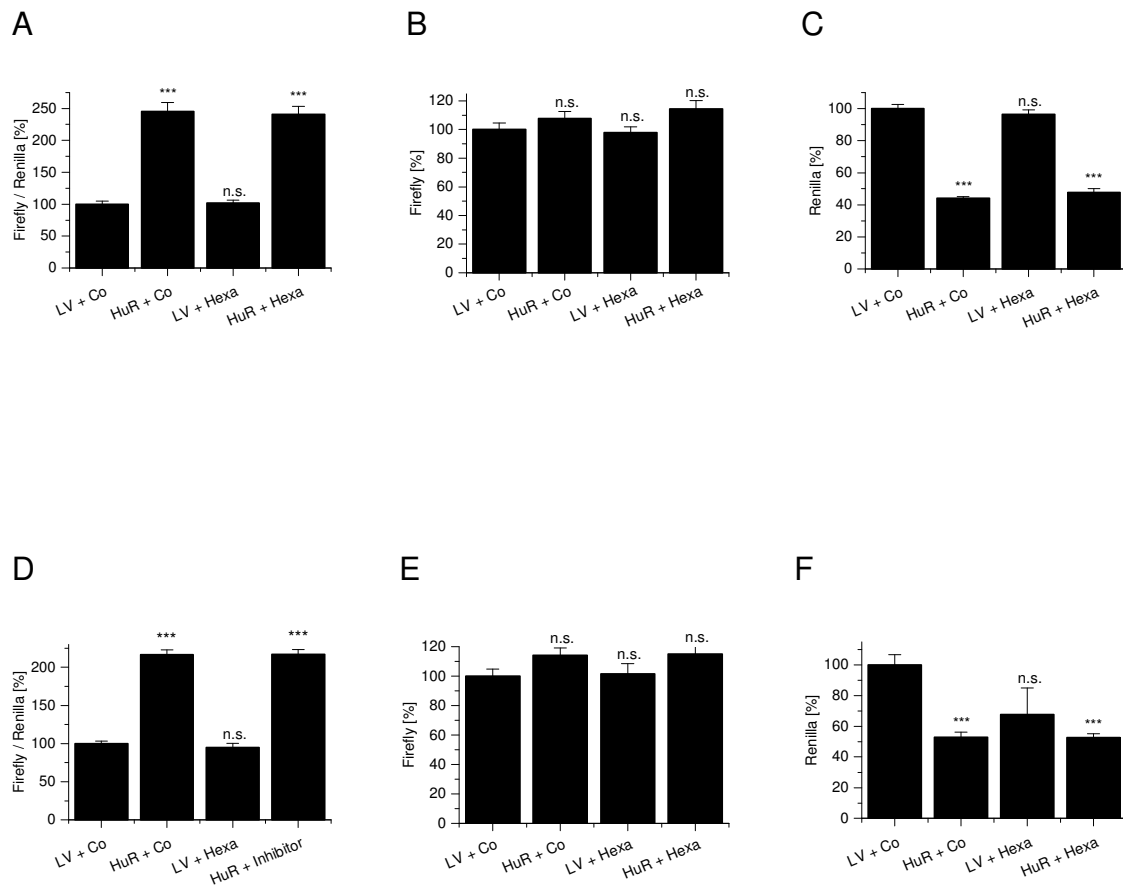


Abb. 24: Effekt von HuR \pm Inhibitor Hexadecylpyridiniumchlorid.

HEK293T Zellen wurden mit Renilla-Vektor, Firefly-Vektor inklusive der GILZ-3'UTR und entweder HuR-Expressionsvektor (HuR) oder dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert. Die Zellen wurden entweder 4 h (A, B, C) oder 24 h (D, E, F) nach der Transfektion mit Hexadecylpyridiniumchlorid (0,2 μ M in Wasser; „Hexa“) oder mit der Lösemittelkontrolle (0,36% Wasser in Medium; „Co“) behandelt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz der Firefly- und Renilla-Luciferase gemessen. Die Firefly-Daten wurden auf die Renilla-Daten normalisiert (A, D) oder jeweils für sich dargestellt (B, C, E, F). LV + Co wurde als 100% gesetzt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der angegebenen Lumineszenzen aus einem Experiment in Octuplikaten + SEM mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ verglichen mit „LV + Co“, berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whitney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten.

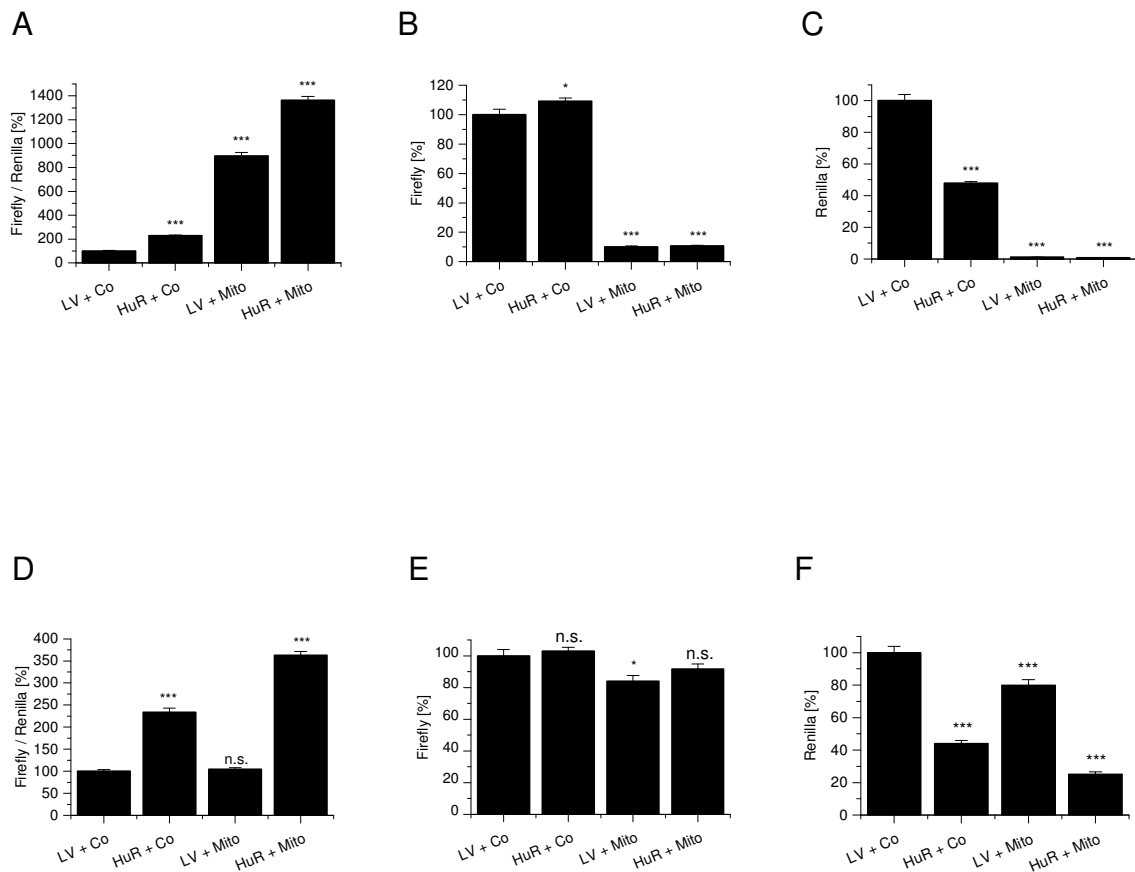


Abb. 25: Effekt von HuR ± Inhibitor Mitoxantron.

HEK293T Zellen wurden mit Renilla-Vektor, Firefly-Vektor inklusive der GILZ-3'UTR und entweder HuR-Expressionsvektor (HuR) oder dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert. Die Zellen wurden entweder 4 h (A, B, C) oder 24 h (D, E, F) nach der Transfektion mit Mitoxantron (0,2 μ M in DMSO; „Mito“) oder mit der Lösemittelkontrolle (0,25% DMSO in Medium; „Co“) behandelt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz der Firefly- und Renilla-Luciferase gemessen. Die Firefly-Daten wurden auf die Renilla-Daten normalisiert (A, D) oder jeweils für sich dargestellt (B, C, E, F). LV + Co wurde als 100% gesetzt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der angegebenen Lumineszenzen aus einem Experiment in Octuplikaten + SEM mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ verglichen mit „LV + Co“, berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whitney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten.

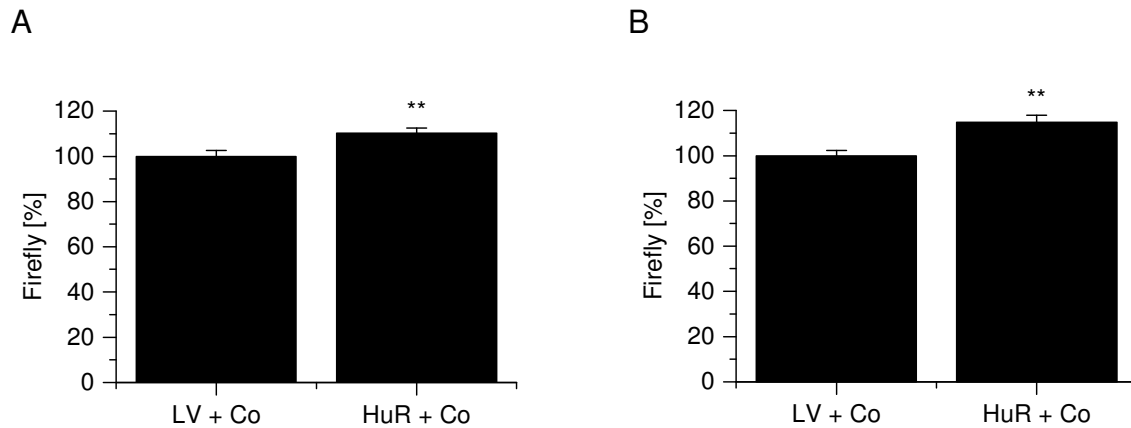


Abb. 26: Effekt von HuR auf GILZ-3'UTR.

HEK293T Zellen wurden mit Renilla-Vektor, Firefly-Vektor inklusive der GILZ-3'UTR und entweder HuR-Expressionsvektor (HuR) oder dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert. Die Zellen wurden entweder 4 h (A) oder 24 h (B) nach der Transfektion mit den Lösemittelkontrollen Co behandelt (Co je nach Datenset = 0,6% Ethanol in Medium oder 0,36% H₂O in Medium oder 0,25% DMSO in Medium). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz der Firefly-Luciferase gemessen. LV + Co wurde als 100% gesetzt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der angegebenen Lumineszenzen aus drei Experiment in Octuplikaten + SEM mit ** $p < 0,01$, berechnet mit Mann Whitney Test.

Kapitel 4

Regulation des *Glucocorticoid-induced leucine zipper* über
miRNAs in Makrophagen

Einleitung

TLR-Signalling

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, werden die unterschiedlichen TLRs über verschiedene Stimuli aktiviert (Abb. 27). Pam₃CSK₄ (Pam) ist ein synthetischer Ligand für TLR1 und TLR2, die im Allgemeinen triacetylierte Lipoproteine erkennen (Akira and Takeda, 2004; De Nardo, 2015; Hacker and Karin, 2006; O'Neill and Bowie, 2007). Nach Stimulation dieser Rezeptoren wird ein Signalweg angestoßen, der über die Adapter-Moleküle MyD88 und Mal verläuft. Sobald diese mit dem TLR2/1- oder TLR2/6-Komplex assoziieren, werden die Proteinkinasen der *IL1 receptor associated kinase family* (IRAK) rekrutiert, die dann wiederum den *tumor necrosis factor receptor associated factor* (TRAF) 6 binden. TRAF6 aktiviert im Anschluss den IKK Komplex, der dann IκB phosphoryliert. Dadurch unterliegt IκB einem proteasomalen Abbau und NF-κB kann in den Kern translozieren (Akira & Takeda, 2004, Hacker & Karin, 2006, O'Neill & Bowie, 2007, Opitz et al., 2010).

TLR3 hingegen erkennt doppelsträngige (ds)RNA sowie die synthetische *Polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly(I:C); PIC) (Alexopoulou et al., 2001; Blasius and Beutler, 2010). Im Gegensatz zu allen anderen TLRs aktiviert TLR3 ausschließlich einen MyD88-unabhängigen Signalweg, der über das Adapterprotein TRIF verläuft.

TLR4 zeigt die Besonderheit, dass nach Aktivierung mit LPS sowohl der MyD88/Mal-abhängige, als auch der TRIF-abhängige Signalweg in Kombination mit dem Molekül TRAM aktiviert wird.

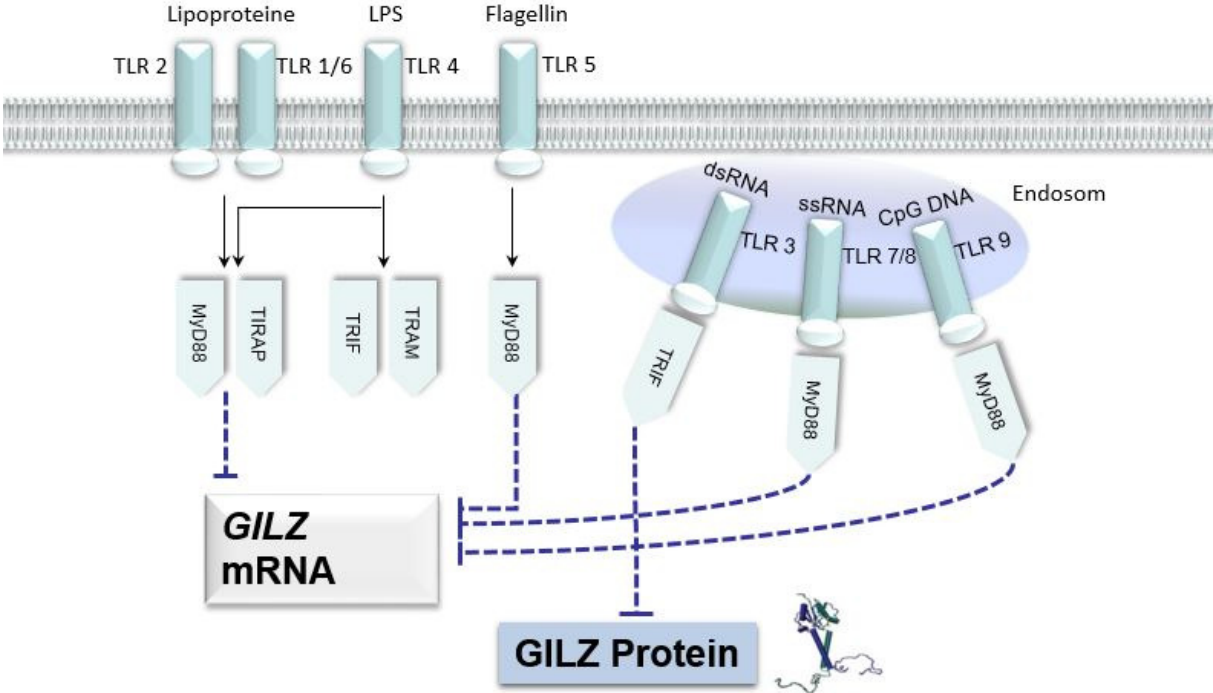


Abb. 27: TLR-Aktivierung, deren Signalwege und Einfluss auf GILZ. Erläuterungen zur Abbildung befinden sich im Text beziehungsweise in der Einleitung ab Seite 6. Die Abbildung wurde erstellt von Dr. Jessica Hopstädter und Dr. Lisa Eifler.

GILZ-Regulation durch TLR-Aktivierung

In noch nicht publizierten experimentellen Vorarbeiten zur MyD88- und TRIF-abhängigen Regulation der GILZ-Expression von Dr. Jessica Hoppstädter wurde die inflammatorische Aktivierbarkeit von Alveolarmakrophagen (AMs) überprüft. Dazu wurden die AMs mit Pam₃CSK₄ oder PIC stimuliert und anschließend die Zytokinspiegel gemessen (Abb. 28). Wie erwartet zeigten die AMs in den meisten Fällen einen Anstieg der Zytokinexpression nach inflammatorischer Stimulation, wobei allein nach MyD88-abhängiger Aktivierung Interleukin (IL)-1 α , IL-10, IL-12p40, IL-8 und IL-1 β induziert wurden. Allein über den TRIF-abhängigen Signalweg wurde *Interferon gamma-inducible protein 10* (IP10; auch bekannt als *C-X-C motif chemokine 10*, *CXCL10*) vermehrt exprimiert. G-CSF, IL-6 und TNF- α wurden über die Aktivierung beider Signalwege induziert.

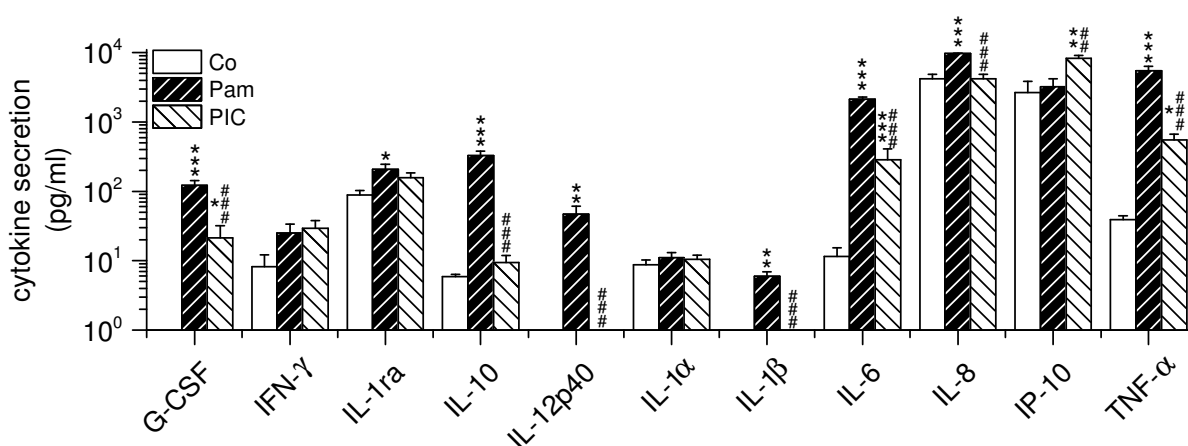
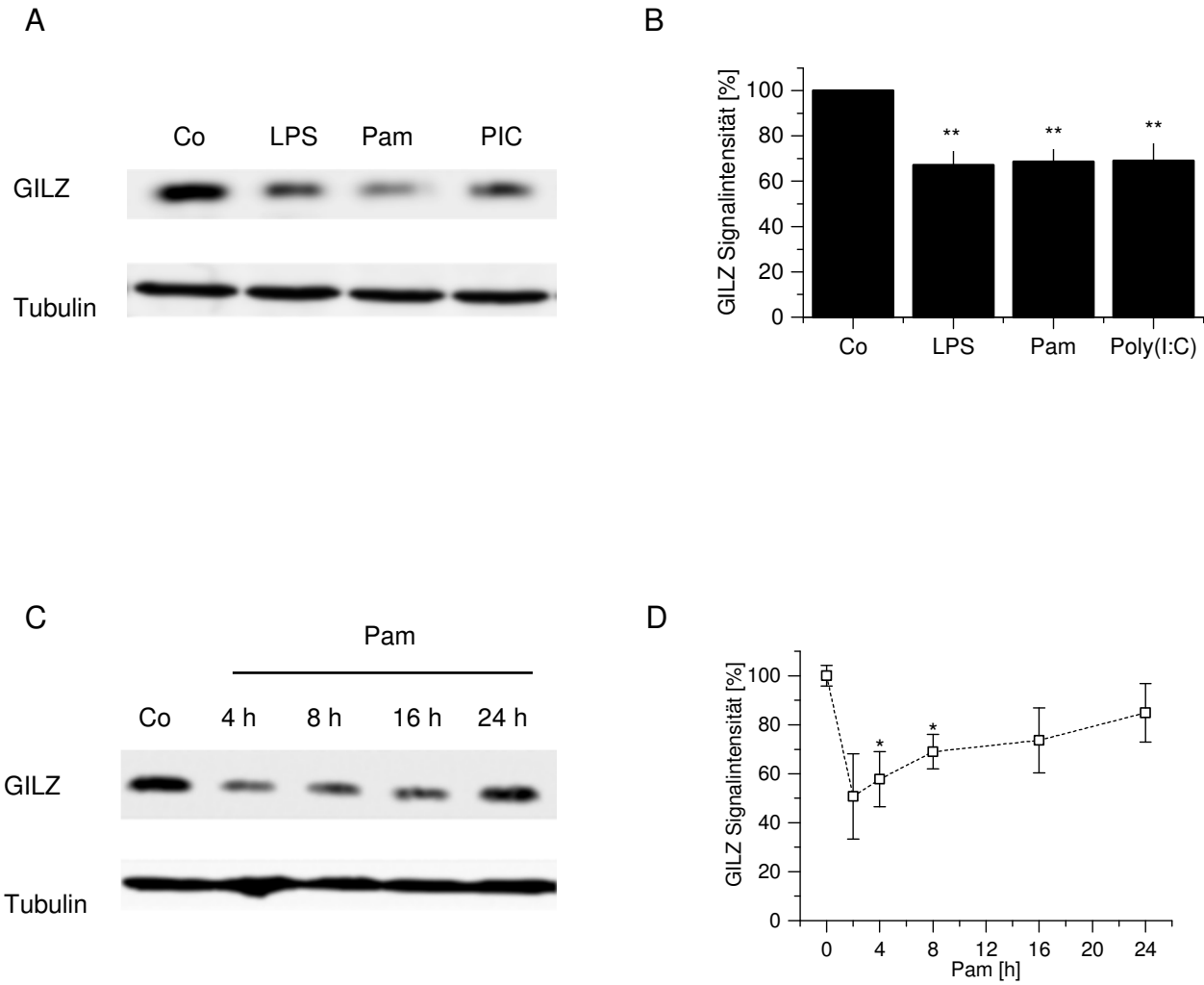


Abb. 28: Zytokinsekretion nach TLR1/2- (MyD88-abhängig, Pam₃CSK₄) oder TLR3- (MyD88-unabhängig, PIC) Aktivierung.

AMs blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit Pam₃CSK₄ (100 ng/ml) oder PIC (10 μ g/ml) für 6 h behandelt. Die Überstände wurden zur Messung der Zytokinproduktion mit Hilfe des *Luminex bead assay* genutzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte + SEM aus unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten mit Zellen von vier verschiedenen Spendern durchgeführt wurden. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 verglichen mit Co; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 verglichen mit Pam₃CSK₄-behandelten AMs. Das Experiment wurde durchgeführt von Dr. Jessica Hoppstädter (unveröffentlichte Daten). Normalverteilt: ANOVA mit Bonferroni's post hoc Test; nicht normalverteilt: Mann Whitney Test mit Bonferroni Korrektur.

Hoppstädter et al. konnten zeigen, dass in AMs sowohl eine Induktion des MyD88-abhängigen Signalweges über LPS und Pam₃CSK₄, als auch eine Induktion des MyD88-unabhängigen Signalweges durch Stimulation mit LPS und PIC zu einer Herunterregulation des anti-inflammatorischen Proteins GILZ führt (Abb. 29).



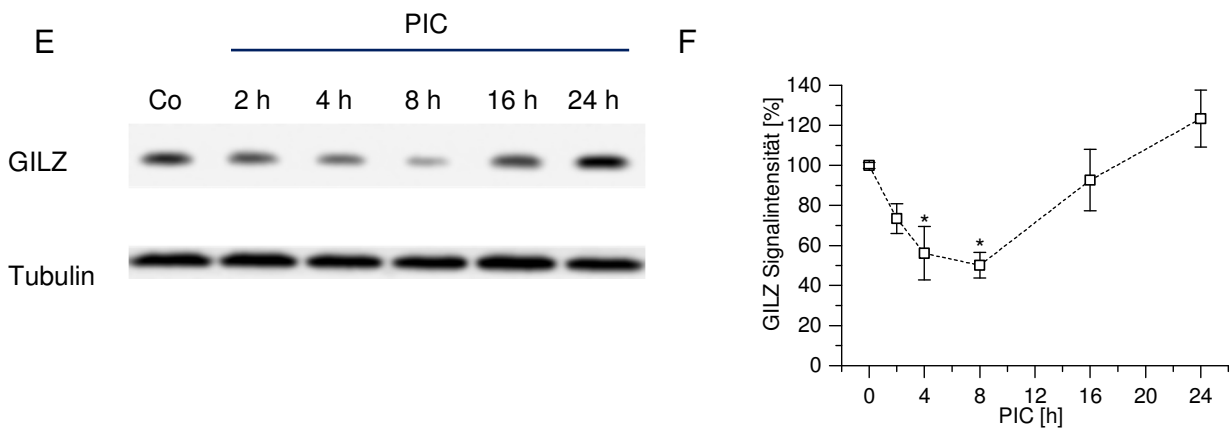


Abb. 29: GILZ Protein-Spiegel nach LPS-, Pam₃CSK₄- und PIC-Behandlung.

(A und B) AMs von 9 Spendern blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit LPS (1 µg/ml), Pam₃CSK₄ (1 µg/ml) oder PIC (10 µg/ml) für 4 h behandelt. Die Proteinspiegel wurden mittels Western Blot quantifiziert. (A) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus neun. (B) Die Signalintensitäten wurden quantifiziert und auf Tubulin normalisiert. Co wurde als 100% gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM. ** p < 0,01 im Vergleich zu Co, berechnet mit *One sample t-Test*. (C und D) AMs aus drei Spendern blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit Pam₃CSK₄ (1 µg/ml) für 4 h, 8 h, 16 h oder 24 h behandelt. (C) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei. (D) Die Signalintensitäten wurden quantifiziert und auf Tubulin normalisiert. Co wurde als 100% gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM. * p < 0,05; berechnet mit Bonferroni Test. (E und F) AMs aus drei Spendern blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit Poly(I:C) (PIC; 10 µg/ml) für 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h behandelt. (E) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei. (F) Die Signalintensitäten wurden quantifiziert und auf Tubulin normalisiert. Co wurde als 100% gesetzt. Die Daten werden dargestellt als Mittelwerte ± SEM. * p < 0,05; berechnet mit Bonferroni Test. Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Jessica Hoppstädter.

Nach Stimulation mit LPS und Pam₃CSK₄ waren auch die *GILZ* mRNA-Spiegel herabreguliert. Allerdings konnte eine PIC-Behandlung keine erniedrigten *GILZ* mRNA-Spiegel herbeiführen, weder nach 2 h (Abb. 30) noch zu späteren Zeitpunkten (Hoppstädter et al., 2012).

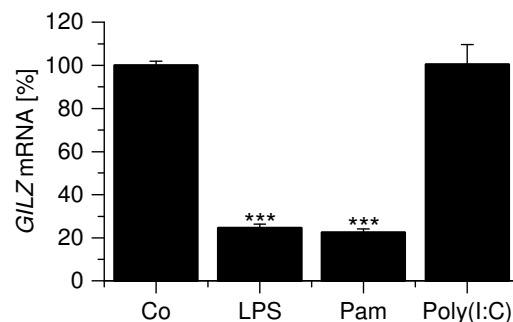


Abb. 30: *GILZ* mRNA-Spiegel nach Behandlung mit LPS, Pam₃CSK₄ oder PIC. AMs aus vier Spendern (Duplikate) blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit LPS (1 µg/ml), Pam₃CSK₄ (1 µg/ml) oder PIC (10 µg/ml) für 2 h behandelt. Anschließend wurden *GILZ* mRNA Spiegel mittels Real-time RT-PCR bestimmt und auf *ACTB* normalisiert. Der Mittelwert der Co-Werte wurde als 100% gesetzt. Die Daten werden gezeigt als Mittelwerte + SEM (n = 4, Duplikate). *** p < 0.001 im Vergleich zu Co; berechnet mit Bonferroni Test. Das Experiment wurde durchgeführt von Dr. Jessica Hoppstädter (unveröffentlichte Daten).

Auch ZFP36 wurde nach PIC-Behandlung nicht induziert (Hoppstädter et al., 2012). Daraus kann man schlussfolgern, dass die *GILZ*-Regulation über den TRIF-abhängigen Signalweg, anders als nach einer Stimulation mit Pam₃CSK₄, nicht über ZFP36 verläuft. Die PIC-induzierte *GILZ* Protein-Herabregulation verläuft also über andere Mechanismen. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die Aktivierung des TLR3 durch PIC möglicherweise zur Induktion von bestimmten miRNAs führt, die einen regulatorischen Einfluss auf die *GILZ* mRNA haben.

Eine fast komplementäre Bindung einer miRNA an eine mRNA hat einen durch RISC induzierten Abbau der mRNA zur Folge. Dieses Szenario konnte ausgeschlossen werden, da die *GILZ* mRNA-Spiegel nach PIC-Behandlung unverändert blieben. Verringerte Proteinspiegel bei gleichzeitig unveränderten Mengen an mRNA können durch eine nur teilweise komplementäre Bindung einer miRNA an eine Ziel-mRNA hervorgerufen werden (Abb. 31). Daher sollte in diesem Kapitel die Hypothese einer miRNA-abhängigen *GILZ*-Regulation überprüft werden.

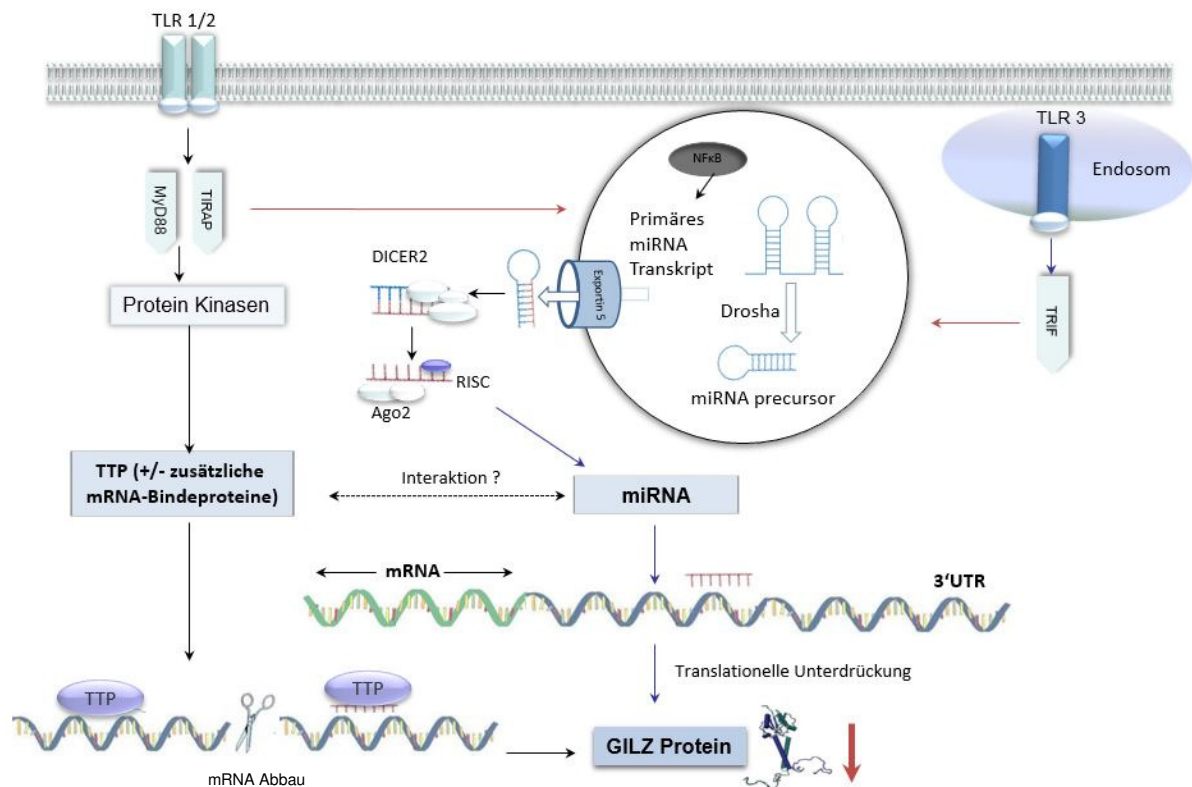


Abb. 31: Hypothese zur unterschiedlichen Regulation von *GILZ* mRNA und *GILZ* Protein nach Anstoß des MyD88-abhängigen oder TRIF-abhängigen Signalweges.

Erläuterungen zur Abbildung befinden sich im Text beziehungsweise in der Einleitung ab Seite 6. Die Abbildung wurde erstellt von Dr. Jessica Hoppstädter und Dr. Lisa Eifler.

miRNAs und Entzündung

miRNAs sind endogene, einzelsträngige, etwa 20 Nukleotide lange, nicht kodierende RNA-Sequenzen, die die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene regulieren (Vrijens et al., 2015). Für verschiedene miRNAs ist beschrieben, dass sie in entzündlichen Prozessen eine Rolle spielen (Marques-Rocha et al., 2015). So ist zum Beispiel miR-149 in osteoarthritischen Chondrozyten herabreguliert und geht mit einer erhöhten Expression von TNF α , IL-1 β und IL-6 einher (Santini et al., 2014). Für miR-19 konnte gezeigt werden, dass sie in murinen sowie humanen Typ 2 T-Helferzellen die inflammatorische Zytokinproduktion bei Asthma stimuliert (Simpson et al., 2014). Ein weiteres Beispiel ist miR-155, die an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist (Boldin and Baltimore, 2012; Chapman and Pekow, 2015; Ge et al., 2014; Huang et al., 2014; Kumar et al., 2014; Ma et al., 2013; Singh et al., 2013). Unter den miRNAs, die im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen untersucht wurden und werden, gehören miR-146, miR-155 und miR-223 zu den am intensivsten beforschten miRNAs. Diese miRNAs spielen eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Antwort und werden NF- κ B-abhängig induziert (Boldin & Baltimore, 2012, Huang, Liu et al., 2014, Kumar, Palermo et al., 2014). Die Liste an miRNAs, die in NF- κ B-Signalwegen oder anderen entzündungsrelevanten Prozessen involviert sind, ist lang und Gegenstand der aktuellen Forschung (Chapman & Pekow, 2015, Ge, Brichard et al., 2014, Marques-Rocha et al., 2015, Singh, Massachi et al., 2013).

Ergebnisse

Inflammatorische Aktivierung in anderen Makrophagen-Populationen

Nachdem durch Vorarbeiten von Dr. Jessica Hoppstädter (siehe Daten in Einleitung zu Kapitel 4) gezeigt werden konnte, dass AMs sowohl nach Stimulation des TLR1/2 und TLR4, als auch nach Stimulation des TLR3 inflammatorisch aktiviert werden, *GILZ* mRNA im Gegensatz zu *GILZ* Protein jedoch nach TLR3-Aktivierung nicht herabreguliert wird, sollte untersucht werden, ob auch andere Makrophagen-Typen ähnlich reagieren. Dazu wurden sowohl *in vitro* differenzierte humane Makrophagen (MΦs), als auch Zellen der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinien U937 und THP-1 in undifferenziertem und differenziertem Status mit LPS, Pam₃CSK₄ und PIC behandelt und deren *TNF*, *GILZ*, *IP10* und *IL-10* mRNA-Spiegel untersucht.

MΦs zeigten nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ und LPS eine deutliche inflammatorische Aktivierung gemessen anhand der *TNF* mRNA-Induktion, die sehr viel stärker ausfiel als nach PIC-Behandlung. *CXCL10* mRNA wurde zwar auch durch LPS tendenziell induziert, jedoch waren die Effekte nicht signifikant. *GILZ* mRNA wurde in diesem Zelltyp nach LPS und Pam₃CSK₄ Behandlung signifikant herunterreguliert. Seine Expression blieb durch eine PIC-Behandlung unverändert. Das antientzündlich wirkende Zytokin IL-10 war nach Zugabe von LPS stark und nach Zugabe von höheren Konzentrationen von Pam₃CSK₄ leicht hochreguliert. PIC zeigte auch hier keinen Effekt (Abb. 32).

Man kann also zusammenfassen, dass MΦs im Vergleich zu AMs deutlich schlechter durch PIC aktivierbar waren (siehe Abb. 28). Wie in AMs beobachtet, kam es zu keiner Herabregulation von *GILZ* mRNA.

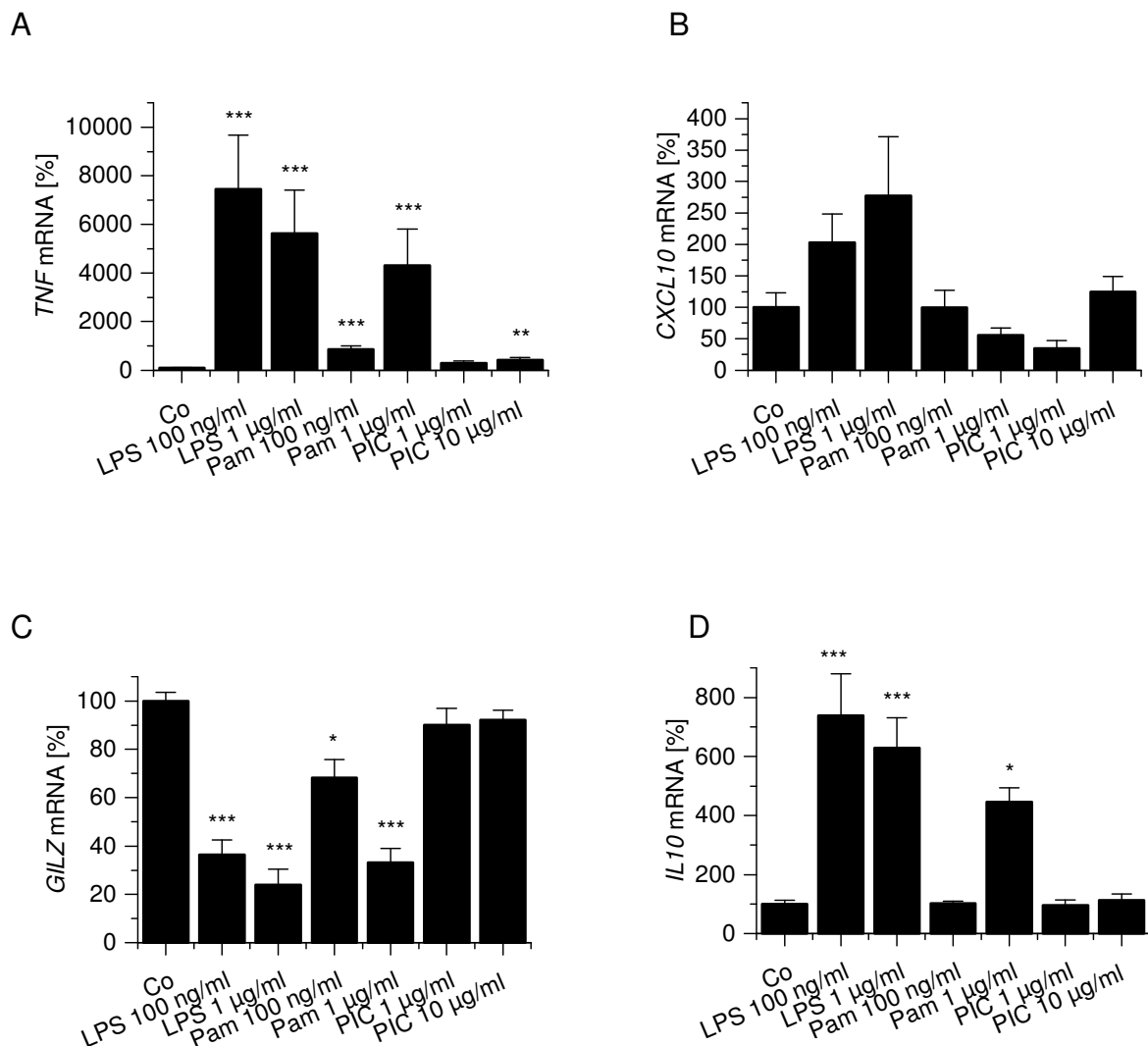


Abb. 32: Inflammatorische Stimulation von *in vitro* differenzierten Makrophagen (MΦs).

Mit M-CSF differenzierte MΦs aus zwei Spendern blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit LPS (100 ng/ml oder 1 µg/ml), Pam₃CSK₄ (Pam; 100 ng/ml oder 1 µg/ml) oder PIC (1 µg/ml oder 10 µg/ml) für 2 h behandelt. Anschließend wurden die *TNF*-, *CXCL10*-, *GILZ*- und *IL10*-Spiegel mittels Real-time RT-PCR bestimmt und auf *ACTB* normalisiert. Der Mittelwert der Co-Werte wurde als 100% gesetzt. Die Daten werden gezeigt als Mittelwerte + SEM (n = 2, Triplikate). *** p < 0,001, ** p < 0,01 und * p < 0,05 im Vergleich zu Co; berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whithney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten.

Undifferenzierte, monozytäre U937 Zellen ließen sich im Vergleich zu MΦs schwerer inflammatorisch aktivieren. Nach Stimulation der Zellen konnte mit den drei Substanzen LPS, Pam₃CSK₄ und PIC keine signifikante Induktion von *TNF* mRNA erreicht werden. *GILZ* mRNA wurde unter keiner Behandlung herabreguliert und auch für *IL-10* mRNA-Spiegel waren keine Veränderungen messbar (Abb. 33). Die Daten zu *CXCL10* konnten nicht ausgewertet werden, da die Expression in U937 Suspensionszellen zu schwach und zu heterogen ausfiel. Undifferenzierte U937 Zellen waren daher nicht für weitere Untersuchungen zur MyD88- beziehungsweise TRIF-abhängigen Regulation von GILZ geeignet.

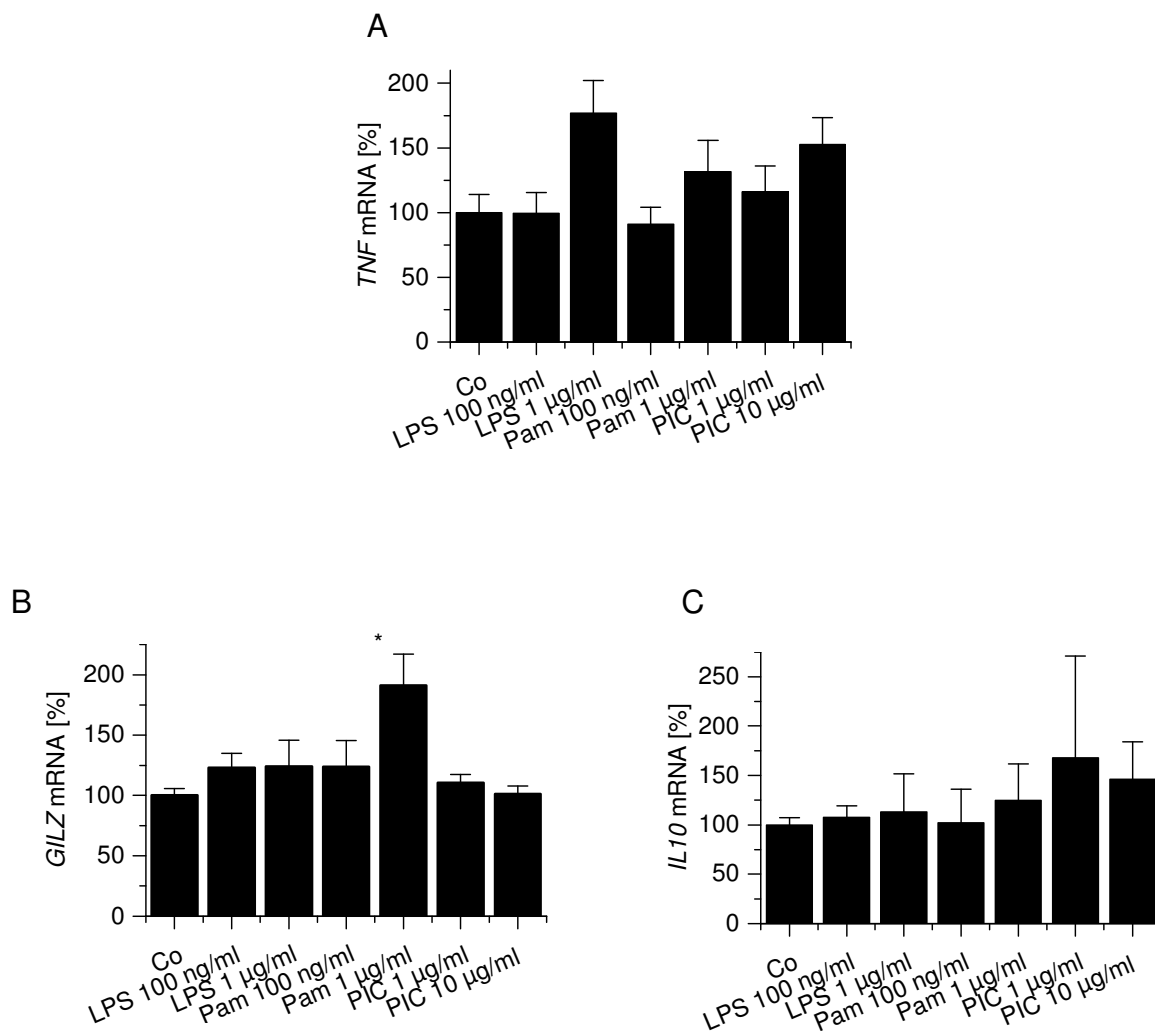


Abb. 33: Inflammatorische Stimulation von undifferenzierten U937 Zellen.

U937 Zellen blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit LPS (100 ng/ml oder 1 µg/ml), Pam₃CSK₄ (100 ng/ml oder 1 µg/ml) oder PIC (1 µg/ml oder 10 µg/ml) für 2 h behandelt. Anschließend wurden die *TNF*, *CXCL10*, *GILZ* und *IL-10* mRNA-Spiegel mittels Real-time RT-PCR bestimmt und auf *ACTB* normalisiert. Der Mittelwert der Co-Werte wurde als 100% gesetzt. Die Daten werden gezeigt als Mittelwerte + SEM (n = 2, Triplikate). * p < 0,05 im Vergleich zu Co; berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whithney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten.

Im nächsten Ansatz wurden U937 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ausdifferenziert, so dass die Zellen adhärent und makrophagenähnlicher wurden (Ralph et al., 1982). Nach Behandlung der Zellen mit LPS, Pam₃CSK₄ und PIC wurden wieder deren *TNF*, *GILZ*, *CXCL10* und *IL-10* mRNA-Spiegel untersucht. Die ausdifferenzierten Zellen zeigten allenfalls nach Behandlung mit LPS in hoher Konzentration eine geringe Induktion von *TNF* mRNA. *CXCL10* mRNA konnte auch hier nicht ausgewertet werden, da die Expression auch in den differenzierten U937 Zellen zu gering ausfiel. Die mRNA-Spiegel der beiden antientzündlichen Parameter *GILZ* und *IL-10* wurden nicht signifikant von der Behandlung beeinflusst (Abb. 34). Somit waren U937 auch nach Differenzierung nicht für Folgeuntersuchungen geeignet.

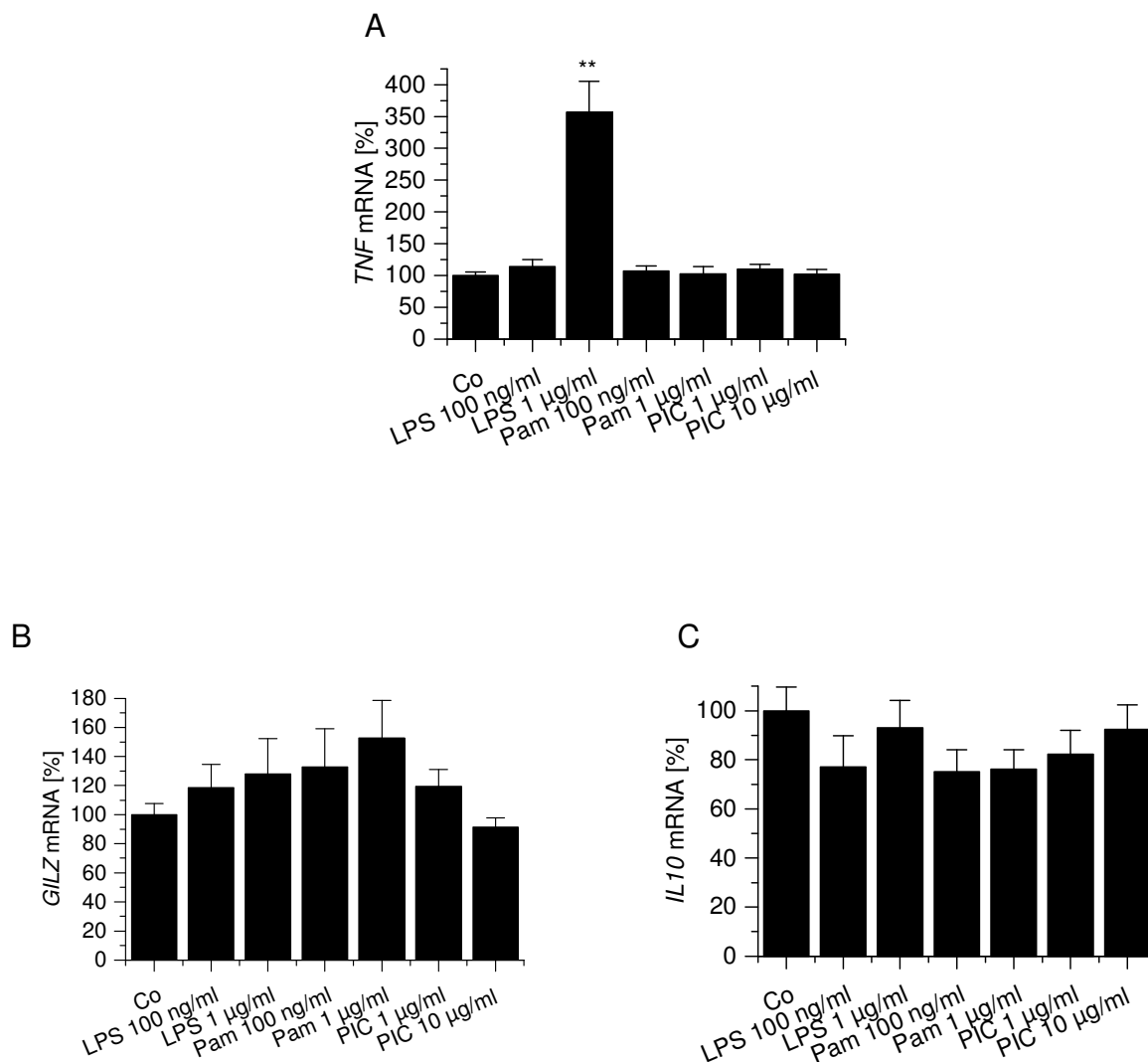


Abb. 34: Inflammatorische Stimulation von differenzierten U937 Zellen.

Differenzierte U937 Zellen blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit LPS (100 ng/ml oder 1 µg/ml), PAM₃CSK₄ (100 ng/ml oder 1 µg/ml) oder PIC (1 µg/ml oder 10 µg/ml) für 2 h behandelt. Anschließend wurden die *TNF*, *CXCL10*, *GILZ* und *IL-10* mRNA-Spiegel mittels Real-time RT-PCR bestimmt und auf *ACTB* normalisiert. Der Mittelwert der Co-Werte wurde als 100% gesetzt. Die Daten werden gezeigt als Mittelwerte + SEM (n = 2, Triplikate). *** p < 0,001, ** p < 0,01 und * p < 0,05 im Vergleich zu Co; berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whitney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten.

Als nächstes wurden undifferenzierte sowie mit PMA differenzierte THP-1 Zellen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass in beiden Fällen die Zellen sowohl auf Pam₃CSK₄, als auch auf LPS inflammatorisch reagierten, was über die *TNF* mRNA-Spiegel gemessen wurde. Die *GILZ* mRNA Spiegel zeigten jedoch nur geringe Schwankungen im Vergleich zur Nullkontrolle. Nach PIC-Behandlung war weder für *TNF*, noch für *GILZ* eine deutliche Änderung der mRNA-Spiegel messbar. Die Daten zu *CXCL10* konnten auch in dieser Zelllinie auf Grund der zu schwachen Expression nicht ausgewertet werden, ebenso wie die mRNA-Spiegel von *IL-10* (Abb. 35). Hierbei muss man jedoch sagen, dass das Experiment nur einmal durchgeführt wurde. Insgesamt waren THP-1 Zellen auch nicht als Modell geeignet, da sie keine inflammatorische Aktivierung nach PIC-Behandlung zeigten.

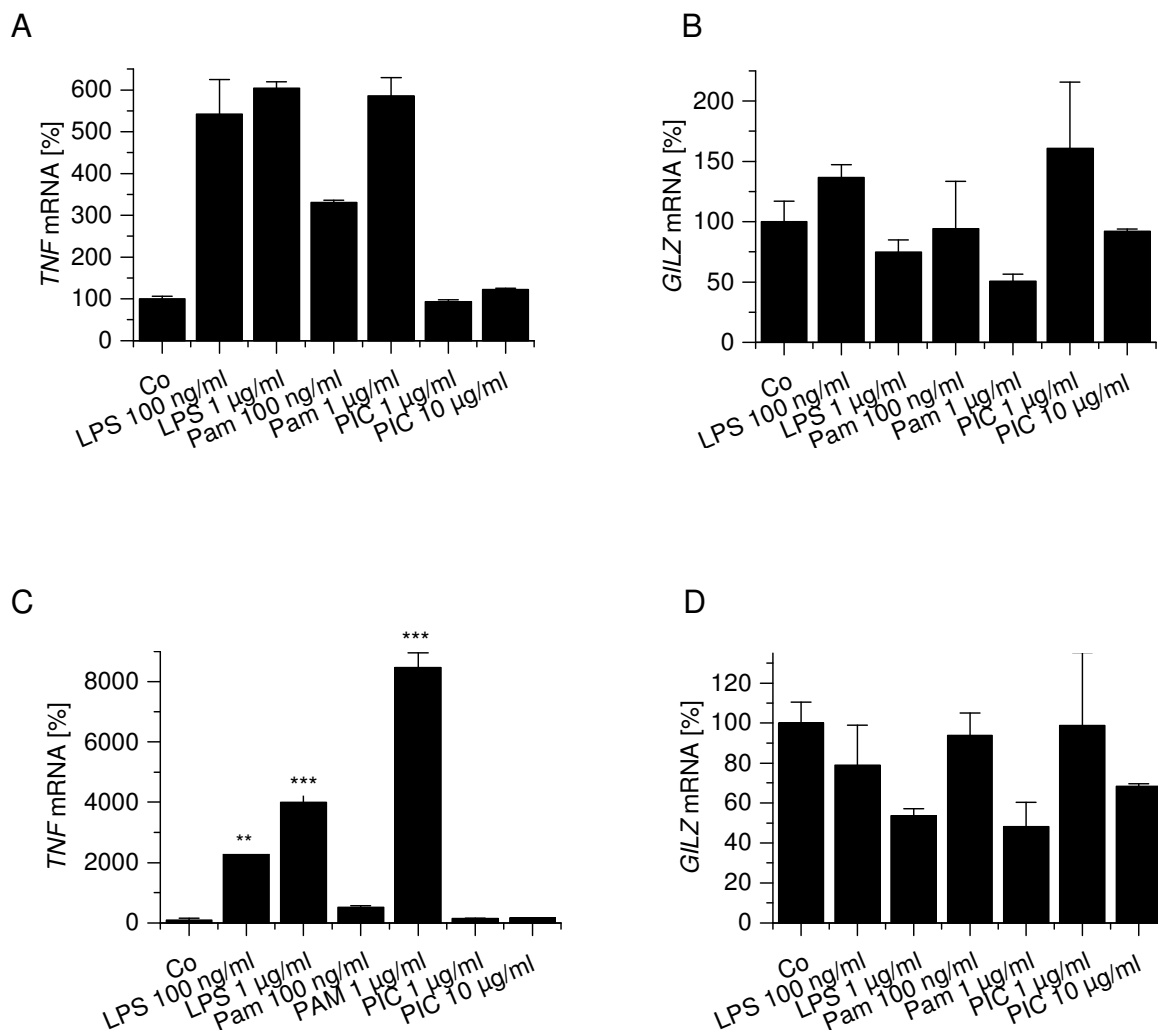


Abb. 35: Inflammatorische Stimulation von undifferenzierten und ausdifferenzierten THP-1 Zellen. Undifferenzierte (A, B) und differenzierte (C, D) THP-1 Zellen blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit LPS (100 ng/ml oder 1 µg/ml), Pam₃CSK₄ (100 ng/ml oder 1 µg/ml) oder PIC (1 µg/ml oder 10 µg/ml) für 2 h behandelt. Anschließend wurden die *TNF*- und *GILZ*-Spiegel mittels Real-time RT-PCR bestimmt und auf *ACTB* normalisiert. Der Mittelwert der Co-Werte wurde als 100% gesetzt. Die Daten werden gezeigt als Mittelwerte + SEM (n = 1, Triplikate). *** p < 0,001 und ** p < 0,01 im Vergleich zu Co; berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whitney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten.

Weiterhin interessant war die Tatsache, dass eine Stimulation mit Pam₃CSK₄ für 2 und 4 Stunden in undifferenzierten THP-1 Zellen zu einer deutlichen ZFP36-Induktion auf Protein Ebene führte. Im Vergleich dazu konnte in undifferenzierten U937 Zellen kein ZFP36, auch nicht nach inflammatorischer Aktivierung, detektiert werden (Abb. 36).

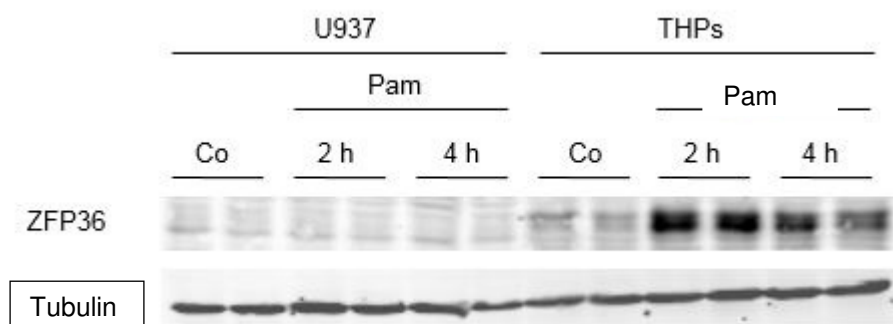


Abb. 36: Unterschied in der ZFP36-Induktion in U937 und THP-1 Zellen nach Stimulation mit Pam₃CSK₄.

THP-1 Zellen und U937 Zellen blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit PAM₃CSK₄ (1 µg/ml) für 2 h oder 4 h behandelt. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle getesteten Zellarten keine gute Alternative zu Alveolarmakrophagen darstellten. Aus diesem Grund wurden weitere Experimente, sofern möglich, in AMs durchgeführt.

Regulation von GILZ in AMs nach TLR3-Aktivierung

Um zu überprüfen, ob die GILZ-Herabregulation nach Aktivierung des TLR3 mit einer miRNA-Induktion in Verbindung gebracht werden kann, wurde getestet, inwieweit eine Hemmung der miRNA-Prozessierung durch den RISC *loading inhibitor aurintricarboxylic acid* (ATA) (Boonstra et al., 2006; Guilliams et al., 2013; Hiemstra et al., 2013; Martinez et al., 2006; Ouyang et al., 2007; Sato et al., 2003; Seif et al., 2016; Shibata et al., 2001; Sieweke and Allen, 2013; Tan et al., 2012; Teixeira-Coelho et al., 2014; Wang et al., 2005; Yamamoto et al., 2003a; Yamamoto et al., 2003b) die GILZ-Regulation beeinflussen kann. Für dieses Experiment wurden Alveolarmakrophagen mit PIC und / oder mit ATA behandelt und die Zellysate mittels Western Blot untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des RISC der PIC-induzierten GILZ-Herabregulation entgegen wirken kann (Abb. 37). Dieser Versuch weist darauf hin, dass der Mechanismus der GILZ-Regulation über miRNAs verläuft.

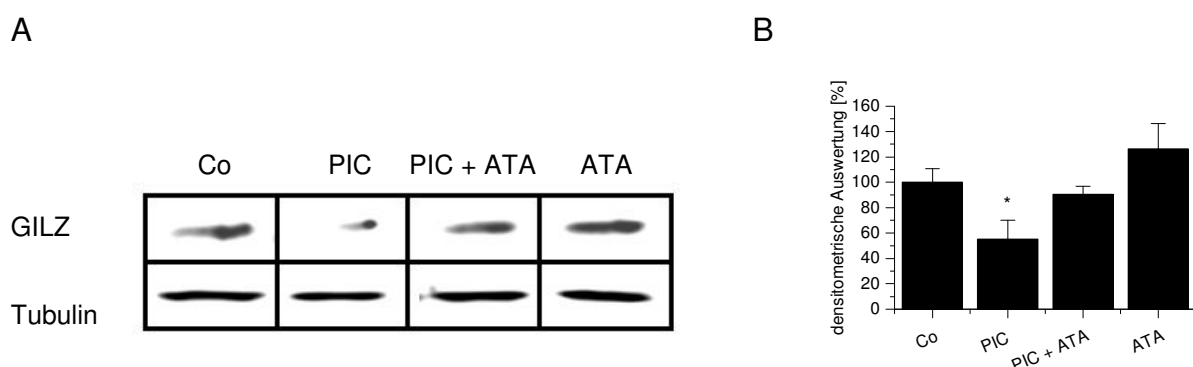


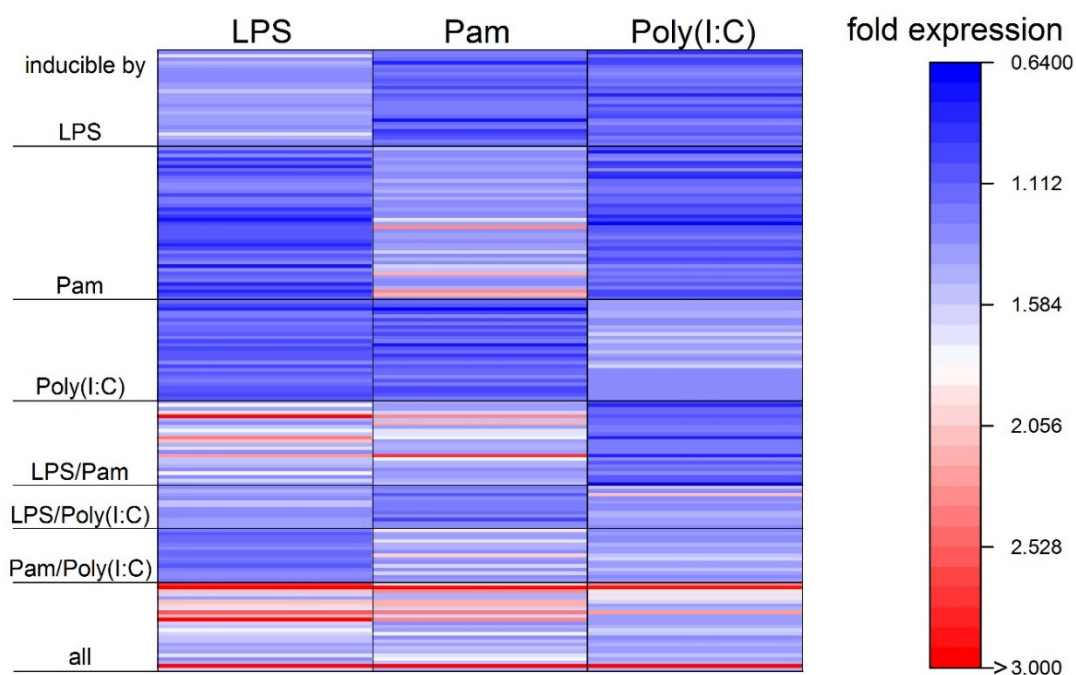
Abb. 37: Einfluss von ATA auf die Herabregulation von GILZ nach TLR3-Aktivierung.

AMs blieben unbehandelt (Co) oder wurden mit PIC (10 µg/ml) und / oder ATA (25 µM) für 8 h behandelt. (A) Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot aufgetrennt. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus drei. (B) Densitometrische Auswertung aus drei Experimenten. Die Mittelwerte der Co-Proben wurden als 100% gesetzt. Die Daten werden gezeigt als Mittelwerte + SEM. *p < 0.05 im Vergleich zu Co; berechnet mit One sample t-Test.

Untersuchung der Regulation von miRNAs in AMs nach inflammatorischer Stimulation

Im Folgenden wurden AMs mit Pam₃CSK₄, PIC oder LPS behandelt und die Änderung der miRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Proben in einem Microarray betrachtet. Untersucht wurden 1.205 verschiedene miRNAs. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden Heatmaps aller mehr als 1,3-fach induzierten und aller weniger als 0,7-fach exprimierten miRNAs nach inflammatorischer Stimulation erstellt. In den Heatmaps wurde nach Hoch- beziehungsweise Herabregulation der miRNAs unterschieden, die entweder nur bei einem bestimmten Stimulus, oder bei zwei oder allen drei Stimuli beobachtet wurden (Abb. 38). Auffällig dabei ist, dass es wesentlich mehr miRNAs gibt, die spezifisch von nur einem oder zwei Stimuli induziert oder herabreguliert werden, als solche, die unter allen Bedingungen ähnlich reguliert sind.

A



B

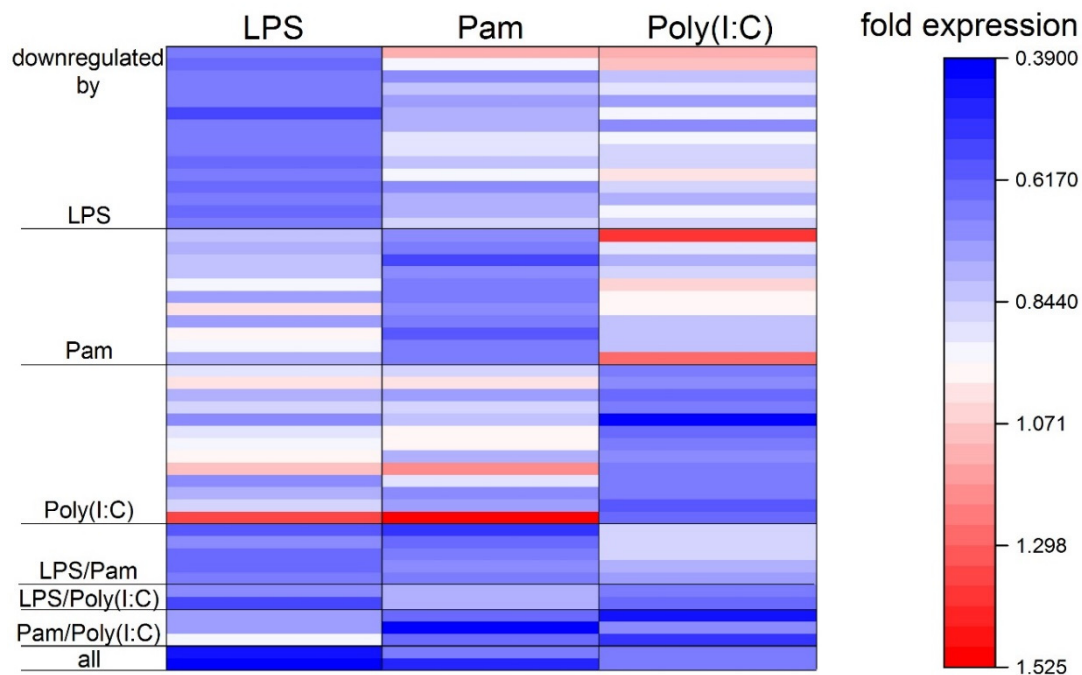


Abb. 38: Darstellung von im Microarray untersuchten miRNAs.

AMs von drei verschiedenen Spendern blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), Pam₃CSK₄ (1 $\mu\text{g/ml}$) oder PIC (1 $\mu\text{g/ml}$) für 2 h behandelt. Die mRNA und miRNAs wurden mit Hilfe des Qiagen miRNeasy Kits isoliert und anschließend in einem Microarray untersucht. Der Microarray wurde durchgeführt von Dr. Petra Leidinger (AG Meese). Die so erhaltenen Daten wurden in Heatmaps visualisiert. (A) zeigt die mehr als 1,3-fach induzierten miRNAs und (B) zeigt die weniger als 0,7-fach exprimierte miRNAs nach inflammatorischer Stimulation. Die Heatmaps wurden erstellt von Dr. Jessica Hoppstädter.

***In silico* Analyse von miRNAs**

Neben dem Microarray wurden auch verschiedene *in silico* Analysen durchgeführt, um miRNAs zu finden, die mit großer Wahrscheinlichkeit an die GILZ 3'-UTR binden und somit potentielle GILZ-Regulatoren nach einer TLR3-Aktivierung darstellen könnten. Für diese bioinformatischen Vorhersagen wurden die Internettools miRDip, miRWalk und miRTarBase genutzt. Des Weiteren wurde geprüft, welche miRNAs konstant bei Proben aus allen drei AM-Spendern eine Induktion nach einer PIC-Behandlung nach 2 h zeigen. Unter Einbeziehung dieser genannten Kriterien wurde eine Auswahl an miRNAs getroffen (miR-15b-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-24, miR-34b*, miR-136, miR-143, miR-222, miR-320d1 und miR-424), die möglichst viele Parameter erfüllen und die auf Grund dessen näher untersucht werden sollten.

Untersuchung der miRNAs auf eine Interaktion mit der GILZ-3'UTR

Die oben genannte Auswahl von elf miRNAs wurde im Folgenden in einem Luciferase-Reportergen-Assay untersucht. Für den Assay wurden zunächst die jeweiligen precursor-miRNAs in einen pSG5-Überexpressionsvektor kloniert. Danach wurden *human embryonic kidney* 293T (HEK 293T) Zellen mit drei verschiedenen Vektoren transfiziert. Die transfizierten Zellen enthielten einen der elf miRNA-Expressionsvektoren oder den pSG5-Leervektor, einen Firefly-Luciferase-Vektor mit oder ohne nachgeschalteter GILZ-3'UTR und einen Renilla-Luciferase-Vektor als Kontrollreporter.

Nach 24 h Inkubation wurden die transfizierten Zellen lysiert und die Lysate auf ihre Luciferase-Aktivität untersucht. Gemessen wurde jeweils die Renilla-, sowie die Firefly-Luciferase-Aktivität in Form von Lumineszenz. Die so erhaltenen Rohdaten eines Assays wurden wie folgt bearbeitet:

Die Rohwerte für Firefly-Luciferase wurden auf die Renilla-Signalintensitäten normiert, um Ungenauigkeiten bei der Aussaat oder Transfektion der Zellen auszugleichen. Die erhaltenen Quotienten für miRNA-cotransfizierte Zellen wurden als Prozent der für mit pSG5-Leervektor cotransfizierten Zellen ausgedrückt. Von diesen Prozentwerten „x“, getrennt nach Luciferasevektor mit und ohne GILZ-3'UTR, wurden die Mittelwerte für jede miRNA eines Assays berechnet und die Werte für Vektoren mit GILZ-3'UTR als prozentuale Darstellung der Werte für Vektoren ohne GILZ-3'UTR ausgedrückt.

$$x = \frac{\text{(Firefly-Wert / Renilla-Wert) von miRNA-cotransfizierten Zellen}}{\text{(Firefly-Wert / Renilla-Wert) von pSG5-cotransfizierten Zellen}}$$

$$\text{Expression [\%]} = \frac{x \text{ (Luci GILZ-3'UTR)}}{x \text{ (Luci e.V.)}}$$

Diese Formel entspricht der Auswertung, wie sie auch in Campos-Melo et al., 2014 durchgeführt wurde.

Die so erhaltenen Daten wurden in einem Punkte-Diagramm dargestellt (Abb. 39). Jeder Punkt steht für das Ergebnis aus einem Assay. Liegt der Mittelwert der Punkte (kleine schwarze Linie) für eine miRNA unter der 100%-Marke (rote Linie), so lässt sich vermuten, dass ein herabregulierender Effekt der miRNA auf die GILZ-3'UTR vorlag. miR-34b*, miR-222 und miR-320d1 zeigten sich somit als die interessantesten Kandidaten für weitere Untersuchungen. Statistisch signifikante Ergebnisse zeigten sich bei miR-222 und miR-15b, wobei bei miR-15b ein stabilisierender, beziehungsweise hochregulierender Effekt auf die GILZ-3'UTR zu beobachten war.

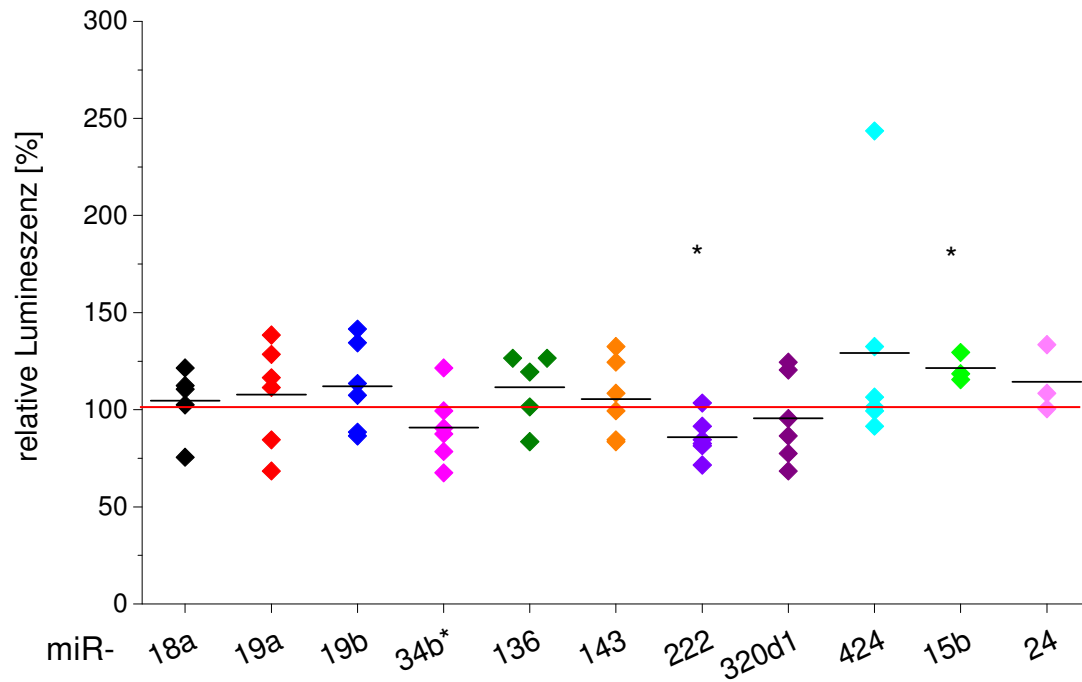


Abb. 39: Darstellung der relativen Lumineszenz als Ergebnis der Luciferase Assays mit Hilfe der angegebenen Formel.

Jede miRNA wurde in mindestens drei und maximal sechs unabhängigen Assays untersucht. In jedem Assay wurden die Transfektionen mit der jeweiligen miRNA (jeweils mit Firefly-Luciferase-Vektor \pm GILZ-3'UTR) in Sextuplikaten durchgeführt. Eine detaillierte Erklärung zur Abbildung befindet sich im Text. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des One Sample t-Test ermittelt mit * $p < 0,05$.

Vergleicht man nur die Mittelwerte der Quotienten aller pSG5-cotransfizierten Zellen mit Luciferasevektor ohne GILZ-3'UTR (Luci eV) mit denen mit GILZ-3'UTR (Luci UTR), zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied in der relativen Lumineszenz (Abb. 40). Aus diesem Grund sind die unterschiedlichen Transfektionsansätze mit und ohne GILZ-3'UTR nicht ohne Normalisierungsschritte miteinander vergleichbar.

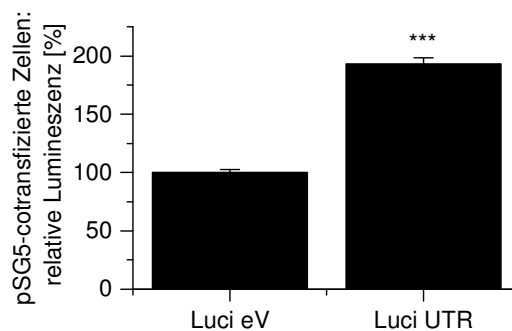


Abb. 40: Darstellung der relativen Lumineszenz aller pSG5-cotransfizierten Zellen. Der pSG5-Vektor wurde in 13 unabhängigen Assays untersucht. In jedem Assay wurden die Transfektionen zusätzlich mit dem jeweiligen Firefly-Luciferase-Vektor \pm GILZ-3'UTR in Sextuplikaten durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student t-Test ermittelt mit *** $p < 0,001$.

Experiment zur Bestätigung der Induktion der vielversprechendsten miRNAs nach TLR3-Aktivierung

Zur Bestätigung der miRNA-Überexpression im Luciferase-Assay wurden HEK 293T Zellen mit pSG5-precursor-miRNA-Konstrukten transfiziert und die entsprechende miRNA in den Zellen überexprimiert. Dies wurde für die miRNAs miR-34b*, miR-222 und miR-320d1 durchgeführt und im Northern Blot ausgewertet. Für alle drei miRNAs konnte eine Überexpression erreicht und im Northern Blot dargestellt werden (Abb. 41).

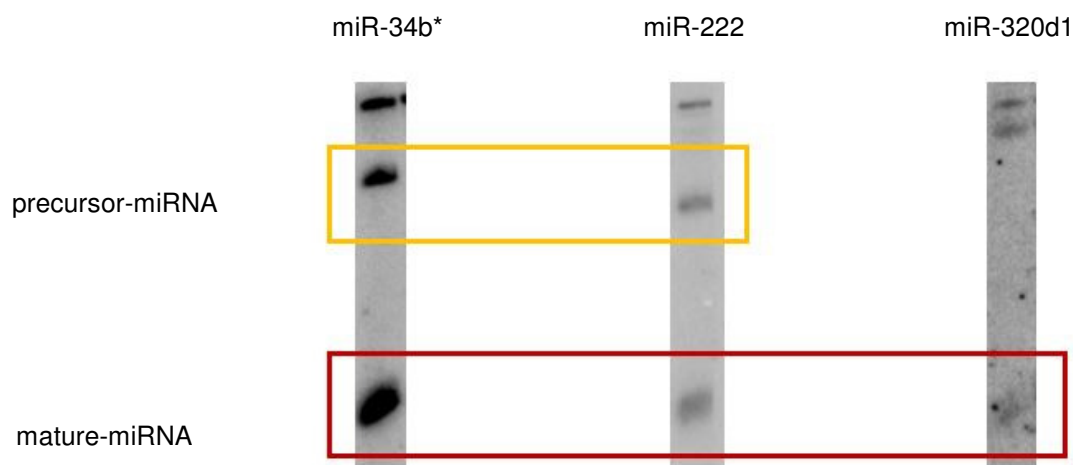
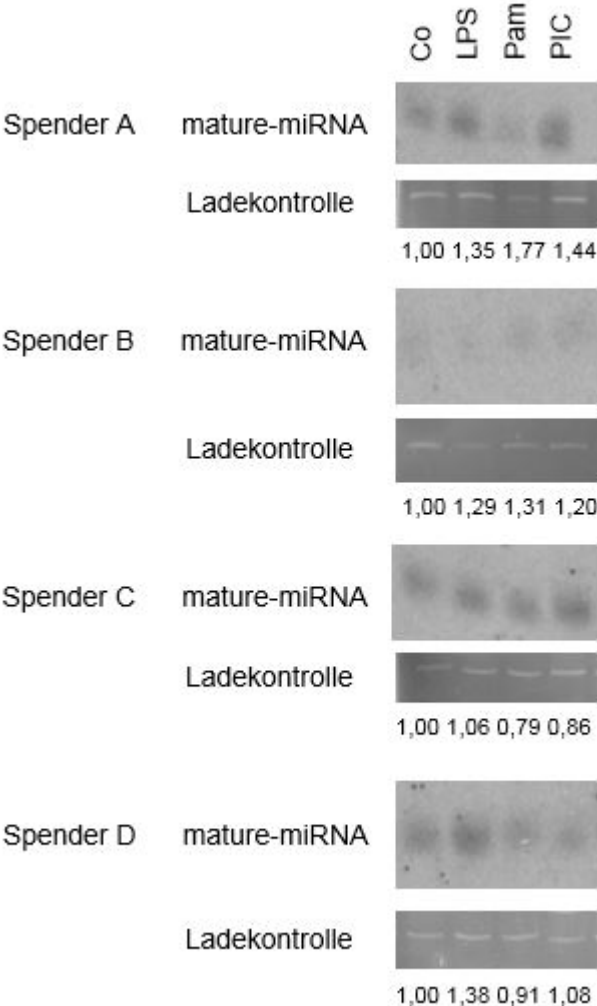


Abb. 41: Northern Blot der überexprimierten miRNAs. HEK 293T Zellen wurden mit den pSG5-precursor-miRNA mit Hilfe des PolyFect Transfektionsreagenzes transfiziert. Die Expression der jeweiligen miRNA ist im rot gekennzeichneten Bereich sichtbar. Die precursor-Form ist im Northern Blot nicht immer zu sehen. In diesem Fall kann man sie bei miR-34b* und miR-222 erkennen. Generell erscheint der Blot der miR-320d1 schwächer, da hier eine gestrippte Membran verwendet wurde.

Für die miRNAs miR-34b*, miR-222 und miR-320d1 sollte nun ebenfalls im Northern Blot getestet werden, inwieweit sie tatsächlich nach einer Aktivierung des TRIF-abhängigen Signalweges induziert sind. Für das Experiment wurden keine Alveolarmakrophagen verwendet, da die Zellausbeute aus Lungengewebe zu gering ausfiel, um genug RNA zur Generierung der Northern Blot-Proben isolieren zu können. Stattdessen wurden Monozyten aus humanem Blut isoliert und anschließend 5 bis 7 Tage mit GM-CSF ausdifferenziert. Da M-CSF eher zu einer Differenzierung zu anti-inflammatorischen, tumorfördernden M2-Makrophagen und GM-CSF eher eine Differenzierung Richtung proinflammatorischem, tumorsuppressivem M1 Subtyp, der eine größere Ähnlichkeit zu Alveolarmakrophagen aufweist, anstößt, wurde für dieses Experiment GM-CSF verwendet (Guilliams, De Kleer et al., 2013, Martinez, Gordon et al., 2006, Seif, Philippi et al., 2016, Shibata, Berclaz et al., 2001, Sieweke & Allen, 2013). Für eine Analyse der Induktion der miRNAs nach TLR3-Stimulation wurden die differenzierten MΦs mit LPS, Pam₃CSK₄ oder PIC für 2 h behandelt. Im Anschluss wurde die isolierte Gesamt-RNA auf die Induktion der betreffenden miRNAs mittels Northern Blot überprüft. Alle drei miRNAs wurden exprimiert, allerdings konnte für keine eine Induktion durch LPS oder PIC im Vergleich zu einer Behandlung mit Pam₃CSK₄ oder einer unbehandelten Probe nachgewiesen werden (Abb. 42).

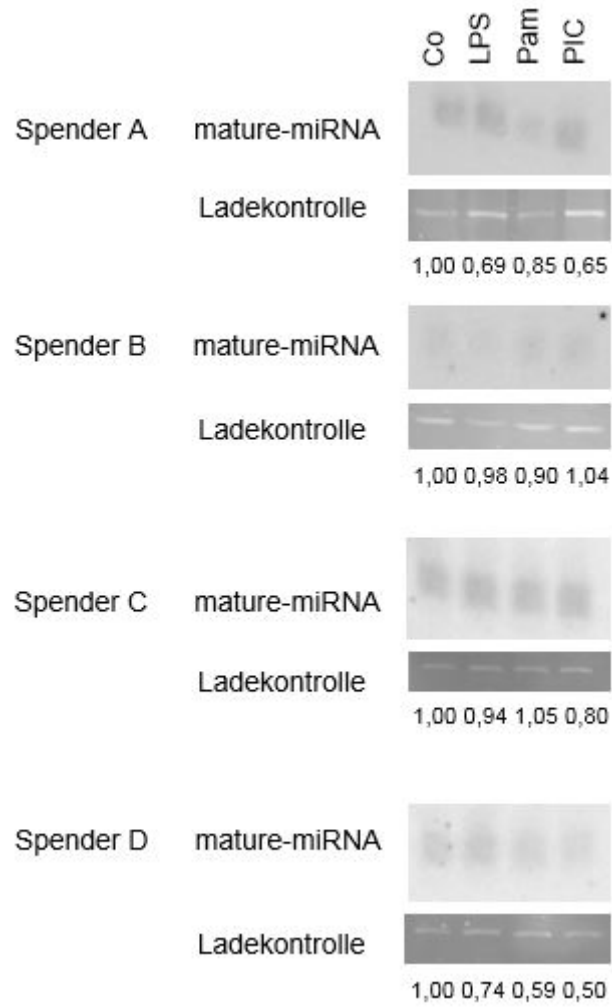
A

miR-34b*



B

miR-222



C

miR-320d1

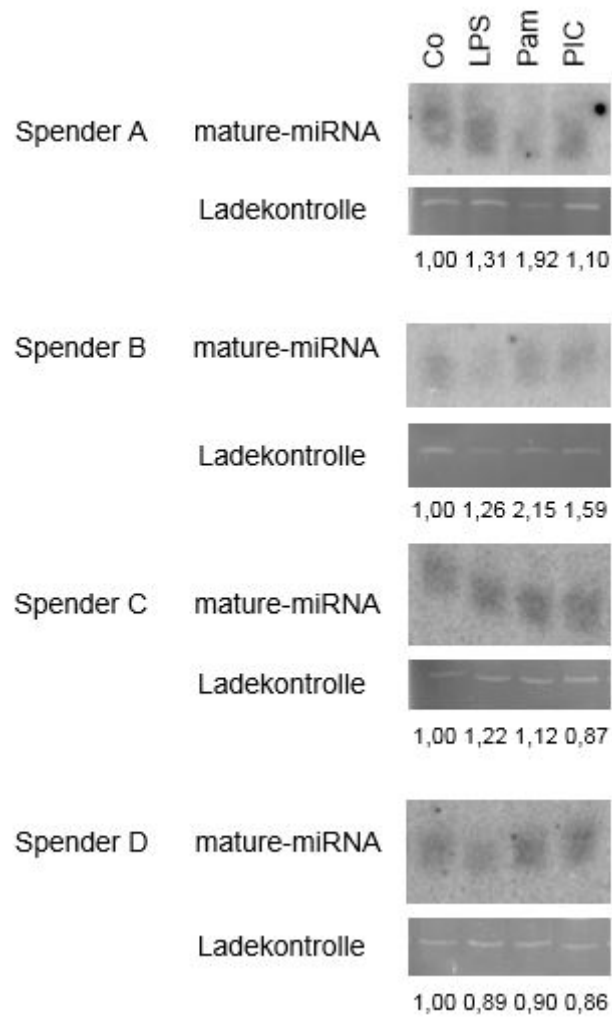


Abb. 42: Detektion von miR-34b*, miR-222 und miR-320d1 mittels Northern Blot.

GM-CSF-differenzierte MΦs von vier verschiedenen Spendern blieben entweder unbehandelt (Co) oder wurden mit LPS (1 µg/ml), Pam₃CSK₄ (1 µg/ml) oder PIC (1 µg/ml) für 2 h behandelt. Die mRNA und miRNAs wurden mit Hilfe des Qiagen miRNeasy Kits isoliert und anschließend mittels Northern Blot untersucht. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ. Zur Quantifizierung wurden die Banden der miRNAs auf ihre jeweilige Ladekontrolle (18S ribosomale RNA) bezogen und dieser Quotient als x-faches zu Co ausgedrückt. Der Blot wurde durchgeführt von Jennifer Menegatti, AG Grässer, Homburg.

Diskussion

Um die Ansprechbarkeit der isolierten Alveolarmakrophagen auf TLR-Liganden zu überprüfen, wurden diese mit den inflammatorischen Stimuli Pam₃CSK₄ und PIC behandelt. Es ist bekannt, dass verschiedene Zytokine wie IL-6, IL-12p40, IL-10, IP-10 oder TNF- α sowohl über den MyD88- als auch über den TRIF-Signalweg induziert werden können (Boonstra, Rajsbaum et al., 2006, Ouyang, Negishi et al., 2007, Sato, Sugiyama et al., 2003, Yamamoto, Sato et al., 2003a, Yamamoto et al., 2003b). Die Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Überstand PIC-behandelter Alveolarmakrophagen zeigte, dass nach Stimulation des TRIF-abhängigen Signalweges vor allem die Zytokine IL-6, IP-10 und TNF- α vermehrt sezerniert wurden. Eine Stimulation des MyD88-abhängigen Signalweges mit Pam zeigte sogar ein noch größeres inflammatorisches Potenzial, da auch weitere Zytokine, wie zum Beispiel IL-10, IL-12p40, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α und auch G-CSF induziert wurden, was bisherige Befunde aus der Literatur bestätigt (Hiemstra, Vrijland et al., 2013, Teixeira-Coelho, Guedes et al., 2014, Wang, Kurt-Jones et al., 2005).

Neben der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen konnte ebenfalls eine verminderte Expression des anti-inflammatorischen Proteins GILZ nach Aktivierung beider Signalwege beobachtet werden.

Interessanterweise zeigten Hoppstädter et al., dass in Alveolarmakrophagen die *GILZ* mRNA-Spiegel nur nach Anstoß des MyD88-abhängigen Signalweges herabreguliert wurden (Hoppstädter et al., 2012). *GILZ* Protein-Spiegel konnten jedoch ebenso nach Aktivierung des TRIF-abhängigen Signalweges herabreguliert werden. Diese Beobachtung warf zunächst die Frage auf, ob auch andere Makrophagen-, beziehungsweise Monozyten-Populationen auf die genannte Weise

reagieren. Um dies näher zu untersuchen, wurden primäre, aus Monozyten differenzierte MΦs und die beiden Zelllinien U937 und THP-1 untersucht. Die von Sundström und Nilsson zum ersten Mal charakterisierten U937 Zellen weisen manche Eigenschaften auf, zum Beispiel, Lysozym-positiv und schwach phagozytierend, die auch denen der Alveolarmakrophagen entsprechen (Deaton et al., 1994; Sundström and Nilsson, 1976).

Experimente mit *in vitro* differenzierten Makrophagen ergaben, dass diese auf eine inflammatorische Stimulation mit LPS, Pam und PIC in besonders ähnlicher Weise bezüglich der *GILZ* mRNA reagieren wie AMs. Es konnte eine Herabregulation nach Stimulation der MyD88-abhängigen Signalwege, sowie keine Veränderung nach Stimulation des TRIF-abhängigen Signalweges festgestellt werden. Allerdings zeigen Alveolarmakrophagen auch nach PIC-Behandlung eine erhöhte Menge an *TNF* mRNA (Hoppstädter et al., 2012), was mit MΦs nicht bestätigt wurde (Hoppstädter et al., 2012). Insofern konnte nicht sicher festgestellt werden, ob dieser Makrophagentyp überhaupt auf TLR3-Liganden reagiert.

Die Untersuchung von Makrophagen-ähnlichen Zelllinien ergab eine noch geringere Ansprechbarkeit auf inflammatorische Stimuli, sowohl für entzündliche, als auch anti-entzündliche Marker. Für U937 Zellen konnte sogar gezeigt werden, dass kaum ZFP36, selbst nach inflammatorischer Aktivierung vorhanden ist, was einen weiteren wichtigen Unterschied zu Alveolarmakrophagen darstellt (Hoppstädter et al., 2012). Daher bietet keine der getesteten Zellarten einen adäquaten Ersatz für die Verwendung von Alveolarmakrophagen.

Eine mögliche Erklärung für die gleichbleibend hohen *GILZ* mRNA-, aber erniedrigten *GILZ* Protein-Spiegel nach PIC-Behandlung in Alveolarmakrophagen könnte die Regulation über miRNAs sein, die über den TRIF-Signalweg induziert werden. So ist zum Beispiel für miR-9 bekannt, dass sie nach Stimulation von TLR2, TLR4 und

TLR7/8 in humanen Monozyten induziert wird (Bazzoni et al., 2009). Um zu untersuchen, ob miRNAs eine Rolle spielen könnten, wurde ein Experiment mit der synthetischen *aurintricarboxylic acid* (ATA) durchgeführt, welche die Interaktion zwischen *small RNAs* und dem *human Argonaute-2*, und somit die miRNA-Prozessierung über RISC, verhindert (Danielson et al., 2015; Tan et al., 2012). Eine Untersuchung der GILZ Protein-Spiegel nach Behandlung von AMs mit PIC, ATA oder beidem zeigt, dass ATA in der Lage ist, den PIC-induzierten GILZ-Abbau zu inhibieren. Dies bestärkt die Hypothese, dass eine miRNA-Induktion im TRIF-abhängigen Signalweg der GILZ-Regulation eine Rolle spielt.

Im Anschluss daran wurde ein Microarray mit AM-Proben durchgeführt, um Änderungen der miRNA-Expression nach inflammatorischen Stimuli in AMs zu untersuchen. Des Weiteren wurden *in silico* Analysen durchgeführt, um miRNAs herauszufiltern, deren Bindung an die *GILZ* mRNA als wahrscheinlich vorausgesagt wird. Unter Berücksichtigung aller Daten wurde festgestellt, dass die im Microarray passend erscheinenden miRNAs in den seltensten Fällen mit denen übereinstimmen, die laut *in silico* Analyse mit der *GILZ* mRNA interagieren können. Eine stark verkleinerte Auswahl an miRNAs (miR-15b-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-24, miR-34b*, miR-136, miR-143, miR-222, miR-320d1 und miR-424) sollte potentielle Kandidaten aus Microarray-basierten und *in silico* Untersuchungen berücksichtigen. So gehörte zum Beispiel miR-320d1 zu den Top 1% der von miRDIP als GILZ-bindend vorausgesagten miRNAs. Bei der miRNA-Suche mittels miR-Walk, einer Datenbank für die umfassende Darstellung von miRNA-Target-Interaktionen basierend auf den Daten mehrerer Vorhersageprogramme (zum Beispiel miRMap, miRanda, Targetscan, usw.), wurden die miRNAs-143, -15b, -136, -18a, -24 und -424 ausgewählt, da sie jeweils von 5-7 unterschiedlichen Datenbanken als „wahrscheinlich bindend“ vorhergesagt wurden. Diese bioinformatischen

Vorhersagen müssen natürlich mit Vorsicht betrachtet werden, da je nach angewendeten Algorithmen und unterschiedlichen Datensätzen, auf die die Programme zurückgreifen, auch fehlerhafte oder falsch positive Ergebnisse entstehen können. Dennoch ist der Einsatz solcher informatischer Anwendungen sehr wichtig, um weitere miRNAs und deren Interaktionen unter den vielen bisher bekannten zu entdecken (Gomes et al., 2013). Bei der Datenbank miRTarBase erschienen miR-18a, -19a und -19b als besonders interessante Kandidaten. Diese miRNAs sind Teil des konservierten miRNA-Clusters miR-17~92, das unter anderem essentiell für die B-Lymphozyten-Entwicklung ist (Ventura et al., 2008; Xiao and Rajewsky, 2009). Es konnte sogar gezeigt werden, dass TNF- α die Expression von miR-17~92 in *rheumatoid arthritis synovial fibroblasts* (RASFs) NF- κ B-abhängig induziert. Insbesondere eine Überexpression von pre-miR-18a in RASFs rief eine proinflammatorische Antwort durch eine Interaktion mit dem NF- κ B-Signalweg-Inhibitor TNF α -induced-protein-3 (TNFAIP3) hervor (Trenkmann et al., 2013; Vandevyver et al., 2014; Vreugdenhil et al., 2009). miR-18a wurde auch im Zusammenhang mit der Regulation des Glukokortikoidrezeptors untersucht (GR) (Uchida, Nishida et al., 2008, Vandevyver, Dejager et al., 2014, Vreugdenhil, Verissimo et al., 2009), wo sie zum Beispiel eine Erniedrigung der GR-Spiegel im hypothalamischen paraventriculären Kern von Ratten hervorruft (Uchida et al., 2008). Möglicherweise könnte miR-18a, und somit auch das dazugehörige Cluster, auch ein potentieller Kandidat für die GILZ-Regulation sein.

Zu den miRNAs, die besonders durch die Ergebnisse des Microarrays hervorstachen, zählten miR-136, -18a, -24, -320d, -222 und -34b*. Die ersten vier genannten miRNAs stiegen in den AMs aus allen drei Spenderlungen nach Behandlung mit PIC über 2 h an. miR-24 ist bereits für seine wichtige regulatorische Funktion in primären Makrophagen und dendritischen Zellen bekannt. Es konnte

gezeigt werden, dass eine Überexpression von miR-24 in diesen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) zu einer abgeschwächten Antigen-Prozessierung und T-Zell-Proliferation (Naqvi et al., 2016) sowie zu einer verminderten inflammatorischen Zytokinantwort führt (Fordham et al., 2015; Hao et al., 2014; Jickling et al., 2014; Tadano et al., 2016; Wang et al., 2014). In diesem Zusammenhang zeigt miR-24 einen anti-inflammatorischen Effekt. Dies schließt jedoch eine Interaktion mit der GILZ-3'UTR nicht aus, vor allem da miR-24 von besonders vielen Datenbanken (7 verschiedene bei miRWalk und miRDip) als voraussichtlich GILZ-bindend angezeigt wird.

Um die ausgewählten miRNAs hinsichtlich ihrer GILZ-regulierenden Eigenschaften weiter zu untersuchen, wurde ein Dual-Luciferase-Assay durchgeführt. Dieser gängige Assay ist generell *in vitro* gut durchführbar und ermöglicht einen hohen Durchsatz mit vielen Replikaten. Die verwendeten Zellen müssen jedoch gut transfizierbar sein, weshalb in unserem Versuch auf HEK293 T Zellen ausgewichen wurde. Außerdem besteht die Gefahr, dass die Transfektion von Renilla- und Firefly-Luciferase-Plasmid unterschiedlich gut verläuft und damit das Gesamtergebnis verfälscht wird. Dieses Problem könnte umgangen werden, indem man beide Luciferasen in denselben Vektor kloniert und somit eine gleichmäßige Expression erreicht. Dennoch könnte auch dann ein möglicher Effekt der überexprimierten miRNA auf die Luciferasen nicht ausgeschlossen werden. Die Auswertung des Assays ergab, dass die drei miRNAs miR-320d, miR-34b* und miR-222 einen posttranskriptionellen Effekt auf die GILZ-3'UTR besitzen. Interessanterweise gehört keine dieser miRNAs zu den von miRWalk vorausgesagten miRNAs. miRDip zählt zumindest miR-222, vor allem aber miR-320d zu den miRNAs, die GILZ wahrscheinlich als Target haben.

Literaturrecherchen ergaben, dass miR-320d aktuell hauptsächlich als Biomarker für Krebserkrankungen, wie Darmkrebs oder Nierenzellkarzinom (Hao, Ren et al., 2014, Tadano, Kakuta et al., 2016), und für akuten Schlaganfall diskutiert wird, da sie sowohl in Darmkarzinomzellen und Nierenzellkarzinomzellen, als auch im Plasma von Schlaganfallpatienten erniedrigt vorliegt (Jickling, Ander et al., 2014, Wang, Sun et al., 2014). Faiz et al. bringen miR-320d auch mit entzündlichen Prozessen in Verbindung. Sie identifizierten miR-320d als anti-inflammatorische miRNA, die in Epithelzellen von COPD-Patienten herabreguliert ist und die Infiltration von Neutrophilen beeinflusst (Faiz et al., 2015). Dennoch zeigen unsere Array-Ergebnisse eine tendenzielle Induktion von miR-320d nach allen drei inflammatorischen Behandlungen (LPS, Pam und PIC).

Die Expression von miR-34b* (entspricht miR-34b-5p laut Angaben von miRBase), wie auch weiterer Mitglieder der miR-34/449 Familie, war in *in vivo* Studien mit Bronchialepithelabstrichen von Asthma-Patienten, sowie in *in vitro* Versuchen mit IL-13-Behandlung in primären Lungenepithelzellen, stark unterdrückt (Solberg et al., 2012). Auch in den Exosomen aus bronchoalveolarer Spülflüssigkeit konnte für miR-34b* eine Herabregulation in asthmatischen Patienten, verglichen mit gesunden Probanden, detektiert werden (Levänen et al., 2013). Allerdings lag sie in Lungenproben von Mäusen nach LPS-Behandlung in einer mehr als doppelt so hohen Konzentration im Vergleich zu den Kontrollproben vor (Hsieh et al., 2012). Welche Rolle miR-34b* tatsächlich in Alveolarmakrophagen spielt, wurde bisher noch nicht untersucht.

Die Funktion von miR-222 wurde bereits in THP-1 Makrophagen untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sie nach Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) vermehrt exprimiert wird und sowohl den Arrest in der G2 Phase des Zellzyklus als auch, in Kombination mit weiteren miRNAs, die Differenzierung von

Monozyten in Makrophagen induziert (Forrest et al., 2009). Auch in humanen Monozyten scheint miR-222 in den Differenzierungsprozess zu Makrophagen involviert zu sein (Graff et al., 2012). Außerdem inhibiert miR-222 die Makrophagen-Migration *in vitro* und *in vivo*. Eine verminderte Expression von miR-222 in Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) führt demnach zu einer verstärkten Einwanderung dieses Makrophagen-Typs in das Tumorgewebe (Li et al., 2015). Ortega et al. bringen miR-222 auch in einen inflammatorischen Kontext. Sie zeigten, dass im entzündlichen Fettgewebe miR-222 sowohl in differenzierten Adipozyten verstärkt exprimiert war, als auch in deren Überständen vermehrt detektiert wurde (Ortega et al., 2015).

Um zu prüfen, ob die Expression von miR-320d, miR-34b* und miR-222 tatsächlich durch einen Anstoß des TRIF-abhängigen Signalweges über PIC und LPS induziert wird, folgte ein Northern Blot mit inflammatorisch stimulierten (LPS, Pam oder PIC) MΦs zur Untersuchung der miRNA-Expression im Vergleich zu Kontrollproben. Entgegen unserer Annahme zeigte sich nach PIC- oder LPS-Stimulation weder im Vergleich zur Nullkontrolle, noch zu den Pam-behandelten Proben eine vermehrte miRNA-Expression. Dieses Ergebnis könnte darin begründet liegen, dass entweder die Spender-Heterogenität zu groß war oder primäre MΦs in diesem Fall kein geeignetes Modell für das Verhalten von humanen Alveolarmakrophagen darstellen. Wie schon im Ergebnisteil beschrieben, reagieren MΦs im Vergleich zu AMs kaum auf eine PIC-Stimulation, selbst in hohen Konzentrationen von 10 µg / ml. Daher ist es auch nicht verwunderlich, wenn Änderungen der entsprechenden Signalwege, in diesem Fall durch die Expression spezieller miRNAs, nicht zu detektieren sind. Allerdings muss man beachten, dass die Differenzierungsmethoden der MΦs in den verschiedenen Experimenten unterschiedlich waren. Die MΦs im Test auf ihre inflammatorische Aktivierbarkeit waren M-CSF differenziert, während die MΦs für die

Northern Blot Versuche GM-CSF differenziert waren. Generell wäre es sinnvoll, auch die Northern Blot Analysen, die momentan noch den Goldstandard der miRNA-Detektion darstellen (de Planell-Saguer and Rodicio, 2011; Li et al., 2014), in AMs durchzuführen, um nicht auf ein unzureichend geeignetes Zellmodell ausweichen zu müssen. Allerdings ist es kaum möglich, pro Lungenprobe eines Spenders genug Zellen für dieses Experiment mit entsprechender Probenzahl zu generieren.

Eine weitere Erklärung für das vorliegende Ergebnis könnte der Effekt von *miRNA Sponges* sein. Kodierende und nicht-kodierende RNA Moleküle können als *Sponge RNAs* fungieren, in dem sie die gleichen *miRNA recognition elements* (MREs) teilen wie auch die miRNAs selbst und sich dadurch gegenseitig regulieren. Diese RNA-Moleküle werden *competing endogenous RNAs* (ceRNAs) genannt mit einem in Abbildung 43 schematisch dargestellten Wirkungsmechanismus (Kartha and Subramanian, 2014). Yoon et al., 2014

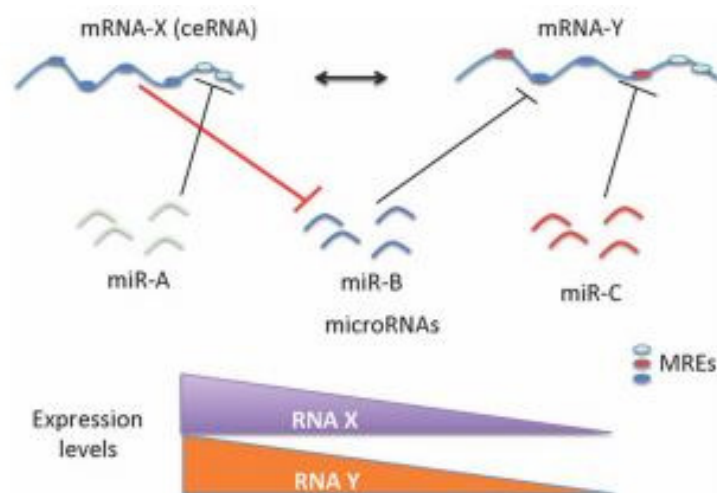


Abb. 43: Schematische Darstellung der ceRNA-vermittelten Genregulation (Kartha and Subramanian, 2014).

Die Abbildung zeigt, dass sich nicht nur miRNAs und mRNAs gegenseitig beeinflussen können, sondern auch mRNAs mit den entsprechenden MREs andere mRNAs in ihrer Menge und Aktivität beeinflussen können. Dieser übergreifende Regulationsprozess, vermittelt über MREs, hängt von der Anzahl und Frequenz des spezifischen MRE-Typs ab. Im Detail zeigt die Abbildung schematisch die Regulation einer mRNA-Y. mRNA-Y ist ein funktionelles Target von miR-B. Die Expressionslevel von mRNA-X, die MREs für miR-B enthält, können einen *sponge* Effekt auf miR-B haben, die miRNA abfangen und somit den Effekt von miR-B auf mRNA-Y abschwächen. Das heißt, dass eine Herabregulation in der Expression von mRNA-X auch eine Herabregulation der Expressionsspiegel von mRNA-Y zur Folge hat.

Nazari-Jahantigh et al. konnten bereits in inflammatorisch aktivierten Makrophagen eine übergreifende ce-Regulationskette von miR-155, miR-342-5p, *AKT1* mRNA und *Bmpr2* mRNA aufdecken (Nazari-Jahantigh et al., 2014). Auch in den von uns durchgeführten Experimenten wurden möglicherweise durch die Versuchsbedingungen ceRNAs aktiviert, die dann die miRNAs selbst abfangen und übergreifende Effekte auf *GILZ* mRNA vermittelt haben könnten. Alternativ wäre es denkbar, dass auch die PIC-Behandlung zu einer Herabregulation von ceRNAs geführt hat, wodurch möglicherweise eine verringerte Blockade potenziell *GILZ*-bindender miRNAs herbeigeführt wurde. Der Effekt auf *GILZ* mRNA würde also durch PIC verstärkt werden ohne eine sichtbare Änderung im Northern Blot detektieren zu können.

Um den translationshemmenden Einfluss dieser drei und auch weiterer interessanter miRNAs auf die *GILZ* mRNA zu verifizieren, müssten noch weitere Analysen im Anschluss an die bisherigen Experimente erfolgen. Um den Funktionsverlust von miRNAs durch komplementäre Sequenzen, ähnlich wie bei den ceRNAs, gezielt in einem Assay auszunutzen, könnte man entsprechende Antagomirs für die untersuchten miRNAs einsetzen. Scherr et al. nutzten eine Lentivirus-vermittelte Antagomir-Expression und konnten dadurch unter anderem für miR-18a und -19b eine spezifische miRNA-vermittelte Reporter-gen-Expression unterdrücken (Scherr et al., 2007).

Um die Hypothese der Translationshemmung von *GILZ* durch miR-320d, miR-34b* und miR-222 zu untermauern, wäre es zudem sinnvoll, eine miRNA-Überexpression in primären Alveolarmakrophagen durchzuführen, wobei die Transfektion primärer Zellen meist problematisch ist (Hamm et al., 2002). Grundsätzlich sollte man sich bewusst sein, dass auch zu hohe miRNA-Überexpressionsraten Ergebnisse

verfälschen können, weil sie unspezifische Veränderungen in der Genexpression hervorrufen können (Jin et al., 2015).

Eine weitere Möglichkeit zur spezifischeren Analyse der miRNA-*GILZ* mRNA-Bindung wäre die Einführung gezielter Mutationen in der Binderegion der mRNA. Da nach unserer Hypothese ein translationshemmender Effekt durch eine partiell-komplementäre Bindung der miRNA an die *GILZ*-3'UTR zustande kommt, könnten eine oder mehrere Punktmutationen an den komplementären Basen die Bindung soweit verringern, dass man die Translationshemmung der *GILZ* mRNA aufheben könnte. Weitere Mutationsstrategien wären eine Mutation der kompletten Target-Sequenz oder ein Löschen der gesamten Seed-Sequenz (Jin et al., 2013).

Abschließend lässt sich sagen, dass miRNAs sehr weitreichende Regulationen hervorrufen und deren Effekte selbst wiederum auch stark von den experimentellen Gegebenheiten abhängen. Die hier getroffene und untersuchte Auswahl bezüglich der Regulation der *GILZ* mRNA ist nicht exklusiv. Daher bleibt zu untersuchen, welche weiteren miRNAs eine regulatorische Wirkung auf *GILZ* haben könnten und inwieweit die bisherigen Ergebnisse verifiziert werden können.

Anhang zu Kapitel 4

Regulation der miRNAs in AMs nach inflammatorischer Stimulation

Die folgenden Listen zeigen eine detaillierte Auflistung der in den Heatmaps dargestellten miRNAs (in Kapitel 4 beschrieben). Die Reihenfolge der miRNAs entspricht der Auflistung in den Heatmaps (Abb. 44).

A

LPS	Pam	Poly(I:C)
hsa-miR-106a*	hsa-let-7f	hsa-let-7a*
hsa-miR-10b*	hsa-miR-1182	hsa-miR-1228
hsa-miR-122*	hsa-miR-1193	hsa-miR-1260b
hsa-miR-1253	hsa-miR-1255b	hsa-miR-1273d
hsa-miR-1279	hsa-miR-136*	hsa-miR-150*
hsa-miR-1282	hsa-miR-1471	hsa-miR-182*
hsa-miR-1285	hsa-miR-18b*	hsa-miR-1914*
hsa-miR-1301	hsa-miR-192*	hsa-miR-219-1-3p
hsa-miR-133b	hsa-miR-2114*	hsa-miR-3156
hsa-miR-2053	hsa-miR-2115*	hsa-miR-3193
hsa-miR-208a	hsa-miR-2355-5p	hsa-miR-3198
hsa-miR-3118	hsa-miR-3065-3p	hsa-miR-3622a-5p
hsa-miR-3133	hsa-miR-3117	hsa-miR-3649
hsa-miR-3613-5p	hsa-miR-3123	hsa-miR-3650
hsa-miR-3647-5p	hsa-miR-3134	hsa-miR-378c
hsa-miR-3680	hsa-miR-3136	hsa-miR-424*
hsa-miR-3688	hsa-miR-3145	hsa-miR-4261
hsa-miR-3908	hsa-miR-3195	hsa-miR-431
hsa-miR-3924	hsa-miR-3612	hsa-miR-4311
hsa-miR-3929	hsa-miR-3656	hsa-miR-4314
hsa-miR-491-3p	hsa-miR-3663-3p	hsa-miR-484
hsa-miR-545*	hsa-miR-3668	hsa-miR-488*
hsa-miR-576-3p	hsa-miR-3679-5p	hsa-miR-517c
hsa-miR-587	hsa-miR-3690	hsa-miR-548a-5p
hsa-miR-601	hsa-miR-376a	hsa-miR-589*
hsa-miR-624*	hsa-miR-4259	hsa-miR-600
hsa-miR-664*	hsa-miR-4327	hsa-miR-608
	hsa-miR-452	hsa-miR-634
	hsa-miR-514b-5p	
	hsa-miR-516a-3p	
	hsa-miR-518a-5p	
	hsa-miR-518e*	
	hsa-miR-548g	
	hsa-miR-551b*	
	hsa-miR-599	
	hsa-miR-621	
	hsa-miR-630	
	hsa-miR-633	
	hsa-miR-649	
	hsa-miR-663	
	hsa-miR-718	
	hsa-miR-762	
	hsa-miR-765	

B

LPS + Pam	LPS + Poly(I:C)	Pam + Poly(I:C)
hsa-miR-1278	hsa-miR-1305	hsa-miR-1283
hsa-miR-1297	hsa-miR-19b-2*	hsa-miR-1321
hsa-miR-1298	hsa-miR-217	hsa-miR-153
hsa-miR-155	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-198
hsa-miR-155*	hsa-miR-374a*	hsa-miR-3116
hsa-miR-190	hsa-miR-4300	hsa-miR-3138
hsa-miR-19a*	hsa-miR-466	hsa-miR-625
hsa-miR-221*	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-3914
hsa-miR-222*	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-520a-5p
hsa-miR-27a*	hsa-miR-544	hsa-miR-3153
hsa-miR-29b-1*	hsa-miR-874	hsa-miR-875-3p
hsa-miR-3201	hsa-miR-92b	hsa-miR-606
hsa-miR-335		hsa-miR-3610
hsa-miR-3618		hsa-miR-526b
hsa-miR-3675-3p		hsa-miR-3667-5p
hsa-miR-3687		
hsa-miR-412		
hsa-miR-4309		
hsa-miR-483-5p		
hsa-miR-518c		
hsa-miR-519e*		
hsa-miR-520c-3p		
hsa-miR-559		
hsa-miR-620		

C

Alle Stimuli
hsa-miR-1
hsa-miR-1252
hsa-miR-1262
hsa-miR-1291
hsa-miR-1299
hsa-miR-2052
hsa-miR-23a*
hsa-miR-3121
hsa-miR-3135
hsa-miR-3611
hsa-miR-3654
hsa-miR-3666
hsa-miR-3686
hsa-miR-376c
hsa-miR-3939
hsa-miR-3941
hsa-miR-4305
hsa-miR-4324
hsa-miR-4330
hsa-miR-513c
hsa-miR-642a
hsa-miR-711
hsa-miR-9*
hsa-miR-920
hsa-miR-938

D

LPS	Pam	Poly(I:C)
hsa-miR-10a*	hsa-miR-1260b	hsa-miR-1200
hsa-miR-1266	hsa-miR-1274a	hsa-miR-1225-5p
hsa-miR-127-5p	hsa-miR-3191	hsa-miR-218-1*
hsa-miR-141	hsa-miR-34c-3p	hsa-miR-297
hsa-miR-142-3p	hsa-miR-3661	hsa-miR-3170
hsa-miR-21*	hsa-miR-375	hsa-miR-331-5p
hsa-miR-2114	hsa-miR-3909	hsa-miR-3674
hsa-miR-218-2*	hsa-miR-3910	hsa-miR-3919
hsa-miR-29b	hsa-miR-4293	hsa-miR-4281
hsa-miR-3120	hsa-miR-647	hsa-miR-4302
hsa-miR-3169	hsa-miR-720	hsa-miR-452*
hsa-miR-3187		hsa-miR-612
hsa-miR-4292		hsa-miR-620
hsa-miR-4316		
hsa-miR-615-5p		

E

LPS + Pam	LPS + Poly(I:C)	Pam + Poly(I:C)
hsa-miR-3907	hsa-miR-3155	hsa-miR-135b*
hsa-miR-3677	hsa-miR-4251	hsa-miR-922
hsa-miR-187*		hsa-miR-941
hsa-miR-1274b		
hsa-miR-1231		

F

Alle Stimuli
hsa-miR-3181
hsa-miR-4285

Abb. 44: Regulation der miRNAs in AMs nach inflammatorischer Stimulation.

(A, D) Auflistung aller miRNAs, die nur bei einer Behandlung mehr als 1,3-fach (A) oder weniger als 0,7-fach (D) exprimiert waren. (B, E) Auflistung aller miRNAs, die bei zwei Behandlungen mehr als 1,3-fach (B) oder weniger als 0,7-fach (E) exprimiert waren. (C, F) Auflistung aller miRNAs, die bei allen drei Behandlungen mehr als 1,3-fach (C) oder weniger als 0,7-fach (F) exprimiert waren.

TLR2-regulierende miRNAs

Im Rahmen eines weiteren Projektes von Dr. Jessica Hoppstädter konnte gezeigt werden, dass die TLR2-Expression nach einer LPS-Langzeitbehandlung in Makrophagen heraufreguliert ist. Interessanterweise zeigten die Microarray Daten für miRNA- 19a, -19b und tendenziell auch für -18a aus dem miR-17~92 Cluster eine Herabregulation nach einer LPS-Langzeitbehandlung von 24 h in den untersuchten Spendern (Abb. 45). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die betrachteten miRNAs in Makrophagen TLR2 regulierend wirken, so wie es zum Beispiel schon für rheumatoide, fibroblasten-ähnliche Synoviozyten gezeigt werden konnte (Philippe et al., 2012).

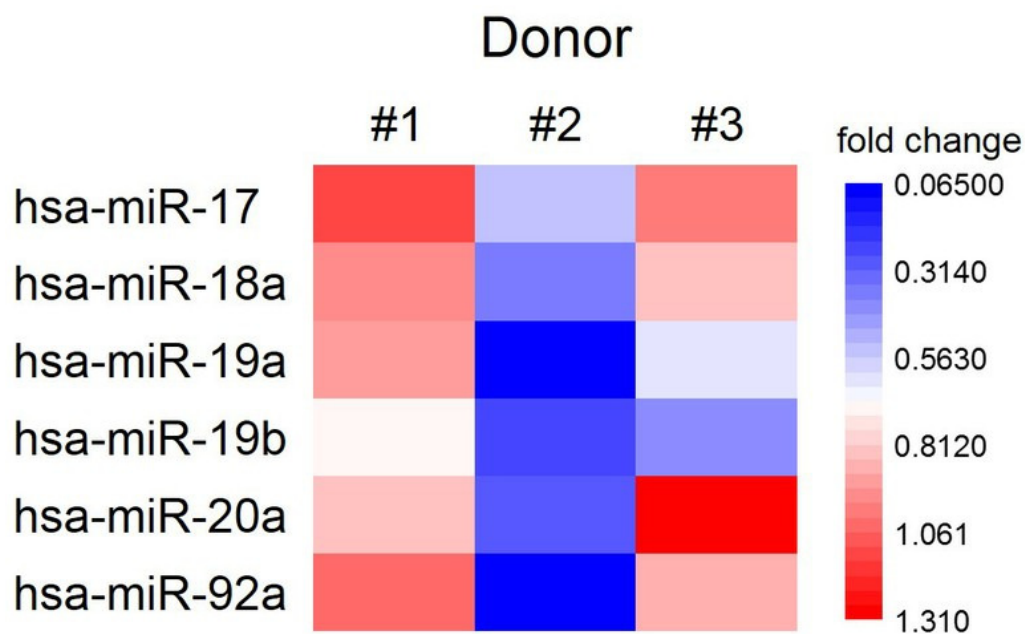


Abb. 45: Änderung der miRNA-Expression nach LPS-Langzeitbehandlung. Dargestellt sind die Expressionsänderungen der miRNAs des miR-17~92 Clusters nach einer 24-stündigen LPS-Behandlung (100 ng/ml) aus AM-Proben von drei verschiedenen Spendern. Die Daten wurden erhalten mittel eines Microarray (Wie in Kapitel 4 beschrieben). Die Abbildung wurde erstellt von Dr. Jessica Hoppstädter.

Zur näheren Untersuchung diesbezüglich wurden die miRNA-Spiegel von miR-18a, -19a und -19b in 24 h LPS-behandelten AMs auch mittels Realtime RT-PCR untersucht. Tatsächlich waren alle drei miRNAs in den behandelten Proben tendenziell herabreguliert, auch wenn nur für miR-19a ein statistisch signifikantes Ergebnis erhalten wurde (Abb. 46). Zu erwähnen ist jedoch auch, dass die Gesamt-miRNA-Spiegel in allen Proben sehr gering ausfielen.

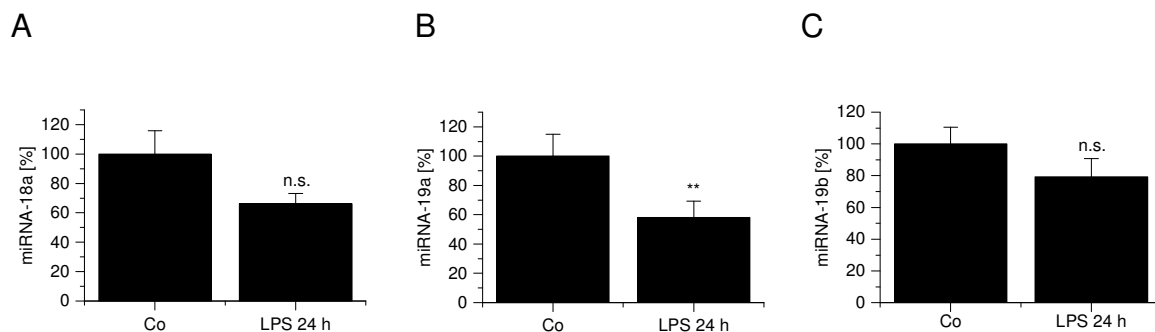


Abb. 46: miRNA-Spiegel nach Langzeit LPS-Behandlung.

AMs wurden mit LPS (100 ng/ml) für 24 h behandelt (LPS 24 h) oder blieben unbehandelt (Co). Die miRNAs miR-18a (A), miR-19a (B) und miR-19b (C) wurden isoliert und deren Spiegel mittels Realtime RT-PCR gemessen. Die miRNA-Rohdaten wurden auf RNU6B-Rohdaten bezogen und Co wurde als 100% gesetzt. Die Daten zeigen die Mittelwerte aus drei verschiedenen Spendern einmal im Duplikat, einmal im Triplikat und einmal im Quadruplikat mit ** $p < 0,01$, berechnet mit Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whitney im Fall von nicht normalverteilten Daten.

Materialien und Methoden

Materialien

Das Kulturmedium RPMI und weitere Zusätze wie Penicillin, Streptomycin und Glutamin wurden von der Firma PAA verwendet (Pasching, Österreich). DMEM *high glucose* Medium wurde von Sigma-Aldrich und das zugesetzte fötale Kälberserum (FCS) wurde von PAA oder von Sigma bezogen. Bei Pam₃CSK₄, LPS und PIC, welche zur Stimulation von Toll-like Rezeptoren eingesetzt wurden, handelte es sich um Reagenzien von Invivogen (San Diego, CA, USA). Die verwendete Thiophosphat-modifizierte immunstimulatorische Sequenz ISS 1018 (5'-TGA₂CTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), alle RT-qPCR Primer, Oligonukleotide und Sonden wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt. 5x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus wurde von Solis BioDyne (Tartu, Estland) bezogen. *Taq*-Polymerase (5 U/μl), 10x *Taq*-Puffer und der dNTP Mix waren von der Firma Genscript (Piscataway, NJ, USA). Qiazol, RNeasy mini Kits und miRNeasy mini Kits waren von Qiagen (Hilden, Deutschland). siGILZ (M-021438-01-0010), siZFP36 (siTTP; L-010789-01-0005) und siControl (D-001810-01-05) waren von Dharmacon (Nidderau, Deutschland). Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden entweder von Sigma-Aldrich, Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Zellkultur

THP-1 Zellen

Verwendet wurde die THP-1 Zelllinie mit humanen, in Suspension wachsenden, Monozyten-ähnlichen Zellen, die entweder undifferenziert blieben oder mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; 100 nMol) für 2 Tage ausdifferenziert wurden, wie bereits beschrieben (Kiemer et al., 2009).

U937 Zellen

Die Monozyten-ähnlichen, in Suspension wachsenden Zellen der U937 Zelllinie wurden in RPMI1640 mit 10% FCS, 100 Units/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin kultiviert. Zur Ausdifferenzierung wurde auch hier PMA verwendet.

Alveolarmakrophagen

Humane Alveolarmakrophagen wurden isoliert wie bereits in Hoppstädter et al., 2010 beschrieben.

In vitro differenzierte Makrophagen (MΦs)

Humane Monozyten wurden von gesunden, erwachsenen Blutspendern (Blutspendezentrale Saarbrücken, Deutschland; siehe auch Ethik-Antrag "Untersuchung molekularer Mechanismen der Aktivierung humaner Makrophagen" Kenn-Nr. 130/08) entweder wie in Kiemer et al., 2009 beschrieben oder mittels Miltenyi Beads isoliert (Dembek et al., 2017). Zur Ausdifferenzierung in Makrophagen wurde entweder M-CSF oder GM-CSF (20 ng/ml) (siehe Legende des jeweiligen

Versuchs) in RPMI1640 mit 10% FCS, 100 Units/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin verwendet. Die Zellen wurden auf diese Weise für 6 bis 8 Tage kultiviert, anschließend mit Accutase abgelöst und mit der gewünschten Zellzahl ausgesät. Die Behandlung der Zellen erfolgte einen Tag nach der Aussaat.

HEK 293T

Die adhärent wachsenden HEK 293T Zellen wurden in *high glucose* DMEM Medium mit den Zusätzen von 10% FCS, 100 units/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 4 mM Glutamin kultiviert. Im Vergleich zu den HEK 293 Zellen exprimiert diese Zelllinie das große SV40 T-Antigen, wodurch die DNA-Replikation von Plasmiden mit dem SV40 Promotor und *origin of replication* ermöglicht wird (Wu et al., 2004). Für die jeweilige Behandlung wurden die Zellen mit der gewünschten Zellzahl ausgesät und am darauffolgenden Tag behandelt.

Human umbilical vein endothelial cells

Die Präparation, Kultivierung und Charakterisierung der *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) wurde durchgeführt wie bereits beschrieben (Diesel et al., 2012; Weber et al., 2003). HUVEC wurden für alle Experimente in Passage drei oder vier genutzt und in 6-Well Platten ausgesät.

Plasmid-Generierung

precursor-miRNA-Vektoren

Zur Generierung eines miRNA-Überexpressionsvektors wurde zunächst die Lage der entsprechenden *precursor*-miRNAs im Genom mit Hilfe der miRBase Datenbank ermittelt. Für miRNA-920 wäre dies zum Beispiel auf Chromosom 12: 24212421-24212495 [+] auf dem Plusstrang. Die miRNA-Stem-Loop-Sequenz wurde inklusive der Sequenzen 200 Basenpaare (bp) *up*- und *downstream* amplifiziert. Falls die pre-miRNA auf dem negativen Strang lag, wurde das gleiche für die entsprechend *revers*-komplementäre Sequenz durchgeführt.

Da als Leervektor der pSG5-Vektor verwendet wurde (Abb. 47; zur Verfügung gestellt von Prof. F. Grässer; Homburg/Saar), wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI zum Schneiden verwendet.

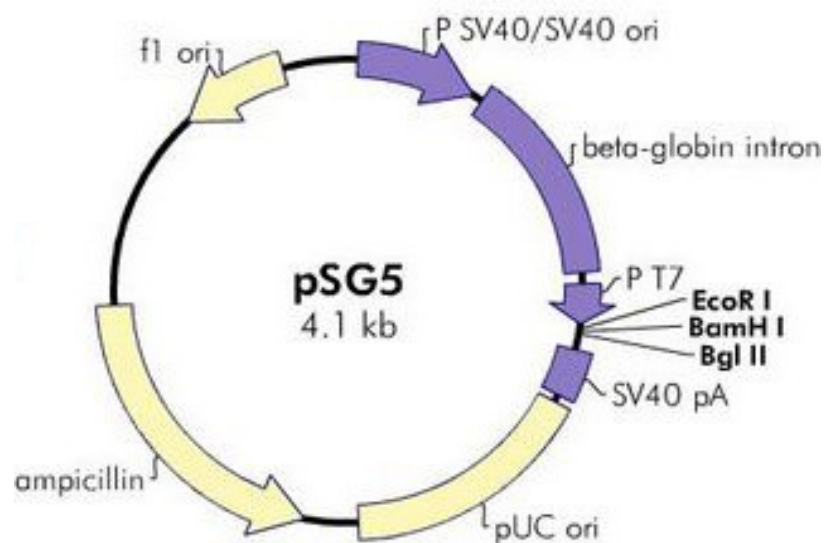


Abb. 47: pSG5-Vektor-Karte (Agilent Genomics; #216201).

Für das Design der PCR-Primer wurde sichergestellt, dass sich in der *precursor*-miRNA-Sequenz mit angehängten Basenpaaren keine EcoRI oder BamHI Schnittsequenz befindet. War dies der Fall, so wurde für den *forward*-Primer die Sequenz der ersten 21 Basen genommen und ein Startcodon ATG an das 5'-Ende angehängt. Davor wurde die EcoRI-Schnittstellensequenz GAATTC gesetzt und davor wiederum die Basen GC angehängt. Zur Generierung des *revers*-Primers wurde die *revers*-komplementäre Sequenz zu den letzten 21 Basen erzeugt und die BamHI-Schnittstellensequenz GGATCC an das 5'-Ende gesetzt. Auch hier wurden zuletzt wieder die Basen GA an das 5'-Ende zugefügt. Mit Hilfe der MOPS-Check Funktion der Eurofins Genomics Website wurde die Qualität der Primer hinsichtlich ihrer Bindungsaffinitäten und Annealingtemperaturen getestet. War diese zufriedenstellend, so wurde mit den designten Primern eine PCR aus humaner genomischer DNA aus THP-Zellen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in einem 1,5%igen Agarose Gel aufgetrennt, mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* Kit aufgereinigt und mit Hilfe des *pGEM®-T Easy Ligation* Kits nach den Angaben des Herstellers in den pGEM-TEasy-Vektor hinein kloniert. Der kompetente Bakterienstamm *E. coli* GT116 (Invivogen, San Diego, CA, USA) wurde mit dem neu klonierten Vektor transformiert. Diese Bakterien wurden ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die Plasmidisolation aus den entsprechenden Bakterienklonen erfolgte unter Nutzung des QIAprep Spin Mini-prep oder des Roche *High Pure Plasmid Isolation* Kits nach den Angaben des Herstellers. Zur Überprüfung, ob die entsprechende miRNA-*precursor*-Sequenz in den Plasmiden enthalten war, wurde der MWG Sequenzierservice genutzt. Wenn die *precursor*-Sequenz entweder in normaler oder in *revers*-komplementärer Richtung ohne Mutation vorhanden war, wurde sowohl der pSG5-, als auch der Insert-enthaltende pGEMTEasy-Vektor mit EcoRI und BamHI doppel-verdaut. Die einzelnen Segmente wurden wieder in einem

Gel aufgetrennt, aufgereinigt und das pre-miRNA-Insert in den pSG5-Vektor ligiert. Mit diesem miRNA-Vektor wurde ebenso verfahren wie mit dem pGEMTeasy-Vektor bis zum Schritt der Sequenzierung.

HuR-Vektor

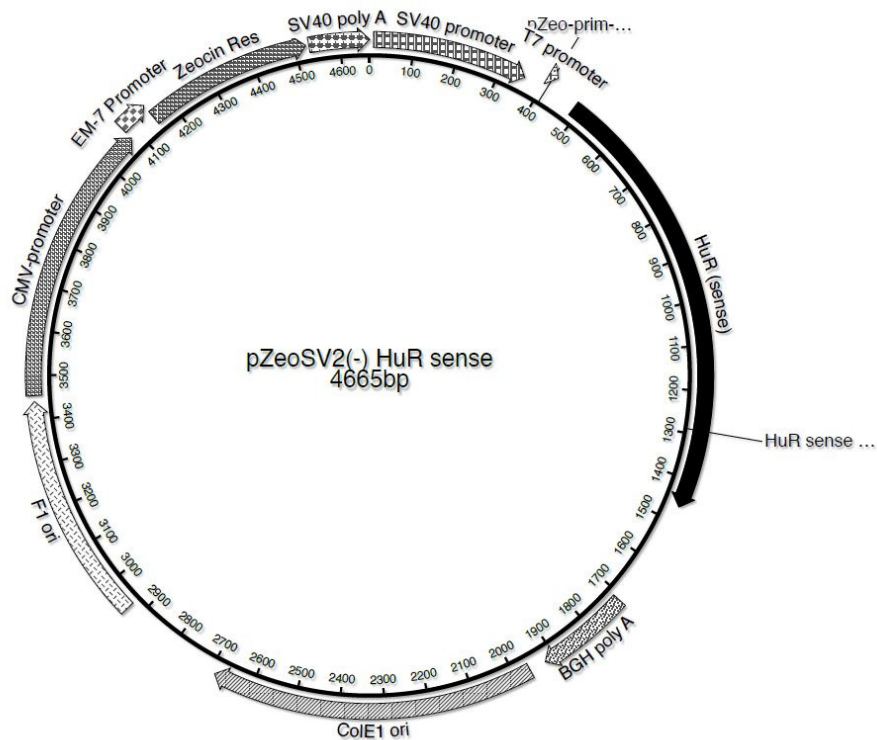


Abb. 48: HuR-Vektor-Karte (pZeoSV2(-) Leervektor von Thermo Fisher Scientific).

Der pZeoSV2-Vektor mit und ohne HuR-Insert wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. H. Kleinert (Institut für Pharmakologie, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz) zur Verfügung gestellt (Abb. 48).

ZFP36-Vektor

Der ZFP36-Vektor (pZeo-hTTP-sense) und der entsprechende Kontrollvektor (pZeo-hTTP-antisense) wurde uns ebenfalls von Prof. Dr. H. Kleinert zur Verfügung gestellt.

Renilla-Luciferase-Vektor

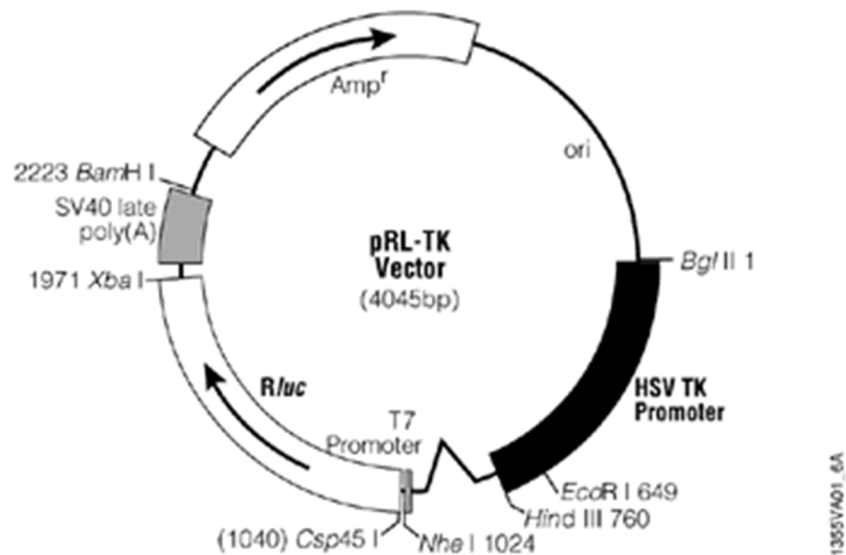


Abb. 49: pRL-TK-Renilla-Luciferase-Vektor-Karte (Promega).

Für den Luciferase-Reportergen-Assay wurde der pRL-TK-Vektor von Prof. Brüne (Frankfurt) (Kuhn et al., 2011) zur Verfügung gestellt (Abb. 49). Der Vektor diente zum Erhalt von Lumineszenzdaten zur Normalisierung der erhaltenen Firefly-Renilla-Daten.

Firefly-Luciferase-Vektor

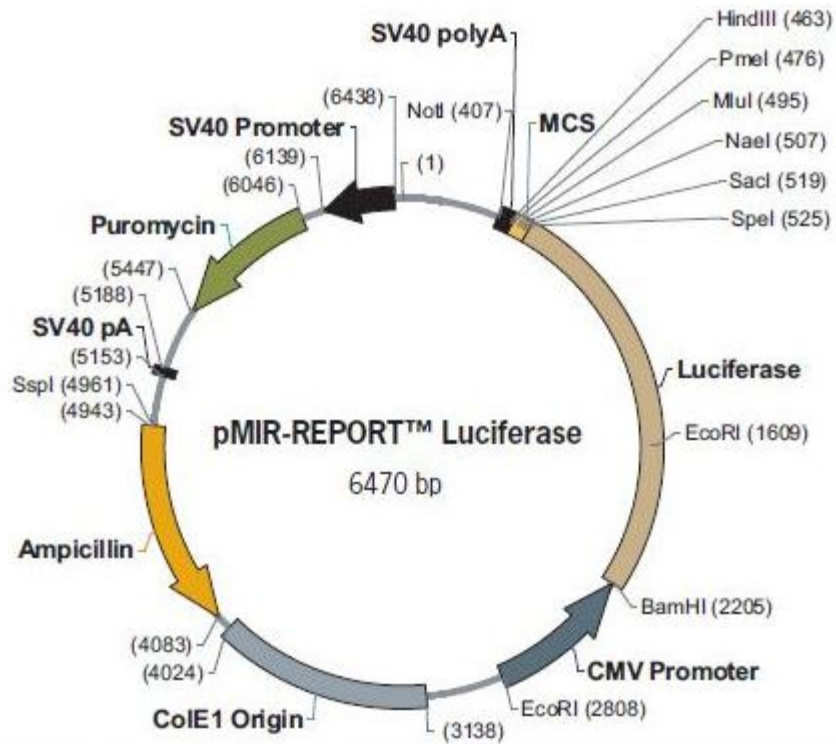


Figure 1. pMIR-REPORT Luciferase

CMV Promoter: 2210–2813
 Firefly luciferase: 540–2210
 MCS: 467–539
 SV40 Poly(A): 404–467
 SV40 Promoter: 6139–6438

Puromycin: 5447–6046
 SV40 pA signal: 5153–5188
 Ampicillin: 4083–4943
 CoIE1 Origin: 3138–4024

Abb. 50: pMIR-REPORT-Firefly-Luciferase-Vektor-Karte (Applied Biosystems).

Der pMIR-REPORT-Luciferase-Vektor wurde mit und ohne humanem GILZ-3'UTR 21-1181-Insert genutzt (Abb. 50) (Eifler, 2009).

Bakterienkultur

Bakterientransformation

50 bis 150 ng der entsprechenden Plasmid-DNA wurden in 100 µl der *E. coli* GT116 Bakteriensuspension pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2 minütigen Hitzeschock bei 42°C und anschließender Inkubation auf Eis für 2 min wurden 900 µl Luria Bertani (LB-) Medium ohne Ampicillin-Zusatz zugegeben. Die Suspension wurde 45 min bis 2 h bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Suspension auf LB_{amp}-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Plasmidisolation und Konzentrationsbestimmung

Die Isolation der Plasmide aus den Übernachtskulturen wurde mit Hilfe des *QIA prep Spin Mini-prep* oder Roche *High Pure Plasmid Isolation Kits* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmidkonzentration wurde mit dem NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) gemessen.

Zell-Transfektion

Transfektion der HUVEC Zellen

HUVEC wurden ausgesät und kultiviert, bis sie 80% Konfluenz erreicht hatten, und dann mit siRNA (1 μM) oder dem TTP-Überexpressionsvektor (50 $\mu\text{g/ml}$) unter Benutzung der Amaxa® Nucleofector® Technologie nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Experimente wurden nach einer Inkubationszeit von 20 h oder 24 h durchgeführt (Hahn et al., 2014).

Transfektion der HEK293T Zellen -Luciferase Reportergen Assay-

Bei den am Tag zuvor in einer 96-well-Platte ausgesäten HEK293T Zellen (20.000 Zellen / Well) wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und danach frisches Medium langsam auf den empfindlichen Zellrasen pipettiert. Die Transfektion erfolgte nach den Angaben des Qiagen PolyFect-Protokolls, herunterskaliert mit dem Faktor 28,235 von einer 6-well-Plattengröße auf eine 96-well-Plattengröße. Jeder Transfektionsansatz enthielt 3 verschiedene Vektoren (Renilla-Luciferase-Vektor, Firefly-Luciferase-Vektor \pm GILZ-3'UTR und ein weiterer Vektor, z.B. miRNA-Vektor, Leervektor, HuR-Vektor, je nach Versuch) im Verhältnis 1/6 zu 1/6 zu 4/6. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h (falls in der Legende nicht anders angegeben) kultiviert. Nach der entsprechenden Transfektionsdauer wurde das Medium wieder vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 5x Lysepuffer (Promega) (1:5 mit H_2O bidest. verdünnt) lysiert. Die Platte wurde bei -80°C bis zur Lumineszenzmessung eingefroren.

Messung der Lumineszenz

Für die Lumineszenzmessung im GloMax Discover (Promega) wurden sowohl für die Firefly-, als auch für die Renilla-Lumineszenzmessung jeweils 5 µl pro Well des auf Eis aufgetauten Lysats in eine weiße 96-Well-Platte (Nunc) pipettiert. Im Gerät selbst wurde während der Messung 50 µl Firefly- (Tab. 4) oder 50 µl Renilla-Puffer (Tab. 3) über eine Pumpe zugesetzt und dann direkt die entsprechende Lumineszenz gemessen.

Tab. 3: Ansatz für den Renilla-Luciferase-Puffer.

NaCl	0,1 M
Tris HCl pH 7,5	25 mM
CaCl (+ 2 H ₂ O)	1 mM

50 µg Coelenterazin (Biotium, 10110) wurden in 1,3 ml Methanol gelöst und zu 100 µl Aliquots bei -80 °C gelagert. Erst kurz vor Gebrauch des Puffers wurden pro 10 ml Puffer 100 µl gelöstes Coelenterazin zugesetzt.

Tab. 4: Ansatz für den Firefly-Luciferase-Puffer.

Tricin	20 mM
MgCO ₃ Mg (OH) ₂ x5H ₂ O	1,07 mM
MgSO ₄ x7H ₂ O	2,67 mM
EDTA	100 µM
DTT	33,3 mM
ATP	530 µM
Coenzym A	0,213 mg / ml
D-Luciferin	470 µM

Der pH wurde auf 7,8 eingestellt und der fertige Puffer in lichtgeschützte Falcons aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zellbehandlung

Silica Nanopartikel

Falls nicht anders angegeben, wurden die im Versuch verwendeten SiNP (S6; mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $96,0 \pm 33,5$ nm in Wasser beziehungsweise $198,4 \pm 68,7$ nm in Medium) in Zellkulturmedium mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) suspendiert und für 10 min in einem Ultraschall-Wasserbad behandelt. Die Inkubationszeiten und Konzentrationen sind in den Legenden der entsprechenden Diagramme angegeben. Sofern in den Legenden nicht anders angegeben, erfolgten zwei kombinierte Behandlungen simultan.

ISS 1018, BCG DNA und Cytochalasin D

Die Behandlungen mit den CpG-Sequenz-enthaltenden Oligonukleotiden ISS 1018, mit BCG DNA isoliert aus dem *Mycobacterium bovis* (mit einem hydrodynamischen Durchmesser in PBS von 268 ± 104 nm) und mit dem Aktin-Polymerisationsinhibitor Cytochalasin D wurden durchgeführt zu den Zeiträumen und Konzentrationen, wie sie in der Legende angegeben sind (Diesel et al., 2013).

TLR-Aktivatoren LPS, Pam₃CSK₄ und PIC

Die TLR-Aktivatoren LPS, Pam₃CSK₄ und PIC wurden nach Herstellerangaben in H₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Die verwendeten Konzentrationen und Behandlungszeiträume in den verschiedenen Experimenten finden sich in der Legende wieder.

Aurintricarboxylic acid

Aurintricarboxylic acid (ATA) ist ein potenter Inhibitor von Protein-Nukleinsäure-Interaktionen. Der zugrunde liegende Mechanismus beruht wahrscheinlich auf einer Konkurrenz um die Bindestelle am Protein zwischen der Nukleinsäure und dem polymeren ATA (Gonzalez et al., 1980). Außerdem ist bekannt, dass ATA die Bindung von miRNAs an AGO2 inhibiert (Tan et al., 2012). ATA wurde zu 7 mg/ml in H₂O gelöst und in der angegebenen Konzentration verwendet.

Curcumin

Curcumin wurde zu 25 mg/ml in DMSO gelöst und lichtgeschützt bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Der Naturstoff wurde, sofern nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 6,25 µM in den Experimenten verwendet.

Actinomycin D und Cycloheximid

Actinomycin D (Act D) wirkt als Transkriptioninhibitor durch Interkalation in die DNA und einer dadurch vermittelten Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (Perry and Kelley, 1970). Act D wurde zu 2 mg/ml in DMSO gelöst, lichtgeschützt gelagert und falls nicht anders angegeben in einer Konzentration von 5 µg/ml in den jeweiligen Experimenten verwendet.

Cycloheximid (CHX) wurde zur Hemmung der Translation eingesetzt. Die verwendungsfertige Lösung mit 100 mg/ml in DMSO wurde bei 4°C gelagert und in einer Konzentration von 5 µg/ml in den Experimenten angewendet.

TNF- α und SB203580

SB203580 (SB) agiert als p38 MAPK Inhibitor. Der Stoff wurde zu 2 mg/ml in DMSO gelöst, bei -20 °C gelagert und, falls nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 10 μ M verwendet. SB wurde als 30-minütige Vorbehandlung zu einer Stimulation mit TNF- α eingesetzt. Die TNF- α -Behandlung erfolgte für den in den Diagrammunterschriften angegebenen Zeitraum mit einer Konzentration von 10 ng/ml.

Quercetin, Hexadecylpyridiniumchlorid und Mitoxantron

Quercetin wurde zu 0,5 mg/ml in Ethanol, Hexadecylpyridiniumchlorid zu 1,0 mg/ml in H₂O und Mitoxantron zu 2,0 mg/ml in DMSO gelöst. Die gelösten Substanzen wurden in den in der Legende angegebenen Konzentrationen verwendet.

RNA-Isolierung und Reverse Transkription

RNA Isolierung

Die Extraktion der gesamten RNA erfolgte entweder unter Nutzung von Qiazol (Qiagen), dem RNeasy mini Kit (Qiagen) oder, wenn miRNAs untersucht werden sollten, unter Verwendung des miRNeasy Kits (Qiagen) unter Beachtung der jeweils vom Hersteller angegebenen Vorschriften. Danach erfolgte der Verdau der verbleibenden DNA mit dem DNA-free Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) oder dem RNase-free DNase Set zur Verwendung auf der Säule, falls die RNA mit Kits isoliert wurde.

Messung der RNA Konzentration

Die Messung der RNA Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm entweder unter Nutzung eines BioMate UV-Vis Spektrometers (ThermoElectron, Oberhausen, Deutschland) oder mit Hilfe eines NanoDrop LITE Spectrophotometers (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts).

Alu PCR

Um den Verdau der DNA in den RNA-Proben zu bestätigen, wurde eine PCR auf Alu Elemente, die sehr häufig im humanen Genom zu finden sind, durchgeführt. Dazu wurde folgender Primer verwendet: 5'-TCATGTCGACGCGAGACTCCATCTCAAA-3'.

Tab. 5: Reaktionsansatz für eine Alu PCR.

<i>Taq</i> -Polymerase	2,5 U
dNTPs	800 μ M
10 x <i>Taq</i> -Puffer	2,5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	5 mM
Primer (50 μ M)	100 nM
Template	100 ng RNA
H ₂ O	Ad 25 μ l

5 ng THP-1 DNA wurde als Positivkontrolle verwendet. Durchgeführt wurde die PCR in einem T100 Thermal Cycler (Biorad) unter den folgenden Bedingungen:

Denaturierung	5 min 94 °C	
Denaturierung	1 min 94 °C	} 30 Zyklen
Annealing	1 min 56 °C	
Elongation	1 min 72 °C	
Finale Elongation	10 min 72 °C	

Die PCR-Produkte wurden mit der Agarose Gelelektrophorese detektiert. Die RNA war DNA-frei, wenn keine Produkte sichtbar waren.

Reverse Transkription

Im Anschluss erfolgte die reverse Transkription von 250 bis 1.000 ng RNA mit Hilfe des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und RNase OUT (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die so erhaltene cDNA in einem Volumen von 20 µl wurde auf insgesamt 100 µl mit TE-Puffer verdünnt. In dem Fall, dass miRNA umgeschrieben werden sollte, wurde das miScript II RT Kit (Qiagen) verwendet unter Nutzung des HighSpec Buffers in einem Gesamtvolumen von 20 µl nach Angaben des Herstellers. Die erhaltene cDNA wurde mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt.

Real-time RT-PCR

Primer- und Sonden-Sequenzen

Tab. 6: Primersequenzen, Primervolumen und Annealingtemperatur für Real-time RT-PCR.

mRNA	Primer forward 5' → 3' Primer revers 3' → 5'	Primervolumen aus 10 µM Stock [µl]	Annealing- temperatur [°C]
<i>ACTB</i>	TGC GTG ACA TTA AGG AGA AG GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT	0,4	60
<i>ACTB für IP</i>	CCC CGC GAG CAC AGA G TAT CAT CAT CCA TGG TGA GCT GG	0,6	61
<i>Ppia</i>	GGC CGA TGA CGA GCC C TGT CTT TGG AAC TTT GTC TGC	0,25	60
<i>TNF</i>	CTC CAC CCA TGT GCT CCT CA CTC TGG CAG GGG CTC TTG AT	0,4	60
<i>CXCL10</i>	GAG CCT ACA GCA GAG GAA CC AAG GCA GCA AAT CAG AAT CG	0,25	60
<i>IL10</i>	CAA CAG AAG CTT CCA TTC CA AGC AGT TAG GAA GCC CCA AG	0,25	60
<i>GILZ</i>	CAT GTG GTT TCC GTT AAG CTG G AGG ATC TCC ACC TCC TCT CTC	0,4	60
<i>GILZ für IP</i>	GTT AAG CTG GAC AAC AGT GCC T TTC TCC ACC AGC TCT CGG AT	0,4	63
<i>Gilz</i>	GGG ATG TGG TTT CCG TTA AAC TGG A TGC TCA ATC TTG TTG TCT AGG GCC A	0,4	61
<i>ZFP36</i>	TCG CCA CCC CAA ATA CAA TTC GCT AGG GTT GTG GAT	0,5	60
<i>ELAVL1</i>	GGT GAC ATC GGG AGA ACG AA CCA AGC TGT GTC CTG CTA CT	0,5	58

<i>Firefly Luciferase</i>	TCG ATT CCA ATT CAG CGG GG ACT GGG ACG AAG ACG AAC AC	0,5	59
<i>Renilla Luciferase</i>	GAT AAC TGG TCC GCA GTG GT GAA GAG GCC GCG TTA CCA T	0,4	59
<i>GAPDH</i> für IP	TTC GAC AGT CAG CCG CAT CT GCC CAA TAC GAC CAA ATC CGT T	0,4	63
<i>CCNB1</i> für IP	ATG GTG AAT GGA CAC CAA CTC T CAT TCT TAG CCA GGT GCT GC	0,5	60
<i>TLR2</i>	GGA GTT CTC CCA GTG TTT GGT GCA GTG AAA GAG CAA TGG GC	0,3	65
<i>ICAM</i>	GAA GTG GCC CTC CAT AGA CA TCA AGG GTT GGG GTC AGT AG	0,25	58
<i>VCAM</i>	CGA GAC CAC CCC AGA ATC TA CTG TGG TGC TGC AAG TCA AT	0,25	58
<i>SELE</i>	AGC CCA GAG CCT TCA GTG TA CCC TGC ATG TCA CAG CTT TA	0,25	58

Tab. 7: Sondensequenzen und Konzentrationsangaben für Sonde, dNTPs und MgCl₂ für Real-time RT-PCR.

mRNA	Sonde, 5' FAM → 3' BHQ1	Sonde [pmol]	dNTPs [μM]	MgCl ₂ [mM]
<i>ICAM</i>	AAC ACA AAG GCC CAC ACT TC	2,5	200	3
<i>VCAM</i>	GCT CAG ATT GGT GAC TCC GT	2,5	200	4
<i>SELE</i>	CAT CTG GGA ATT GGG ACA AC	1,5	200	4
<i>CXCL10</i>	TCC AGT CTC AGC ACC ATG AAT CAA A	1,5	200	4
<i>IL10</i>	AGC CTG ACC ACG CTT TCT AGC TGT TGA G	2,5	200	4
<i>Ppia</i>	TGG GCC GCG TCT CCT TCG A	1,5	125	3

Standard Verdünnungsreihen

Bei jedem Real-time RT-PCR Lauf wurden entweder in pGEM-T Easy klonierte PCR-Produkte als Standards von 200 bis 0,0002 Attomol pro Ansatz oder eine aus cDNA hergestellte Verdünnungsreihe von 100% bis 0,16% in 1:5 Verdünnungsschritten auf der Platte mitgeführt, um eine Standardkurve zur Überprüfung der Effizienz zu erhalten und die Target mRNA in den Proben zu quantifizieren.

Die benötigte Menge an Plasmid wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$c \text{ (Target-DNA) } [\mu\text{mol/ml}] = c \text{ (Plasmid-DNA) } [\mu\text{g/ml}] / \text{MW} * L$$

mit MW = Molekulargewicht der DNA (ungefähr 660 g/mol) und L = Länge des Plasmids plus Insert in Basenpaaren (bp).

Real-time RT-PCR Temperaturprofil mit EvaGreen

Denaturierung	95 °C, 15 min
Denaturierung	95 °C, 20 sec
Annealing	55 °C – 65 °C, 20 sec
Elongation	72 °C, 20 sec
finale Elongation	95 °C, 10 sec

Real-time RT-PCR Reaktionsansatz mit EvaGreen

Ein Reaktionsansatz für eine Probe enthält folgende Bestandteile:

EvaGreen	4,0 µl
Primer forward	siehe Tabelle
Primer revers	siehe Tabelle
H ₂ O	ad 16 µl

Real-time RT-PCR Temperaturprofil mit Sonde

Denaturierung	95 °C, 8 min
Denaturierung	95 °C, 15 sec
Annealing	55 °C – 65 °C, 15 sec
Elongation	72 °C, 15 sec
finale Elongation	25 °C, 30 sec

Real-time RT-PCR mit Sonden

Ein Reaktionsansatz für eine Probe enthält folgende Bestandteile:

<i>Taq</i> -Polymerase	2,5 U
10 x <i>Taq</i> -Puffer	2,5 µl
dNTPs	siehe Tabelle
Primer forward	500 nM
Primer revers	500 nM
Sonde	siehe Tabelle
MgCl ₂	siehe Tabelle
Template	5 µl
H ₂ O	ad 25 µl

HuR-Immunopräzipitation mit magnetischen Beads

Präparation der Beads

Die SureBeads Magnetic Beads (BioRad) wurden in dem Puffer, in dem sie geliefert wurden, resuspendiert und 100 µl davon in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Gefäße wurden in den dafür vorgesehenen magnetischen Halter (BioRad) gestellt, die Beads magnetisiert und der Überstand entfernt. Die Beads wurden mit 1 ml PBST, hergestellt mit DEPC-H₂O und 0,1% Tween 20 und angereichert mit Proteinase-Inhibitor und RNaseOUT (Tab. 8), gewaschen, d.h. durch Vortexen resuspendiert, anschließend mit Hilfe einer Tischzentrifuge zentrifugiert, wieder magnetisiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt.

Tab. 8: Ansatz für 7 ml PBST zur Immunopräzipitation.

PBST	5,95 ml
Protease-Inhibitor (Complete ® Roche) (1 Tablette gelöst in 1 ml DEPC H ₂ O)	1,05 ml
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl; Invitrogen)	17,5 µl

Nach dem Waschen wurden 5 µg der entsprechenden Antikörperlösungen (Tab. 9 und 10) mit einem Gesamtvolumen von 200 µl zu den Beads gegeben und diese darin wieder resuspendiert.

Tab. 9: Ansatz für 200 μ l einer Antikörperlösung Anti-HuR.

Anti-HuR Antikörper (Santa Cruz; 3A2 sc-5261; 200 μ g/ml)	25 μ l
NaCl Lösung 150 nM in DEPC-H ₂ O	175 μ l

Tab. 10: Ansatz für 200 μ l einer Antikörperlösung Anti-IgG.

Anti-IgG (Sigma; I5381 IgG from mouse serum; 1 μ g/ μ l)	5 μ l
NaCl Lösung 150 nM in DEPC-H ₂ O	195 μ l

In diesen Antikörperlösungen wurden die magnetischen Beads 10 min bei Raumtemperatur unter Rotation (CMK 3100; Labortechnik Fröbel GmbH; Stufe 1) inkubiert. Danach wurden die Beads wieder durch Magnetisierung von der Antikörperlösung befreit und wie beschrieben drei Mal mit PBST gewaschen.

Lyse der Zellen

Für die HuR-Immunopräzipitation wurden U937 Suspensionszellen verwendet. Für vier Proben wurden insgesamt 45 Millionen Zellen in Medium in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 500 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS (hergestellt mit DEPC-H₂O) gewaschen. Die Suspension wurde kurz gevortext und dann wieder bei 4°C und 500 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 2 ml RIPA-Puffer (Tab. 11) resuspendiert und bei 4°C und 16.000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend verworfen. Der Überstand wurde weiterverwendet.

Tab. 11: Ansatz für den RIPA-Puffer in DEPC-H₂O.

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Nonidet P-40	1%
Natriumdesoxycholat	0,5%
SDS	0,05%
EDTA	1 mM
NaCl	150 mM

Für den verwendungsfertigen Puffer wurden zu 2,55 ml RIPA-Puffer noch 450 µl Protease-Inhibitor (Complete ® Roche; 1 Tablette gelöst in 1 ml DEPC H₂O) und 7,5 µl RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl; Invitrogen) hinzugefügt.

Immunopräzipitation

In jedes Eppendorfgefäß mit den zuvor vorbereiteten Beads wurden 500 µl des Zellüberstandes zupipettiert und dann 1 h bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert (Stufe 1). Im Anschluss wurden die Beads wieder magnetisiert und der Überstand verworfen. Es folgte wieder der dreifache Waschschrift mit PBST. Vor der letzten Magnetisierung der Beads wurde die Suspension in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Dann wurde wieder magnetisiert, der Überstand verworfen, kurz zentrifugiert, wieder magnetisiert und der restliche Puffer im Gefäß entfernt.

Elution der Proteine von den Beads

Zu den Beads wurden 40 µl 1x Laemmli Puffer (Tab. 12) zugegeben und die Suspension für 10 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert. Zur endgültigen Entfernung der magnetischen Beads wurde jede Probe nochmals magnetisiert und der Puffer mit den eluierten Proteinen in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

Tab. 12: Ansatz für den Laemmli Puffer.

β-Mercaptoethanol	0,1%
Bromphenolblau	0,0005%
Glycerol	10%
SDS	2%
Tris-Hcl	63 mM
H ₂ O	ad 100%

Alternativ: Elution der mRNA von den Beads

Die magnetischen Beads wurden in 0,5 ml Qiazol resuspendiert und für mindestens 1 h bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Proben mit 0,1 ml Chloroform versetzt, für 10 sek gevortext und anschließend bei 4 °C und 16.000 x *g* für 10 min zentrifugiert. In vorbereiteten Eppendorfgefäßen mit jeweils 600 µl Isopropanol, 60 µl Ammoniumacetat (Sigma Aldrich, 09691, 5 M) und 6 µl linearem Acrylamid (Ambion, 5 mg/ml) wurde die obere wässrige Phase der Proben hineinpipettiert. Diese Mischung wurde wieder gevortext und die RNA wurde über Nacht bei -80 °C präzipitiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben wieder auf Eis aufgetaut und bei 4 °C und 16.000 x *g* für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und

mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Darauf folgte wieder ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 16.000 x *g* für 10 min. Im Anschluss wurde der Überstand ganz vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei 55°C im Heizblock getrocknet. Nach der Trocknung erfolgte die Wiederaufnahme in 20 µl DEPC-H₂O für 10 min bei 55°C unter gelegentlichem Schnippen. Die gelöste Probe konnte nun bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren werden. Aufgrund der geringen Konzentrationen an RNA konnte keine Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden. Die reverse Transkription wurde mit 10 µl RNA von jeder Probe durchgeführt. Für die Messung der cDNA in der Real-time RT-PCR wurden die Proben 1:1 mit TE-Puffer verdünnt. Da die hier verwendeten Primer nicht an genomische DNA binden konnten, entfiel die Notwendigkeit eines DNase-Verdau.

Northern Blot

Die Methode wurde von Frau Menegatti im Institut für Virologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Grässer am Universitätsklinikum des Saarlandes durchgeführt (Hart et al., 2016). Die RNA-Proben (mindestens 20 µg in höchstens 30 µl Volumen) aus behandelten MΦs wurden mit RNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und in die Taschen eines 12%igen Harnstoff-Polyacrylamidgels pipettiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte für 2,5 bis 3 h bei 20 W. Danach wurde das Gel zur Ladekontrolle in einem Ethidiumbromidbad gefärbt (100 ml 1xTBE-Puffer mit 10 µl EtBr [10 µg/ml]) und anschließend die RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) für 30 bis 45 min bei 15 V geblottet. Das darauffolgende chemische Crosslinken erfolgte für 1 h bei 55°C. Die Nylonmembran wurde in einem Hybridisierungspuffer mit einer passend zur untersuchenden miRNA hergestellten RNA-Sonde und radioaktivem UTP³² über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran gewaschen und auf einem Phosphorscreen über Nacht exponiert. Am dritten Tag erfolgte die Entwicklung der Membran mit dem Typhoon Scanner.

Rac-1 Aktivitäts Assay / *pulldown* Assay

Der Mechanismus dieses Assays beruht darauf, dass aktives Rac1 an die p21-Bindedomäne (PBD) des Rac1-Targets p21-aktivierte Kinase 1 bindet. Des Weiteren ist diese Bindedomäne an die Glutathion S-Transferase (GST) gebunden. So wird also in diesem Assay ein Komplex aus GST-PBD gebunden an aktiviertes Rac1 (Rac1-GTP) präzipitiert (Diesel et al., 2013). Der Rac1 *pulldown* Assay wurde mit THP-1 Makrophagen durchgeführt (zu 1×10^6 in 1 ml Medium pro Well einer 6-Well-Platte). Die Zellen wurden entweder mit Pam₃CSK₄, ISS oder BCG DNA für drei beziehungsweise acht Minuten behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach der Behandlung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in ihrer Platte sofort auf Eis gestellt. Die Zellen wurden einmal mit 2 ml eiskaltem PBS (Tab. 13) gewaschen und anschließend in 120 µl PBD-Puffer (Abb. 14) respektive GTPγS-Puffer (Abb. 15; eine Probe als Positivkontrolle) lysiert. Dabei wurden die Makrophagen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und samt Puffer in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend 15 min lang bei 4°C unter Rotation inkubiert und danach 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Je 5 µl des überstehenden Lysats wurden für einen Bradford Assay entnommen (siehe Bradford Assay). Von jedem Überstand wurde dann ein Volumen entnommen, welches 200 µg Protein entsprach und mit Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Von diesen Proben wurde jeweils 5 µl entnommen, was später im Western Blot den Banden des gesamten Rac1 entspricht. Zu den verbleibenden Volumina von 195 µl wurden 15 µl GST-PBD-Beads (siehe Herstellung der GST-PBD-Beads) zugegeben und 1 h bei 4°C langsam rotiert. Im Anschluss daran wurden die Proben bei 8000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml PBD-Puffer, beziehungsweise die

Positivkontrolle mit GTPγS-Puffer gewaschen. Dieser Waschschrift erfolgt vier bis fünfmal. Am Ende wurde das Pellet, sowie die 5 µl Proben gesamtes Rac1 in 10 µl Roti® Load (Roth; K930.1) resuspendiert und bei -80°C eingefroren bis zur Verwendung im Western Blot.

Bradford Assay

4 ml 5x Bradford Reagent (Biorad) wurden mit 16 ml Wasser verdünnt. Eine Bovin Serum Albumin (BSA) Standard Verdünnungsreihe (mit 30, 25, 20, 15, 10, 7,5, 5, 2,5, und 0 µg/ml) wurde in Triplikaten mit 10 µl / Well in eine 96-Well-Platte pipettiert. Von den Proben-Lysaten wurden je 5 µl entnommen und in 45 µl Wasser verdünnt. Von diesen verdünnten Proben wurden ebenfalls 10 µl in Triplikaten pipettiert. In jedes Well mit Proben oder Standard-Verdünnungsreihe wurde anschließend 190 µl verdünntes Bradford-Reagenz zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Absorption in einem Photometer gemessen und mit Hilfe der Standard-BSA-Verdünnungsreihe das Volumen für 200 µg Protein aus den zu vermessenden Proben berechnet.

Herstellung der GST-PBD-Beads

Die Herstellung basiert auf der Methode nach Robert Fürst (LMU-München). Vier Liter LB-Medium (25g LB-Pulver in 1l destilliertem Wasser) und acht 500 ml Kolben, sowie zwei 250 ml Kolben wurden autoklaviert. Zur Herstellung der Beads wurden Glutathione-Sepharose-Beads (17-0756-01; Healthcare) bezogen.

An Tag 1 der Herstellung wurden die beiden 250 ml Kolben mit jeweils 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) befüllt und mit jeweils 100 µl einer BL21-PBD *E.coli* Bakteriensuspension angeimpft. Die Suspension wurde über Nacht bei 37°C

unter Schütteln bei 150 rpm inkubiert. An Tag 2 der Herstellung wurden die acht 500 ml Kolben mit jeweils 475 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) befüllt. Zu jedem Kolben wurden zusätzlich 25 ml der Über-Nacht-Bakterienkultur zugegeben. Diese Suspension wurde unter Schütteln bei 150 rpm und 37°C inkubiert und alle 2 h die OD gemessen. Sobald diese bei einem Wert von >0,6 lag, wurden die Kolben mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4°C gelagert. Falls die gewünschte OD nicht erreicht wurde, wurden die Kolben am 3. Tag der Herstellung ohne Parafilm erneut inkubiert bis zu einer OD >0,6. Dann wurde zu jedem Ansatz 150 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; 1,0 M) zugegeben. Die Suspension wurde wieder 3 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension in 50 ml Falcons aufgeteilt und bei 4°C und 4300 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Überstände über den Pellets wurden entfernt, alle Pellets in insgesamt 40 ml Lysepuffer (Tab. 16) resuspendiert und die Suspension bei -80°C eingefroren. Am 4. Tag wurden die Bakterienpellet-Lysate auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurden die Glutathione-Sepharose-Beads in ein 50 ml Falcon überführt und 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Die Beads wurden dreimal mit 10 ml Waschpuffer (Tab. 17; ohne PMSF-Zusatz) und zwischen den Waschrufen jeweils für 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Die aufgetauten Bakterienpellet-Lysate wurden dreimal für 20 sec mit dem Ultraschallstab homogenisiert und im Anschluss 10 min bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert. Von dem so entstandenen Überstand (ÜS1) wurden 10 µl entnommen und bei -80°C eingefroren. Der restliche Überstand wurde in ein frisches Falcon überführt und 2,5 ml der reinen Beads zugegeben. Diese Mischung wurde für 2 h unter Rotation bei 4°C inkubiert und anschließend 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Von dem so erhaltenen Überstand (ÜS2) wurden ebenfalls 10 µl entnommen und bei -80°C eingefroren. Der restliche Überstand wurde entfernt und die Beads fünfmal mit jeweils 10 ml Waschpuffer (mit PMSF-Zusatz) gewaschen. Die

Zentrifugationsschritte erfolgten weiterhin für 5 min bei 4°C und 1000 rpm. Nach dem zweiten Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde vom Überstand (ÜS3) wieder 10 µl entnommen und eingefroren. Nach dem letzten Wasch- und Zentrifugationsschritt wurden die Beads in 2,5 ml Waschpuffer (mit PMSF-Zusatz) resuspendiert. Auch davon wurden 10 µl Probe (resuspendierte Beads) entnommen und bei -80°C eingefroren. Die restlichen Beads in Waschpuffer wurden zu 200 µl-Volumina aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Am fünften Tag wurden die gesammelten Proben ÜS1, ÜS2, ÜS3 und die resuspendierten Beads auf Eis aufgetaut und zu jeder Probe 10 µl Roti Load zugegeben, gemischt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Alle Proben wurden mit der Tischzentrifuge zentrifugiert, auf Eis gelagert und in die Geltaschen eines 12%igen Polyacrylamidgels pipettiert. Im Anschluss wurde ein Western Blot performt. Das Gel wurde 1 h in Coomassie-Färbelösung (Tab. 18) eingelegt und anschließend in der Entfärbelösung (Tab. 19) solange inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Alle 30 min wurde die Entfärbelösung gewechselt. Auf dem entfärbten Gel konnte man bei der Beads-Probe zwischen 43 und 34 kD eine klare Bande ohne Verunreinigung für GST-PBD erkennen.

Tab. 13: Ansatz für PBS-Puffer.

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24
H ₂ O	ad 1000 ml (einstellen auf pH 7,4)

Tab. 14: Ansatz für PBD-Puffer.

Tris pH 8,0	25 mM
DTT	1 mM
MgCl ₂	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	0,5 mM
Triton-X-100	1% final
Protease-Inhibitor (Complete ® Roche) (1 Tablette gelöst in 1 ml DEPC H ₂ O)	0,1%

Tab. 15: Ansatz für GTPyS-Puffer.

Tris pH 8,0	25 mM
DTT	1 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
Triton-X-100	1%
Protease-Inhibitor (Complete ® Roche) (1 Tablette gelöst in 1 ml DEPC H ₂ O)	0,1%

Tab. 16: Ansatz für Lysepuffer für Bakterienpellet.

Tris Base	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM (frisch zugeben)
Leupeptin	1 µg/ml
Aproptinin	10 µg/ml
H ₂ O bidest.	ad 100 ml (pH auf 7,5 einstellen)

Tab. 17: Ansatz für Waschpuffer.

Tris Base	50 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	0,1 mM
EDTA	1 mM
PMSF	0,1 mM (frisch zugeben)
H ₂ O bidest.	ad 500 ml

Tab. 18: Ansatz für eine Coomassie-Färbelösung.

Eisessig	100 ml
Methanol	500 ml
Coomassie Blue	1 g (0,1%)
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

Tab. 19: Ansatz für eine Entfärbelösung.

Eisessig	70 ml
Methanol	350 ml
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

SDS-PAGE und Western Blot

Die (falls nicht anders angegeben) mit SB Lysepuffer (Tab. 20) versetzten Proben wurden für 10 min bei 95°C inkubiert und komplett in die Geltaschen der 12%igen Polyacrylamidgele hinein pipettiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon FL-PVDF Membran (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) transferiert. Die Membranen wurden in Blocking Buffer (RBB) bei Raumtemperatur für 1 h geblockt. Anschließend wurden die Membranen in einer Primärantikörperlösung in RBB inkubiert (Tab. 21), entweder für 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Darauf folgte nach einigen Waschsritten eine Inkubation für 1,5 h mit einer IR-Sonde-konjugierten Sekundärantikörperlösung in RBB bei Raumtemperatur. Nach weiteren Waschsritten wurden die Membranen mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging Systems (LI-COR Biosciences) gescannt und die relativen Proteinmengen mit der dazugehörigen Odyssey Software oder mit dem Programm ImageJ bestimmt.

Tab. 20: Ansatz für SB Lysepuffer.

Tris pH 6,8	50 mM
SDS	1% [m/v]
Glycerol	10% [v/v]
β -Mercaptoethanol	5%
Bomphenolblau	0,004% [m/v]

Dem Puffer wurde desweiteren Complete® Protease Inhibitor (Roche) nach Angaben des Herstellers zugesetzt. Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tab. 21: Verdünnungen und Inkubationszeiten von Antikörperlösungen.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Inkubation
Anti-human Rac1 Maus IgG Antikörper (Millipore; USA; Klon 23A8)	1:500 in RBB	3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C
Anti-GILZ (Sigma; polyclonal rabbit anti-GILZ Ab, SAB1101125)	1:1.000 in RBB	über Nacht bei 4 °C
Anti-ZFP36 (Anti-TTP; T5327 Sigma)	1:500 in RBB	über Nacht bei 4 °C
Anti-Tubulin (T9026 Sigma)	1:1.000 in RBB	über Nacht bei 4 °C
Anti-IgG (I5381 Sigma)	Siehe IP	
Anti-HuR (3A2; sc-5261 Santa Cruz)	1:1.000 in PBST + 5% Milchpulver	über Nacht bei 4 °C

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Inkubation
IRDye © 800CW conjugated goat anti-mouse IgG (LI-COR Biosciences)	1:10.000 in RBB	1,5 h bei RT
IRDye © 680 conjugated mouse anti-rabbit IgG (LI-COR Biosciences)	1:5.000 in RBB	1,5 h bei RT

Statistik

Mittelwerte und Standardfehler (SEM) wurden aus allen Daten des entsprechenden Experiments berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Daten wurden mittels t-Test oder ANOVA mit anschließendem Bonferroni Test im Fall von normalverteilten Daten oder Mann Whitney Test im Fall von nicht normalverteilten Daten berechnet und als * mit $p < 0,05$; ** mit $p < 0,01$ und *** mit $p < 0,001$ angegeben.

Referenzen

- Abdelmohsen, K. and Gorospe, M. (2010) Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA*, 1, 214.
- Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Kim Hyeon, H. and Gorospe, M. (2008) Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biological Chemistry*, Vol. 389, p. 243.
- Aderem, A. and Ulevitch, R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406, 782.
- Aggarwal, B.B., Gupta, S.C. and Sung, B. (2013) Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *British Journal of Pharmacology*, 169, 1672.
- Aggarwal, B.B. and Sung, B. (2009) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 85.
- Aggarwal, S., Ichikawa, H., Takada, Y., Sandur, S.K., Shishodia, S. and Aggarwal, B.B. (2006) Curcumin (Diferuloylmethane) Down-Regulates Expression of Cell Proliferation and Antiapoptotic and Metastatic Gene Products through Suppression of I κ B-Kinase and Akt Activation. *Molecular Pharmacology*, 69, 195-206.
- Aizer, A., Kalo, A., Kafri, P., Shraga, A., Ben-Yishay, R., Jacob, A., Kinor, N. and Shav-Tal, Y. (2014) Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. *Journal of Cell Science*, 127, 4443-4456.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4, 499.
- Albrecht, C., Höhr, D., Haberzettl, P., Becker, A., Borm, P.J.A. and Schins, R.P.F. (2007) Surface-Dependent Quartz Uptake by Macrophages: Potential Role in Pulmonary Inflammation and Lung Clearance. *Inhalation Toxicology*, 19, 39.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. and Flavell, R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732.
- Ameres, S.L. and Zamore, P.D. (2013) Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 475.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A. and Aggarwal, B.B. (2007) Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*, 4, 807.
- Antony, B., Merina, B., Iyer, V.S., Judy, N., Lennertz, K. and Joyal, S. (2008) A Pilot Cross-Over Study to Evaluate Human Oral Bioavailability of BCM-95[®]CG (Biocurcumax[™]), A Novel Bioenhanced Preparation of Curcumin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 445.
- Aoyagi, S. and Archer, T.K. (2011) Differential Glucocorticoid Receptor-mediated Transcription Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 4610-4619.
- Arbibe, L., Mira, J.-P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P.J., Ulevitch, R.J. and Knaus, U.G. (2000) Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol*, 1, 533.
- Asselin-Labat, M.-L., David, M., Biola-Vidamment, A., Lecoecue, D., Zennaro, M.-C., Bertoglio, J. and Pallardy, M. (2004) GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood*, 104, 215-223.
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmborg, A. and Karin, M. (1995) Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF- κ B Activity Through Induction of I β B Synthesis. *Science*, 270, 286-290.
- Ayroldi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D'Adamio, F. and Riccardi, C. (2001) Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappa B. *Blood*, 98, 743-753.
- Ayroldi, E., Petrillo, M.G., Bastianelli, A., Marchetti, M.C., Ronchetti, S., Nocentini, G., Ricciotti, L., Cannarile, L. and Riccardi, C. (2014) L-GILZ binds p53 and MDM2 and suppresses tumor growth through p53 activation in human cancer cells. *Cell Death Differ*, 22, 118.

- Ayroldi, E. and Riccardi, C. (2009) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB Journal*, 23, 3649-3658.
- Ayroldi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R. and Riccardi, C. (2007) GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 1605.
- Ayroldi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C. and Riccardi, C. (2002) Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Inhibits the Raf-Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Binding to Raf-1. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 7929-7941.
- Barreau, C., Paillard, L. and Osborne, H.B. (2005) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Research*, 33, 7138.
- Bauer, S., Kirschning, C.J., HÄxcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G.B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 9237-9242.
- Bazzoni, F., Rossato, M., Fabbri, M., Gaudiosi, D., Mirolo, M., Mori, L., Tamassia, N., Mantovani, A., Cassatella, M.A. and Locati, M. (2009) Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 5282-5287.
- Beaulieu, E. and Morand, E.F. (2011) Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 7, 340.
- Berrebi, D., Bruscoli, S., Cohen, N., Foussat, A., Migliorati, G., Bouchet-Delbos, L., Maillot, M.-C., Portier, A., Couderc, J., Galanaud, P., Peuchmaur, M., Riccardi, C. and Emilie, D. (2003) Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood*, 101, 729-738.
- Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430, 257.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I. and Filipowicz, W. (2006) Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress. *Cell*, 125, 1111.
- Biswas, C., Rao, S., Slade, K., Hyman, D., Dersh, D., Mantegazza, A., Argon, Y., Marks, M. and Edward, B. (2015) The N-terminal Box 1 Tyrosine in the TIR Domain of TLR9 is Critical for Endoplasmic Reticulum Egress and Maturation of the Receptor. *The FASEB Journal*, 29.
- Blankenberg, S., Barboux, S. and Tiret, L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170, 191.
- Blasius, A.L. and Beutler, B. (2010) Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*, 32, 305.
- Bokoch, G.M. (2005) Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends in Cell Biology*, 15, 163.
- Bokoch, G.M. and Knaus, U.G. (2003) NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 502.
- Boldin, M.P. and Baltimore, D. (2012) MicroRNAs, new effectors and regulators of NF- κ B. *Immunological Reviews*, 246, 205.
- Bolshakova, A., Magnusson, K.-E., Pinaev, G. and Petukhova, O. (2015) EGF-induced dynamics of NF- κ B and F-actin in A431 cells spread on fibronectin. *Histochemistry and Cell Biology*, 144, 223-235.
- Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., Marques, R., Asselin-Paturel, C., Pereira, J.o.P., Bates, E.E.M., Akira, S., Vieira, P., Liu, Y.-J., Trinchieri, G. and O'Garra, A. (2006) Macrophages and Myeloid Dendritic Cells, but Not Plasmacytoid Dendritic Cells, Produce IL-10 in Response to MyD88- and TRIF-Dependent TLR Signals, and TLR-Independent Signals. *The Journal of Immunology*, 177, 7551-7558.
- Braun, J.E., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2012) A Molecular Link between miRISCs and Deadenylases Provides New Insight into the Mechanism of Gene Silencing by MicroRNAs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4.

- Brooks, S.A. and Blackshear, P.J. (2013) Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829, 666.
- Brown, S., Kamal, M., Nasreen, N., Baumuratov, A., Sharma, P., Antony, V. and Moudgil, B. (2007) Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity. *Advanced Powder Technology*, 18, 69-79.
- Bruscoli, S., Biagioli, M., Sorcini, D., Frammartino, T., Cimino, M., Sportoletti, P., Mazzon, E., Bereshchenko, O. and Riccardi, C. (2015) Lack of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) deregulates B-cell survival and results in B-cell lymphocytosis in mice. *Blood*, 126, 1790-1801.
- Bruscoli, S., Donato, V., Velardi, E., Di Sante, M., Migliorati, G., Donato, R. and Riccardi, C. (2010) Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) and Long GILZ Inhibit Myogenic Differentiation and Mediate Anti-myogenic Effects of Glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 10385-10396.
- Cannarile, L., Cuzzocrea, S., Santucci, L., Agostini, M., Mazzon, E., Esposito, E., Mui , C., Coppo, M., Di Paola, R. and Riccardi, C. (2009) Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Is Protective in Th1-Mediated Models of Colitis. *Gastroenterology*, 136, 530.
- Cannarile, L., Fallarino, F., Agostini, M., Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Vacca, C., Genovese, T., Migliorati, G., Ayroldi, E. and Riccardi, C. (2006) Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines. *Blood*, 107, 1039-1047.
- Cannarile, L., Zollo, O., D'Adamio, F., Ayroldi, E., Marchetti, C., Tabilio, A., Bruscoli, S. and Riccardi, C. (2001) Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death Differ*, 8, 201-203.
- Carpenter, S., Ricci, E.P., Mercier, B.C., Moore, M.J. and Fitzgerald, K.A. (2014) Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 14, 361.
- Castellano, F., Montcourrier, P. and Chavrier, P. (2000) Membrane recruitment of Rac1 triggers phagocytosis. *Journal of Cell Science*, 113, 2955.
- Chapman, C.G. and Pekow, J. (2015) The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 8, 4-22.
- Chen, C.-Y.A. and Shyu, A.-B. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 465.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436, 740.
- Cheng, Q., Fan, H., Ngo, D., Beaulieu, E., Leung, P., Lo, C.Y., Burgess, R., van der Zwan, Y.G., White, S.J., Khachigian, L.M., Hickey, M.J. and Morand, E.F. (2013) GILZ Overexpression Inhibits Endothelial Cell Adhesive Function through Regulation of NF-kappaB and MAPK Activity. *The Journal of Immunology*, 191, 424-433.
- Cohen, N., Mouly, E., Hamdi, H., Maillot, M.-C., Pallardy, M., Godot, V.r., Capel, F., Balian, A., Naveau, S., Galanaud, P., Lemoine, F.o.M. and Emilie, D. (2006) GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood*, 107, 2037.
- Collins, T. and Cybulsky, M.I. (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *The Journal of Clinical Investigation*, 107, 255.
- Cuadrado, A., Martín-Moldes, Z., Ye, J. and Lastres-Becker, I. (2014) Transcription Factors NRF2 and NF- B Are Coordinated Effectors of the Rho Family, GTP-binding Protein RAC1 during Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 15244-15258.
- Cullen, B.R. (2004) Transcription and Processing of Human microRNA Precursors. *Molecular Cell*, 16, 861.
- Cuomo, J., Appendino, G., Dern, A.S., Schneider, E., McKinnon, T.P., Brown, M.J., Togni, S. and Dixon, B.M. (2011) Comparative Absorption of a Standardized Curcuminoid Mixture and Its Lecithin Formulation. *Journal of Natural Products*, 74, 664.

- D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G. and Riccardi, C. (1997) A New Dexamethasone-Induced Gene of the Leucine Zipper Family Protects T Lymphocytes from TCR/CD3-Activated Cell Death. *Immunity*, 7, 803.
- D'Ambrosi, N., Rossi, S., Gerbino, V. and Cozzolino, M. (2014) Rac1 at the crossroad of actin dynamics and neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 279.
- Dalpke, A.H., Zimmermann, S., Albrecht, I. and Heeg, K. (2002) Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology*, 106, 102.
- Damdindorj, L., Karnan, S., Ota, A., Hossain, E., Konishi, Y., Hosokawa, Y. and Konishi, H. (2014) A Comparative Analysis of Constitutive Promoters Located in Adeno-Associated Viral Vectors. *PLoS ONE*, 9, e106472.
- Danielson, D.C., Filip, R., Powdrill, M.H., O'Hara, S. and Pezacki, J.P. (2015) Suppressing RNA silencing with small molecules and the viral suppressor of RNA silencing protein p19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463, 1135.
- Das, S., Ghosh, A.K., Singh, S., Saha, B., Ganguly, A. and Das, P. (2014) Unmethylated CpG motifs in the *L. donovani* DNA regulate TLR9-dependent delay of programmed cell death in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 97, 363-378.
- Davidson, B.L. and McCray, P.B. (2011) Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet*, 12, 329.
- De Nardo, D. (2015) Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 74, 181.
- de Planell-Saguer, M. and Rodicio, M.C. (2011) Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review. *Analytica Chimica Acta*, 699, 134.
- Deaton, P.R., McKellar, C.T., Culbreth, R., Veal, C.F. and Cooper, J.A. (1994) Hyperoxia stimulates interleukin-8 release from alveolar macrophages and U937 cells: attenuation by dexamethasone. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 267, L187-L192.
- Delfino, D.V., Spinicelli, S., Pozzesi, N., Pierangeli, S., Velardi, E., Bruscoli, S., Martelli, M.P., Pettirossi, V., Falchi, L., Kang, T.b. and Riccardi, C. (2011) Glucocorticoid-induced activation of caspase-8 protects the glucocorticoid-induced protein Gilz from proteasomal degradation and induces its binding to SUMO-1 in murine thymocytes. *Cell Death and Differentiation*, 18, 183.
- Dembek, A., Laggai, S., Kessler, S.M., Czepukojc, B., Simon, Y., Kiemer, A.K. and Hoppstädter, J. (2017) Hepatic interleukin-6 production is maintained during endotoxin tolerance and facilitates lipid accumulation. *Immunobiology*.
- Desvignes, T., Batzel, P., Berezikov, E., Eilbeck, K., Eppig, J.T., McAndrews, M.S., Singer, A. and Postlethwait, J.H. (2015) miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends in Genetics*, 31, 613.
- Di Marco, B.D., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Virgilio, R.D., Velardi, E., Donato, V., Migliorati, G. and Riccardi, C. (2007) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF- κ B interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Research*, 35, 517-528.
- Diesel, B., Hoppstädter, J., Hachenthal, N., Zarbock, R., Cavellius, C., Wahl, B., Thewes, N., Jacobs, K., Kraegeloh, A. and Kiemer, A.K. (2013) Activation of Rac1 GTPase by nanoparticulate structures in human macrophages. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84, 315.
- Diesel, B., Ripoché, N.g., Risch, R.T., Tierling, S., Walter, J.r. and Kiemer, A.K. (2012) Inflammation-induced up-regulation of TLR2 expression in human endothelial cells is independent of differential methylation in the TLR2 promoter CpG island. *Innate Immunity*, 18, 112-123.
- Eddleston, J., Herschbach, J., Wagelie-Steffen, A.L., Christiansen, S.C. and Zuraw, B.L. (2007) The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119, 115.

- Eifler, L.K. (2009) Untersuchungen zur Regulation des Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in Makrophagen.
- Elnakish, M.T., Hassanain, H.H., Janssen, P.M., Angelos, M.G. and Khan, M. (2013) Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. *The Journal of Pathology*, 231, 290.
- Erridge, C. (2009) The Roles of Toll-Like Receptors in Atherosclerosis. *Journal of Innate Immunity*, 1, 340.
- Fabian, M.R. and Sonenberg, N. (2012) The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 586.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N. and Filipowicz, W. (2010) Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 351.
- Faiz, A., Borggrewe, M., Postma, D., Steiling, K., Spira, A., Lenburg, M., Jonker, M., Koppelman, G., Hiemstra, P., Sterk, P., Timens, W., Brandsma, C.-A., Van den Berge, M. and Heijink, I. (2015) MiR-320d: A novel anti-inflammatory miRNA up regulated by corticosteroids. *European Respiratory Journal*, 46.
- Fazal, F., Minhajuddin, M., Bijli, K.M., McGrath, J.L. and Rahman, A. (2007) Evidence for Actin Cytoskeleton-dependent and -independent Pathways for RelA/p65 Nuclear Translocation in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 3940-3950.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, 102.
- Fordham, J.B., Naqvi, A.R. and Nares, S. (2015) Regulation of miR-24, miR-30b, and miR-142-3p during macrophage and dendritic cell differentiation potentiates innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 98, 195-207.
- Forrest, A.R.R., Kanamori-Katayama, M., Tomaru, Y., Lassmann, T., Ninomiya, N., Takahashi, Y., de Hoon, M.J.L., Kubosaki, A., Kaiho, A., Suzuki, M., Yasuda, J., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Hume, D.A. and Suzuki, H. (2009) Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. *Leukemia*, 24, 460.
- Frey, R.S., Gao, X., Javaid, K., Siddiqui, S.S., Rahman, A. and Malik, A.B. (2006) Phosphatidylinositol 3-Kinase γ Signaling through Protein Kinase C ζ Induces NADPH Oxidase-mediated Oxidant Generation and NF- κ B Activation in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 16128-16138.
- Fukui, M., Umemura, M. and Matsuzaki, G. (2014) Combined vaccination of subcutaneous BCG and intranasal HBHA with cholera toxin enhances early protective immunity against pulmonary M. tuberculosis infection (VAC7P.972). *The Journal of Immunology*, 192, 141.117.
- Fürst, R., Brueckl, C., Kuebler, W.M., Zahler, S., Krötz, F., Görlach, A., Vollmar, A.M. and Kiemer, A.K. (2005) Atrial Natriuretic Peptide Induces Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 in Human Endothelial Cells via Rac1 and NAD(P)H Oxidase/Nox2-Activation. *Circulation Research*, 96, 43-53.
- Gao, S., Zhou, J., Liu, N., Wang, L., Gao, Q., Wu, Y., Zhao, Q., Liu, P., Wang, S., Liu, Y., Guo, N., Shen, Y., Wu, Y. and Yuan, Z. (2015) Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 85, 131.
- Ge, Q., Brichard, S., Yi, X. and Li, Q. (2014) microRNAs as a New Mechanism Regulating Adipose Tissue Inflammation in Obesity and as a Novel Therapeutic Strategy in the Metabolic Syndrome. *Journal of Immunology Research*, 2014, 10.
- Geiser, M. (2010) Update on Macrophage Clearance of Inhaled Micro- and Nanoparticles. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 23, 207.
- Gimbrone, M.A., Nagel, T. and Topper, J.N. (1997) Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 1809.
- Giovanni, M., Yue, J., Zhang, L., Xie, J., Ong, C.N. and Leong, D.T. (2015) Pro-inflammatory responses of RAW264.7 macrophages when treated with ultralow concentrations of silver, titanium dioxide, and zinc oxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 297, 146.

- Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G. and Vagner, S. (2011) HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 18, 1692.
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Franco, S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Huffman, M.D., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Magid, D., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., McGuire, D.K., Mohler, E.R., Moy, C.S., Mussolino, M.E., Nichol, G., Paynter, N.P., Schreiner, P.J., Sorlie, P.D., Stein, J., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D. and Turner, M.B. (2013) Heart Disease and Stroke Statistics-2013 Update. *A Report From the American Heart Association*, 127, e6-e245.
- Godot, V., Garcia, G., Capel, F., Arock, M., Durand-Gassel, I., Asselin-Labat, M.L., Emilie, D. and Humbert, M. (2006) Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells. *Allergy*, 61, 886.
- Gomes, C., Cho, J.-H., Hood, L., Franco, O., Pereira, R. and Wang, K. (2013) A Review of Computational Tools in microRNA Discovery. *Frontiers in Genetics*, 4.
- Gomez, M., Raju, S.V., Viswanathan, A., Painter, R.G., Bonvillain, R., Byrne, P., Nguyen, D.H., Bagby, G.J., Kolls, J.K., Nelson, S. and Wang, G. (2010) Ethanol Upregulates Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Expression and Modulates Cellular Inflammatory Responses in Lung Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 184, 5715-5722.
- Gonzalez, R.G., Haxo, R.S. and Schleich, T. (1980) Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein-nucleic acid interactions. *Biochemistry*, 19, 4299.
- Gota, V.S., Maru, G.B., Soni, T.G., Gandhi, T.R., Kochar, N. and Agarwal, M.G. (2010) Safety and Pharmacokinetics of a Solid Lipid Curcumin Particle Formulation in Osteosarcoma Patients and Healthy Volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2095.
- Graff, J.W., Dickson, A.M., Clay, G., McCaffrey, A.P. and Wilson, M.E. (2012) Identifying Functional MicroRNAs in Macrophages with Polarized Phenotypes. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 21816-21825.
- Gratacós, F.M. and Brewer, G. (2010) The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1, 457.
- Griffiths-Jones, S. (2004) The microRNA registry. *Nucleic Acids Research*, 32, D109.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. and Enright, A.J. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36, D154-D158.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H. and Lambrecht, B.N. (2013) Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of Experimental Medicine*.
- Gupta, A.K. and Gupta, M. (2005) Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 26, 1565.
- Gupta, S.C., Kismali, G. and Aggarwal, B.B. (2013) Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. *BioFactors*, 39, 2.
- Gupta, S.C., Patchva, S., Koh, W. and Aggarwal, B.B. (2012) Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39, 283.
- Haberzettl, P., Schins, R.P.F., Höhr, D., Wilhelmi, V., Borm, P.J.A. and Albrecht, C. (2008) Impact of the FcγII-receptor on quartz uptake and inflammatory response by alveolar macrophages. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294, L1137-L1148.
- Hacker, H. and Karin, M. (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci Stke*, 2006, re13.
- Hahn, R.T., Hoppstädter, J., Hirschfelder, K., Hachenthal, N., Diesel, B., Kessler, S.M., Huwer, H. and Kiemer, A.K. (2014) Downregulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes vascular inflammation. *Atherosclerosis*, 234, 391.

- Hamdi, H., Bigorgne, A., Naveau, S., Balian, A., Bouchet-Delbos, L., Cassard-Doulcier, A.-M., Maillot, M.-C., Durand-Gasselien, I., Prévot, S., Delaveaucoupet, J., Emilie, D. and Perlemuter, G. (2007) Glucocorticoid-induced leucine zipper: A key protein in the sensitization of monocytes to lipopolysaccharide in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 46, 1986.
- Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R. and Bosserhoff, A.K. (2002) Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng*, 8, 235-245.
- Hanagata, N. (2012) Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2181.
- Hanna, S. and El-Sibai, M. (2013) Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular Signalling*, 25, 1955.
- Hao, J.-F., Ren, K.-M., Bai, J.-X., Wang, S.-N., Shao, B., Cao, N. and Li, X. (2014) Identification of potential biomarkers for clear cell renal cell carcinoma based on microRNA-mRNA pathway relationships. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10, 167-177.
- Hart, M., Rheinheimer, S., Leidinger, P., Backes, C., Menegatti, J., Fehlmann, T., Grässer, F., Keller, A. and Meese, E. (2016) Identification of miR-34a-target interactions by a combined network based and experimental approach. *Oncotarget*, 7, 34288.
- Hiemstra, I.H., Vrijland, K., Bouma, G., Kraal, G. and den Haan, J.M.M. (2013) TLR2-induced G-CSF stimulates the differentiation of Ly6C⁺ monocytes. *Microbial control of the mucosal barrier function*, 85.
- Hodge, R.G. and Ridley, A.J. (2016) Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, advance online publication.
- Hofmann, C., Dunger, N., Doser, K., Lippert, E., Siller, S., Edinger, M., Falk, W. and Obermeier, F. (2014) Physiologic TLR9-CpG-DNA Interaction Is Essential for the Homeostasis of the Intestinal Immune System. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20, 136-143.
- Höhr, D., Steinfartz, Y., Schins, R.P.F., Knaapen, A.M., Martra, G., Fubini, B. and Borm, P.J.A. (2002) The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205, 239.
- Hollams, E.M., Giles, K.M., Thomson, A.M. and Leedman, P.J. (2002) mRNA Stability and the Control of Gene Expression: Implications for Human Disease. *Neurochemical Research*, 27, 957-980.
- Hoppstädter, J., Diesel, B., Eifler, L.K., Schmid, T., Brüne, B. and Kiemer, P.A.K. (2012) Glucocorticoid-induced leucine zipper is downregulated in human alveolar macrophages upon Toll-like receptor activation. *European Journal of Immunology*, 42, 1282.
- Hoppstädter, J., Hachenthal, N., Valbuena-Perez, J.V., Lampe, S., Astanina, K., Kunze, M.M., Bruscoli, S., Riccardi, C., Schmid, T., Diesel, B. and Kiemer, A.K. (2016) Induction of Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) Contributes to Anti-inflammatory Effects of the Natural Product Curcumin in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 22949-22960.
- Hoppstädter, J., Kessler, S.M., Bruscoli, S., Huwer, H., Riccardi, C. and Kiemer, A.K. (2015) Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper: A Critical Factor in Macrophage Endotoxin Tolerance. *The Journal of Immunology*, 194, 6057-6067.
- Hoppstädter, J. and Kiemer, A.K. (2015) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in immuno suppression: master regulator or bystander? *Oncotarget*, 6, 38446.
- Hordijk, P.L. (2006) Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *FEBS Journal*, 273, 4408.
- Hsieh, C.-H., Rau, C.-S., Jeng, J.C., Chen, Y.-C., Lu, T.-H., Wu, C.-J., Wu, Y.-C., Tzeng, S.-L. and Yang, J.C.-S. (2012) Whole blood-derived microRNA signatures in mice exposed to lipopolysaccharides. *Journal of Biomedical Science*, 19, 69.
- Huang, M.-T., Lou, Y.-R., Ma, W., Newmark, H.L., Reuhl, K.R. and Conney, A.H. (1994) Inhibitory Effects of Dietary Curcumin on Forestomach, Duodenal, and Colon Carcinogenesis in Mice. *Cancer Research*, 54, 5841-5847.

- Huang, Y., Liu, Y., Li, L., Su, B., Yang, L., Fan, W., Yin, Q., Chen, L., Cui, T., Zhang, J., Lu, Y., Cheng, J., Fu, P. and Liu, F. (2014) Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: implications for glomerular endothelial injury. *BMC Nephrology*, 15, 1-12.
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12, 99.
- Huotari, N., Hömmö, T., Taimi, V., Nieminen, R., Moilanen, E. and Korhonen, R. (2012) Regulation of tristetraprolin expression by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *APMIS*, 120, 988.
- Imaizumi, S., Grijalva, V., Priceman, S., Wu, L., Su, F., Farias-Eisner, R., Hama, S., Navab, M., Fogelman, A.M. and Reddy, S.T. (2010) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E null mice by reducing monocyte chemoattractant protein-1 levels. *Molecular Genetics and Metabolism*, 101, 66.
- Ipsaro, J.J. and Joshua-Tor, L. (2015) From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol*, 22, 20.
- Ivanov, P. and Anderson, P. (2013) Post-transcriptional regulatory networks in immunity. *Immunological Reviews*, 253, 253.
- Iwakawa, H.-o. and Tomari, Y. (2015) The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology*, 25, 651.
- Jickling, G.C., Ander, B.P., Zhan, X., Noblett, D., Stamova, B. and Liu, D. (2014) microRNA Expression in Peripheral Blood Cells following Acute Ischemic Stroke and Their Predicted Gene Targets. *PLOS ONE*, 9, e99283.
- Jin, H.Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A.V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S.R., Macauley, M.S., Rickert, R.C. and Xiao, C. (2015) Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Frontiers in Genetics*, 6, 340.
- Jin, Y., Chen, Z., Liu, X. and Zhou, X. (2013) Evaluating the MicroRNA Targeting Sites by Luciferase Reporter Gene Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 936, 117.
- Kaleem, A., Hoessli, D.C., Ahmad, I., Walker-Nasir, E., Nasim, A., Shakoori, A.R. and Din, N.-u. (2008) Immediate-early gene regulation by interplay between different post-translational modifications on human histone H3. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103, 835.
- Kartha, R.V. and Subramanian, S. (2014) Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of gene regulation. *Frontiers in Genetics*, 5, 8.
- Kasper, J., Hermanns, M.I., Bantz, C., Maskos, M., Stauber, R., Pohl, C., Unger, R.E. and Kirkpatrick, J.C. (2011) Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: Comparison with conventional monocultures. *Particle and Fibre Toxicology*, 8, 1-16.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Vrieling, J.A.F.O., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Årom, U.A., Lund, A.H., Perrakis, A., Raz, E. and Agami, R. (2007) RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. *Cell*, 131, 1273.
- Kerkmann, M., Costa, L.T., Richter, C., Rothenfusser, S., Battiany, J., Hornung, V., Johnson, J., Englert, S., Ketterer, T., Heckl, W., Thalhammer, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2005) Spontaneous Formation of Nucleic Acid-based Nanoparticles Is Responsible for High Interferon- α Induction by CpG-A in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 8086-8093.
- Kiemer, A.K., Baron, A., Gerbes, A.L., Bilzer, M. and Vollmar, A.M. (2002a) The atrial natriuretic peptide as a regulator of Kupffer cell functions. *Shock*, 17.
- Kiemer, A.K., Senaratne, R.H., Hoppstädter, J., Diesel, B., Riley, L.W., Tabeta, K., Bauer, S., Beutler, B. and Zuraw, B.L. (2009) Attenuated Activation of Macrophage TLR9 by DNA from Virulent Mycobacteria. *Journal of Innate Immunity*, 1, 29.
- Kiemer, A.K., Weber, N.C., Fürst, R., Bildner, N., Kulhanek-Heinze, S. and Vollmar, A.M. (2002b) Inhibition of p38 MAPK Activation via Induction of MKP-1: Atrial Natriuretic Peptide Reduces

- TNF-alpha Induced Actin Polymerization and Endothelial Permeability. *Circulation Research*, 90, 874-881.
- Kim, G.-Y., Kim, K.-H., Lee, S.-H., Yoon, M.-S., Lee, H.-J., Moon, D.-O., Lee, C.-M., Ahn, S.-C., Park, Y.C. and Park, Y.-M. (2005) Curcumin Inhibits Immunostimulatory Function of Dendritic Cells: MAPKs and Translocation of NF-kappaB as Potential Targets. *The Journal of Immunology*, 174, 8116-8124.
- Kim, H.S., Tavakoli, S. and Asmis, R. (2015) Abstract 203: Redox Regulation of MKP-1 and the Functional Reprogramming of Monocyte-Derived Macrophages by Metabolic Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35, A203.
- Kim, S.-R., Bae, Y.-H., Bae, S.-K., Choi, K.-S., Yoon, K.-H., Koo, T.H., Jang, H.-O., Yun, I., Kim, K.-W., Kwon, Y.-G., Yoo, M.-A. and Bae, M.-K. (2008) Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kB activation in endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783, 886.
- Köberle, M., Göppel, D., Grandl, T., Gaentzsch, P., Manncke, B., Berchtold, S., Müller, S., Lüscher, B., Asselin-Labat, M.-L., Pallardy, M., Sorg, I., Langer, S., Barth, H., Zumbihl, R., Autenrieth, I.B. and Bohn, E. (2012) *Yersinia enterocolitica* YopT and *Clostridium difficile* Toxin B Induce Expression of GILZ in Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 7, e40730.
- Krausz, A.E., Adler, B.L., Cabral, V., Navati, M., Doerner, J., Charafeddine, R.A., Chandra, D., Liang, H., Gunther, L., Clendaniel, A., Harper, S., Friedman, J.M., Nosanchuk, J.D. and Friedman, A.J. (2015) Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11, 195.
- Kuhn, A.-M., Tzieply, N., Schmidt, M.V., von Knethen, A., Namgaladze, D., Yamamoto, M. and Brüne, B. (2011) Antioxidant signaling via Nrf2 counteracts lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses in foam cell macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 50, 1382.
- Kullmann, M., Göpfert, U., Siewe, B. and Hengst, L. (2002) ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes & Development*, 16, 3087-3099.
- Kumar, V., Palermo, R., Talora, C., Campese, A.F., Checquolo, S., Bellavia, D., Tottone, L., Testa, G., Miele, E., Indraccolo, S., Amadori, A., Ferretti, E., Gulino, A., Vacca, A. and Screpanti, I. (2014) Notch and NF-kB signaling pathways regulate miR-223/FBXW7 axis in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 28, 2324.
- Kustermans, G., Piette, J. and Legrand-Poels, S. (2008) Actin-targeting natural compounds as tools to study the role of actin cytoskeleton in signal transduction. *Biochemical Pharmacology*, 76, 1310.
- Kuwano, Y., Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Martindale, J.L., Yang, X. and Gorospe, M. (2008) MKP-1 mRNA Stabilization and Translational Control by RNA-Binding Proteins HuR and NF90. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 4562-4575.
- Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K. and Gorospe, M. (2005) Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin-alpha. *The EMBO Journal*, 24, 1852-1862.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T. and Golenbock, D.T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*, 5, 190.
- Leandersson, K., Riesbeck, K. and Andersson, T. (2006) Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic Acids Research*, 34, 3988-3999.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843.
- Lee, S., Hong, J., Choi, S.-Y., Oh, S.B., Park, K., Kim, J.S., Karin, M. and Lee, S.J. (2004) CpG oligodeoxynucleotides induce expression of proinflammatory cytokines and chemokines in astrocytes: the role of c-Jun N-terminal kinase in CpG ODN-mediated NF-kB activation. *Journal of Neuroimmunology*, 153, 50.

- Lee, S., Yun, H.-S. and Kim, S.-H. (2011) The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis. *Biomaterials*, 32, 9434.
- Leifer, C.A., Kennedy, M.N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M.J. and Segal, D.M. (2004) TLR9 Is Localized in the Endoplasmic Reticulum Prior to Stimulation. *The Journal of Immunology*, 173, 1179-1183.
- Levänen, B., Bhakta, N.R., Torregrosa Paredes, P., Barbeau, R., Hiltbrunner, S., Pollack, J.L., Sköld, C.M., Svartengren, M., Grunewald, J., Gabrielsson, S., Eklund, A., Larsson, B.-M., Woodruff, P.G., Erle, D.J. and Wheelock, A.S.M. (2013) Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 894.
- Levy, A.P. (1998) Hypoxic Regulation of VEGF mRNA Stability by RNA-binding Proteins. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 8, 246.
- Li, X., Lin, W.-J., Chen, C.-Y., Si, Y., Zhang, X., Lu, L., Suswam, E., Zheng, L. and King, P.H. (2012a) KSRP: A checkpoint for inflammatory cytokine production in astrocytes. *Glia*, 60, 1773.
- Li, X., Ni, M., Zhang, C., Ma, W. and Zhang, Y. (2014) A convenient system for highly specific and sensitive detection of miRNA expression. *RNA*, 20, 252.
- Li, Y., Berke, I.C. and Modis, Y. (2012b) DNA binding to proteolytically activated TLR9 is sequence-independent and enhanced by DNA curvature. *The EMBO Journal*, 31, 919-931.
- Li, Y., Zhao, L., Shi, B., Ma, S., Xu, Z., Ge, Y., Liu, Y., Zheng, D. and Shi, J. (2015) Functions of miR-146a and miR-222 in Tumor-associated Macrophages in Breast Cancer. *Scientific Reports*, 5, 18648.
- Liang, J., Lei, T., Song, Y., Yanes, N., Qi, Y. and Fu, M. (2009) RNA-destabilizing Factor Tristetraprolin Negatively Regulates NF- κ B Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 29383-29390.
- Libby, P., Ridker, P.M. and Hansson, G.K. (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473, 317.
- Ma, X., Ma, C. and Zheng, X. (2013) MicroRNA-155 in the Pathogenesis of Atherosclerosis: A Conflicting Role? *Heart, Lung and Circulation*, 22, 811.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D. and Doudna, J.A. (2006) Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science*, 311, 195-198.
- Malgor, R., Bhatt, P.M., Connolly, B.A., Jacoby, D.L., Feldmann, K.J., Silver, M.J., Nakazawa, M., McCall, K.D. and Goetz, D.J. (2014) Wnt5a, TLR2 and TLR4 are elevated in advanced human atherosclerotic lesions. *Inflammation Research*, 63, 277-285.
- Malyala, P., O'Hagan, D.T. and Singh, M. (2009) Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 218.
- Mangtani, P., Abubakar, I., Ariti, C., Beynon, R., Pimpin, L., Fine, P.E.M., Rodrigues, L.C., Smith, P.G., Lipman, M., Whiting, P.F. and Sterne, J.A. (2014) Protection by BCG Vaccine Against Tuberculosis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Clinical Infectious Diseases*, 58, 470-480.
- Maniataki, E. and Mourelatos, Z. (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & Development*, 19, 2979-2990.
- Marco, B.D., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Virgilio, R.D., Velardi, E., Donato, V., Migliorati, G. and Riccardi, C. (2007a) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF- κ B interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Research*, 35, 517-528.
- Marco, B.D., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Virgilio, R.D., Velardi, E., Donato, V., Migliorati, G. and Riccardi, C. (2007b) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF- κ B interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Research*, 35, 517-528.
- Marques-Rocha, J.L., Samblas, M., Milagro, F.I., Bressan, J., Martínez, J.A. and Martí, A. (2015) Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *The FASEB Journal*, 29, 3595-3611.

- Marques-Rocha, J.L., Samblas, M., Milagro, F.I., Bressan, J., Martínez, J.A. and Marti, A. (2016) Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *The FASEB Journal*, 29, 3595-3611.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M. and Mantovani, A. (2006) Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 177, 7303-7311.
- Mazan-Mamczarz, K., Hagner, P.R., Corl, S., Srikantan, S., Wood, W.H., Becker, K.G., Gorospe, M., Keene, J.D., Levenson, A.S. and Gartenhaus, R.B. (2008) Post-transcriptional gene regulation by HuR promotes a more tumorigenic phenotype. *Oncogene*, 27, 6151.
- McGarry, T., Connolly, M., Gao, W., McCormick, J., Veale, D. and Fearon, U. (2012) AB0108 β 1...BETA-1 integrin is a critical mediator of TLR2-induced cell migration and invasion in RA. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71, 643.
- McGarry, T., Veale, D.J., Gao, W., Orr, C., Fearon, U. and Connolly, M. (2015) Toll-like receptor 2 (TLR2) induces migration and invasive mechanisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 17, 1-14.
- Meng, H., Yang, S., Li, Z., Xia, T., Chen, J., Ji, Z., Zhang, H., Wang, X., Lin, S., Huang, C., Zhou, Z.H., Zink, J.I. and Nel, A.E. (2011) Aspect Ratio Determines the Quantity of Mesoporous Silica Nanoparticle Uptake by a Small GTPase-Dependent Macropinocytosis Mechanism. *ACS Nano*, 5, 4434.
- Meng, Z., King, P.H., Nabors, L.B., Jackson, N.L., Chen, C.-Y., Emanuel, P.D. and Blume, S.W. (2005) The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Research*, 33, 2962-2979.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. and Pesole, G. (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*, 3, 1-10.
- Miller, S.I., Ernst, R.K. and Bader, M.W. (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Micro*, 3, 36.
- Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.-S., Tam, W.-L., Thomson, A.M., Lim, B. and Rigoutsos, I. (2006) A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. *Cell*, 126, 1203.
- Misra, A., Hickey, A.J., Rossi, C., Borchard, G., Terada, H., Makino, K., Fourie, P.B. and Colombo, P. (2011) Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis. *Tuberculosis*, 91, 71.
- Mittelstadt, P.R. and Ashwell, J.D. (2001) Inhibition of AP-1 by the Glucocorticoid-inducible Protein GILZ. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 29603-29610.
- Moreno, J.J. and Teresa Mitjavila, M.a. (2003) The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 182.
- Mostowy, S. and Shenoy, A.R. (2015) The cytoskeleton in cell-autonomous immunity: structural determinants of host defence. *Nat Rev Immunol*, 15, 559.
- Muhonen, P. and Holthofer, H. (2009) Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24, 1088-1096.
- Mukherjee, N., Jacobs, N.C., Hafner, M., Kennington, E.A., Nusbaum, J.D., Tuschl, T., Blackshear, P.J. and Ohler, U. (2014) Global target mRNA specification and regulation by the RNA-binding protein ZFP36. *Genome Biology*, 15, 1-16.
- Naqvi, A.R., Fordham, J.B., Ganesh, B. and Nares, S. (2016) miR-24, miR-30b and miR-142-3p interfere with antigen processing and presentation by primary macrophages and dendritic cells. *Scientific Reports*, 6, 32925.
- Nazari-Jahantigh, M., Egea, V., Schober, A. and Weber, C. (2014) MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 89, 35.
- Nolte-'t Hoen, E.N.M., Van Rooij, E., Bushell, M., Zhang, C.Y., Dashwood, R.H., James, W.P.T., Harris, C. and Baltimore, D. (2015) The role of microRNA in nutritional control. *Journal of Internal Medicine*, 278, 99.

- Ntoufa, S., Vilia, M.G., Stamatopoulos, K., Ghia, P. and Muzio, M. (2016) Toll-like receptors signaling: A complex network for NF- κ B activation in B-cell lymphoid malignancies. *Seminars in Cancer Biology*.
- O'Neill, L.A.J. and Bowie, A.G. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7, 353.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D. and Bowie, A.G. (2013) The history of Toll-like receptors [mdash] redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13, 453.
- Ohtsuka, M., Ling, H., Doki, Y., Mori, M. and Calin, G.A. (2015) MicroRNA Processing and Human Cancer. *J Clin Med*, 4, 1651-1667.
- Opitz, B., van Laak, V., Eitel, J. and Suttorp, N. (2010) Innate Immune Recognition in Infectious and Noninfectious Diseases of the Lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181, 1294.
- Orom, U.A., Nielsen, F.C. and Lund, A.H. (2008) MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Molecular Cell*, 30, 460.
- Orr, G., Panther, D.J., Phillips, J.L., Tarasevich, B.J., Dohnalkova, A., Hu, D., Teeguarden, J.G. and Pounds, J.G. (2007) Submicrometer and Nanoscale Inorganic Particles Exploit the Actin Machinery To Be Propelled along Microvilli-like Structures into Alveolar Cells. *ACS Nano*, 1, 463.
- Ortega, F.J., Moreno, M., Mercader, J.M., Moreno-Navarrete, J.M., Fuentes-Batllevell, N., Sabater, M., Ricart, W. and Fernández-Real, J.M. (2015) Inflammation triggers specific microRNA profiles in human adipocytes and macrophages and in their supernatants. *Clinical Epigenetics*, 7, 49.
- Ouyang, X., Negishi, H., Takeda, R., Fujita, Y., Taniguchi, T. and Honda, K. (2007) Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 1045.
- Parasramka, M.A., Ho, E., Williams, D.E. and Dashwood, R.H. (2012) MicroRNAs, diet, and cancer: New mechanistic insights on the epigenetic actions of phytochemicals. *Molecular Carcinogenesis*, 51, 213.
- Patel, P.H., Barbee, S.A. and Blankenship, J.T. (2016) GW-Bodies and P-Bodies Constitute Two Separate Pools of Sequestered Non-Translating RNAs. *PLoS ONE*, 11, e0150291.
- Perry, R.P. and Kelley, D.E. (1970) Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: Characteristic dose-response of different RNA species. *Journal of Cellular Physiology*, 76, 127.
- Philippe, L., Alsaleh, G., Suffert, G., Meyer, A., Georgel, P., Sibilia, J., Wachsmann, D. and Pfeffer, S. (2012) TLR2 Expression Is Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes. *The Journal of Immunology*, 188, 454-461.
- Phillips, K., Kedersha, N., Shen, L., Blackshear, P.J. and Anderson, P. (2004) Arthritis suppressor genes TIA-1 and TTP dampen the expression of tumor necrosis factor α , cyclooxygenase 2, and inflammatory arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 2011-2016.
- Phillips, R.S., Ramos, S.B.V. and Blackshear, P.J. (2002) Members of the Tristetraprolin Family of Tandem CCCH Zinc Finger Proteins Exhibit CRM1-dependent Nucleocytoplasmic Shuttling. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 11606-11613.
- Pinheiro, I., Dejager, L., Petta, I., Vandevyver, S., Puimège, L., Mahieu, T., Ballegeer, M., Van Hauwermeiren, F., Riccardi, C., Vuylsteke, M. and Libert, C. (2013) LPS resistance of SPRET/Ei mice is mediated by Gilz, encoded by the Tsc22d3 gene on the X chromosome. *EMBO Molecular Medicine*, 5, 456-470.
- Prabhala, P., Bunge, K., Rahman, M.M., Ge, Q., Clark, A.R. and Ammit, A.J. (2015) Temporal regulation of cytokine mRNA expression by tristetraprolin: dynamic control by p38 MAPK and MKP-1. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*.
- Ralph, P., Williams, N., Moore, M.A.S. and Litcofsky, P.B. (1982) Induction of antibody-dependent and nonspecific tumor killing in human monocytic leukemia cells by nonlymphocyte factors and phorbol ester. *Cellular Immunology*, 71, 215.

- Rao, C.V., Rivenson, A., Simi, B. and Reddy, B.S. (1995) Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by Dietary Curcumin, a Naturally Occurring Plant Phenolic Compound. *Cancer Research*, 55, 259-266.
- Rasmussen, R., Benvegna, D., O'Shea, E.K., Kim, P.S. and Alber, T. (1991) X-ray scattering indicates that the leucine zipper is a coiled coil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 561-564.
- Rauta, P.R., Samanta, M., Dash, H.R., Nayak, B. and Das, S. (2014) Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. *Immunology Letters*, 158, 14.
- Riccardi, C., Zollo, O., Nocentini, G., Bruscoli, S., Bartoli, A., D'Adamio, F., Cannarile, L., Delfino, D., Ayroldi, E. and Migliorati, G. (2000) Glucocorticoid hormones in the regulation of cell death. *Therapie*, 55, 165.
- Roberts, T.L., Dunn, J.A., Terry, T.D., Jennings, M.P., Hume, D.A., Sweet, M.J. and Stacey, K.J. (2005) Differences in Macrophage Activation by Bacterial DNA and CpG-Containing Oligonucleotides. *The Journal of Immunology*, 175, 3569-3576.
- Ronchetti, S., Migliorati, G. and Riccardi, C. (2015) GILZ as a Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 170.
- Ronkina, N., Menon, M.B., Schwermann, J., Tiedje, C., Hitti, E., Kotlyarov, A. and Gaestel, M. (2010) MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: Complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1915.
- Ross, E.A., Smallie, T., Ding, Q., O'Neil, J.D., Cunliffe, H.E., Tang, T., Rosner, D.R., Klevernic, I., Morrice, N.A., Monaco, C., Cunningham, A.F., Buckley, C.D., Saklatvala, J., Dean, J.L. and Clark, A.R. (2015) Dominant Suppression of Inflammation via Targeted Mutation of the mRNA Destabilizing Protein Tristetraprolin. *The Journal of Immunology*, 195, 265-276.
- Roy, H., Bhardwaj, S. and Yla-Herttuala, S. (2009) Molecular genetics of atherosclerosis. *Human Genetics*, 125, 467-491.
- Sanjuan, M.A., Rao, N., Lai, K.-T.A., Gu, Y., Sun, S., Fuchs, A., Fung-Leung, W.-P., Colonna, M. and Karlsson, L. (2006) CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion. *The Journal of Cell Biology*, 172, 1057-1068.
- Santini, P., Politi, L., Vedova, P.D., Scandurra, R. and Scotto d'Abusco, A. (2014) The inflammatory circuitry of miR-149 as a pathological mechanism in osteoarthritis. *Rheumatology International*, 34, 711-716.
- Sasaki, H., Sunagawa, Y., Takahashi, K., Imaizumi, A., Fukuda, H., Hashimoto, T., Wada, H., Katanasaka, Y., Takeya, H., Fujita, M., Hasegawa, K. and Morimoto, T. (2011) Innovative Preparation of Curcumin for Improved Oral Bioavailability. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 660.
- Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K. and Akira, S. (2003) Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β (TRIF) Associates with TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1, and Activates Two Distinct Transcription Factors, NF- κ B and IFN-Regulatory Factor-3, in the Toll-Like Receptor Signaling. *The Journal of Immunology*, 171, 4304-4310.
- Scherr, M., Venturini, L., Battmer, K., Schaller-Schoenitz, M., Schaefer, D., Dallmann, I., Ganser, A. and Eder, M. (2007) Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Research*, 35, e149.
- Schichl, Y.M., Resch, U., Hofer-Warbinek, R. and de Martin, R. (2009) Tristetraprolin Impairs NF- κ B/p65 Nuclear Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 29571-29581.
- Schott, J., Reitter, S., Philipp, J., Haneke, K., Schäfer, H. and Stoecklin, G. (2014) Translational Regulation of Specific mRNAs Controls Feedback Inhibition and Survival during Macrophage Activation. *PLoS Genetics*, 10, e1004368.

- Sedlyarov, V., Fallmann, J., Ebner, F., Huemer, J., Sneezum, L., Ivin, M., Kreiner, K., Tanzer, A., Vogl, C., Hofacker, I. and Kovarik, P. (2016) Tristetraprolin binding site atlas in the macrophage transcriptome reveals a switch for inflammation resolution. *Molecular Systems Biology*, 12.
- Seif, M., Philippi, A., Breinig, F., Kiemer, A.K. and Hoppstädter, J. (2016) Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Polarizes Both M-CSF- and GM-CSF-Differentiated Macrophages Toward an M1-Like Phenotype. *Inflammation*, 39, 1690-1703.
- Sengupta, S., Jang, B.-C., Wu, M.-T., Paik, J.-H., Furneaux, H. and Hla, T. (2003) The RNA-binding Protein HuR Regulates the Expression of Cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 25227-25233.
- Sepulveda, F.E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E., Lennon-Duménil, A.-M., Amigorena, S., Cabanie, L. and Manoury, B.n.d. (2009) Critical Role for Asparagine Endopeptidase in endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells. *Immunity*, 31, 737.
- Shah, S., Mostafa, M.M., McWhae, A., Traves, S.L. and Newton, R. (2015) Negative Feed-forward Control of Tumor Necrosis Factor (TNF) by Tristetraprolin (ZFP36) Is Limited by the Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase, Dual-specificity Phosphatase 1 (DUSP1): IMPLICATIONS FOR REGULATION BY GLUCOCORTICOIDS. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 110-125.
- Shen, J., Chandrasekharan, U.M., Ashraf, M.Z., Long, E., Morton, R.E., Liu, Y., Smith, J.D. and DiCorleto, P.E. (2010) Lack of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Protects ApoE-Null Mice Against Atherosclerosis. *Circulation Research*, 106, 902-910.
- Sherf, A., Navarro, S.L., Hannah, R.R. and Wood, K.V. (1996) Dual-Luciferase™ Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays.
- Shi, X., Shi, W., Li, Q., Song, B., Wan, M., Bai, S. and Cao, X. (2003) A glucocorticoid-induced leucine zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO reports*, 4, 374-380.
- Shibata, Y., Berclaz, P.-Y., Chroneos, Z.C., Yoshida, M., Whitsett, J.A. and Trapnell, B.C. (2001) GM-CSF Regulates Alveolar Macrophage Differentiation and Innate Immunity in the Lung through PU.1. *Immunity*, 15, 557.
- Shishodia, S., Sethi, G. and Aggarwal, B.B. (2005) Curcumin: Getting Back to the Roots. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056, 206.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R. and Srinivas, P.S.S.R. (1998) Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. *Planta Med*, 64, 353-356.
- Sieweke, M.H. and Allen, J.E. (2013) Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science*, 342.
- Simpson, L.J., Patel, S., Bhakta, N.R., Choy, D.F., Brightbill, H.D., Ren, X., Wang, Y., Pua, H.H., Baumjohann, D., Montoya, M.M., Panduro, M., Remedios, K.A., Huang, X., Fahy, J.V., Arron, J.R., Woodruff, P.G. and Ansel, K.M. (2014) A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine production. *Nat Immunol*, 15, 1162.
- Singh, R.P., Massachi, I., Manickavel, S., Singh, S., Rao, N.P., Hasan, S., Mc Curdy, D.K., Sharma, S., Wong, D., Hahn, B.H. and Rehim, H. (2013) The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 12, 1160.
- Singh, S. and Aggarwal, B.B. (1995) Activation of Transcription Factor NF- κ B Is Suppressed by Curcumin (Diferuloylmethane). *Journal of Biological Chemistry*, 270, 24995-25000.
- Soetikno, V., Sari, F.R., Veeraveedu, P.T., Thandavarayan, R.A., Harima, M., Sukumaran, V., Lakshmanan, A.P., Suzuki, K., Kawachi, H. and Watanabe, K. (2011) Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF- κ B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. *Nutrition & Metabolism*, 8, 1-11.
- Solberg, O.D., Edwin, J.O., Michael, I.L., Jeffrey, C.P., Nirav, R.B., Lydia, H., Christine, N., Margaret, S., Cindy, N., Andrea, J.B., Lorna, T.Z., Denitza, P.B., Walter, E.F., Ansel, K.M., Joseph, R.A., David, J.E. and Prescott, G.W. (2012) Airway Epithelial miRNA Expression Is Altered in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186, 965-974.

- Soohyoung, L., It, sup, gt, It, sup, gt, Young-Jin, K., It, sup, gt, It, sup, gt, Sanghoon, K., It, sup, gt, It, sup, gt, Younghee, L., It, sup, gt, It, sup, gt, Soo Young, C., It, sup, gt, It, sup, gt, Jinseu, P., It, sup, gt, It, sup, gt, amp, amp, Hyung-Joo, K., It, sup, gt, It, sup and gt. (2009) Inhibitory effects of flavonoids on TNF- α -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB Rep.*, 42, 265.
- Soundararajan, R., Zhang, T.T., Wang, J., Vandewalle, A. and Pearce, D. (2005) A Novel Role for Glucocorticoid-induced Leucine Zipper Protein in Epithelial Sodium Channel-mediated Sodium Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 39970-39981.
- Srikantan, S., Tominaga, K. and Gorospe, M. (2012) Functional Interplay between RNA-Binding Protein HuR and microRNAs. *Current Protein and Peptide Science*, 13, 372.
- Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W.F.C., Blackwell, T.K. and Anderson, P. (2004) MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *The EMBO Journal*, 23, 1313-1324.
- Stoecklin, G., Tenenbaum, S.A., Mayo, T., Chittur, S.V., George, A.D., Baroni, T.E., Blackshear, P.J. and Anderson, P. (2008) Genome-wide Analysis Identifies Interleukin-10 mRNA as Target of Tristetraprolin. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 11689-11699.
- Stow, J.L. and Condon, N.D. (2016) The cell surface environment for pathogen recognition and entry. *Clin Trans Immunol*, 5, e71.
- Stumpo, D.J., Lai, W.S. and Blackshear, P.J. (2010) Inflammation: cytokines and RNA-based regulation. *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA*, 1, 60.
- Sundström, C. and Nilsson, K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer*, 17, 565.
- Szmitko, P.E., Wang, C.-H., Weisel, R.D., de Almeida, J.R., Anderson, T.J. and Verma, S. (2003) New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation. *Part I*, 108, 1917-1923.
- Tadano, T., Kakuta, Y., Hamada, S., Shimodaira, Y., Kuroha, M., Kawakami, Y., Kimura, T., Shiga, H., Endo, K., Masamune, A., Takahashi, S., Kinouchi, Y. and Shimosegawa, T. (2016) MicroRNA-320 family is downregulated in colorectal adenoma and affects tumor proliferation by targeting CDK6. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8, 532.
- Takeshita, F., Gursel, I., Ishii, K.J., Suzuki, K., Gursel, M. and Klinman, D.M. (2004) Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Seminars in Immunology*, 16, 17.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140, 805.
- Tan, G.S., Chiu, C.-H., Garchow, B.G., Metzler, D., Diamond, S.L. and Kiriakidou, M. (2012) Small Molecule Inhibition of RISC Loading. *ACS Chemical Biology*, 7, 403.
- Taylor, G.A., Carballo, E., Lee, D.M., Lai, W.S., Thompson, M.J., Patel, D.D., Schenkman, D.I., Gilkeson, G.S., Broxmeyer, H.E., Haynes, B.F. and Blackshear, P.J. (1996) A Pathogenetic Role for TNF α in the Syndrome of Cachexia, Arthritis, and Autoimmunity Resulting from Tristetraprolin (TTP) Deficiency. *Immunity*, 4, 445.
- Teixeira-Coelho, M., Guedes, J., Ferreirinha, P., Howes, A., Pedrosa, J., Rodrigues, F., Lai, W.S., Blackshear, P.J., O'Garra, A. and Castro, A.G. (2014) Differential post-transcriptional regulation of IL-10 by TLR2 and TLR4-activated macrophages. *European journal of immunology*, 44, 856-866.
- Teusch, N., Lombardo, E., Eddleston, J. and Knaus, U.G. (2004) The Low Molecular Weight GTPase RhoA and Atypical Protein Kinase C ζ are Required for TLR2-Mediated Gene Transcription. *The Journal of Immunology*, 173, 507-514.
- Tiedje, C., Diaz-Muñoz, M.D., Trulley, P., Ahlfors, H., Laaß, K., Blackshear, P.J., Turner, M. and Gaestel, M. (2016) The RNA-binding protein TTP is a global post-transcriptional regulator of feedback control in inflammation. *Nucleic Acids Research*.
- Tong, L. and Tergaonkar, V. (2014) Rho protein GTPases and their interactions with NF- κ B: crossroads of inflammation and matrix biology. *Bioscience Reports*, 34.
- Trenkmann, M., Brock, M., Gay, R.E., Michel, B.A., Gay, S. and Huber, L.C. (2013) Tumor Necrosis Factor α -Induced MicroRNA-18a Activates Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Through a Feedback Loop in NF- κ B Signaling. *Arthritis & Rheumatism*, 65, 916.

- Uchida, S., Nishida, A., Hara, K., Kamemoto, T., Suetsugi, M., Fujimoto, M., Watanuki, T., Wakabayashi, Y., Otsuki, K., McEwen, B.S. and Watanabe, Y. (2008) Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *European Journal of Neuroscience*, 27, 2250.
- Vandevyver, S., Dejager, L. and Libert, C. (2014) Comprehensive Overview of the Structure and Regulation of the Glucocorticoid Receptor. *Endocrine Reviews*, 35, 671.
- Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J.A. (2007) Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*, 318, 1931-1934.
- Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A. and Jacks, T. (2008) Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters. *Cell*, 132, 875.
- Vlasova-St. Louis, I. and Bohjanen, P.R. (2014) Post-Transcriptional Regulation of Cytokine Signaling by AU-Rich and GU-Rich Elements. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34, 233.
- von Roretz, C., Marco, S.D., Mazroui, R. and Gallouzi, I.-E. (2011) Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2, 336.
- Vreugdenhil, E., Verissimo, C.S.L., Mariman, R., Kamphorst, J.T., Barbosa, J.S., Zweers, T., Champagne, D.L., Schouten, T., Meijer, O.C., Ron de Kloet, E. and Fitzsimons, C.P. (2009) MicroRNA 18 and 124a Down-Regulate the Glucocorticoid Receptor: Implications for Glucocorticoid Responsiveness in the Brain. *Endocrinology*, 150, 2220.
- Vrijens, K., Bollati, V. and Nawrot, T.S. (2015) MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. *Environ Health Perspect*, 123, 399-411.
- Wagner, H. (2004) The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends in Immunology*, 25, 381.
- Wang, J.-C., Derynck, M.K., Nonaka, D.F., Khodabakhsh, D.B., Haqq, C. and Yamamoto, K.R. (2004) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15603-15608.
- Wang, J.P., Kurt-Jones, E.A., Shin, O.S., Manchak, M.D., Levin, M.J. and Finberg, R.W. (2005) Varicella-Zoster Virus Activates Inflammatory Cytokines in Human Monocytes and Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *Journal of Virology*, 79, 12658-12666.
- Wang, W., Caldwell, M.C., Lin, S., Furneaux, H. and Gorospe, M. (2000) HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *The EMBO Journal*, 19, 2340-2350.
- Wang, W., Sun, G., Zhang, L., Shi, L. and Zeng, Y. (2014) Circulating MicroRNAs as Novel Potential Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Stroke in Humans. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 23, 2607.
- Weber, N.C., Blumenthal, S.B., Hartung, T., Vollmar, A.M. and Kiemer, A.K. (2003) ANP inhibits TNF-alpha-induced endothelial MCP-1 expression--involvement of p38 MAPK and MKP-1. *Journal of leukocyte biology*, 74, 932.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855.
- Wu, X., Avni, D., Chiba, T., Yan, F., Zhao, Q., Lin, Y., Heng, H. and Livingston, D. (2004) SV40 T antigen interacts with Nbs1 to disrupt DNA replication control. *Genes & Development*, 18, 1305-1316.
- Wurth, L. and Gebauer, F.t. (2015) RNA-binding proteins, multifaceted translational regulators in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849, 881.
- Xiao, C. and Rajewsky, K. (2009) MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*, 136.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003a) Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science*, 301, 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2003b) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*, 4, 1144.

- Yang, L., Chu, Y., Wang, L.a., Wang, Y., Zhao, X., He, W., Zhang, P., Yang, X., Liu, X., Tian, L., Li, B., Dong, S. and Gao, C. (2015) Overexpression of CRY1 protects against the development of atherosclerosis via the TLR/NF-kappaB pathway. *International Immunopharmacology*, 28, 525.
- Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Luppa, P.B., Schmitz, F., Haas, T., Heit, A., Bauer, S. and Wagner, H. (2006) CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *European Journal of Immunology*, 36, 431.
- Young, N.A., Bruss, M.S., Gardner, M., Willis, W.L., Mo, X., Valiente, G.R., Cao, Y., Liu, Z., Jarjour, W.N. and Wu, L.-C. (2014) Oral Administration of Nano-Emulsion Curcumin in Mice Suppresses Inflammatory-Induced NF-kappaB Signaling and Macrophage Migration. *PLoS ONE*, 9, e111559.
- Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L. and Lee, J.C. (1997) Pyridinyl Imidazole Inhibitors of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Bind in the ATP Site. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 12116-12121.
- Yu, T.-X., Rao, J.N., Zou, T., Liu, L., Xiao, L., Ouyang, M., Cao, S., Gorospe, M. and Wang, J.-Y. (2013) Competitive binding of CUGBP1 and HuR to occludin mRNA controls its translation and modulates epithelial barrier function. *Molecular Biology of the Cell*, 24, 85-99.
- Zakkar, M., Chaudhury, H., Sandvik, G., Enesa, K., Luong, L.A., Cuhlmann, S., Mason, J.C., Krams, R., Clark, A.R., Haskard, D.O. and Evans, P.C. (2008) Increased Endothelial Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Expression Suppresses Proinflammatory Activation at Sites That Are Resistant to Atherosclerosis. *Circulation Research*, 103, 726-732.
- Zeng, C., Zhong, P., Zhao, Y., Kanchana, K., Zhang, Y., Khan, Z.A., Chakrabarti, S., Wu, L., Wang, J. and Liang, G. (2015) Curcumin protects hearts from FFA-induced injury by activating Nrf2 and inactivating NF-kappaB both in vitro and in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 79, 1.
- Zhang, H., Taylor, W.R., Joseph, G., Caracciolo, V., Gonzales, D.M., Sidell, N., Seli, E., Blackshear, P.J. and Kallen, C.B. (2013) mRNA-Binding Protein ZFP36 Is Expressed in Atherosclerotic Lesions and Reduces Inflammation in Aortic Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33, 1212-1220.
- Zhang, W., Yang, N. and Shi, X.-M. (2008) Regulation of Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation by Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ). *Journal of Biological Chemistry*, 283, 4723-4729.
- Zhang, X.H., Lu, X., Long, X.B., You, X.J., Gao, Q.X., Cui, Y.H. and Liu, Z. (2009) Chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps is associated with decreased expression of glucocorticoid-induced leucine zipper. *Clinical & Experimental Allergy*, 39, 647.
- Zhou, H., S. Beevers, C. and Huang, S. (2011) The Targets of Curcumin. *Current Drug Targets*, 12, 332.
- Zhou, Y., Chang, R., Ji, W., Wang, N., Qi, M., Xu, Y., Guo, J. and Zhan, L. (2016) Loss of Scribble Promotes Snail Translation through Translocation of HuR and Enhances Cancer Drug Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 291-302.
- Zhou, Y., Zhang, T., Wang, X., Wei, X., Chen, Y., Guo, L., Zhang, J. and Wang, C. (2015) Curcumin Modulates Macrophage Polarization Through the Inhibition of the Toll-Like Receptor 4 Expression and its Signaling Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36, 631.
- Zhu, Y.-p., Shen, T., Lin, Y.-j., Chen, B.-d., Ruan, Y., Cao, Y., Qiao, Y., Man, Y., Wang, S. and Li, J. (2013) Astragalus polysaccharides suppress ICAM-1 and VCAM-1 expression in TNF- α -treated human vascular endothelial cells by blocking NF-[kappa]B activation. *Acta Pharmacol Sin*, 34, 1036.
- Ziaei, A., Hoppstädter, J., Kiemer, A.K., Ramezani, M., Amirghofran, Z. and Diesel, B. (2015) Inhibitory effects of teuclatriol, a sesquiterpene from *salvia mirzayanii*, on nuclear factor-kappaB activation and expression of inflammatory mediators. *Journal of Ethnopharmacology*, 160, 94.

Zucal, C., D'Agostino, V., Loffredo, R., Mantelli, B., Thongon, N., Lal, P., Latorre, E. and Provenzani, A. (2015) Targeting the multifaceted HuR protein, benefits and caveats. *Current drug targets*, 16, 499-515.

Publikationen

Original Publikationen

Diesel B., Hoppstädter J., Hachenthal N., Zarbock R., Cavelius C., Wahl B., Thewes N., Jacobs K., Kraegeloh A., Kiemer A. K. Activation of Rac1 GTPase by nanoparticulate structures in human macrophages. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Volume 84, Issue 2, June 2013, Pages 315-324

Hahn R. T., Hoppstädter J., Hirschfelder K., Hachenthal N., Diesel B., Kessler S. M., Huwer H., Kiemer A. K. Downregulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes vascular inflammation. *Atherosclerosis*. Volume 234, Issue 2, June 2014, Pages 391-400

Hoppstädter J., Hachenthal N., Valbuena-Perez J. V., Lampe S., Astanina K., Kunze M. M., Bruscoli S., Riccardo C., Schmidt T., Diesel B., Kiemer A. K. Induction of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) contributes to anti-inflammatory effects of the natural product curcumin in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. September 14, 2016. 291, 22949-22960.

Schultheiss C., Laggai S., Czepukojc B., Hussein U. K., List M., Barghash A., Tierling S., Hosseini K., Golob-Schwarzl N., Pokorny J., Hachenthal N., Schulz M., Helms V., Walter J., Zimmer V., Lammert F., Bohle R. M., Dandolo L., Haybaeck J., Kiemer A. K., Kessler S. M. LncRNA H19 in HCC and chemoresistance. *in press*

Posterpräsentationen

Hachenthal N., Stadter T., Leidinger P., Grässer F., Meese E., Bruscoli S., Riccardi C., Kiemer A. K. Mechanisms of MyD88- and TRIF-dependent downregulation of the *Glucocorticoid-induced leucine zipper* (GILZ) in macrophages – mRNA destabilization vs. microRNAs. Posterpräsentation auf dem *International Congress of Immunology ICI*, Mailand 2013.

Hachenthal N., Hoppstädter J., Astanina K., Bruscoli S., Riccardi C., Diesel B., Kiemer A. K. The natural compound Curcumin induces the *Glucocorticoid-induced leucine zipper* (GILZ) via the mRNA binding protein HuR in macrophages. Posterpräsentation auf der *29th Annual Conference of the EMDS*, Krakau 2015.

Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. A. K. Kiemer bedanken. Sie gab mir die Möglichkeit sowohl meine Diplomarbeit, als auch meine Doktorarbeit in ihrem Arbeitskreis anzufertigen. Danke für die Betreuung, die Möglichkeit an Kongressen teilzunehmen, die vielen Besprechungen, Ideen, Tipps und ermutigenden Worte in so manchen „experimentellen Durststrecken“, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Prof. Dr. Luzhetskyy für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und Dr. Stefan Boettcher für die Teilnahme als wissenschaftlicher Mitarbeiter.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Jessica Hoppstädter, die die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat. Ohne ihren fachlichen Rat, neue Ideen für Versuchsaufbauten, die Einweisung in die Welt der Makrophagen oder miRNAs, die Hilfe bei diversen Auswertungsproblemen oder „GILZ-Banden-Interpretationen“ wäre ich so manches Mal nicht weiter gekommen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Christina Schultheiß. Was ganz kollegial mit dem Zuschieben von dem ein oder anderen Schokoriegel zur Aufmunterung begann (und die nehme ich auch heute noch gerne an ;-)) ist inzwischen eine tolle Freundschaft geworden. Liebe Christina, ich danke dir für dein stets offenes Ohr für alle Problemchen dieser Welt, für die gemeinsamen Kaffeepausen und alles andere, was diesen Rahmen hier sprengen würde.

Ebenso danke ich allen weiteren (zum Teil ehemaligen) wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern dieses Arbeitskreises: Dr. Britta Diesel, Dr. Sonja Kessler, Dr. Stephan Laggai, Dr. Rebecca Hahn, Dr. Yvette Simon, Dr. Ksenia Astanina, Anna Dembeck, Beate Czepukojc, Vanessa Valbuena-Perez, Kevan Hosseini, Marie Minet, Theo Ransweiler und Herrn Schneider. Danke für die schöne Zeit und die gute Zusammenarbeit.

Ganz lieben Dank insbesondere an Astrid Decker und Theo Ransweiler für die Hilfe in allen möglichen organisatorischen Dingen, sei es im Labor (Theo) oder im Bürokratiedschungel (Astrid)! Ihr habt mich immer sehr unterstützt. (Die beiden Meerschweinchen Friedolin und Paulchen möchten sich an dieser Stelle auch ganz herzlich für den Käfig, den Auslauf und diverses Spielzeug bedanken).

Danke an alle meine Freunde und die, die mich ganz unabhängig von der Arbeit kennen, gern haben und unterstützen. Ohne euch alle wäre der ganze Wahnsinn nicht auszuhalten! ;-)

Zu guter Letzt geht mein Dankeschön an meine Familie, die mich in jeder Entscheidung unterstützt und in jeder noch so schweren Phase aufgebaut hat...durch das komplette Studium, die Diplom- und die Promotionszeit. Ich danke euch von ganzem Herzen dafür, dass ihr niemals Druck aufgebaut habt und mich immer verstanden habt. Dankeschön!