

Summary

Tissue injury and repair is a highly complex and dynamic process. Myeloid cells are known to be one of the major regulators driving these processes. Specifically cells of the monocyte/macrophage lineage have been shown to be critical determinants of the outcome of the healing response. However, there is limited information on the transcriptional control of macrophage plasticity during the diverse stages of tissue injury and remodeling. It is unclear how monocytes/macrophages adapt to the injured environmental milieu and support tissue growth and differentiation in concert with tissue resident cells during the sequential repair stages. Mechanisms and pathways that coordinate these complex and dynamic events have yet to be elucidated. In this study, particularly the myeloid cell-restricted activation of the p38 α MAP kinase and Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) pathways have been investigated in different mouse models of acute and chronic skin injury.

We identified myeloid cell-restricted Stat3 activation as an important suppressor of skin fibrosis in a mouse model of chronic bleomycin-induced tissue injury, while the impact of myeloid cell-restricted p38 α or Stat3 activation on the dynamics or quality of healing after acute excision skin injury was minor. To further examine the functional impact of Stat3-mediated macrophage activation during the course of skin fibrosis, we generated myeloid cell-specific Stat3 deficient mice (Stat3^{MKO}) and analyzed bleomycin-induced skin fibrosis. Bleomycin-induced skin fibrosis was significantly accelerated in Stat3^{MKO} mice when compared to controls. Fibrotic lesions in Stat3^{MKO} mice were characterized by increased collagen deposition and pro-fibrotic mediators including cartilage oligomeric matrix protein (COMP). Whereas the absolute number and the percentage of macrophages within fibrotic lesions were comparable in Stat3^{MKO} versus control mice, transcripts of several mediators controlling autocrine and paracrine TGF β 1 activity were differentially expressed in macrophages isolated from fibrotic skin lesions in Stat3^{MKO} versus control mice. Bleomycin-mediated injury in control mice resulted in increased expression of IL-10, SOCS3, and decorin in macrophages, all factors that previously have been reported to inhibit TGF β 1 signaling and/or the development of fibrosis. In contrast, in Stat3-deficient macrophages, expression of these genes was significantly attenuated when

compared to controls, proposing their functional role in the accelerated fibrotic response in Stat3^{MKO} mice. Consistently, TGFβ1 transcripts and downstream targets such as pSmad2 were significantly increased in lesional Stat3-deficient macrophages and the fibrotic lesion, respectively. To corroborate our *in vivo* findings suggestive for increased TGFβ1 activity in Stat3^{MKO} mice, we investigated macrophage-fibroblasts co-cultures. Notably, these *in vitro* experiments confirmed IL-10-Stat3-mediated suppression of TGFβ1 expression in control macrophages, and alleviation of this suppression by either macrophage-specific Stat3 or type II TGFβ receptor-deficiency, or TGFβ1 blocking antibodies. In addition, co-culture experiments of Stat3-deficient macrophages with dermal fibroblasts resulted in increased expression of the TGFβ1 target CTGF in fibroblasts. Conclusively, our findings identify IL-10-mediated activation of Stat3 in macrophages as an important suppressor of bleomycin-induced skin fibrosis. Our findings provide new mechanistic insights into the macrophage-fibroblast crosstalk and uncover novel therapeutic targets to limit skin fibrosis.

Zusammenfassung

Gewebeschädigung und deren Reparatur sind hoch komplexe und dynamische Prozesse, deren bekannte Hauptregulatoren myeloide Zellen sind. Es wurde insbesondere gezeigt, dass Zellen der Monozyten/Makrophagen Abstammung wichtige Faktoren sind, die den Ausgang des Heilungsprozesses bestimmen. Allerdings ist unser Wissen darüber, welche intrazellulären Signalwege die Plastizität der Makrophagen während der Gewebereparatur und deren Umstrukturierung kontrollieren, noch unausgereift. Es ist unklar, wie sich Monozyten/Makrophagen an das unbeständige Wundmilieu anpassen und darauffolgend den Aufbau des Granulationsgewebes und dessen Umstrukturierung durch Interaktionen mit ansässigen Gewebszellen fördern und dirigieren. Die Mechanismen und Signalwege, die diese komplexen dynamischen Ereignisse koordinieren, wurden noch nicht aufgeklärt. In dieser Studie wurden speziell die Myeloidzell-spezifischen Signalwege der p38 α MAP Kinase und des Transkriptionsfaktors „Signal transducer and activator of transcription 3“ (Stat3) in verschiedenen Mausmodellen der akuten und chronischen Hautverwundung untersucht.

Wir konnten die Aktivierung von Myeloidzell-spezifischem Stat3 als wichtigen Unterdrücker der Hautfibrose in einem Mausmodell der Bleomycin-induzierten chronischen Gewebeschädigung identifizieren. Indessen stellte sich die Auswirkung der Myeloidzell-spezifischen p38 α und Stat3 Aktivierung auf die Dynamik und Qualität der Wundheilung nach akuter Gewebeexzision eher als geringfügig heraus. Um die Funktion der Stat3-vermittelten Makrophagenaktivierung im Verlauf der Hautfibrose zu untersuchen, wurden Mäuse mit Myeloidzell-spezifischer Stat3 Defizienz (Stat3^{MKO}) generiert und in Bleomycin-induzierter Hautfibrose analysiert. Im Vergleich zu Kontrollmäusen war die Bleomycin-induzierte Hautfibrose in Stat3^{MKO} Mäusen signifikant beschleunigt. Die fibrotische Läsion in Stat3^{MKO} Mäusen war durch vermehrte Kollagenablagerung und pro-fibrotische Faktoren, inklusive „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP), charakterisiert. Während die absolute und relative Anzahl an Makrophagen in der fibrotischen Läsion von Stat3^{MKO} und Kontrollmäusen vergleichbar war, war die Genexpression einiger Mediatoren, die die autokrine und parakrine TGF β 1 Aktivität kontrollieren, in isolierten Makrophagen der fibrotischen Läsion der Stat3^{MKO}

Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen verändert. Bleomycin-vermittelte Verletzung von Kontrollmäusen führte zur erhöhter Expression von IL-10, SOCS3 und Decorin in Makrophagen, alles Faktoren, welche bereits als Inhibitoren des TGF β 1 Signalweges und/oder der Fibroseentwicklung gemeldet wurden. Im Gegensatz dazu ist die Expression dieser Gene in Stat3^{MKO} Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu den Kontrollen, was darauf hinweist, dass sie eine wichtige Funktion in der beschleunigten fibrotischen Antwort in Stat3^{MKO} Mäusen haben. Übereinstimmend damit sind TGF β 1 Transkripte und deren nachgelagerten Ziele wie pSmad2 jeweils in den Makrophagen der Läsion und der fibrotischen Läsion signifikant erhöht. Um unsere *in vivo* Resultate zu bekräftigen, die eine erhöhte TGF β 1 Aktivität in Stat3^{MKO} Mäusen nahelegen, wurden Makrophagen-Fibroblasten Co-Kulturen untersucht. Bemerkenswerterweise bestätigten diese *in vitro* Versuche eine IL-10-Stat3-vermittelte Unterdrückung der TGF β 1 Expression in Kontrollmakrophagen, während eine Verminderung dieser Unterdrückung in Makrophagen mit Stat3 oder Typ II TGF β Rezeptor Defizienz, oder durch TGF β 1-neutralisierende Antikörper zu sehen war. Zusätzlich resultierte ein Co-Kultur Experiment mit Stat3-defizienten Makrophagen und dermalen Fibroblasten in einer erhöhten CTGF Expression in Fibroblasten, welches durch TGF β 1 induziert werden kann. Insgesamt identifizieren unsere Ergebnisse IL-10-vermittelte Aktivierung von Stat3 in Makrophagen als wichtigen Unterdrücker von Bleomycin-induzierter Fibrose. Unsere Ergebnisse liefern neue mechanistische Erkenntnisse über die Interaktion von Makrophagen und Fibroblasten und bieten neuartige therapeutische Ziele zur Begrenzung von Hautfibrose.