

# **Aktivierung und Inhibierung von intrazellulären Signalkaskaden in Makrophagen durch Lipopolysaccharid und N-Acetylcystein**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von  
Lydia Blauhut  
geboren am 07.09.1986 in Meerane

2016

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. habil. Udo Markert, Universitätsklinikum Jena
2. PD Dr. rer. nat. et. med. habil. Uta-Christina Hipler, Universitätsklinikum Jena
3. PD Dr. med. Sabine Segerer, endokrinologikum Hamburg und Universitätsklinikum  
Würzburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 09.01. 2017

Die vorliegende Dissertation wurde im Labor von  
Herrn Professor Dr. med. habil. Udo R. Markert  
am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena,  
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
angefertigt.

**Für meine Mutter**

## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	8
Zusammenfassung .....	12
1 Einleitung .....	13
1. 1 Die Makrophage .....	13
1.1.1 Funktion und Aufgaben der Makrophagen .....	13
1.1.2 Phagozytose .....	14
1.2 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies .....	15
1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....	15
1.2.2 Reaktive Stickstoffspezies (NOS) .....	17
1.3 Die Entzündungsreaktion .....	18
1.3.1 Ablauf einer Entzündungsreaktion .....	18
1.3.1.1 Die Sofortreaktion .....	18
1.3.1.2 Migration von Effektorzellen und Einleitung der erworbenen Immunantwort .....	19
1.4 Die Rolle von Makrophagen bei entzündlichen Erkrankungen .....	20
1.4.1 Makrophagen als Mediatoren des septischen Schocks .....	20
1.5 Antioxidanzien .....	22
1.5.1 N-Acetylcystein (NAC) .....	22
1.5.2 Glutathion (GSH) .....	23
1.6 Signaltransduktionswege .....	24
1.6.1 Der Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) .....	25
1.6.2 Der Transkriptionsfaktor NFκB .....	26
1.6.3 RAS/MEK/ERK-Weg .....	27
1.6.4 JAK/STAT-Weg .....	29
2 Ziele der Arbeit .....	31
3 Methoden .....	32
3.1 Zelllinie THP-1 .....	32
3.2 Zellkultur .....	33
3.2.1 Kultivierung der Zellen .....	33
3.2.2 Behandlung der Makrophagen .....	33
3.2.3 Die Zellyse .....	34
3.2.4 MTT-Assay .....	34
3.4 Kontrolle mittels SDS-Page und Western Blot .....	35
3.4.1 SDS-Page .....	35
3.4.2 Western Blot .....	37

3.4.3 Inkubieren mit Antikörpern.....	38
3.4.4 Detektion der Proteine.....	39
3.5. Strippen.....	40
3.6. Auswertung mit Total Lab .....	40
4 Ergebnisse.....	42
4.1 Signaltransduktion über TLR-4 - pIRAK-1.....	42
4.1.1 LPS-Stimulation der THP-1 Zellen.....	42
4.1.2 NAC-Stimulation der THP-1 Zellen.....	44
4.1.3 LPS+NAC-Stimulation der THP-1 Zellen.....	46
4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	48
4.2 Transkriptionsfaktor NFκB.....	49
4.2.1 LPS-Stimulation der THP-1 Zellen.....	49
4.2.2 NAC-Stimulation der THP-1 Zellen.....	51
4.2.3 LPS+NAC-Stimulation der THP-1 Zellen.....	53
4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	55
4.3 pErk1/2 und ERK 1/2 .....	55
4.3.1 LPS-Stimulation der THP-1 Zellen.....	56
4.3.2 NAC-Stimulation der THP-1 Zellen.....	59
4.3.3 LPS+NAC-Stimulation der THP-1 Zellen.....	62
4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	65
4.4 pStat3 und STAT3 .....	66
4.4.1 LPS-Stimulation der THP-1 Zellen.....	66
4.4.2 NAC-Stimulation der THP-1 Zellen.....	69
4.4.3 LPS+NAC-Stimulation der THP-1 Zellen.....	72
4.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	75
5 Diskussion .....	76
5.1. Zytokinsekretion und ROS/NOS-Produktion in LPS-stimulierten THP-1 Zellen unter NAC-Behandlung.....	76
5.2 Interpretation und Diskussion der Ergebnisse.....	78
5.2.1 Signaltransduktion während einer LPS-Stimulation in THP-1 Zellen .....	78
5.2.2 Signaltransduktion während einer NAC-Stimulation in THP-1 Zellen .....	80
5.2.3 Signaltransduktion LPS-stimulierter THP-1 Zellen unter NAC-Behandlung .....	80
5.3. Bestimmung der Signaltransduktion durch das Western Blot-Verfahren.....	85
5.3.1 Anpassung der Methode.....	85
5.3.2 Diskussion und Fehleranalyse der Methode.....	88
6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	90

Literatur – und Quellenverzeichnis .....	92
Anhang .....	I
Verwendete Geräte und Materialien.....	I
Danksagung.....	VIII
Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Ehrenwörtliche Erklärung .....	IX

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AA/BAA	Bis-/Acrylamid
Abb.	Abbildung
AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl 10	B-cell Lymphoma/Leukemia 10
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
bzw	beziehungsweise
CaM	Zelladhäsionsmolekül
CARMA-1	Caspase Recruitment Domain-containing Membrane-associated Guanylate Kinase Protein-1
CAT	Katalase
CCD-Kamera	Charge-coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
DAG	1,2-Diacyl- <i>sn</i> -glycerinen
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elk-1	ETS domain-containing protein 1
ERK 1/2	Extrazellulär-regulierte Kinase 1/2
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fc	Crystallisable Fragment

FCS	Fetales Kälberserum
Fe <sup>2+</sup>	Zweiwertiges Eisen
FMN	Flavinmononukleotid
Fos	Transkriptionsfaktor
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
HWZ	Halbwertszeit
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IgG	Immunglobulin G
IFN-γ	Interferon-γ
IκB	Inhibitor von kappa B
IκK	IκB Kinase
IL	Interleukin
IRAK-1	Interleukin-1Rezeptor-assoziierte Kinase 1
i.v.	intravenös
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
Jun	Transkriptionsfaktor
KCL	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid

---

M <sub>r</sub>	Molekulare Masse
MALT 1	Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Protein 1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MD-2	Myeloid Differentiation Factor 2
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	Myeloide Differenzierungsfaktor 88
LBP	LPS-bindendes Protein
mRNS	Mikro-Ribonukleinsäure
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Net-G	Buffer mit Gelatine
NFκB	Nuklear Factor kappa B
NO•	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxid-Anion
OH•	Hydroxylradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit

---

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKC	Proteinkinase C
PLC- $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
PMA	Tetradecanoyl-Phorbolacetat
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktiven Sauerstoffspezies
SAPK	Stress-activated protein kinases
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOD	Superoxid-Dismutase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAK 1	Transforming Growth Factor $\beta$ -actinase 1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THP-1	Zelllinie der Humanen akuten monozytären Leukämie
TIR	Toll like + IL-1 Rezeptor-Funktion
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAK-6	TNF-Rezeptor-assozierte Kinase 6
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TLR	Toll-like Rezeptor
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat

## Zusammenfassung

Hintergrund: Eine Überreaktion des Immunsystems kann den Körper, sowohl akut durch Störung der Kreislaufregulation und Verlust von Organfunktionen als auch durch chronische entzündliche Prozesse an Gelenken und verschiedenen Organen, schädigen. Makrophagen als Bestandteil der angeborenen Immunantwort erkennen eingedrungene Erreger durch spezifische Oberflächenmoleküle wie zum Beispiel Lipopolysaccharid, ein Zuckermolekül der Bakterienzellwand und leiten die Beseitigung des Pathogens unter anderem durch Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine sowie die Produktion von Sauer- und Stickstoffradikalen ein. N-Acetylcystein, Vorstufe des stärksten Antioxidanz des Körpers Glutathion, ist in der Lage durch Neutralisierung freier Radikale und Senkung der Zytokinausschüttung hemmend in den Entzündungsprozess einzugreifen.

Ziele: Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von N-Acetylcystein auf entzündungsassoziierte Signalwege und den Transkriptionsfaktor NFκB in Lipopolysaccharid-aktivierten Makrophagen.

Material und Methoden: Dazu wurden mittels Westen Blot Signalmoleküle dieser Signalwege in Makrophagen, der Zelllinie THP-1 untersucht, die mit jeweils Lipopolysaccharid, N-Acetylcystein und beiden Detergenzien stimuliert wurden. Bei dieser Untersuchung wurden die Signalmoleküle IRAK-1 als Bestandteil des Aktivierungsweges des Toll-like-Rezeptors 4, ERK1/2 im RAS/MEK/ERK-Weg, STAT3 im JAK/STAT-Weg und der Transkriptionsfaktor NFκB genauer betrachtet. Die Auswertung des Western Blots erfolgte über Chemilumineszenz-Methode und Detektion mit dem Gel-Dokumentationssystem MF-ChemiBIS.

Ergebnisse: Lipopolysaccharid aktiviert alle untersuchten entzündungsfördernden Signalkaskaden. N-Acetylcystein führt ebenfalls zur einer schwächeren Aktivierung einige der untersuchten Signalwege. Eine Aktivierung von ERK1/2 unter N-Acetylcystein war nicht sichtbar. Die Behandlung der Lipopolysaccharid-aktivierten Makrophagen mit N-Acetylcystein zeigt neben einem hemmenden Effekt in Form einer Verzögerung der Aktivierungszeit einiger Signalwege wie den RAS/MEK/ERK-Weg sowie einer Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB auch eine gesteigerte Phosphorylierung von Signalmolekülen, in diesem Fall von IRAK-1 des Rezeptor TLR-4 und STAT-3 des JAK-STAT-Weges der entzündungsfördernden

Signalkaskaden.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass N-Acetylcystein durch Regulation verschiedener entzündungsassoziierter Signalwege Potenzial besitzen könnte, als entzündungshemmendes Medikament bei Erkrankungen wie septischem Schock oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt zu werden.

# 1 Einleitung

## 1. 1 Die Makrophagen

Makrophagen (MΦ) gehören zu den Phagozyten des angeborenen Immunsystems und reifen kontinuierlich aus zirkulierenden Monozyten heran, die den Blutkreislauf verlassen und in das Gewebe migrieren. Blutmonozyten und Gewebemakrophagen stammen von der gleichen Vorläuferlinie, den pluripotenten Stammzelle der myeloiden Reihe, ab und werden als mononukleares System oder Retikuloendotheliales System bezeichnet (Geissmann 2010). Die Differenzierung aus der Vorläuferzelle geschieht durch Einwirken verschiedener Wachstumsfaktoren, anfänglich durch GM-CSF und später hauptsächlich durch M-CSF (Metcalf 1986). Makropagen sind langlebig und erneut aktivierbar.

Makrophagen sind in großen Mengen im Bindegewebe, in der Submucosa des Verdauungstraktes, in der Lunge (sowohl im Interstitium als auch in den Alveolen), entlang bestimmter Blutgefäße in der Leber und in der kompletten Milz lokalisiert (Murphy et al. 2009).

### 1.1.1 Funktion und Aufgaben der Makrophagen

Die Aktivierung erfolgt über ein zweistufiges Verfahren: zuerst die Vorbereitung durch Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (Adams und Hamilton 1987) und die anschließende Auslösung durch Lipopolysaccharid (LPS), einem Membranbestandteil gramnegativer Bakterien. LPS gilt als stärkster Aktivator der Makrophagen (Rietschel und Brade 1992). Neben der klassischen M1-Aktivierung ist eine Stimulation der Makrophage durch IL-4 und IL-13 durch T2-Helferzellen möglich, der sogenannte M2-Weg. Dies führt zu einer anti-entzündlichen Antwort und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Krebserkrankungen (Gordon und Martinez 2010). Die Aktivierung des M1-Weges resultiert in einer Vielzahl von Reaktionen wie der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und pro- oder antikoagulatorischen Gerinnungsfaktoren, sowie bei der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Phagozytose des eingedrungenen Erregers (Sweet und Hume 1996).

Neben der Sofortreaktion des angeborenen Immunsystems spielt die Makrophage eine essentielle Rolle bei der Einleitung der erworbenen Immunantwort. So

präsentieren aktivierte Makrophagen zuvor phagozytierte Antigene als MHC-II-Komplexe dendritischen Zellen und T-Helfer-Zellen (Trombetta und Mellman 2005). Makrophagen produzieren nach Aktivierung eine Vielzahl verschiedener Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Michalek et al. 1980), IL-1 (Fantuzzi et al. 1996), IL-6, IL-8 (Baggiolini et al. 1994), IL-10 (Malefyt et al. 1991), IL-12 (Cassatella et al. 1995) und Lipidmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene (Victorov und Hoek 1995) und den plättchenaktivierenden Faktor (Gan et al. 1995). Diese Moleküle dienen in der induzierten Abwehr als Mediatoren und lösen die Entzündungsreaktion aus. Neben der entzündungsfördernden Aktivität fördert die Makrophage unter anderem die Narbenbildung, bzw. Fibrose durch Anlockung von Fibroblasten (Wynn und Barron 2010) und ist essentieller Bestandteil der Embryogenese (Lichanska et al. 1999).

### **1.1.2 Phagozytose**

Eine Hauptfunktion aktivierter Makrophagen ist die Phagozytose eingedrungener Partikel und deren Zerstörung durch Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Victor et al. 2003a).

Die Phagozytose ist ein aktiver Vorgang (Aderem und Underhill 1999), bei welchem das Pathogen durch Oberflächenrezeptoren wie den Mannose-Rezeptor (Stahl und Ezekowitz 1998) oder Scavenger-Rezeptor (Hampton et al. 1991) erkannt und gebunden wird. Anschließend umhüllt die Membran das gebundene Pathogen (Swanson und Baer 1995), um es in das Phagosom aufzunehmen. Das Phagosom verschmilzt anschließend mit einem Lysosom. Der neu entstandene Komplex wird als Phagolysosom bezeichnet (Desjardins 1995). Während der Phagozytose produzieren Makrophagen eine Reihe von Stoffen wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate, die für die eingedrungenen Erreger direkt toxisch sind (DeLeo et al. 1999).

Neben Krankheitserregern phagozytieren Makrophagen auch körpereigene Zellen, beispielsweise gealterte Zellen wie Erythrozyten, die in der Milz durch Makrophagen abgebaut werden. Aber auch Zellen, die in den programmierten Zelltod gehen, werden ohne Entzündungsreaktion beseitigt (Savill 1997).

## 1.2 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

### 1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), auch ungenau als „Sauerstoffradikale“ bezeichnet, sind die Formen des Sauerstoffes, die den Organismus schädigen können. Sie besitzen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen und sind dadurch äußerst reaktionsfreudig, um einen stabilen Zustand zu erreichen. Zu den ROS zählen neben freien Radikalen wie dem Superoxid-Anion  $O_2^{\cdot-}$ , das hochreaktive Hydroxyl-Radikal  $OH\cdot$ , das Peroxylradikal  $ROO\cdot$  und das Alkoxyradikal  $RO\cdot$ , aber auch stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ , Hydroperoxid  $ROOH$ , Ozon  $O_3$ , Hypochlorit-Anion  $OCl^-$  und angeregte Sauerstoffmoleküle wie der Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$  (Halliwell und Gutteridge 1999).

Die ROS-Bildung erfolgt hauptsächlich in den Mitochondrien durch die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Dabei entstehen als Zwischenstufen  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  und  $OH\cdot$  (siehe Abb. 1.1) (Halliwell und Gutteridge 1999).  $O_2^{\cdot-}$  wird von einer membranassoziierten NADPH-Oxidase, die aus mehreren Untereinheiten (gp22phox, gp91phox, p47phox, p67phox, p40phox und rac) besteht, erzeugt (Babior 1999). Die Aktivierung der NADPH-Oxidase kann durch verschiedene Stimuli wie mikrobiellen Produkten (LPS),  $IFN-\gamma$ , IL-8 oder durch IgG-Bindung an Fc-Rezeptoren erfolgen (DeCoursey und Ligeti 2005). Während der Reduktion wird ein Elektron von NADPH auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dieser Prozess wird als Respiratorische Entladung (*respiratory burst*) bezeichnet, da währenddessen der Sauerstoffverbrauch vorübergehend zunimmt (Baldrige und Gerhard 1933).  $O_2^{\cdot-}$  wird durch eine monovalente Reduktion mit Hilfe des Enzyms Superoxid-Dismutase (SOD) in  $H_2O_2$  umgewandelt (McCord und Fridovich 1969). Im nächsten Schritt können durch die Haber-Weiss-Reaktion (Elektronenübertragung mit Hilfe eines metallischen Reduktionsmittels, meist  $Fe^{2+}$ ) die äußerst aggressiven Hydroxylradikale ( $HO\cdot$  bzw.  $OH\cdot$ ) gebildet werden (Haber und Weiss 1934). Alternativ können nach der Dismutation von  $H_2O_2$  Hypochlorid oder Chloramine durch die Myeloperoxidase (Klebanoff 2005) entstehen.

Bei übermäßiger ROS-Produktion (Oxidativer Stress) können diese ebenfalls körpereigene Makromoleküle angreifen, hauptsächlich die mitochondriale Membran und ihre Proteine, in zweiter Linie erfolgt die Oxidation cytoplasmatischer Proteine oder der DNS.

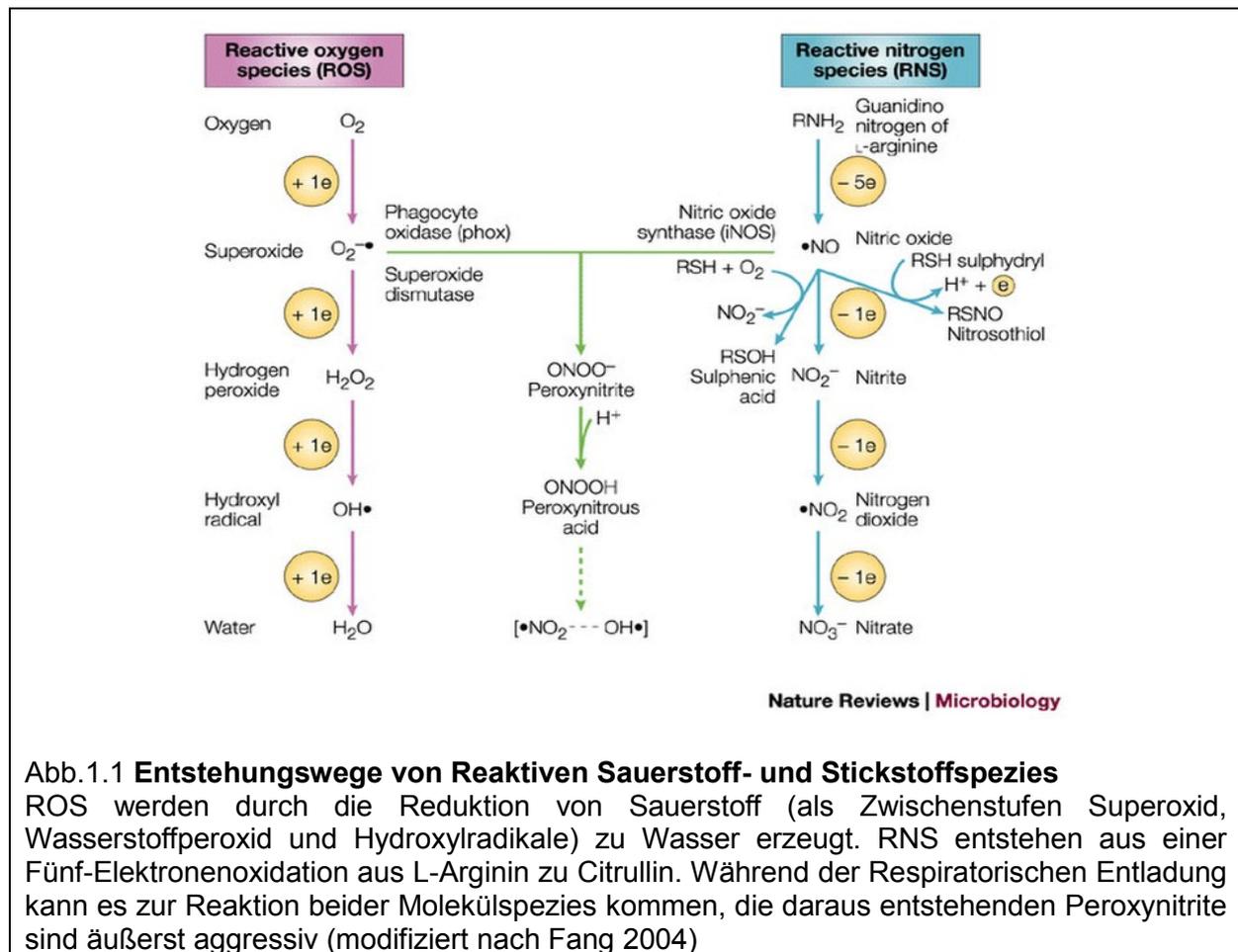


Abb.1.1 **Entstehungswege von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies**

ROS werden durch die Reduktion von Sauerstoff (als Zwischenstufen Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale) zu Wasser erzeugt. RNS entstehen aus einer Fünf-Elektronenoxidation aus L-Arginin zu Citrullin. Während der Respiratorischen Entladung kann es zur Reaktion beider Molekülspezies kommen, die daraus entstehenden Peroxynitrite sind äußerst aggressiv (modifiziert nach Fang 2004)

Während der sogenannten Lipidperoxidation kommt es zur Oxidation ungesättigter Fettsäuren in den Membranlipiden (subtraktive Reaktion) durch ROS. Diese Reaktion führt zur Senkung des Membranpotentials und einem unkontrollierten Ionenaustausch, was letztendlich in der Zerstörung der Membran und dem damit einhergehenden Funktionsverlust resultiert (Gutteridge 1995).

Die durch ROS verursachten Proteinschäden betreffen vor allem Proteine in der mitochondrialen Membran, dabei sind Aminosäuren der Peptide unterschiedlich anfällig. Schwefelhaltige Aminosäuren und speziell Thiolgruppen sind die anfälligsten Stellen. Durch Abspaltung von Wasserstoffatomen von Cystein entsteht ein Thiylradikal, dieses verbindet sich unter Ausbildung einer Disulfidbrücke (S-S) mit einem zweiten Thiylradikal (Yim et al. 1994). Das führt in den meisten Fällen zur Konformationsänderung im Protein und der Deaktivierung des Proteins (Dean et al. 1997). ROS gehören zu den intrazellulären Mutagenen. DNS-Schäden treten entweder direkt als Strangbrüche auf oder als direkte Reaktion mit den Nukleinbasen, besonders Thymin und Guanin (Halliwell und Gutteridge 1999). Die häufigsten durch ROS ausgelösten Erkrankung sind aufgrund dessen Karzinome

(Valko et al. 2006). Zudem spielt ROS eine Rolle bei der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen (Hultqvist et al. 2004), degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Huang et al. 1999) und dem Alterungsprozess (Finkel und Holbrook 2000).

### 1.2.2 Reaktive Stickstoffspezies (NOS)

Zu den reaktiven Stickstoffspezies werden Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\bullet$ ) und dessen Folgeprodukte gezählt wie beispielsweise Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ).

$\text{NO}$  ist ein kleines Molekül mit einem ungepaarten Elektron und einer Halbwertszeit von fünf Sekunden, weswegen es ständig neu produziert werden muss. Es spielt eine wesentliche Rolle als Signalmolekül in verschiedenen physiologischen Prozessen wie Neurotransmission, Blutdruckregulation, Immunabwehr und Muskelrelaxation (Schmidt und Walter 1994).  $\text{NO}$  wird mit Hilfe der homodimeren Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) (Nathan und Xie 1994) erzeugt. Dabei werden mittels einer Fünf-Elektronen-Oxidation eines Guanidino-Stickstoffatoms der Aminosäure L-Arginin und molekularer  $\text{O}_2$  L-Citrullin und  $\text{NO}$  metabolisiert (Palmer et al. 1988, Schmidt et al. 1988) (siehe Abb. 1.1.), was in zwei Schritten mit dem Intermediat  $\text{N}^\omega$ -Hydroxy-L-Arginin ( $\text{NOHLA}$ ) abläuft (Stuehr et al. 1991). Für die Oxidation werden verschiedene Ko-Faktoren und Substrate wie NADPH, FAD, FMN,  $\text{BH}_4$ , CaM und ein Thiolgruppen-Donor benötigt (Stuehr et al. 1991). Die Regulation findet über die Verfügbarkeit von L-Arginin und  $\text{BH}_4$  statt (Tayeh und Marletta 1989).

Es sind 3 Isoformen der NOS bekannt: die Endotheliale NO-Synthase, die NOS in Makrophagen/Mikrogliazellen und die NOS in Neuronen (Alderton et al. 2001). Die NO-Synthase in Makrophagen (iNOS oder NOS2) ist eine induzierbare Isoform, welche in inaktiven Zellen nicht vorkommt (MacMicking et al. 1997). Die Aktivierung erfolgt durch verschiedene Zytokine ( $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ) (Kleinert et al. 1998) und immunologischer Stimuli wie Endotoxine (Stuehr und Marletta 1985). LPS wirkt mit  $\text{IFN-}\gamma$  sowohl synergistisch als auch antagonistisch auf die Induktion von iNOS, abhängig von der Konzentration und der Sequenz der Stimulation (Bogdan 2001). Die von iNOS produzierte Menge an  $\text{NO}$  kann um das 1000-fache höher sein als durch die konstitutive eNOS (Balligand et al. 1994).

Eine Überproduktion von RNS wird als Nitrosativer Stress bezeichnet. Während der Respiratorischen Entladung in entzündlichen Prozessen werden sowohl  $\text{NO}$  als auch

$O_2^{\cdot-}$  produziert, die miteinander reagieren können und das nicht-radikalische, aber hochtoxische  $ONOO^-$  bilden (Blough und Zafiriou 1985) (siehe Abb. 1.1.).  $ONOO^-$  ist in der Lage, neben der DNS-Fragmentierung (Wiseman und Halliwell 1996) und Lipidperoxidation (Rubbo et al. 1994) direkt mit Proteinen zu reagieren. Die Modifizierung von Proteinen wie Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom C erfolgt durch die Oxidation des eisenhaltigen Häms und kann zur irreversiblen Hemmung der Enzyme führen (Beckman und Koppenol 1996).

RNS sind bei der Entstehung verschiedener Krankheiten wie entzündlichen Erkrankungen (Asthma bronchiale, Rheumatoide Arthritis) (Hamid et al. 1993, Sakurai et al. 1995), Sepsis und neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson) (Akiyama 2000, Hunot et al. 1996) involviert.

### **1.3 Die Entzündungsreaktion**

Die Abwehrmechanismen der Makrophagen äußern sich in einer akuten Entzündungsreaktion (Fujiwara et al. 2005). Das klassische Erscheinungsbild der Entzündung, bestehend aus Rötung (Rubor), Erhitzung (Calor), Schwellung (Tumor), Schmerz (Dolor) und Funktionseinschränkung (Functio laesa), entsteht unter anderem durch Effekte von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren auf lokale Blutgefäße. Die Folge ist eine Vasodilatation und Erhöhung der Permeabilität der Blutgefäße. Dies führt zu einem verstärkten Blutfluss und Auspressen von Flüssigkeit in umliegendes Gewebe, was die Erwärmung, Rötung und Schwellung zur Folge hat. Die Zytokine wirken zudem auf das Gefäßendothel, diese sezernieren daraufhin eigene Zytokine (Hedges et al. 1995) und es kommt zur Veränderung der Adhäsionskräfte, um zirkulierende Lymphozyten zu fixieren und die Migration in das infizierte Gewebe einzuleiten. Diese Vorgänge sind für die Schmerzentstehung verantwortlich (Pober und Sessa 2007).

#### **1.3.1 Ablauf einer Entzündungsreaktion**

##### **1.3.1.1 Die Sofortreaktion**

Nach Überwindung der ersten physikalischen und chemischen Abwehrlinien in Form der Haut, der Schleimhäute der Atemwege und des Darmes treffen die eingedrungenen Mikroorganismen auf die Gewebsmakrophagen, die eine sofortige

Abwehr durch das angeborene Immunsystem einleiten. Die Makrophagen erkennen unspezifisch häufige Oberflächenbestandteile von Erregern mit ihren Rezeptoren und werden dadurch aktiviert (Janeway 1992). Nach Erkennung des Pathogens wird dieses phagozytiert und zerstört (Blander und Medzhitov 2004). Neben der direkten Auslösung der Sofortreaktion durch Makrophagen, kann das Komplementsystem eine lokale Entzündung und Phagozytose des Erregers veranlassen (Murakami et al. 1993). Die kleinen Plasmaproteine beseitigen vor allem Erreger, die in die Blutbahn eingedrungen sind (Vollmar et al. 2013). Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt meist durch bakterielle Oberflächen und löst eine Opsonierung aus, wodurch die Pathogene mit Komplementfragmenten (C4a,C3a,C5a) bedeckt und für die Zerstörung durch die Makrophagen markiert werden (Dunkelberger und Song 2010).

### **1.3.1.2 Migration von Effektorzellen und Einleitung der erworbenen Immunantwort**

Gelingt die Beseitigung der eingedrungenen Erreger nicht in der Sofortreaktion werden weitere Abwehrmechanismen induziert (Fearon und Locksley 1996). Die über Toll-like Rezeptoren aktivierten Makrophagen setzen nun verstärkt Zytokine (insbesondere TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6) und Chemokine frei, um weitere Effektorzellen zu mobilisieren und zu aktivieren (Medzhitov et al. 1997). Damit wird die Entzündungsreaktion eingeleitet. Die Zytokine vermitteln die autokrine und parakrine Zellkommunikation zwischen den Effektorzellen. Zu den Zytokinen gehören Interferone, Interleukine, die TNF-Familie, Chemokine und hämatopoetische Wachstumsfaktoren (Murphy et al. 2009). Zur Mobilisierung anderer Effektorzellen werden insbesondere das Chemokin IL-8 (Baggiolini et al. 1997) und MCP-1 (Fuentes et al. 1995) eingesetzt. Chemokine begünstigen neben dem Zustrom von Monozyten ins entzündliche Gewebe auch die Aktivierung, funktionelle Polarisierung und das Homing patrouillierender Monozyten (Mantovani et al. 2004).

Neben Chemokinen spielen Adhäsionsmoleküle wie Selektine, Integrine und Proteine der Immunglobulin-Superfamilie eine entscheidende Rolle bei der Migration von Effektorzellen in das infizierte Gewebe. Durch TNF- $\alpha$  aktiviertes Endothel exprimiert Selektine (Yoshida et al. 1996), die mittels Oligosaccharide (Sialyl-Lewis) und PECAM-1 (Muller et al. 1993) Leukozyten aus der Blutbahn locker binden und sie entlang des Endothels rollen lassen. Die vollständige Adhäsion erfolgt über eine

Chemokin-vermittelte Ausbildung einer Bindung vom ICAM des Endothels an Leukozyten-Integrine ( $\beta$ 2-Integrine wie LFA-1) (Smith et al. 1989). Die Diapedese (Migration der Zelle durch das Endothel) der Leukozyten resultiert aus der proteolytischen Zerstörung der Basalmembran mit Hilfe von Enzymen entlang eines Chemokin-Gradienten (Luster 1998). Zunächst kommt es zur massiven Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren. Die Aktivierung der Makrophagen und Granulozyten erfolgt durch TNF- $\alpha$  (Nathan et al. 1989), welches auch die Produktion der zytotoxischen Sauerstoffspezies verstärkt.

Zudem werden Akute-Phase-Proteine wie C-reaktives Protein aus den Hepatozyten freigesetzt. Diese fungieren als lösliche Rezeptoren, die das angeborene Immunsystem zur Erregeridentifizierung und Einleitung der Phagozytose nutzt (Xia und Samols 1997).

Das von Makrophagen sezernierte TNF- $\alpha$  stimuliert die Produktion von Proteinen, die zur lokalen Blutgerinnung (Bevilacqua et al. 1986) und zur Abkapselung des Infektionsherdes beitragen. Dies dient der Verhinderung einer weiteren Ausbreitung bis zur Aktivierung der erworbenen Immunantwort (Vollmar et al. 2013). TNF- $\alpha$  bewirkt, neben der Expressierung von Adhäsionsmolekülen, eine erhöhte Permeabilität der Gefäße. Dadurch kommt es zur Extravasation in das umliegende Gewebe (Petrache et al. 2003), was zu einer verstärkten Wanderung von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen in das naheliegende lymphatische Gewebe führt. Dort wird die erworbene Immunantwort durch den Kontakt mit den Lymphozyten eingeleitet (Re et al. 2001).

## **1.4 Die Rolle von Makrophagen bei entzündlichen Erkrankungen**

Makrophagen sind vielfältig in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (Hausmann et al. 2001, Kamada et al. 2008), Rheumatoide Arthritis (Chu et al. 1991) und Sepsis (Beutler et al. 1985) involviert.

### **1.4.1 Makrophagen als Mediatoren des septischen Schocks**

Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der Abwehr und Eindämmung von

Infektionen, können aber auch verheerenden systemischen Schaden verursachen (Spooner et al. 1992). Über den TLR-Rezeptor stimulierte Makrophagen in der Leber und Milz sind in der Lage große Mengen TNF- $\alpha$  systemisch in die Blutbahn abzugeben. Die Folge sind eine Permeabilitätserhöhung, sowie die Mobilisierung und Stimulation von Effektorzellen und Gerinnungsfaktoren. Diese Reaktionen gipfeln unter anderem in einem systematischen Ödem und einer Neutropenie und führen zu einem Zusammenbruch des Gefäßsystems, dem septischer Schock (Vollmar et al. 2013). Die intravasale disseminierte Blutgerinnung und die daraus resultierende ungenügende Blutversorgung führen häufig zum Tod (Tracey et al. 1986, Dhainaut et al. 2005).

Das Zytokin MIF (macrophage migration inhibitor factor) trägt unter anderem entscheidend zu der Entstehung einer Sepsis bei (Bernhagen et al. 1993). MIF wird von T-Zellen, aber auch durch Makrophagen produziert (Calandra et al. 1994) und stimuliert zusätzlich die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 und Stickoxiden in Makrophagen (Bozza et al. 1999).

IL-1 verstärkt die Wirkung von TNF- $\alpha$  und führt zur Hypotension, Abfall des peripheren Gefäßwiderstandes und des zentralvenösen Drucks, während die Auswurfleistung des Herzens und die Herzfrequenz ansteigen (Okusawa et al. 1988). TNF- $\alpha$  und IL-1 induzieren die iNOS. Die daraus resultierenden Dysfunktionen der Kardiomyozyten ist verantwortlich für die frühzeitige kardiale Dekompensation während einer Sepsis (Kumar et al. 1996). Das produzierte NO beeinflusst den Kalziummetabolismus und die Kontraktilität der Myozyten, während RNS und Superoxid-Ionen direkt toxisch auf die Zellen einwirken (Ullrich et al. 2000).

Die vaskulären Veränderungen im septischen Schock sind ebenfalls hauptsächlich durch die NO-Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Gefäße bedingt. Eine durch NO verursachte Hyperpolarisation der Plasmamembran der glatten Gefäßmuskeln erhöht die Unempfindlichkeit gegenüber der Wirkung von Katecholaminen und bewirkt eine Vasodilatation. Die endotheliale Dysfunktion führt zur Unfähigkeit der Endothelzellen die vaskuläre Spannung aufrecht zu erhalten, was den Abfall des Blutdrucks zur Folge hat. Zudem führt die Schädigung des Endothels zur Störung der Gefäßpermeabilität mit intravasalem Volumenverlust und zur Ödembildung der beteiligten Organe (Scott und McCormack 1999).

## 1.5 Antioxidanzien

### 1.5.1 N-Acetylcystein (NAC)

N-Acetylcystein ( $C_5H_9NO_3S$ ,  $M_r = 163.2$  g/mol) (siehe Abb. 1.2) ist ein N-acetyliertes Cystein und leicht wasserlöslich.

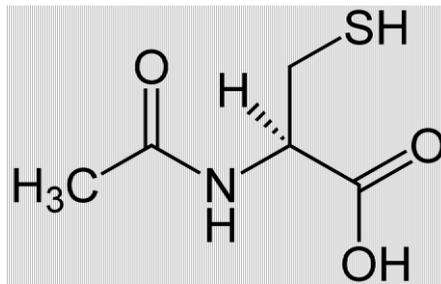


Abb. 1.2 Strukturformel N-Acetylcystein

NAC, auch bekannt als ACC, wird in der Medizin als Expektorans (Schleimlöser) bei Atemwegserkrankungen mit feststehendem Auswurf (z.B. bei Bronchitis) sowie als Antidot bei Paracetamolintoxikation eingesetzt (Prescott et al. 1979; Smilkstein et al. 1988). Die mukolytische Wirkung beruht auf der Spaltung der Disulfidbrücken in den Mucopolysaccharidfasern des Bronchialsekrets, der Minderung der Viskosität und Verflüssigung des Schleims (Sheffner 1963). Bei einer Paracetamolintoxikation entsteht während des Abbaus von Paracetamol durch Cytochrom P450 in der Leber N-Acetyl-p-benzochinonimin, welches die Leberzellen zerstört und eine Leberzellnekrose verursachen kann. Glutathion neutralisiert das N-Acetyl-p-benzochinonimin und wird dadurch verbraucht (Holme et al. 1984).

NAC verfügt über eine direkte und eine indirekte anti-oxidative Wirkung als Glutathion-Vorstufe. Es erhöht die körpereigenen Cystein- und Gluthationspiegel und verstärkt den körpereigenen anti-oxidativen Schutz. Nach oraler Einnahme wird NAC vorwiegend in der Leber deacetyliert und das freie Cystein wird für die Produktion von Glutathion zur Verfügung gestellt (Badaloo et al. 2002, Atkuri et al. 2007).

Das NAC-Molekül besitzt eine SH-Gruppe, die leicht oxidiert werden kann und eine Verbindung in Form einer Disulfidbrücke mit anderen NAC-Molekülen eingeht. Dadurch können gleichzeitig zwei reaktive sauerstoffhaltige Radikale reduziert und neutralisiert werden (Gillissen et al. 1997). NAC reduziert wie Glutathion vorzugsweise  $H_2O_2$  und  $OH\cdot$  und die unterchlorige Säure (Aruoma et al. 1989).

### 1.5.2 Glutathion (GSH)

Glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteineglycine, 5-10 mM) ist ein ubiquitäres Tripeptid mit einer freien Thiolgruppe. Es ist das wichtigste Reduktionsmittel und wasserlösliche Antioxidans im menschlichen Organismus (Meister und Anderson 1983). Mit der Wirkung eines Redoxpuffers reagiert GSH direkt mit freien ROS- und NOS-Radikalen (Kalyanaraman et al. 1996). Dabei wird GSH durch Übertragung eines Elektrons von ROS auf die Thiolgruppe oxidiert. Jeweils zwei oxidierte Glutathion-Moleküle verbinden sich unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zu einem Glutathion-Disulfid (GSSG). Durch das Enzym Glutathion-Reduktase können aus dem GSSG-Dimer unter NADPH-Verbrauch erneut zwei reduzierte GSH entstehen (Jones 2002). GSH liegt durch die Aktivität der Glutathion-Reduktase zu 90% reduziert vor (Akerboom et al. 1982).

Neben der Funktion als Redoxmittel ist GSH eine Reserve für Cystein, einem Baustein der Proteinsynthese (Tateishi et al. 1977). GSH spielt zudem eine wichtige Rolle in Phase II der Biotransformation in der Leber. Mit GSH konjugierte Stoffe sind wasserlöslicher und können besser über die Niere ausgeschieden werden (Jakoby 1978).

Glutathion wird intrazellulär durch Glutamacysteinligase (Reaktion 1) und GSH-Synthetase (Reaktion 2) aus Glutamin, Glycin und Cystein gebildet (Meister & Anderson 1983), wobei Reaktion 1 durch einen Feedbackmechanismus mit GSH inhibiert wird (Richman und Meister 1975). Unter ATP-Verbrauch wird aus Glutamin und Cystein  $\gamma$ -Glutamylcystein gebildet. Dabei wird eine Isopeptidbindung zwischen der  $\gamma$ -Carboxygruppe des Glutaminsäurerestes und der Aminogruppe des Cysteinrestes durch die Glutamacysteinligase erzeugt. Glycin wird durch die GSH-Synthetase unter Verbrauch von ATP an das terminale Kohlenstoffatom addiert (Wu et al. 2004).

GSH befindet sich in allen Gewebe- und Körperflüssigkeiten, wobei die Leber den höchsten Anteil besitzt (Moron et al. 1979). Die GSH-Werte in der Leber variieren in Abhängigkeit von Ernährung, Tageszeit und körperlichem Bedarf (Blanco et al. 2007). In bestimmten Organen (z.B. Darm, Lunge, Nieren) können die Zellen über einen sekundären aktiven Transportmechanismus exogen zugeführtes GSH verwerten (Kaplowitz et al. 1996).

## 1.6 Signaltransduktionswege

Die Übertragung der extrazellulären Signale geschieht auf vielfältige Weise. Häufig führt die Bindung eines Liganden zur Aktivierung der enzymatischen Funktion von Proteinkinasen, die in der Regel in inaktivem Zustand vorliegen. Die Funktion der Proteinkinase besteht in der Proteinphosphorylierung, der kovalenten Verknüpfung von Phosphatgruppen an Proteine, vor allem an den Aminosäureresten Tyrosin, Serin und Threonin. Protein-Tyrosin-Kinasen phosphorylieren spezifisch Tyrosinreste, während Serin-/Threoninprotein-Kinasen Serin- oder Threoninreste aktivieren (Murphy et al. 2009).

LPS aktiviert durch Bindung an einen Membranrezeptor wie TLR-4 (Toll-like Rezeptor) in zirkulierenden Monozyten verschiedene Signaltransduktionswege. Dies geschieht durch die Phosphorylierung diverser Kinasen, inklusive I $\kappa$ B-Kinase, Proteinkinase C (PKC), PI3K und den RAS/MEK/ERK-Weg (O'Connell et al. 1998), welche die Gentranskription über Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B und AP-1 einleiten (Guha et al. 2001) (siehe Abb.1.3).

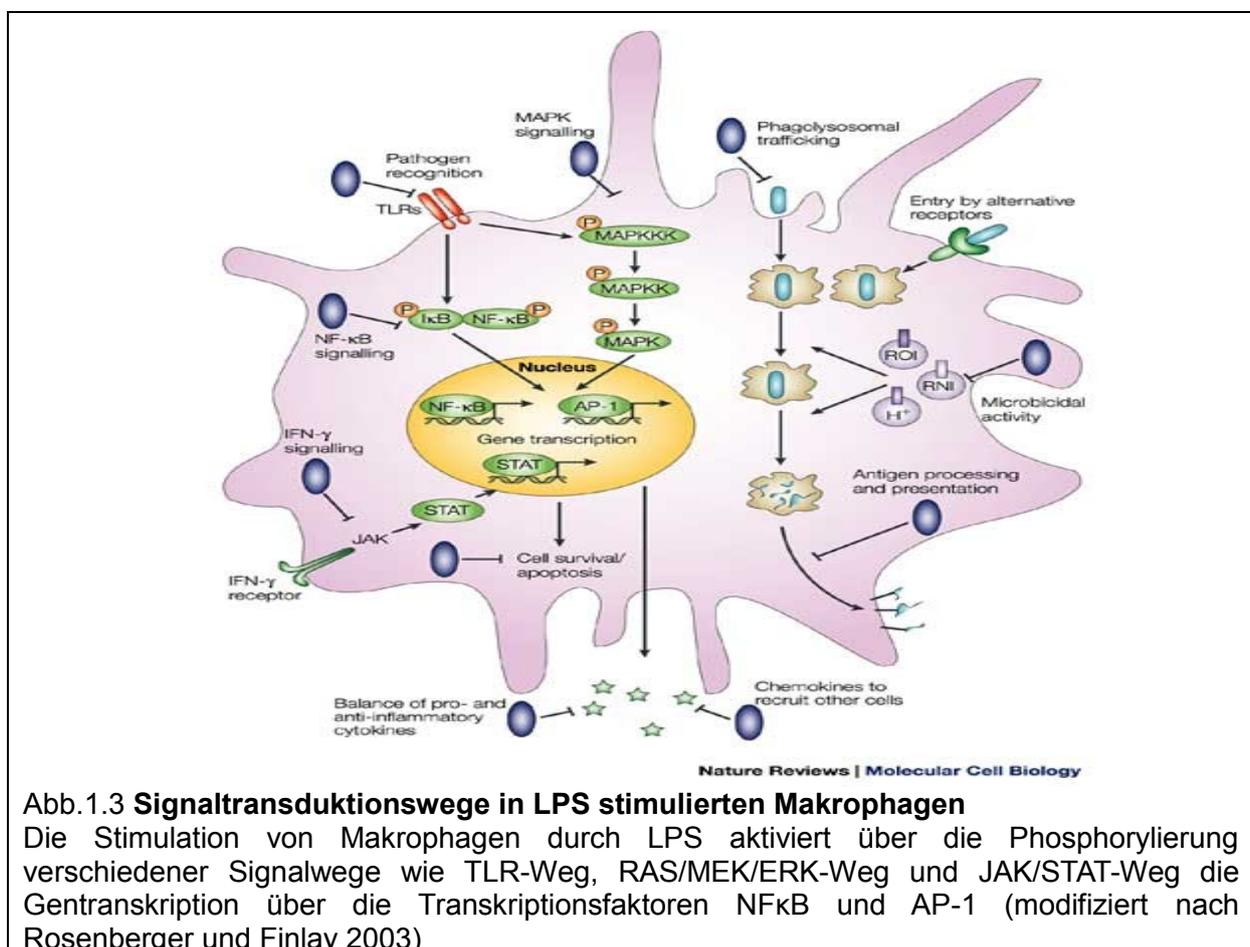


Abb.1.3 **Signaltransduktionswege in LPS stimulierten Makrophagen**

Die Stimulation von Makrophagen durch LPS aktiviert über die Phosphorylierung verschiedener Signalwege wie TLR-Weg, RAS/MEK/ERK-Weg und JAK/STAT-Weg die Gentranskription über die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1 (modifiziert nach Rosenberger und Finlay 2003)

### 1.6.1 Der Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4)

Die Toll-like-Rezeptoren gehören zu den evolutionär älteren Erkennungs- und Signaltransduktionssystemen. Es existieren zehn exprimierte TLR-Gene, welche zehn Oberflächenrezeptoren generieren um verschiedene Bestandteile körperfremder Mikroorganismen zu erkennen. Aufgrund der geringen Anzahl der Gene ist die Spezifität der Erkennung gering, aber ausreichend zur Erfassung der häufigsten Erreger. Strukturell sind TLR „Transmembranproteine mit einem Durchgang“ (Murphy et al. 2009), die durch leucinhaltige Sequenzmotive in ihren extrazellulären Anteil und einem TIR- Sequenzmotiv (Toll-IL-1-Rezeptor) in der intrazellulären Domäne gekennzeichnet sind. Dies weist auf Signalübertragungswege ähnlich des IL-1-Rezeptors hin (Aderem und Ulevitch 2000).

Der Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) wird spezifisch auf Makrophagen exprimiert und ist essentiell bei der Abwehr vieler bakterieller Infektionen. Die Signaltransduktion des TLR-4 wird hauptsächlich durch Bindung von LPS, speziell dem Lipid A, eingeleitet (Lien et al. 2000). Dabei wird LPS über das LPS-bindende Protein (LBP) (Schumann et al. 1990) an CD-14 (Cluster of Differentiation), einen Oberflächenrezeptor der Makrophagen, gebunden (Wright et al. 1990). TLR-4 ist nicht in der Lage den CD14/LBP/LPS-Komplex zu erkennen und benötigt dazu ein weiteres Molekül, MD-2 (Shimazu et al. 1999). Die intrazelluläre Bindung von MD-2 an den TLR-4-Rezeptor leitet die Verankerung des Rezeptors an der Oberfläche ein und das an CD14 gebundene LPS kann erfasst werden. Die Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, sodass sich die intrazelluläre TIR-Domäne an ein Adaptorprotein binden kann.

TLR-4 sendet Signale über zwei verschiedene Wege, den MyD88-abhängigen und den MyD88-unabhängigen Signalweg. MyD88 (myeloider Differenzierungsfaktor 88) ist ein Adaptorprotein mit einer TIR-Domäne, die an TLR-4 bindet (Medzhitov et al. 1998). Nach erfolgter Bindung wird die Todesdomäne von MyD88 aktiviert, eine Serin/Threonin-Proteinkinase. Diese wird als IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK-1) bezeichnet und besitzt ebenfalls eine Todesdomäne zur Mobilisierung des Adaptorproteins TRAF-6 (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor) (Muzio et al. 1998). TRAF-6 phosphoryliert TAK, eine MAPKKK (Irie et al. 2000). Die Aufgabe von TAK1 ist die Aktivierung des I $\kappa$ B-Komplexes und sowie die Einleitung der Gentranskription

über den Transkriptionsfaktor NFκB (siehe Abb. 1.4).

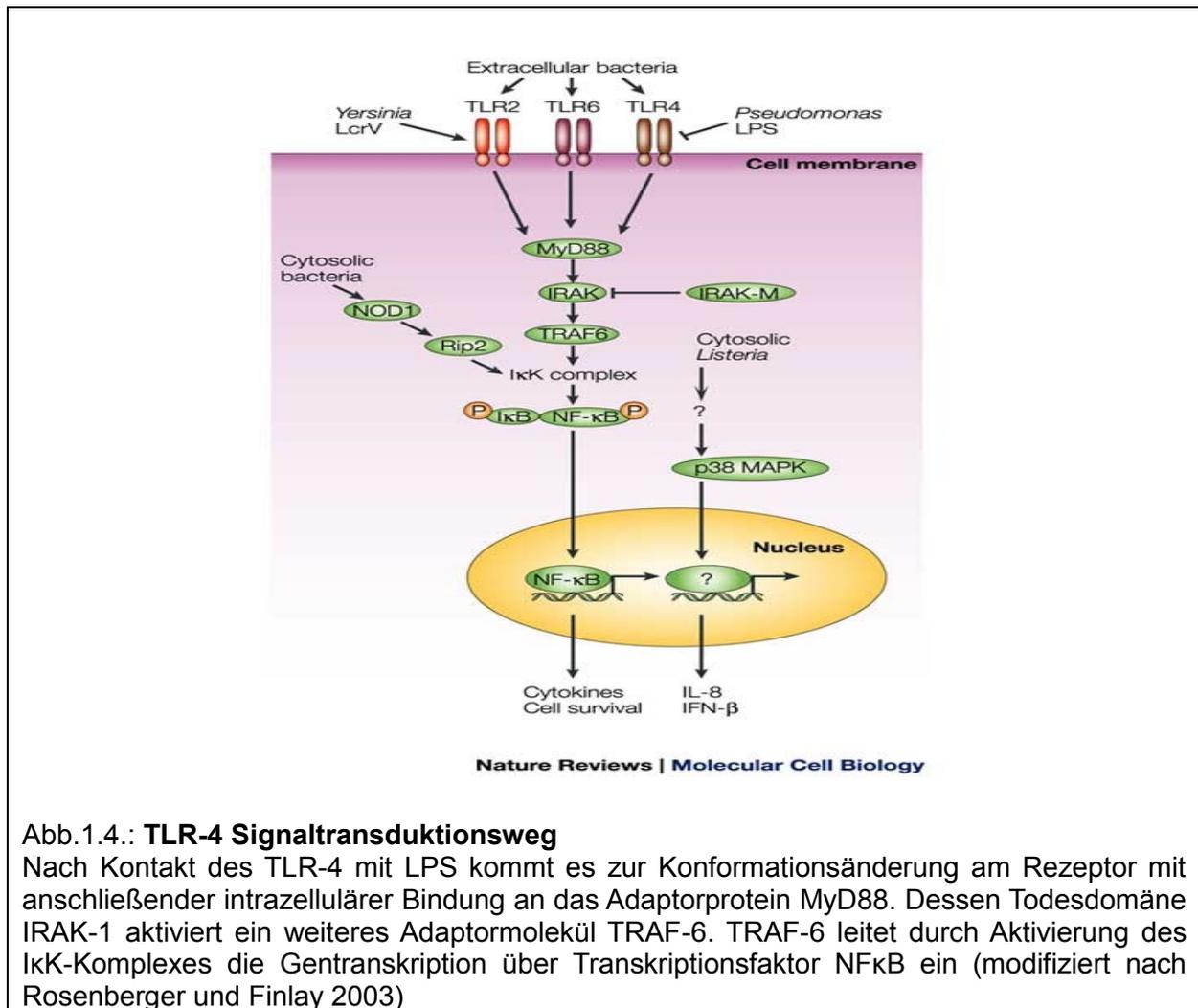


Abb.1.4.: **TLR-4 Signaltransduktionsweg**

Nach Kontakt des TLR-4 mit LPS kommt es zur Konformationsänderung am Rezeptor mit anschließender intrazellulärer Bindung an das Adaptorprotein MyD88. Dessen Todesdomäne IRAK-1 aktiviert ein weiteres Adaptorprotein TRAF-6. TRAF-6 leitet durch Aktivierung des IκK-Komplexes die Gentranskription über Transkriptionsfaktor NFκB ein (modifiziert nach Rosenberger und Finlay 2003)

### 1.6.2 Der Transkriptionsfaktor NFκB

NFκB gehört zu der Familie der Transkriptionsfaktoren und liegt als Homo- oder Heterodimer von Rel-Proteinen (z.B. p50, RelA (p65)) vor. Die Stimulation von NFκB kann durch Antigen- und Zytokinrezeptoren, oxidativen Stress und durch entzündungsfördernde Reize erfolgen (Brivanlou und Darnell 2002).

NFκB liegt inaktiv an ein inhibierendes Molekül, den sogenannten Inhibitor von κB (IκB), gebunden im Zytosol vor (Karin 1999). Um NFκB in seine aktive Form zu überführen, benötigt es die Aktivierung der PKC-θ, einer spezifischen Isoform der Proteinkinase C, durch den second messenger Diacylglycerin (DAG).

Die Antigenrezeptorübertragung führt zur Produktion von DAG, daraufhin wird die PKC-θ in der Membran verankert und aktiviert. Das Gerüstprotein CARMA1, das durch die PKC-θ phosphoryliert wird, bindet an die Proteine Bcl10 und MALT, welche

zusammen einen Komplex bilden (Sommer et al. 2005). Dieser Prozess aktiviert die I $\kappa$ B-Kinase (IKK), einem Komplex aus Serin/Threonin-Kinasen (IKK $\alpha$ :IKK $\beta$ :IKK $\gamma$  (NEMO) (Yamaoka et al. 1998), der I $\kappa$ B phosphoryliert und mit Ubiquitin, einem Protein zur Einleitung des Abbaus von I $\kappa$ B verknüpft. Dadurch wird NF $\kappa$ B von I $\kappa$ B getrennt und kann in den Zellkern translozieren (Chen et al. 1995) (siehe Abb. 1.5). Im Zellkern bindet NF $\kappa$ B an die DNS. Dies führt zur Transkription verschiedener Gene, die unter anderem für die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6) und Chemokinen sowie der Induktion von iNOS verantwortlich und essentiell für die angeborene Immunantwort sind (Müller et al. 1993).

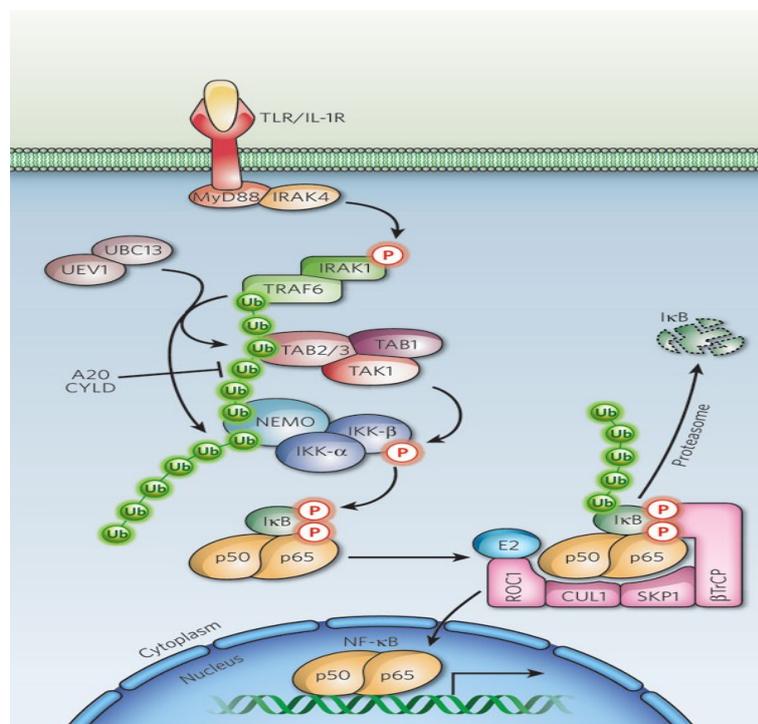


Abb. 1.5 **Gentranskription über NF $\kappa$ B**

NF $\kappa$ B liegt im Zytosol inaktiv an I $\kappa$ B gebunden vor. Durch Aktivierung der PKC- $\theta$  wird die I $\kappa$ B-Kinase (IKK $\alpha$ :IKK $\beta$ :IKK $\gamma$  (NEMO)), eine Serin-/Threonin-Kinase stimuliert, die I $\kappa$ B phosphoryliert und der Abbau durch Ubiquitinierung einleitet. Das freie NF $\kappa$ B transloziert in den Zellkern und bindet an die DNA zur Gentranskription (modifiziert nach Bhoj und Chen 2009)

### 1.6.3 RAS/MEK/ERK-Weg

Die Transduktion von LPS über den RAS/MEK/ERK-Weg erfolgt unter anderem zur Gentranskription und zur vermehrten Sekretion von TNF- $\alpha$  (Geppert et al. 1994) und IL-8 (Holtmann et al. 1999).

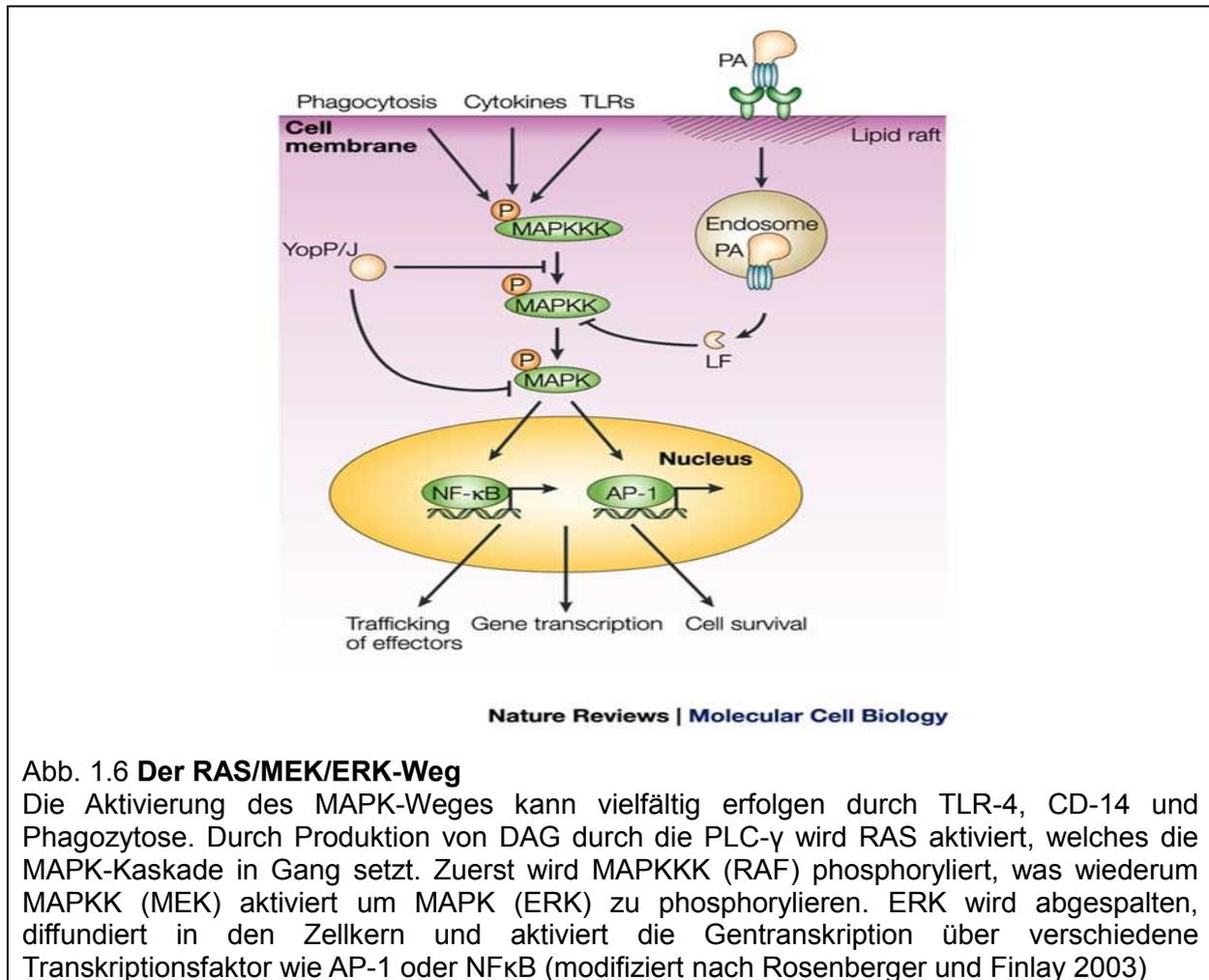


Abb. 1.6 **Der RAS/MEK/ERK-Weg**

Die Aktivierung des MAPK-Weges kann vielfältig erfolgen durch TLR-4, CD-14 und Phagozytose. Durch Produktion von DAG durch die PLC- $\gamma$  wird RAS aktiviert, welches die MAPK-Kaskade in Gang setzt. Zuerst wird MAPKKK (RAF) phosphoryliert, was wiederum MAPKK (MEK) aktiviert um MAPK (ERK) zu phosphorylieren. ERK wird abgespalten, diffundiert in den Zellkern und aktiviert die Gentranskription über verschiedene Transkriptionsfaktor wie AP-1 oder NF $\kappa$ B (modifiziert nach Rosenberger und Finlay 2003)

Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der MAPK-Kaskade (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) spielt DAG, ähnlich wie bei der Aktivierung von NF $\kappa$ B. DAG wird durch die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) erzeugt und wandert in die Plasmamembran um das kleine G-Protein RAS zu aktivieren. Dies geschieht über die Proteinkinase C, eine Serin/Threonin-Kinase und das Protein RASGRP, einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor, die RAS in einen aktiven Zustand überführen (Downward et al. 1990). Die Proteinkinase C kann beispielsweise über den CD14-abhängigen Weg aktiviert werden (Liu et al. 1994).

RAS aktiviert RAF (MAPKKK= Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase), eine Serin/Threonin-Kinase, welche ihrerseits MEK(MAPKK=Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase) stimuliert. MEK ist eine Proteinkinase mit doppelter Spezifität, die sowohl Tyrosin- als auch Threoninreste phosphoryliert (Gardner et al. 1994) und die letzte Proteinkinase in der Kaskade ERK (MAPK) aktiviert. Es existieren acht Isoformen von ERK (Extrazellulär-regulierte Kinase), ERK1 und ERK2 sind in der MAPK-Kaskade vertreten (Bogoyevitch und Court 2004). Nach der Phosphorylierung

erfolgt die Abspaltung von ERK und Translokation in den Zellkern, wo es die Transkription von Genen, beispielsweise zur Produktion von TNF- $\alpha$ , in Gang setzt (van der Bruggen et al. 1999). ERK bindet zu diesem Zweck an den Transkriptionsregulator AP-1. AP-1 ist ein Heterodimer, bestehend aus einem Fos- und Jun-Monomer (Transkriptionsfaktoren). Das aktivierte ERK stimuliert über die Phosphorylierung von ELK-1 gemeinsam mit dem Serum-Response-Faktor, einem weiteren Transkriptionsfaktor, die Transkription von Fos (Guha et al. 2001). Der Jun-Transkriptionsfaktor liegt konstitutiv im Zytoplasma vor und wird über die Aktivierung der Proteinkinase JNK stimuliert und transloziert daraufhin in den Zellkern, um über die Bindung mit Fos AP-1 zu bilden (Angel et al. 1991).

#### 1.6.4 JAK/STAT-Weg

Der JAK/STAT-Weg wird neben der Signalübertragung von Zytokinrezeptoren, auch durch andere auf Immunzellen exprimierte Rezeptoren genutzt.

Die Rezeptoren sind aus mindestens zwei Proteinketten zusammengesetzt, die jeweils mit Janus-Kinasen (JAK) verbunden sind. Die JAK sind zytoplasmatische Tyrosinkinasen, die aus zwei tandemartigen Domänen bestehen (Leonard und O'Shea 1998). STAT (signal transducers and activators of transcription) sind Transkriptionsfaktoren, die SH2-Domänen (Src-homologe Domäne 2) enthalten. Derzeit sind sieben STAT-Faktoren bekannt (1 bis 5, 6a und 6b), wobei die einzelnen Faktoren hochspezifisch an einen bestimmten Rezeptor binden. Die Spezifität beruht auf der Erkennung einer bestimmten Phosphotyrosinsequenz durch die SH2-Domäne (Levy und Darnell 2002).

Die Bindung des Liganden führt zur Dimerisierung der Proteinketten und somit der beiden Januskinasen. Auf diesem Weg wird die enzymatische Aktivität durch die gegenseitige Aktivierung freigesetzt. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren spezifische Tyrosinreste an den Rezeptorenuntereinheiten, die als Bindungsstellen für STAT-Proteine fungieren. Die SH2-Domäne des spezifischen STAT setzt sich an dem Rezeptor fest und wird daraufhin phosphoryliert. Es folgt eine Konformationsänderung des STAT, die eine Dimerbildung mit einem anderen STAT-Molekül ermöglicht (Levy und Darnell 2002). Die Bindung erfolgt über die Phosphotyrosinreste an den SH2-Domänen (Shuai et al. 1994). STAT können sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. Nach der Dimerisierung dissoziieren die STAT-Faktoren vom Rezeptor und sind nun in der Lage in den Zellkern einzudringen, um

die Transkription verschiedener Gene zu initiieren (Darnell et al. 1994) (siehe Abb. 1.7).

STAT3 wird unter anderem durch Epidermal Growth Factor und IL-6 aktiviert und bildet Homo- oder Heterodimere mit STAT1. Als Homodimer bindet es zur Gentranskription c-fos oder als Heterodimer direkt an die DNA (Zhong et al. 1994). STAT3 besitzt zwei Isoformen STAT3 $\alpha$  und STAT3 $\beta$  (Caldenhoven et al. 1996) und wird meist über die Januskinase Jak1 aktiviert (Guschin et al. 1995). Zur Phosphorylierung besitzt STAT3 sowohl einen Serin- (Ser 727) als auch einen Tyrosinrest (Tyr 705). Beide müssen zur maximalen Aktivierung phosphoryliert werden (Wen et al. 1995). STAT3 spielt eine Rolle bei der Suppression der Aktivität von Makrophagen, sowie Ausschüttung von Zytokinen und NO-Synthese, stimuliert durch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (Takeda et al. 1999).

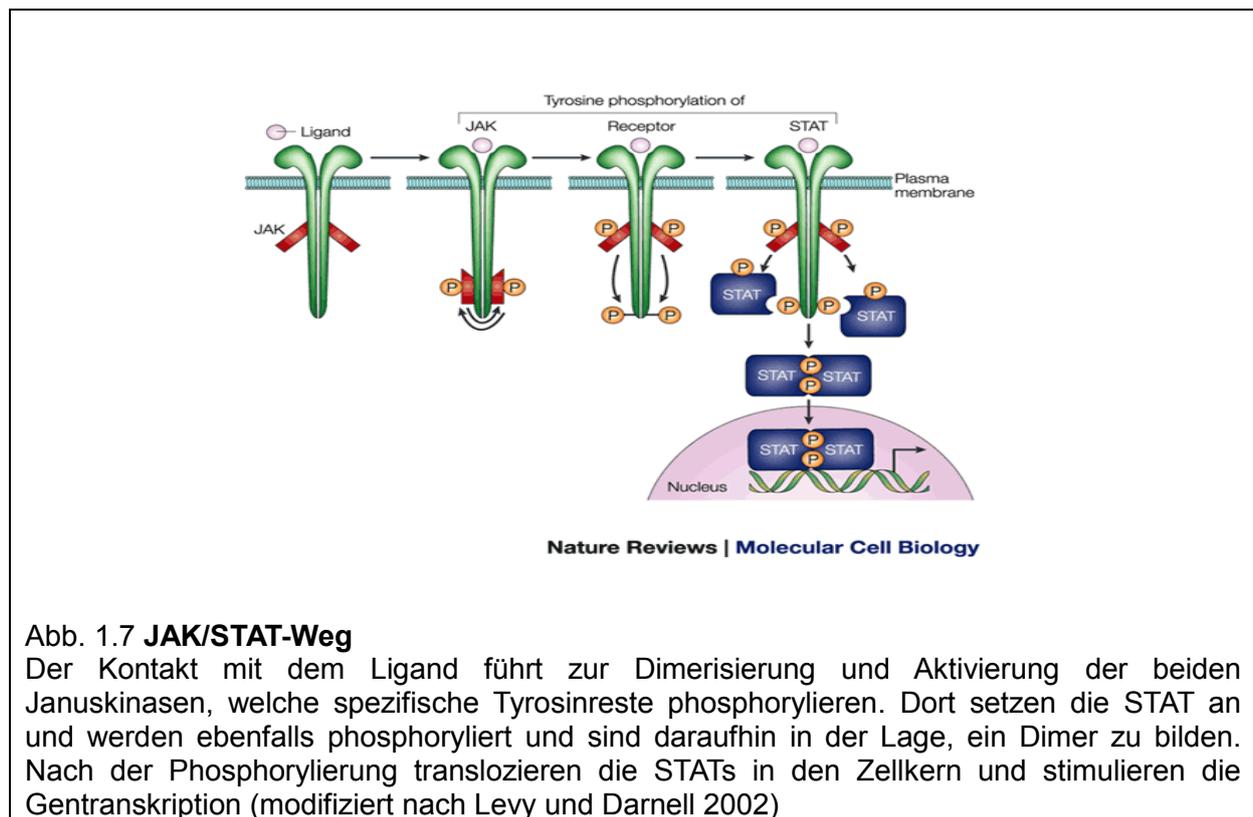


Abb. 1.7 **JAK/STAT-Weg**

Der Kontakt mit dem Ligand führt zur Dimerisierung und Aktivierung der beiden Januskinasen, welche spezifische Tyrosinreste phosphorylieren. Dort setzen die STAT an und werden ebenfalls phosphoryliert und sind daraufhin in der Lage, ein Dimer zu bilden. Nach der Phosphorylierung translozieren die STATs in den Zellkern und stimulieren die Gentranskription (modifiziert nach Levy und Darnell 2002)

## 2 Ziele der Arbeit

Aktivierete Makrophagen können eine Überreaktion des Immunsystems hervorrufen und dadurch diverse Erkrankungen verursachen. In verschiedenen Studien wurde bereits der Effekt von Antioxidantien auf die verstärkte Immunantwort untersucht. Die Arbeitsgruppe um Palacio veröffentlichte eine Studie, die die hemmende Wirkung von N-Acetylcystein auf die Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen und Sauerstoffradikalen untersuchte (Palacio et al. 2011).

Ziel dieser Arbeit ist es, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Palacio et al., dessen gewonnene Erkenntnisse zu vertiefen und die intrazelluläre Funktionsweise von N-Acetylcystein in Entzündungen nachzuweisen.

Das übergeordnete Ziel besteht in der Erforschung eines neuen Mittels zur Bekämpfung von entzündlichen Erkrankungen

Die untergeordneten Zielstellungen dieser Arbeit sind:

1. Untersuchung des Einflusses von LPS auf die Aktivierung Inflammations-assoziiertes Signaltransduktionswege und des Transkriptionsfaktors NFκB in Makrophagen
2. Analyse einer Beeinflussung derselben LPS-aktivierten Inflammations-assoziierten Signaltransduktionswege und des Transkriptionsfaktors NFκB durch N-Acetylcystein.
3. Untersuchung der Wirkung von NAC auf Signaltransduktionswege und des Transkriptionsfaktors NFκB in Makrophagen ohne induzierte Entzündungsreaktion.
4. Testung möglicher zytotoxischer Wirkungen von LPS+NAC auf Makrophagen.

### 3 Methoden

#### 3.1 Zelllinie THP-1

Die Zellen der Linie THP-1 wurden mit freundlicher Unterstützung vom Institut für Biotechnologie und Biomedizin der Autonomen Universität Barcelona zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter monozytären Leukämie etabliert. Sie zeichnet sich durch Fc- und C3b-Rezeptoren aus, besitzt jedoch keine oberflächlichen oder zytoplasmatischen Immunglobuline.

Morphologisch zeigen sich große, runde, einzeln liegende Zellen (siehe Abb. 3.1), welche sich nicht-adhärenz zur Kulturflasche verhalten. Die Verdopplungszeit liegt bei 35 bis 50 Stunden.

THP-1 Zellen sind in der Lage zur Phagozytose und zur Produktion von Lysozym und IL-1. Während der Phagozytose konnte eine Steigerung der CO<sub>2</sub>-Produktion festgestellt werden. Des Weiteren konnte die Aktivität von  $\alpha$ -Naphthylbutyratesterase (Inhibierung durch NaF) und die Wiederherstellung der T-Zellantwort auf ConA nachgewiesen werden (Tsuchiya et al. 1980).

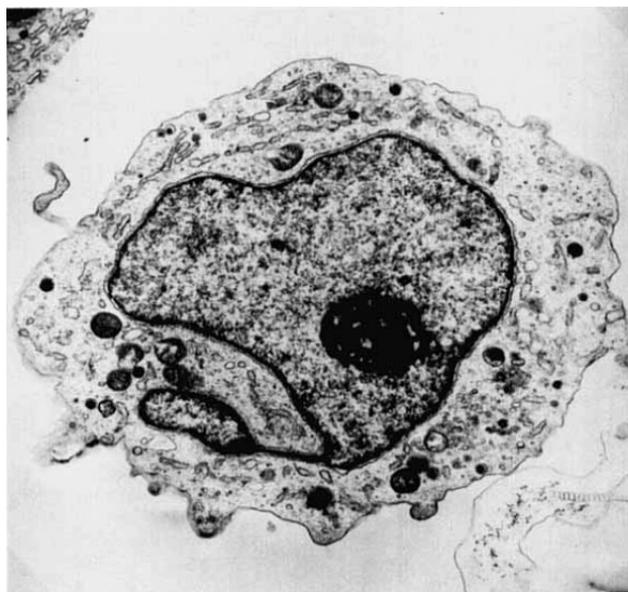


Abb. 3.1 **Elektronenmikroskopische Aufnahme von THP-1, 10 000-fach vergrößert** (modifiziert nach Tsuchiya et al. 1980)

## 3.2 Zellkultur

Die nachfolgend geschilderten Zellkulturarbeiten fanden in Barcelona durch die Arbeitsgruppe von Palacio statt. Die anschließende Analyse der Zelllysate wurde in Jena von der Verfasserin der Arbeit durchgeführt.

### 3.2.1 Kultivierung der Zellen

Die THP-1 Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) ohne Antibiotika kultiviert.

Die Monozyten wurden durch Stimulation mit Tetradecanoyl-Phorbolacetat (PMA) zu Makrophagen aktiviert und in einer 6-Well-Platte mit einer Dichte von  $2,75 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Die Differenzierung zu Makrophagen war nach 72 Stunden Inkubation mit 100 mM PMA abgeschlossen. Die ausdifferenzierten Zellen hafteten an der Flaschenwand, im Gegensatz zu den undifferenzierten Zellen, die beim Mediumwechsel entfernt wurden. Die adhärenierten Zellen wurden daraufhin in 2 ml frischen FCS RPMI-1640 Medium für 24 Stunden inkubiert.

LPS wurde in einer Stammlösung von 1 mg/ml in PBS gelöst, Filter-sterilisiert und bei 20°C gelagert. 15 mM NAC wurde für jedes Experiment neu hergestellt. Die optimale NAC-Konzentration wurde durch den fehlenden zytotoxischen Effekt in der Zellkultur ermittelt (Estany et al. 2007). 97,92 mg NAC wurden zuerst in 30 ml RPMI-1640 Medium gelöst und mit 0,5 M NaOH-Lösung der pH-Wert auf 7,4 justiert. Um das erforderliche Volumen herzustellen, wurden 40 ml hinzugefügt. Die Lösung wurde vor Nutzung Filter-sterilisiert.

### 3.2.2 Behandlung der Makrophagen

Für die Analyse der ERK1/2, STAT3, IRAK-1 und NFκB-Phosphorylierung wurden die Zellen in Medium mit LPS (1 µg/ml) für 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit oder ohne 15 mM NAC behandelt. Als Kontrolle dienten unstimulierte THP-1 Zellen, als „0 Minuten“ bezeichnet. Gleichzeitig wurden die differenzierten Zellen als Kontrolle im Medium allein oder mit 15 mM NAC als NAC Kontrolle inkubiert. Diese Experimente wurden dreimalig wiederholt.

### 3.2.3 Die Zellyse

Die Makrophagen wurden mit den oben beschriebenen Bedingungen in 6-Well-Platten kultiviert. Nach der Behandlung wurden die Zellen aspiriert und mit kaltem PBS gewaschen. 300  $\mu$ L Mammalian Protein Extraction Reagent und darin enthaltener Protease Inhibitor Cocktail (Roche Cat N. 11836170001) wurden dazugegeben. Mit einem Schaber wurden die Zellen von der Platte entfernt, die lysierten Zellen gut durchmischt und dreimal eingefroren. Danach folgte eine Zentrifugation mit 12 000g auf 4°C für 15 Minuten. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde anschließend mit der Bradford-Methode bestimmt. Die Bradford-Methode ist ein schnell durchzuführendes und leicht reproduzierbares Verfahren zur Proteinkonzentrationsmessung. Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an die Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein). Diese Zunahme der Absorption bei 595 nm wird gemessen und daraus die Proteinkonzentration bestimmt (Bradford 1976).

Die Proben wurden bei  $-80$  °C eingefroren, mit Trockeneis verpackt und ins Plazentalabor geschickt.

### 3.2.4 MTT-Assay

Die Zytotoxizitätstests wurden in 96-Well-Platten durchgeführt, es wurden in jedem Well  $1 \times 10^4$  Zellen aktiviert. Die Makrophagen wurden in 100 ml frischem RPMI-1640 Medium für 24 Stunden kultiviert. Nach der Inkubation über Nacht wurden sie mit 0,1, 1 und 3 mg/ml LPS, 1 und 2 mM  $H_2O_2$ , 15 mM NAC oder als Kontrolle lediglich mit Medium behandelt, danach folgte die Untersuchung der durch die zugegebenen Substanzen induzierte Zytotoxizität. Als Maß der Zytotoxizität wurde die Veränderung der metabolischen Aktivität mittels MTT-Assay gemessen. Alle Bedingungen wurden vier mal wiederholt.

Für den MTT Assay wurden die Zellen gewaschen und 100 ml FCS freies Medium und 20 ml der 0,5 mg/ml MTT-Lösung (Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid ) in jedes Well gegeben. Die Platten wurden für 3 Stunden bei 37°C und unter 5%  $CO_2$  in den Brutschrank gestellt. Danach wurde die Farbquantifizierung mit einem Spektrophotometer (Anthos Reader 200, Cultek) bei einer Wellenlänge von 495 nm durchgeführt. Mit dem Referenzfilter von 620 nm wurde die Korrektur der Hintergrundabsorption durchgeführt, die durch Zellfragmente

entstehen kann. Die Absorptionswerte wurden durch den Mittelwert der Absorption in der Kontrollgruppe (Medium) korrigiert.

Alle Zytotoxizitätstests wurden unabhängig voneinander in 3-facher Ausführung mit jeweils vier Proben durchgeführt. Der Prozentsatz der Zellviabilität wurde mit Hilfe der Teilung des durchschnittlichen Absorbanzwertes der behandelten Zellen mit LPS (0.1, 1, 3 mg/ml) oder 15mM NAC durch den durchschnittlichen Absorbanzwert der Kontrollzellen bestimmt.

### **3.4 Kontrolle mittels SDS-Page und Western Blot**

#### **3.4.1 SDS-Page**

Die SDS-Page wird zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und zur Analyse von Proteinmischungen angewandt. SDS als anionisches Tensid bildet mit den meisten Proteinen einen negativ geladenen SDS-Protein-Komplex mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis. Es denaturiert die Proteine und unterbindet auf diesem Weg Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Die Komplexe unterscheiden sich lediglich durch ihre Größe und besitzen vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Wird ein elektrisches Feld erzeugt, wandert der SDS-Protein-Komplex gemäß seiner negativen Ladung in Richtung des Plus-Pols. Dabei separiert der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Proteine-Komplexe. Die Auftrennung erfolgt nach der Kettenlänge proportional zur Molekülmasse, denn die längeren Proteine werden im Gel stärker zurückgehalten als kürzere Proteine. Die Eigenladungen der Proteine sind unter der SDS-Beladung vernachlässigbar. Die positiven Ladungen sind zudem im basischen pH des Gels stark verringert (Rehm und Letzel 2010).

Das häufigste angewandte System ist das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern (Laemmli 1970), welches auch in dieser Arbeit angewendet wurde.

Durchführung

Gegossen wurden die Gele nach den nachfolgenden Rezepturen:

Dichtegel

Trenngel	0,5 ml	1 ml
APS 40%	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l

## Trenngel 9%

	1 Gel	2 Gele
AA/BAA 40%	2,5 ml	5 ml
Trenngelpuffer	1,43 ml	2,85 ml
SDS 20%	37,5 $\mu$ l	75 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3,6 ml	7,2 ml
APS 40%	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l

## Sammelgel

	1 Gel	2 Gele
AA/BAA 40%	0,5 ml	1 ml
Sammelgelbuffer	0,94 ml	1,88 ml
SDS 20%	18,6 $\mu$ l	37,5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	2,33 ml	4,65 ml
APS 40%	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l

Die Gele wurden in folgender Reihenfolge eingefüllt: Dichtegel zur Abdichtung der Elektrophoresekammer, Trenngel und Dichtegel in die Kammer.

Der Unterschied zwischen Sammel- und Trenngel besteht in der unterschiedlichen Porengröße und in den pH-Werten. Das Sammelgel weist einen neutralen pH-Wert auf, in dem die Proteine aufkonzentriert werden. Die Proteine wandern anschließend in das Trenngel mit basischen pH, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Der pH-Gradient zwischen Sammel- und Trenngelpuffer führt zu einem Stapelungseffekt an der Grenze zum Trenngel (Rehm und Letzel 2010).

Nach kompletter Aushärtung der Gele wurde das Elektrophorese-Fenster in die Laufkammer eingesetzt und 1x Laufpuffer dazugegeben.

Im Vorfeld wurden die Proben aus lysierten Zellen aufgetaut, kurz zentrifugiert, SDS und DTT in Form von 5 µl Probenpuffer zugesetzt und die Menge mit Zellysepuffer auf 27 µl aufgefüllt. Anschließend fand die Denaturierung der Proben bei 95 °C sieben Minuten statt um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindung und Konformationsänderungen aufzubrechen (Rehm und Letzel 2010). Als Negativkontrolle diente destilliertes Wasser mit Probenpuffer.

Die Befüllung der Taschen erfolgte durch spezielle Pipettenspitzen.

Anschließend wurde die Kammer an die Spannungsquelle bei konstanter Einstellung der Stromstärke von 25 mA (1 Gel) oder 50 mA (2 Gele) angeschlossen.

### 3.4.2 Western Blot

Beim Blotten werden die Proteine des SDS-Gels elektrophoretisch auf eine absorbierende Trägermembran übertragen. Dabei wird ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine zur Anode wandern. Zudem kann der Transfer alternativ durch Kapillarwirkungen in Richtung des trockenen, hydrophilen und absorbierenden Materials erfolgen (Kapillartransfer). Die Membran kann aus verschiedenen Materialien wie Nylon, Glasfaser oder Polyvinylidenfluorid bestehen. Häufig wird Nitrocellulosemembran eingesetzt (Towbin et al. 1979), die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken bindet und immobilisiert. Beim Transfer bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteine sind nun aber für weitere Methoden zugänglich wie Färbungen oder Immundetektion.

Die Proteine können renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen. Aufgrund der räumlichen Trennung der verschiedenen Untereinheiten eines Proteins kann die Quartärstruktur so jedoch nicht wiederhergestellt werden (Lottspeich und Engels 2006).

#### Durchführung

Der Blot wurde folgendermaßen ohne Luft einschüsse zusammengesetzt: Fünf Seiten Filterpapier, die aktivierte Membran, das SDS-Gel und weitere fünf Seiten Filterpapier. Mit 250 mA bei 300 V wurde für 25 Minuten ein elektrisches Feld angelegt.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für eine Stunde blockiert. Dabei

wurden die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert, um die Bindung der Antikörper an diesen Stellen zu verhindern (Lottspeich und Engels 2006).

### 3.4.3 Inkubieren mit Antikörpern

Die Membranen wurden mit folgenden Lösungen geblockt und mit 7 ml der Blocklösung und dem verdünnten primären Antikörper bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

	Antikörper	Blocklösung	Verdünnung	Inkubationszeiten
1. Antikörper	pIRAK-1	Milchpulver	5%	über Nacht
	pErk1/2	Net-G	1:1000	über Nacht
	ERK1/2	Net-G	1:1000	über Nacht
	pStat3	Net-G	1:1000	über Nacht
	STAT3	Net-G	1:1000	über Nacht
	NFκB	Net-G	1:1000	über Nacht
	β-Aktin	Net-G	1:1000	über Nacht
2. Antikörper	Anti-Rabbit-Antikörper	Net-G	5:1000	1 Stunde
		Milchpulver	5%	1 Stunde

Der primäre Antikörper bindet an sein spezifisches Antigen auf der Membran. Die besten Ergebnisse wurden bei dem primären Antikörper pStat3/STAT3, pErk1/2/ERK1/2, NFκB und β-Aktin bei der Verwendung von Net-G zum Blocken erzielt. Deshalb erfolgte die Blockierung, Waschung und Inkubation mit diesem Detergenz. Der Antikörper IRAK-1 zeigte am Anfang eine geringe Signalstärke bei Verwendung von Net-G. Diese konnte aber durch Änderung des Systems verbessert werden, in dem die Blockierung und Inkubation mit Milch und die Waschung mit TBS/Tween durchgeführt wurde (siehe Abb. 5.7)

Die Waschung erfolgte für pIRAK-1 mit TBS/Tween und für die anderen Antikörper mit Net-G, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Die Membran wurde am nächsten Tag mit dem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit-Antikörper) bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers (in der Regel die Fc-Region) (Lottspeich und Engels 2006).

#### **3.4.4 Detektion der Proteine**

Die Membran wurde mit der "Chemilumineszenz Luminata Forte" behandelt, die Meerrettichperoxidase (HRP) enthält. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Dessen Chemilumineszenzreaktion (ECL-Reaktion) kann mit Hilfe des Gel-Dokumentationssystem MF-ChemiBIS und dessen Auswertungssoftware „Gel Capture“ detektiert werden. Dabei wird das ausgestrahlte Licht mittels einer CCD-Kamera aufgefangen (Rehm und Letzel 2010).

### 3.5. "Stripping"

Zur Wiederverwertung der Membran wurde das Stripping-Verfahren durchgeführt.

Das bedeutet, dass auf einer Western blot-Membran gebundene Antikörper wieder entfernt werden, so dass nachfolgend weitere Proteine mit anderen Antikörpern detektiert werden können.

Nach der Entwicklung der Membran wurde diese jeweils zwei mal sieben Minuten in der sauren Stripping-Lösung als Mild-Stripping-Methode, belassen. Daraufhin folgte eine Behandlung mit PBS jeweils zwei mal zehn Minuten und mit TBS/Tween mit jeweils zwei mal sieben Minuten. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit Net-G oder Milchpulver geblockt und der primäre Antikörper der totalen Proteine konnte aufgetragen werden.

Bei Antikörpern mit ähnlichem Molekulargewicht wie IRAK-1 (80 kDa) auf STAT3 (79,86 kDa) oder beim Versagen der Mild-Stripping-Methode wurden die verbleibenden Stoffe mittels Mercaptoethanol entfernt (Heimer 1989). Dazu wurde die Membran für 30 Minuten unter dem Abzug in eine Lösung mit Mercaptoethanol gelegt. Anschließend erfolgte die Waschung, vier mal je fünf Minuten, mit TBS/Tween sowie die erneute Blockierung für 30 Minuten mit Net-G oder Milchpulver. Im Anschluss daran folgte die ausgiebige Waschung der Membran und die Untersuchung eines weiteren Antikörpers.

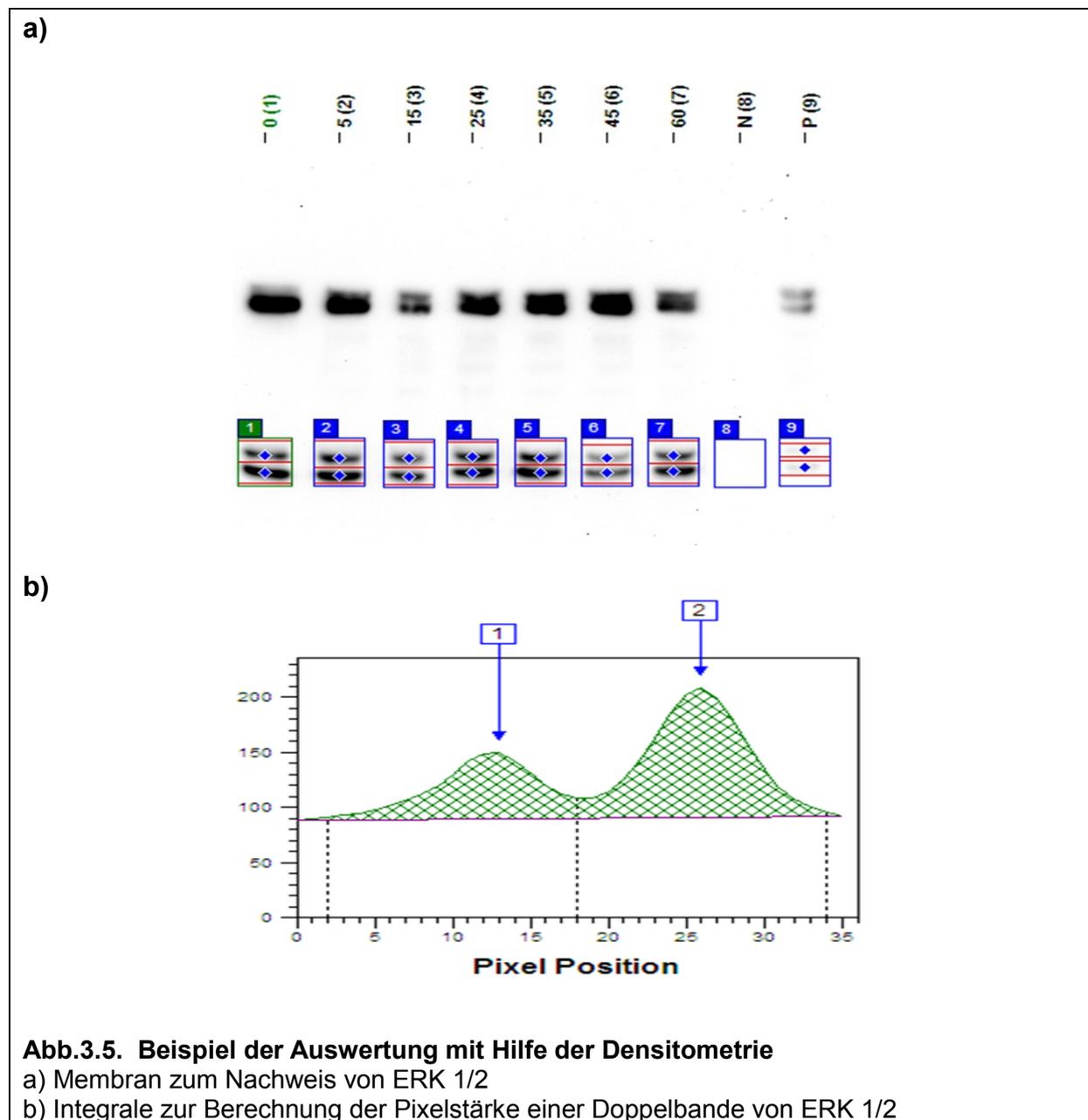
### 3.6. Auswertung mit Total Lab

Die Analyse der aufgenommenen Bilder der Western blots erfolgte mittels Densitometrie über das Programm „Total Lab“. Die Densitometrie ist ein semi-quantitatives Verfahren, bei dem das Verhältnis des Volumens der Bande des Proteins zum Hintergrund bestimmt wird (siehe Abb. 3.5a), um daraus ein Integral zur Bestimmung der Signalstärke zu berechnen (siehe Abb. 3.5b) (Gassmann et al. 2009).

Die daraus resultierenden Werte wurden anhand des Referenzwertes der Expressionsstärke von  $\beta$ -Aktin und der entsprechenden Zeit normalisiert. Die Normalisierung der Zeit erfolgte durch eine Angleichung an die Zeitachse durch Nullsetzung am 0-Minuten-Wert und die Bestimmung der Differenz zu den folgenden Werten.

Aufgrund der fehlenden Normalverteilung und der relativ kleinen Probenzahlen pro

Stimulationskonstellation wurde auf statistische Analysen verzichtet und keine Signifikanzen ermittelt, sondern die Ergebnisse deskriptiv dargestellt



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Signaltransduktion über TLR-4 - pIRAK-1

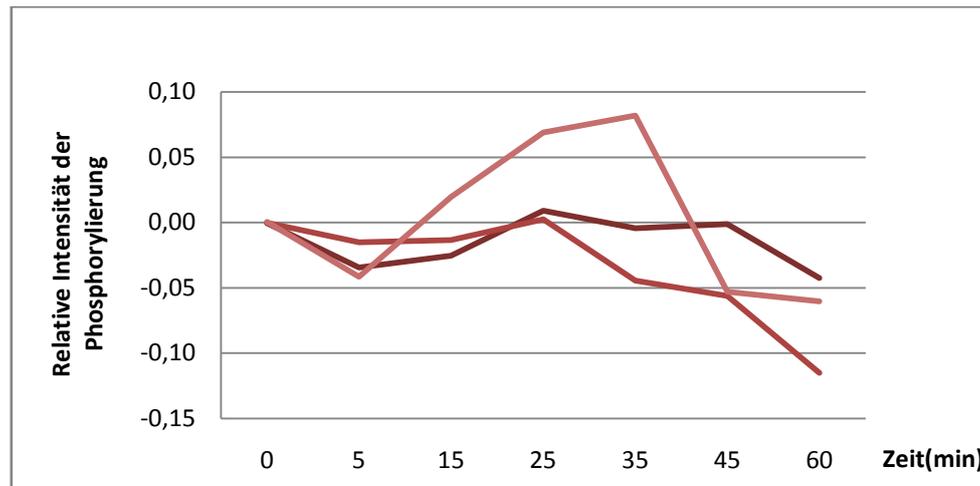
#### 4.1.1 LPS-Stimulation der THP-1 Zellen

Zur Analyse des Einflusses von LPS auf die Aktivierung von IRAK-1 als Signalmolekül des TLR-4 wurde die Makrophagenzelllinie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS inkubiert, um eine Entzündungsreaktion zu simulieren. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran geblottet. Durch den spezifischen Antikörper anti-pIRAK-1 wurde die Phosphorylierung von IRAK-1 mittels Chemilumineszenz-Reaktion detektiert und Densitometrie ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert berechnet.

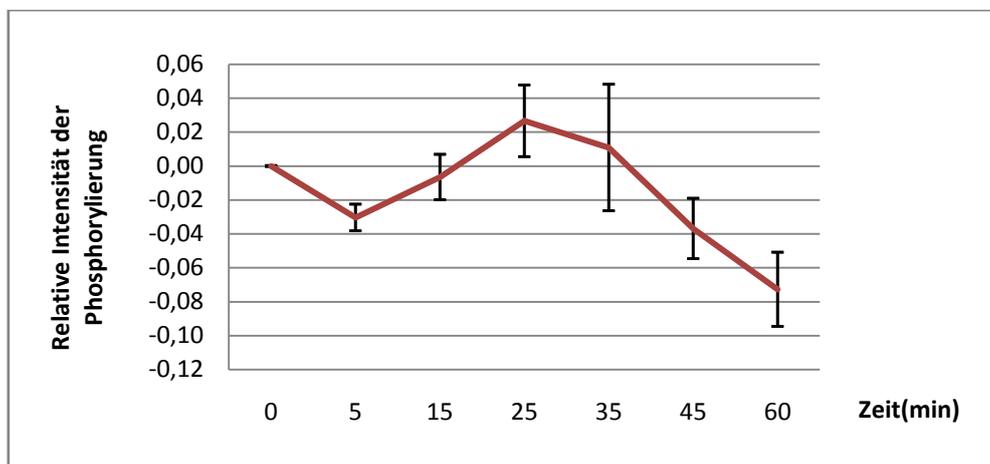
THP-1-Zellen zeigen eine konstitutive Phosphorylierung von IRAK-1. Die LPS-stimulierten THP-1 Zellen (n=3) zeigen einen Anstieg der Phosphorylierung von IRAK-1 in den ersten 25 Minuten nach LPS-Exposition. Das Maximum wird zwischen 25 und 35 Minuten erreicht, danach kommt es zum Abfall der Phosphorylierung. Die Aktivierung von IRAK-1 endet bei 25 Minuten mit dem Rückgang der Phosphorylierung, die auch visuell im Western Blot auftritt (siehe Abb. 4.1c).

LPS aktiviert die Phosphorylierung von IRAK-1 über die Stimulation des TLR-4 und somit die Makrophagen der Zelllinie THP-1, welche eine Entzündungsreaktion auslösen können, die durch NAC moduliert werden kann.

a)



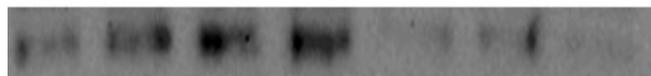
b)



c)

Stimulation in min      0      5      15      25      35      45      60

pIRAK-1



#### Abb. 4.1 Relative Phosphorylierung von IRAK1 in LPS stimulierten THP-1-Zellen

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der IRAK-1-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach LPS-Stimulierung (n=3) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die Aktivierung von IRAK-1 steigt in den ersten 25 Minuten bei vorbestehender Phosphorylierung, erreicht ihr Maximum bei 25 Minuten und fällt danach ab.

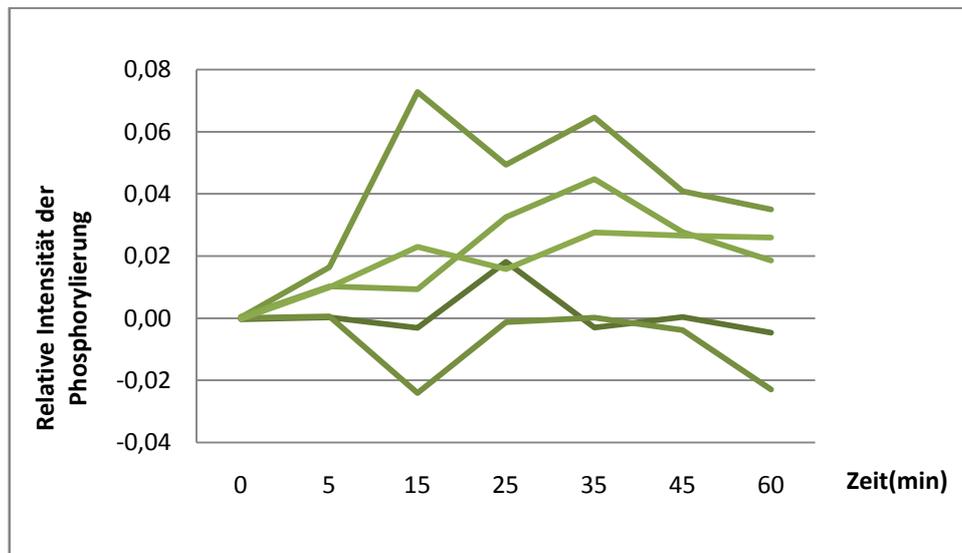
#### 4.1.2 NAC-Stimulation der THP-1 Zellen

Zur Untersuchung einer Wirkung der alleinigen Gabe von NAC auf den TLR-4 Signalweg über IRAK-1 wurde die Makrophagenzelllinie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 15 mM NAC inkubiert. Die Auftrennung der Zelllysate erfolgte mittels SDS-Page und die Proteine wurden auf eine Membran übertragen. Durch den spezifischen Antikörper anti-pIRAK-1 konnte die Phosphorylierung von IRAK-1 mittels Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Densitometrie. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

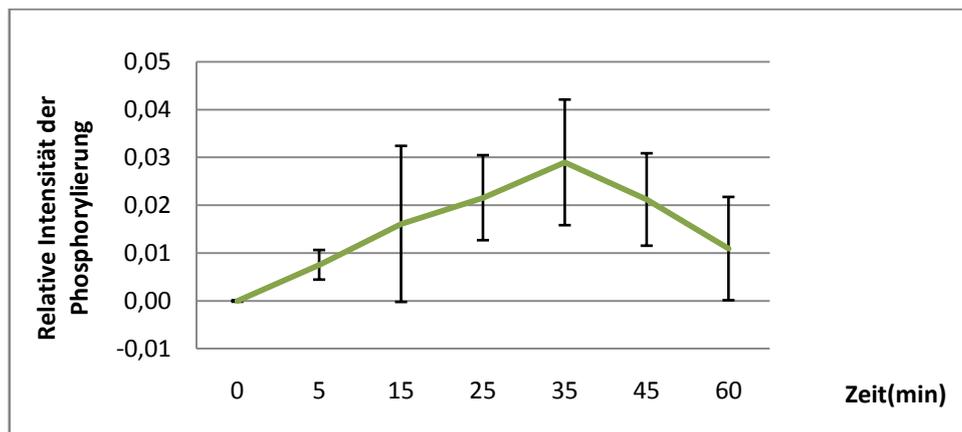
Die NAC-stimulierten Zellen (n=5) zeigen einen Anstieg der Aktivität von IRAK-1. Der Anstieg gestaltet sich in den einzelnen Experimenten unterschiedlich, sowohl steil ansteigend in den ersten 5 Minuten als auch langsamer mit einem späteren Anstieg bei 25 Minuten. Das Maximum wird zwischen 15 und 35 Minuten erreicht, anschließend fällt die Phosphorylierung langsam ab (siehe Abb. 4.2 **a**). Bei der Auswertung der Mittelpunktberechnung aller Experimente sieht man einen stetigen Anstieg der Phosphorylierung mit Maximum bei 35 Minuten und späterem Abfall der Aktivität von IRAK-1 (siehe Abb. 4.2 **b**). Optisch kann während des Zeitverlaufs in mehreren Western Blots ein Anstieg der Intensität der Banden wahr genommen werden, der im hinteren Drittel wieder abfällt (siehe Abb. 4.2 **c**).

Die alleinige Gabe von NAC aktiviert das Signalmolekül IRAK-1 in schwacher Ausprägung. Eine inhibierende Wirkung ist nicht zu beobachten.

a)



b)



c)

Stimulation in min      0      5      15      25      35      45      60

pIRAK1



#### Abb. 4.2 Relative Phosphorylierung von IRAK1 in NAC stimulierten THP-1-Zellen

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blot Membranen zur Kinetik der IRAK-1-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach NAC-Stimulierung (n=5) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die Versuche zeigen einen Anstieg der Phosphorylierung mit Maximum bei 15-35 Minuten und den anschließenden Abfall der Phosphorylierung.

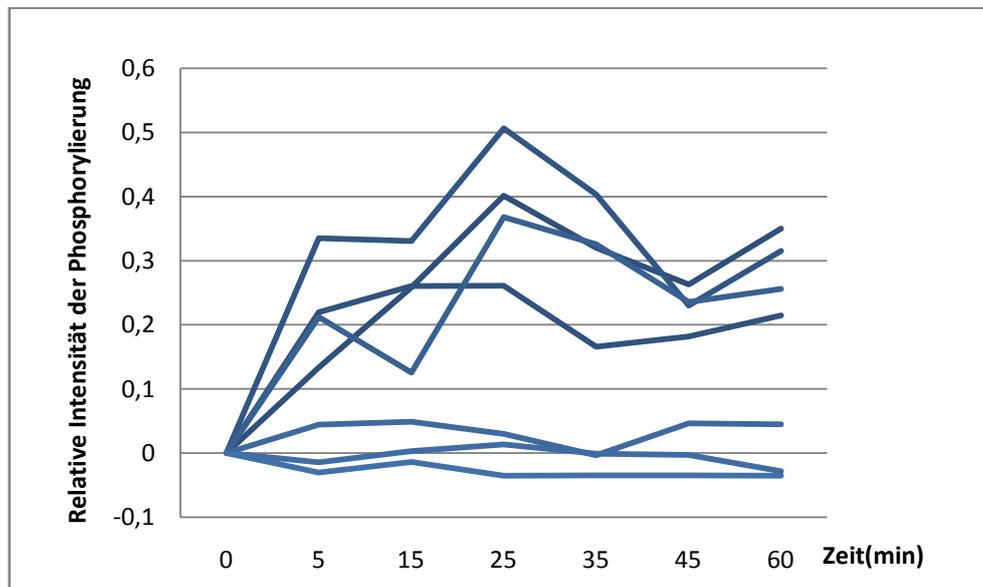
### 4.1.3 LPS+NAC-Stimulation der THP-1 Zellen

Zur Analyse einer Änderung in der Aktivierung von TLR-4 und dessen Signalmolekül IRAK-1 wurden Zellen der Linie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 1 µg/ml LPS zur Simulation einer Entzündungsreaktion und mit 15 mM NAC zur Untersuchung von dessen inhibierender Wirkung inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran geblottet. Durch den spezifischen Antikörper anti-pIRAK-1 wurde die Phosphorylierung von IRAK-1 mittels Chemilumineszenz-Reaktion detektiert und mit Hilfe der Densitometrie ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins β-Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

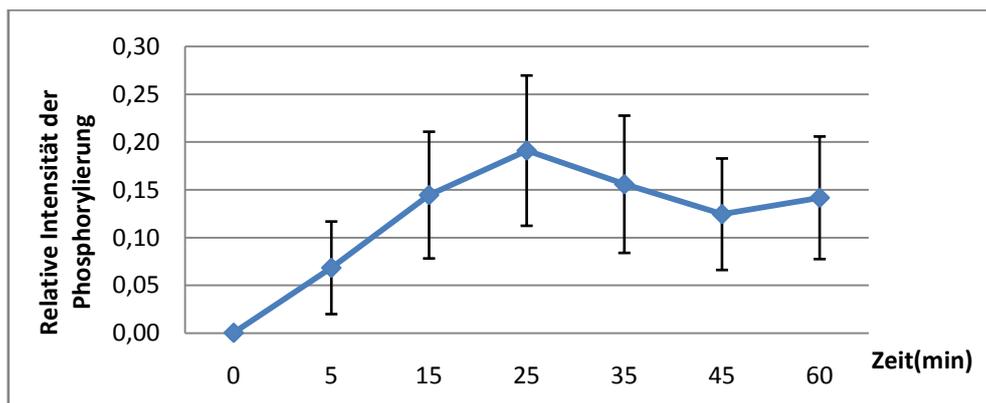
Die LPS+NAC-stimulierten THP-1 Zellen (n=8) weisen einen Anstieg der Phosphorylierung von IRAK-1 auf. Dieser zeigt sich unterschiedlich in der Ausprägung und ist in einem Teil der Experimente stark, in dem anderen schwach. Das Maximum wird bei 25 Minuten erreicht, danach fällt die Aktivierung ab, um abermals bei 60 Minuten gering anzusteigen (siehe Abb. 4.3 a). In einem Teil der Experimente konnte eine sehr starke Bande bei 0 Minuten detektiert werden, welcher hauptsächlich aus einer zweiten beim Kooperationspartner erstellten Charge stammte, deren Herstellung jedoch der ersten Charge absolut identisch gewesen sein soll. Die Mittelwertbestimmung der einzelnen Versuche zeigt eine konstant ansteigende Aktivierung von IRAK-1 mit Maximum bei 25 Minuten. Anschließend erfolgte ein Rückgang bis 45 Minuten und danach ein schwacher Anstieg (siehe Abb. 4.3 b). Optisch fällt ein ähnlicher Verlauf in den Western Blots auf (siehe Abb. 4.3 c). Unter NAC-Behandlung von LPS-stimulierten THP-1 Zellen kommt es zur Phosphorylierung von IRAK-1 und somit zur Stimulation von TLR-4. Die LPS+NAC-Stimulation zeigte eine stärkere Ausprägung der Aktivierung als die alleinige LPS-Exposition.

Ein hemmender Effekt von NAC ist nicht zu beobachten. Im Gegensatz dazu wird die Aktivierung von IRAK-1 und die damit einhergehende Entzündungsreaktion durch NAC verstärkt.

a)



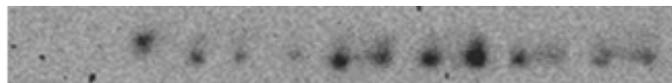
b)



c)

Stimulation in min            0        5        15        25        35        45        60

pIRAK-1



#### Abb. 4.3 Relative Phosphorylierung von IRAK1 in LPS+NAC stimulierten THP-1-Zellen

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der IRAK-1-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach LPS+NAC-Stimulierung (n=8) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die Phosphorylierung von IRAK-1 steigt in den ersten 25 Minuten mit unterschiedlicher Intensität an. Das Maximum wird bei 25 Minuten erreicht, anschließend fällt die Aktivität leicht ab und beginnt bei 45 Minuten erneut anzusteigen.

#### 4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Einfluss von LPS auf den TLR-4 Signalweg in Makrophagen der Zelllinie THP-1 weist bei vorbestehender Phosphorylierung einen Anstieg der Aktivität von IRAK-1 und eine damit verbundene Entzündungsreaktion auf.

NAC allein wirkt ebenfalls auf die Aktivierung von IRAK-1, jedoch nur in schwacher Ausprägung.

Die Gabe von NAC zu LPS-stimulierten THP-1 Zellen zeigt einen steilen Anstieg der Phosphorylierung von IRAK-1 und verstärkt die Stimulation von LPS.

Vergleichend betrachtet, kommt es bei LPS und LPS+NAC zu einem Anstieg der Phosphorylierung von IRAK-1. Das Maximum liegt dabei im mittleren Drittel mit anschließendem Abfall der Aktivierung. Diese ist bei LPS+NAC höher als bei LPS. NAC als alleinige Gabe zeigt einen leichten Anstieg der Aktivierung, die Signalstärke ist schwächer ausgeprägt als bei LPS und LPS+NAC (siehe Abb. 4.4).

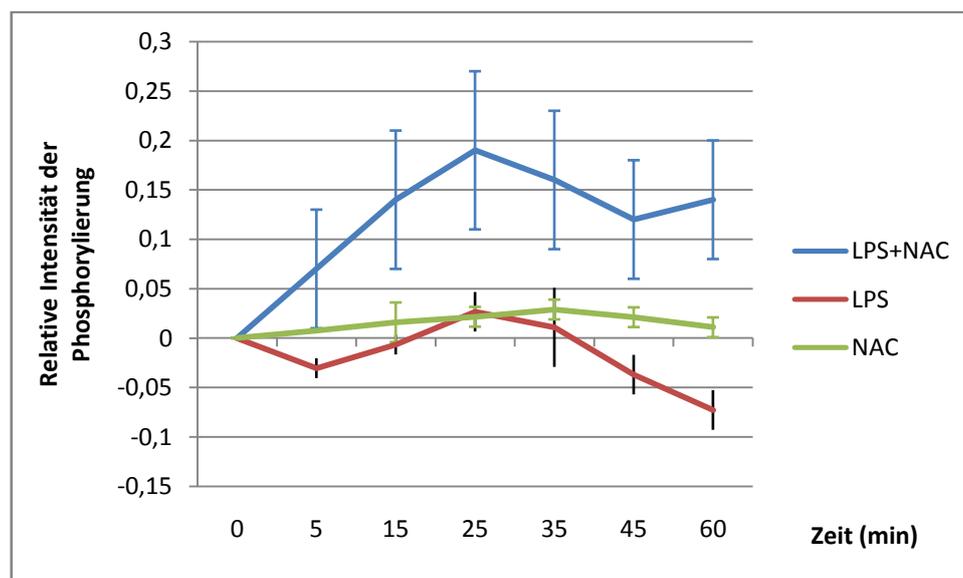


Abb. 4.4 **Vergleich der Kinetik der Phosphorylierung von IRAK-1 in LPS und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen** Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der zeitlichen Verläufe in der Kinetik der IRAK-1-Phosphorylierung in LPS, NAC und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen. LPS und LPS+NAC führen beide zum Anstieg der Phosphorylierung von IRAK-1, mit Maximum bei 25 Minuten und anschließendem Abfall. LPS+NAC weist eine stärkere Aktivierung von IRAK-1 auf als LPS. NAC allein zeigt einen Anstieg der Aktivierung bis 35 Minuten auf, danach erfolgt ein Abfall. Die Phosphorylierung ist schwächer ausgeprägt als bei LPS und LPS+NAC.

## 4.2 Transkriptionsfaktor NFκB

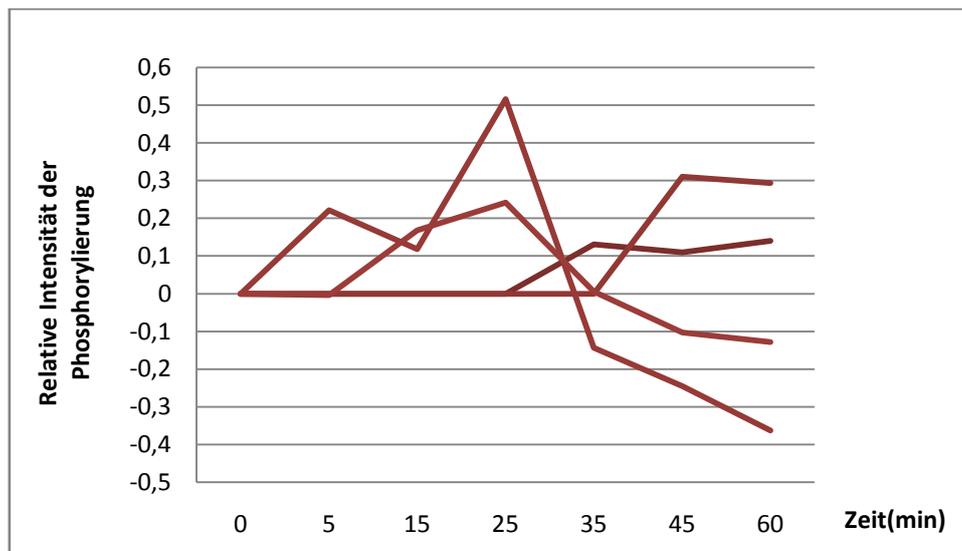
### 4.2.1 LPS-Stimulation der THP-1 Zellen

Zur Analyse des Einflusses von LPS auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB wurde die Makrophagenzelllinie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 1 µg/ml LPS inkubiert, um eine Entzündungsreaktion zu simulieren. Die Proteinauftrennung der Zelllysate erfolgte mittels SDS-Page, anschließend wurden die Proteine auf eine Membran geblottet. Durch den spezifischen Antikörper anti-NFκB p65 wurde die Phosphorylierung der p65-Untereinheit von NFκB mittels Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen und densitometrisch ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins β-Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

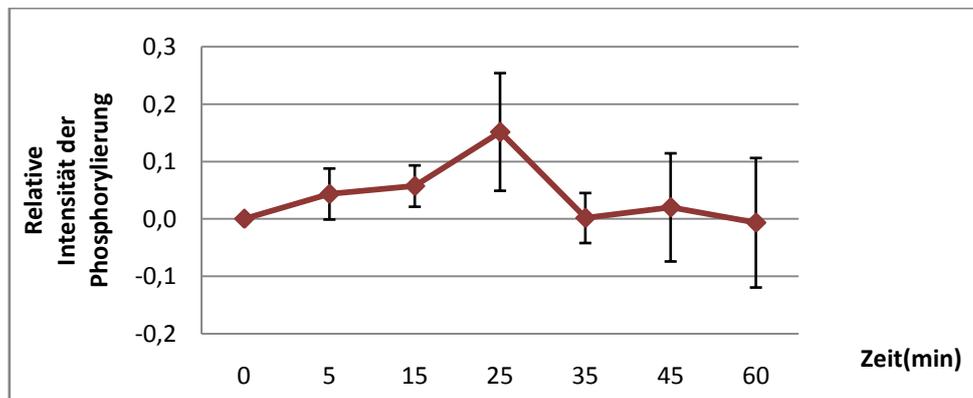
Die Messreihen zeigen einen Anstieg der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFκB in LPS-stimulierten Zellen (n=4) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In einem Teil der Experimente erfolgt ein Anstieg der Phosphorylierung in den ersten 25 Minuten mit anschließendem Abfall. Ein anderer Teil wird erst ab 25 Minuten aktiviert und bleibt über die 60 Minuten konstant (siehe Abb. 4.6 a). Die Auswertung der Mittelwerte in der Densitometrie ergibt einen schwachen Anstieg der NFκB-Phosphorylierung im vorderen Zeitverlauf mit Maximum bei 25 Minuten. Im Folgenden kommt es zu einem schwachen Abfall der Aktivierung, sowie zu einem kurzen erneuten Anstieg der Phosphorylierung bei 45 Minuten (siehe Abb. 4.6 b). Bei der optischen Betrachtung der Banden fällt vorwiegend ein Anstieg der Phosphorylierung von NFκB p65 bis 25 Minuten und ein späteren Abfall der Bandenstärke auf (siehe Abb. 4.6 c).

LPS stimuliert die Aktivierung der NFκB-Untereinheit p65 und damit die Transkription verschiedener Gene zur Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine. Zudem unterstützt es die Produktion von radikalen Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies, die eine Entzündungsreaktion im Organismus hervorrufen können.

a)



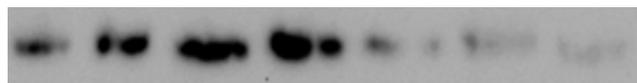
b)



c)

Stimulation in min      0      5      15      25      35      45      60

NFκB



#### Abb 4.6 Relative Phosphorylierung von NFκB p65 in LPS stimulierten THP-1-Zellen

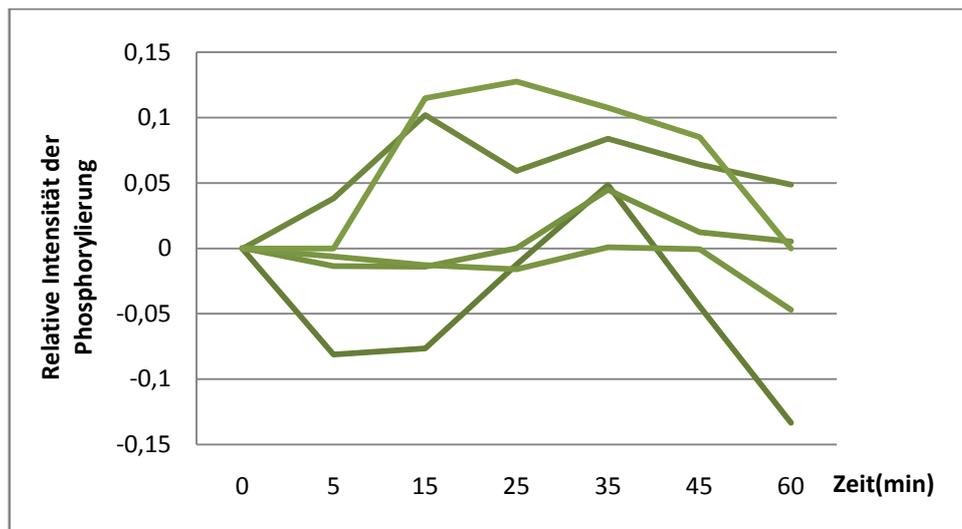
Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der NFκB-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach LPS-Stimulierung (n=4) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. a) Ein Teil der Experimente zeigt einen Anstieg in den ersten 25 Minuten und anschließenden Abfall. Ein anderer Teil eine spätere Aktivierung mit anhaltender Phosphorylierung nach 60 Minuten. b) Durchschnittlich weist die Phosphorylierung von NFκB einen langsamen Anstieg bis 25 Minuten und nachfolgenden Abfall mit erneuter kurzer Aktivierung bei 45 Minuten auf.

#### 4.2.2 NAC-Stimulation der THP-1 Zellen

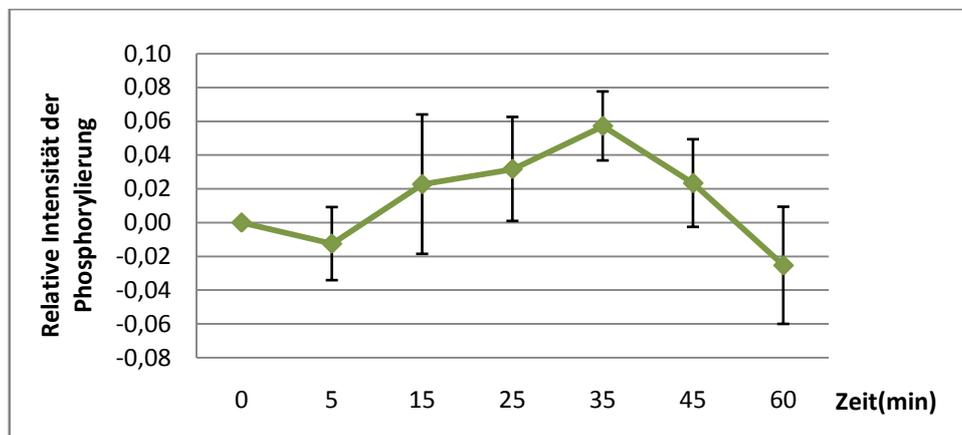
Zur Untersuchung einer Wirkung der alleinigen Gabe von NAC auf den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B bzw. dessen Untereinheit p65 wurde die Makrophagenzelllinie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 15 mM NAC inkubiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran übertragen. Durch den spezifischen Antikörper ant-NF $\kappa$ B p65 zum Nachweis der Phosphorylierung der p65-Untereinheit von NF $\kappa$ B mittels Chemilumineszenz-Reaktion detektiert und Densitometrie ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

Die NAC-Stimulation von THP-1 Zellen (n=5) weist in der Mehrzahl der Experimente einen steilen Anstieg der Phosphorylierung von NF $\kappa$ B p65. Dieser Anstieg erfolgt bis 35 Minuten mit anschließendem Abfall der Aktivierung. Einige Versuche zeigen eine vorbestehende Phosphorylierung (siehe Abb. 4.7 a). Die Mittelwertermittlung der Densitometrie ergibt nach Abfall der vorbestehenden Phosphorylierung einen stetigen Anstieg der Aktivierung bis zu dem Zeitwert von 35 Minuten. Danach erfolgt der Abfall der Phosphorylierung von NF $\kappa$ B p65 in der NAC-Stimulation der THP-1 Zellen (siehe Abb.4.7 b). Bei der optischen Auswertung der Blot Membranen kann ein kontinuierlicher Anstieg der Phosphorylierung über den gesamten Zeitverlauf mit Abfall im letzten Drittel gezeigt werden (siehe Abb. 4.7 c).

a)



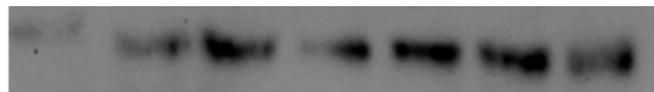
b)



c)

Stimulation in min	0	5	15	25	35	45	60
--------------------	---	---	----	----	----	----	----

NFκB



#### Abb. 4.7 Relative Phosphorylierung von NFκB p65 in NAC stimulierten THP-1-Zellen

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der NFκB-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach NAC-Stimulierung (n=5) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. a) Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich um einen Anstieg der NFκB-Phosphorylierung in den ersten 35 Minuten mit anschließendem Abfall der Aktivierung handelt. Bei einigen Experimenten zeigt sich eine geringe konstitutive Phosphorylierung. Die Aktivierungsphase erstreckt sich in den verschiedenen Experimenten auf 15-35 Minuten.

### 4.2.3 LPS+NAC-Stimulation der THP-1 Zellen

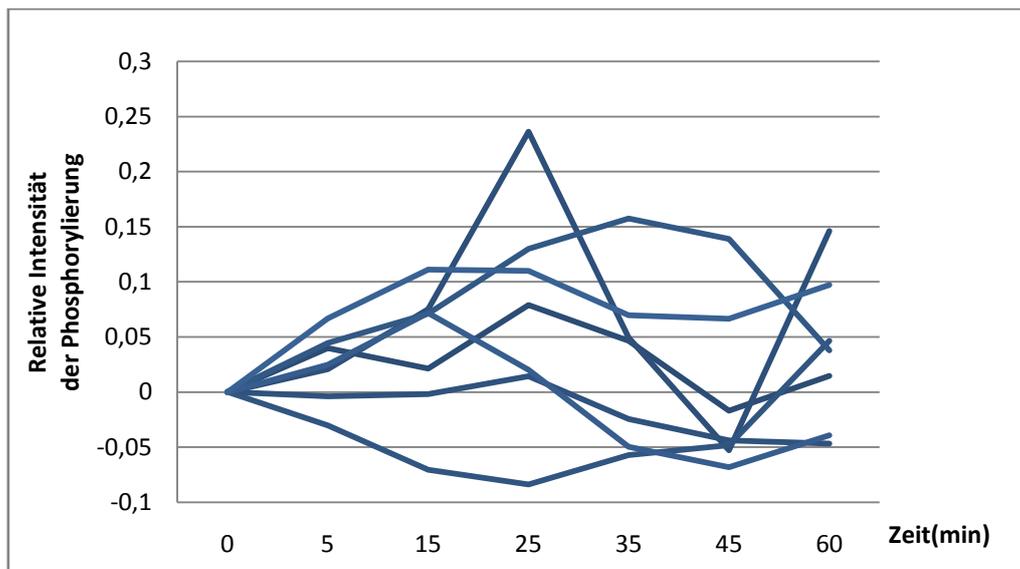
Zur Analyse einer Änderung in der Aktivierung der Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NFκB wurden Zellen der Linie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 1 µg/ml LPS zur Simulation einer Entzündungsreaktion und mit 15 mM NAC zur Untersuchung von dessen inhibierender Wirkung inkubiert. Die Zellysate wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran geblottet. Durch den spezifischen Antikörper anti-NFκB p65, der die Untereinheit p65 von NFκB bindet, wurde die Phosphorylierung von NFκB mittels Chemilumineszenz-Reaktion detektiert und Densitometrie ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins β-Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

Nach Zugabe von NAC zu den LPS-stimulierten THP-1 Zellen (n=7) zeigt sich in einer großen Anzahl der Versuche zunächst ein schwacher Anstieg der Phosphorylierung von NFκB p65 innerhalb der ersten 15-25 Minuten. Anschließend kommt es zu einem kontinuierlichen, langsamen Abfall der Phosphorylierung bzw. einem erneuten Anstieg über die 60 Minuten hinaus (siehe Abb. 4.8 a). Die Mittelwertauswertung der Densitometrie zeigt ebenfalls den langsamen, stetigen Anstieg mit Maximum bei 25 Minuten sowie einen langsamen, konstanten Abfall und erneuten kurzen Anstieg der Aktivierung bei 60 Minuten (siehe Abb.4.8 b).

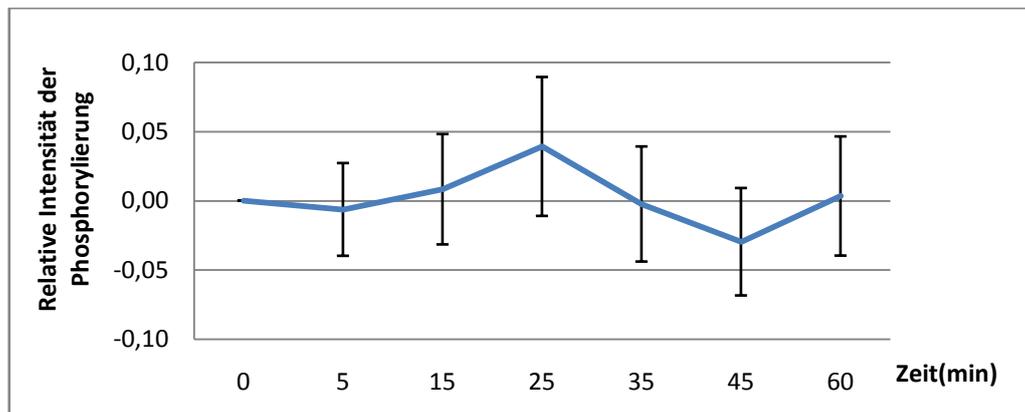
Die densitometrischen Ergebnisse sind auch bei Ansicht der Blot-Membranen nachvollziehbar (Abb. 4.8 c zeigt eine repräsentative Bandenreihe).

Unter NAC-Behandlung kommt es zur Aktivierung der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB in LPS-stimulierten THP-1 Zellen. Diese fällt schwächer aus als unter alleiniger LPS-Exposition. NAC zeigt einen hemmenden Effekt auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors und damit auf die durch LPS verursachte Entzündungsreaktion.

a)



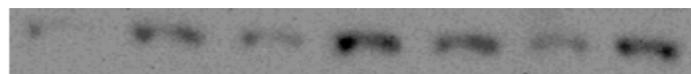
b)



c)

Stimulation in min      0      5      15      25      35      45      60

NFκB



#### Abb. 4.8 Relative Phosphorylierung von NFκB in LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der NFκB-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach LPS+NAC-Stimulierung (n=7) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. a). Die Mehrzahl der Versuche zeigt einen Anstieg der Phosphorylierung bis 25 Minuten mit anschließendem Abfall der Aktivität. einige verlaufen über die 60 Minuten konstant. b). Der Verlauf über die Zeit beginnt mit einer langsamen, stetigen Aktivierung und erreicht das Maximum bei 25 Minuten. Im Anschluss kommt es zu einem Abfall und erneutem Anstieg der Phosphorylierung bei 60 Minuten.

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ist es möglich zu sagen, dass die LPS-Exposition auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in Makrophagen der THP-1 Zelllinie einen langsamen, aber kontinuierlichen Anstieg der Phosphorylierung von NF $\kappa$ B p65 im mittleren Drittel des beobachteten Zeitverlaufs bewirkt.

NAC führt ebenfalls zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B in Form eines Anstiegs der Phosphorylierung. Diese ist schwächer ausgeprägt als unter LPS und LPS+NAC Stimulation.

Die Behandlung LPS-stimulierter Zellen mit NAC zeigt einen Anstieg der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und dessen Untereinheit p65. Diese sinkt im hinteren Drittel der Zeit unter Aktivierungsniveau. Der Kurvenverlauf von LPS und LPS+NAC ist nahezu identisch, die Signalstärke bei LPS ist stärker als bei LPS+NAC. (siehe Abb. 4.9). NAC ist scheinbar in der Lage, LPS-getriggerte Entzündungsreaktionen abzuschwächen.

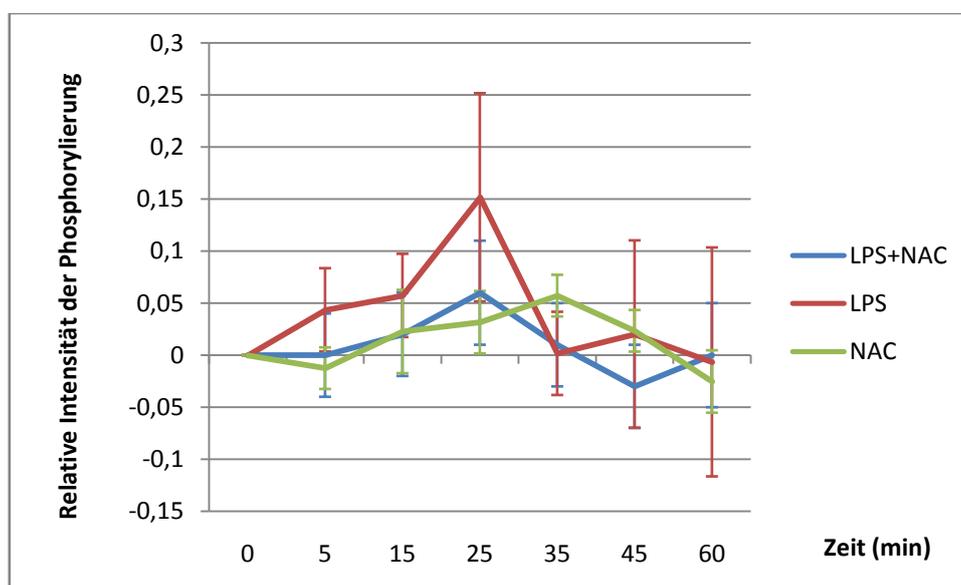


Abb. 4.9 **Vergleich der Kinetik der Phosphorylierung von NF $\kappa$ B in LPS und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen** Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der zeitlichen Verläufe in der Kinetik der NF $\kappa$ B-Phosphorylierung in LPS, NAC und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen. Die Phosphorylierung von NF $\kappa$ B in LPS und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen zeigt einen fast identischen Verlauf. Der Abfall der Aktivität bei LPS ist stärker ausgeprägt als bei LPS+NAC. Die NAC-Gabe aktiviert die Phosphorylierung von NF $\kappa$ B. Diese ist schwächer als bei LPS und LPS+NAC, das Maximum wird erst später erreicht.

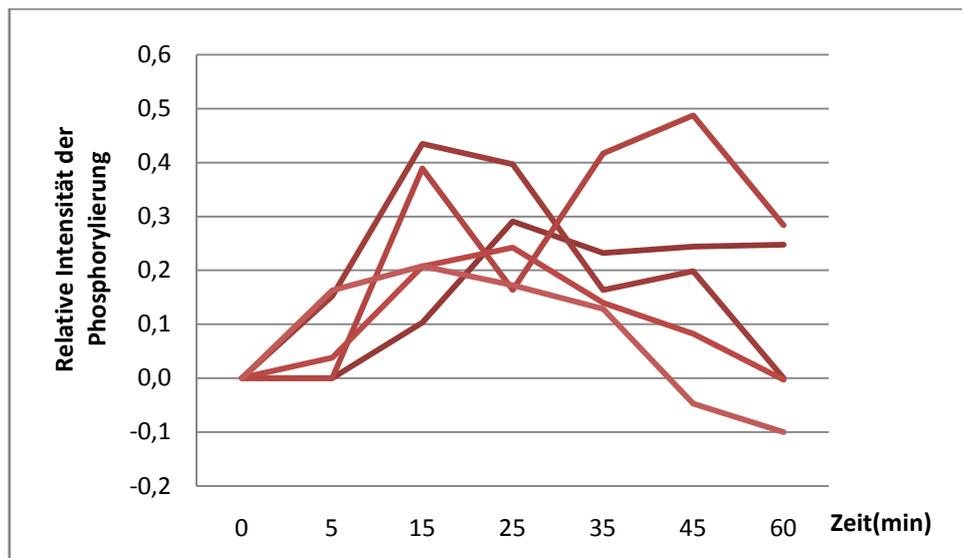
### 4.3 pErk1/2 und ERK 1/2

#### 4.3.1 LPS-Stimulation der THP-1 Zellen

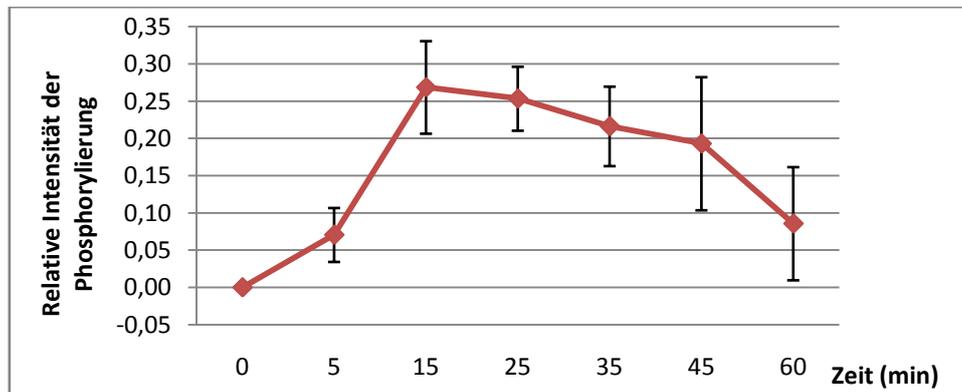
Zur Analyse des Einflusses von LPS auf die Aktivierung der Signalmoleküle ERK1/2 des RAS/MEK/ERK-Weges wurde die Makrophagenzelllinie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 1 µg/ml LPS inkubiert, um eine Entzündungsreaktion zu simulieren. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Übertragung der Proteine auf eine Membran erfolgte mittels Blotting. Durch die spezifischen Antikörper anti-ERK1/2 und anti-pErk1/2 wurde die Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 mittels Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen und Densitometrie ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

Die Zugabe von LPS in THP-1 Zellen (n=5) bewirkt einen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1. ERK2 lässt sich aufgrund der geringen Signalstärke nicht, bzw. lediglich schwach nachweisen. Es zeigt sich eine steile Aktivierung über das erste Drittel des Zeitverlaufes mit Maximum bei 15-25 Minuten. Anschließend nimmt die Phosphorylierung ab bzw. steigt in einem Versuch erneut an (siehe Abb. 4.11a). Bei der Auswertung der Mittelwerte der Densitometrie wird ein ähnliches Bild mit steilem und schnellem Anstieg der Aktivierung von ERK1 im ersten Drittel des Zeitverlaufes mit Maximum bei 15 Minuten deutlich. Anschließend kommt es zu einem langsamen, aber stetigen Abfall der Phosphorylierung (siehe Abb. 4.11b). Optisch erkennt man auf den Blot Membranen ein langsam stärker werdendes Signal bis 25-45 Minuten, welches anschließend an Signalstärke verliert (siehe Abb. 4.11c). LPS führt zur schnellen Aktivierung des RAS/MEK/ERK-Weges. Dies zeigt sich bei der Phosphorylierung der Signalmoleküle ERK1/2.

a)



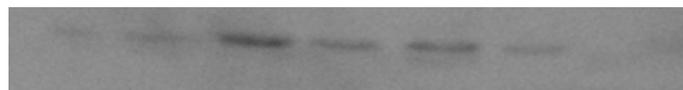
b)



c)

Stimulation in min                      0    5    15    25    35    45    60

pErk 1/2

**Abb.4.11 Relative Phosphorylierung von ERK1 in LPS stimulierten THP-1 Zellen**

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der ERK1-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach LPS Stimulierung (n=5) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. a) Die Stimulation von LPS führt zu einer Aktivierung von ERK1 innerhalb der ersten 15 Minuten, danach erfolgt der langsame Rückgang der Phosphorylierung. Dieser Verlauf konnte sowohl in der Mittelwertanalyse b) als auch bei der Auswertung der Western Blots nachgewiesen werden c) ERK2 kann aufgrund keines oder eines sehr schwachen Signals nicht gezeigt werden.

Die Analyse der Wirkung von LPS auf die Expression von ERK1/2 (n=8) zeigt keinen eindeutigen Einfluss auf keine der beiden Isoformen über die gesamte Zeitspanne. Die Signalstärke von ERK2 fällt schwächer aus als das Signal von ERK 1 (siehe Abb. 4.12).

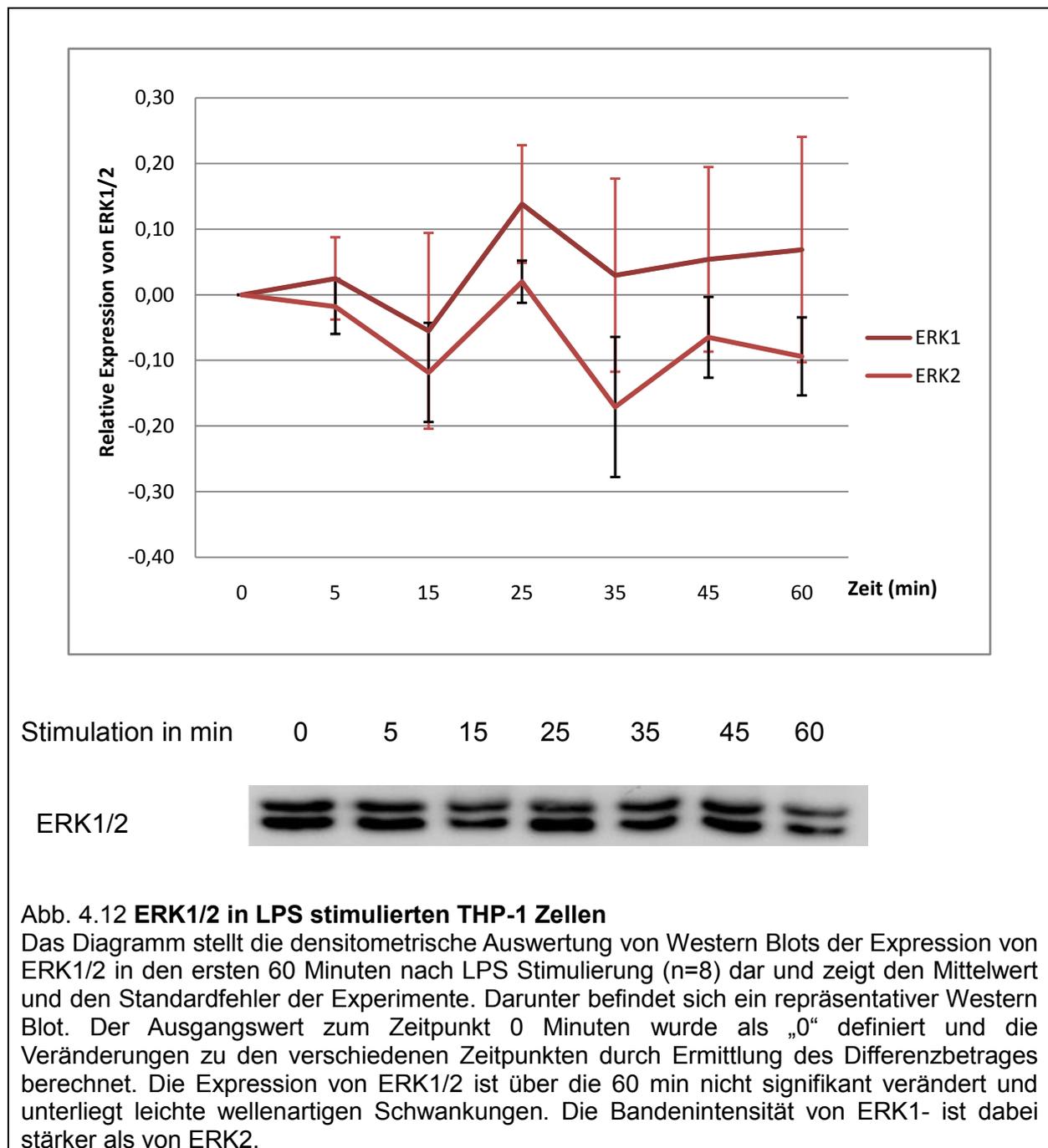


Abb. 4.12 **ERK1/2 in LPS stimulierten THP-1 Zellen**

Das Diagramm stellt die densitometrische Auswertung von Western Blots der Expression von ERK1/2 in den ersten 60 Minuten nach LPS Stimulierung (n=8) dar und zeigt den Mittelwert und den Standardfehler der Experimente. Darunter befindet sich ein repräsentativer Western Blot. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. Die Expression von ERK1/2 ist über die 60 min nicht signifikant verändert und unterliegt leichte wellenartigen Schwankungen. Die Bandenintensität von ERK1- ist dabei stärker als von ERK2.

### 4.3.2 NAC-Stimulation der THP-1 Zellen

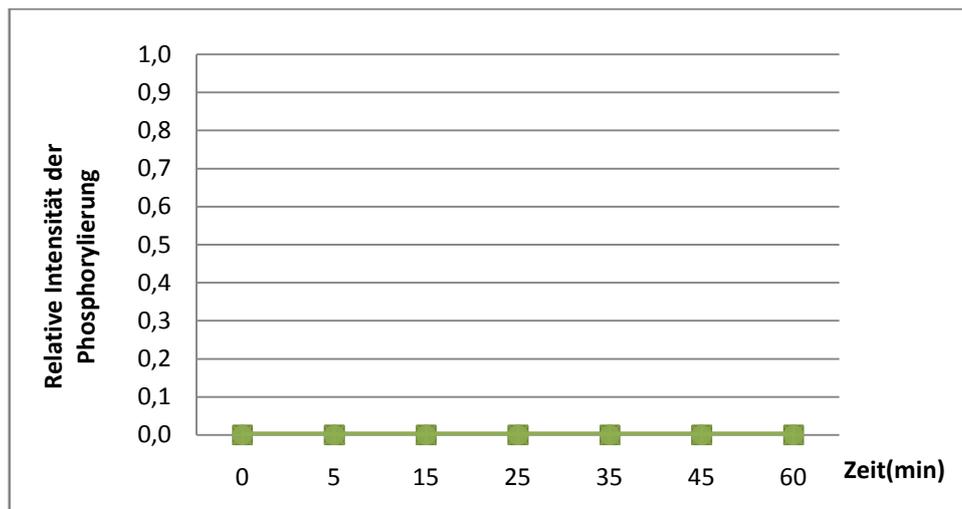
Zur Untersuchung einer Wirkung der alleinigen Gabe von NAC auf den RAS/MEK/ERK-Weg über ERK1/2 wurde die Makrophagenzelllinie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 15 mM NAC inkubiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran geblottet. Durch die spezifischen Antikörper anti-ERK1/2 und anti-pErk1/2 wurde die Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 mittels Chemilumineszenz-Reaktion detektiert. Die Auswertung erfolgte densitometrisch. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

Nach der Stimulation der THP-1 Zellen mit NAC (n=5) konnte keine Phosphorylierung nachgewiesen werden. (siehe Abb. 4.13 a,b).

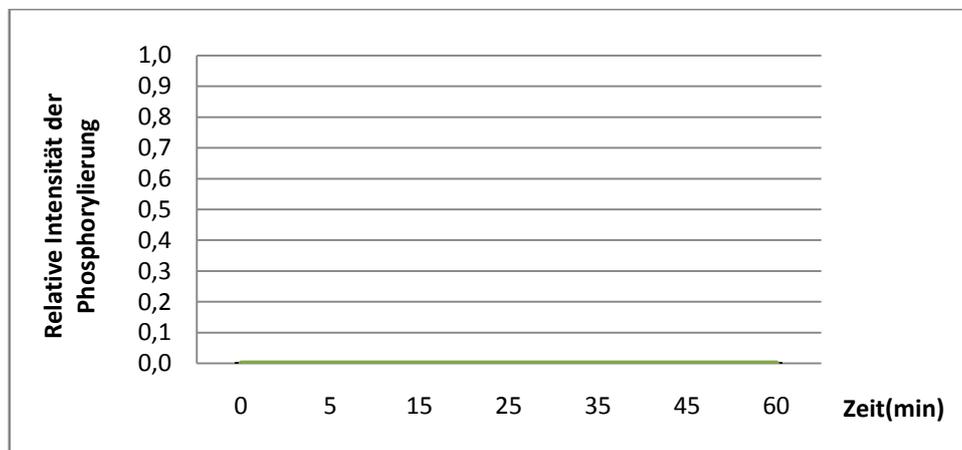
Bei der optischen Analyse der Blot Membranen konnten ebenfalls keine Banden identifiziert werden mit Ausnahme der Positivkontrolle (siehe Abb.4.13 c.).

NAC allein führt zu keiner Aktivierung des RAS/MEK/ERK-Weges über die Signalmoleküle ERK1/2 in THP-1 Zellen.

a)



b)



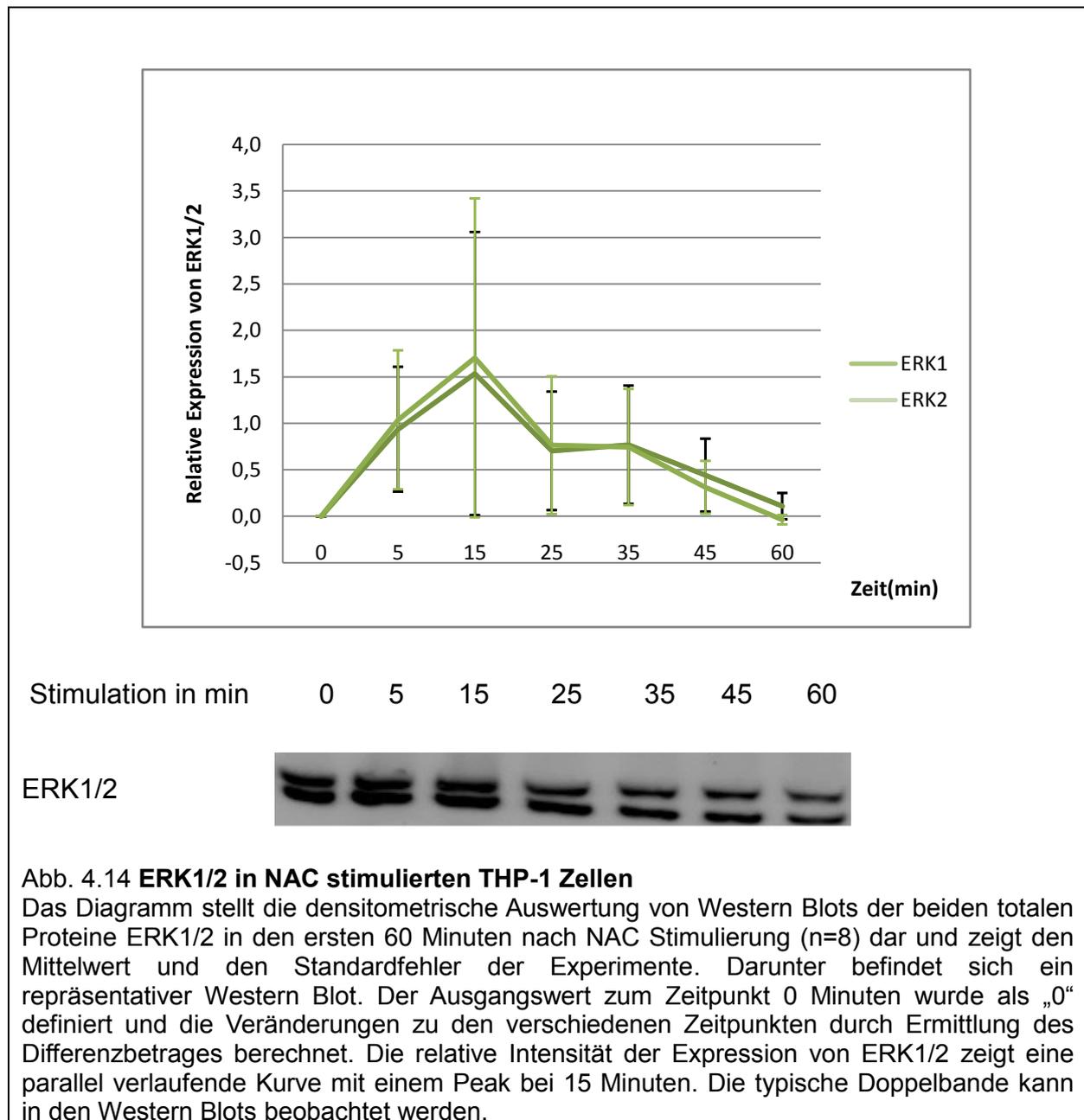
c)



#### Abb. 4.13 Relative Phosphorylierung von ERK1 in NAC stimulierten THP-1 Zellen

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der ERK1-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach NAC Stimulierung (n=5) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die Negativ- und Positivkontrolle ist als „N“ und „P“ gekennzeichnet.

Nach Inkubation mit NAC zeigt die Expression von ERK 1/2 (n=8) in der Densitometrie einen leichten Anstieg bis zu dem Zeitwert 15 Minuten. Danach kommt es bei beiden Proteinen zu einem leichten Abfall. Die Signale für ERK1 und ERK2 sind im Vergleich ähnlich stark ausgeprägt. ERK1/2 kann optisch als Doppelbande in den Blot Membranen beobachtet werden (siehe Abb. 4.14).



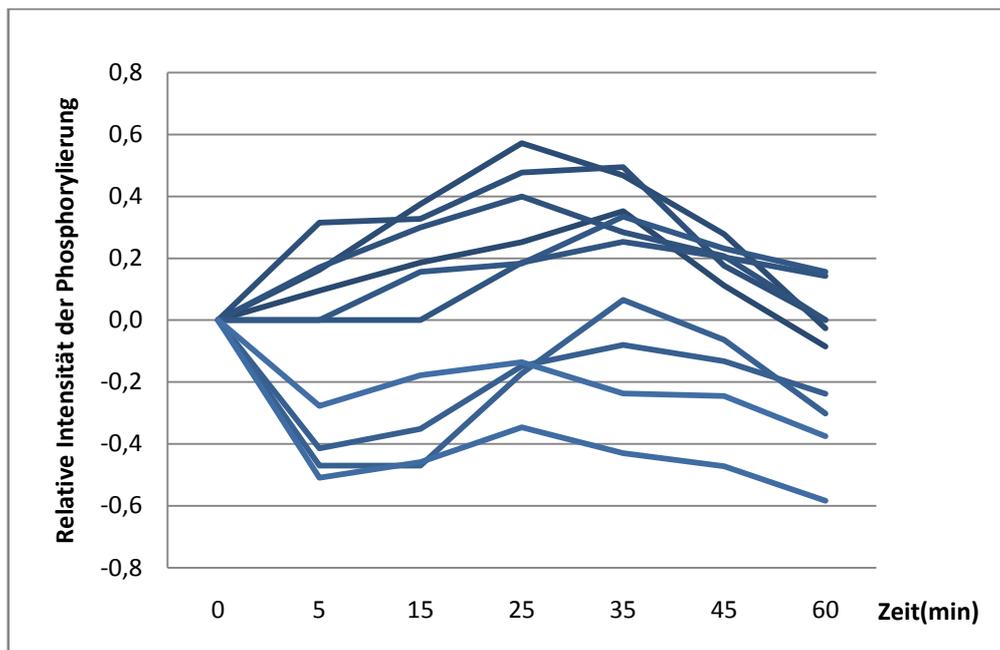
### 4.3.3 LPS+NAC-Stimulation der THP-1 Zellen

Zur Analyse einer Änderung in der Aktivierung des RAS/MEK/ERK-Weges über die Signalmoleküle ERK1/2 wurden Zellen der Linie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 1 µg/ml LPS zur Simulation einer Entzündungsreaktion und mit 15 mM NAC zur Untersuchung von dessen inhibierender Wirkung inkubiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Übertragung der Proteine erfolgte auf eine Membran. Durch die spezifischen Antikörper anti-ERK1/2 und anti-pErk1/2 wurde die Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 mittels Chemilumineszenz-Reaktion detektiert und Densitometrie ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

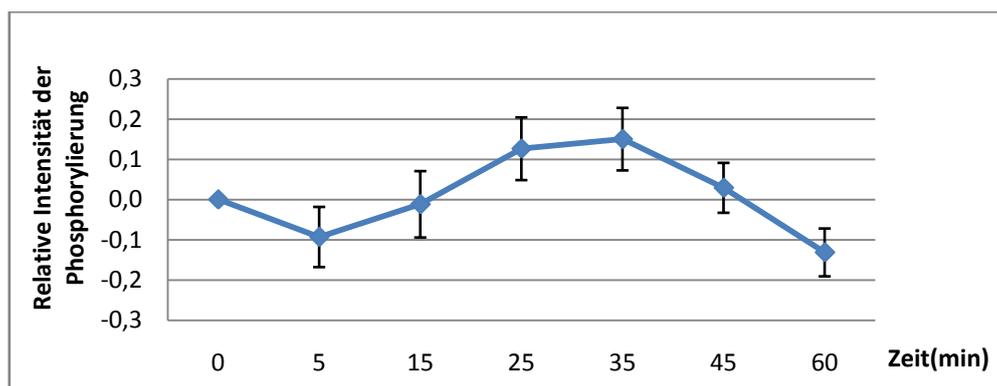
Bei der Untersuchung von LPS-stimulierten THP-1 Zellen mit NAC (n=10) zeigt sich in der Hälfte der Experimente eine konstitutive Phosphorylierung bei 0 Minuten. Alle diese untersuchten Proben stammen aus einer zweiten beim Kooperationspartner erstellten Charge, deren Herstellung jedoch der ersten Charge absolut identisch gewesen sein soll. In allen Versuchen kann ein langsamer Anstieg der Phosphorylierung von ERK1 im ersten Drittel des zeitlichen Verlaufes nachgewiesen werden. Diese Aktivierung von ERK1 fällt nach dem mittleren Drittel des Zeitverlaufes wieder ab (siehe Abb. 4.15 a). Die densitometrische Auswertung ergibt eine Phosphorylierung am Anfang des Verlaufs mit beginnendem langsamen, kontinuierlichen Anstieg der Aktivierung bis in den mittleren Zeitbereich, anschließend kommt es zum Rückgang der Phosphorylierung (siehe Abb. 4.15 b).

Visuell lässt sich eine hohe Phosphorylierung durch die starke Bande am Ausgangspunkt bei 0 Minuten feststellen, die nur auf den Western Blots der zweiten Charge zu sehen ist. Im weiteren Verlauf zeigt sich eine Aktivierung der Phosphorylierung von ERK1 bis zum Maximum bei 35 Minuten, die danach langsam wieder abfällt (siehe Abb. 4.15 c). Die Gabe von NAC auf LPS-stimulierte THP-1 Zellen führt nicht zu einer Änderung der Phosphorylierung von ERK1/2. Die Signalstärke ist identisch mit den Zellen, welche nur mit LPS behandelt wurden. Die Phosphorylierung von ER1/2 wurde unter NAC-Behandlung leicht verlangsamt und erreicht erst zum späteren Zeitpunkt das Maximum der Aktivierung.

a)



b)



c)

Stimulation in min      0      5      15      25      35      45      60

pErk1/2

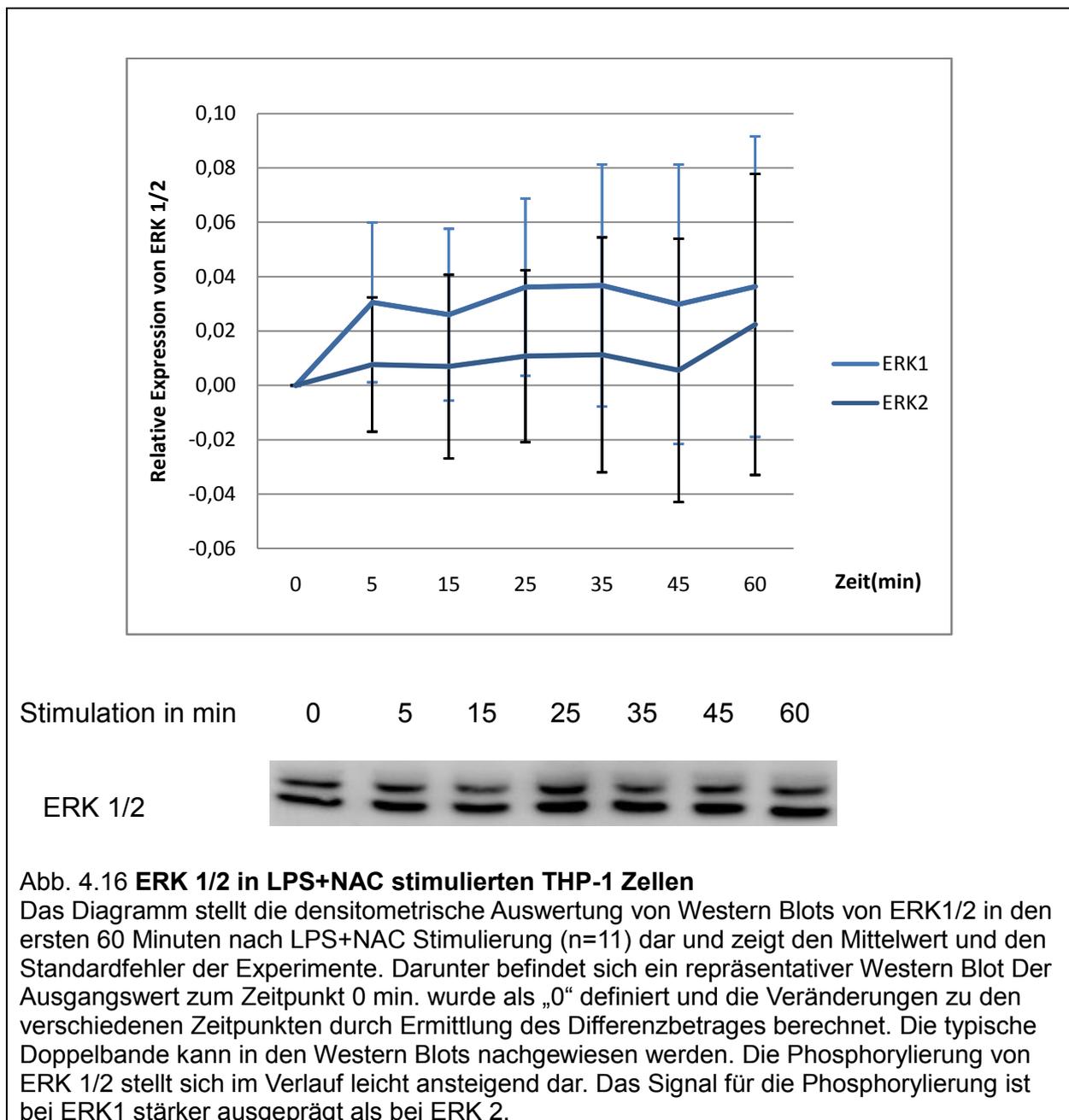


#### Abb. 4.15 Relative Phosphorylierung von ERK1 in NAC stimulierten THP-1 Zellen

Das Diagramm stellt die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der ERK1-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach LPS+NAC Stimulierung (n=10) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. a) Die Hälfte der Experimente zeigt eine konstitutive Phosphorylierung. Alle Versuche weisen einen Anstieg der Aktivierung von ERK1 in den ersten 25-35 Minuten sowie den anschließenden Abfall der Phosphorylierung auf. b). Dieser Verlauf kann auch in den Abb. b) und c) nachvollzogen werden. ERK2 kann aufgrund keines oder eines sehr schwachen Signals nicht gezeigt werden.

Die Expression von ERK1 und ERK2 ist leicht ansteigend über die gesamte Zeitspanne. Das Signal für ERK1 erscheint dabei etwas stärker.

Visuell können die Doppelbanden bei einem Großteil der Experimente nachgewiesen werden (siehe 4.16).



#### 4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass LPS in Makrophagen der Zelllinie THP-1 einen schnellen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1 und die Entstehung einer Entzündungsreaktion hervorruft.

Die alleinige Zugabe von NAC zeigt keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1 in den Experimenten.

Die Behandlung von LPS-stimulierten THP-1 Zellen mit NAC führt zu einem Anstieg der Phosphorylierung in der ersten Hälfte der Zeit. Vergleicht man die Kinetik der Phosphorylierung von ERK1 zwischen LPS und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen, wird bei LPS-stimulierten Zellen ein schnellerer und steilerer Anstieg der Aktivierung sichtbar. Die Signalstärke ist bei beiden Versuchsreihen, LPS und LPS+NAC, annähernd gleich. Das Maximum wird unter NAC-Gabe später erreicht als unter alleiniger LPS-Exposition und fällt schneller ab (siehe Abb. 4.17).

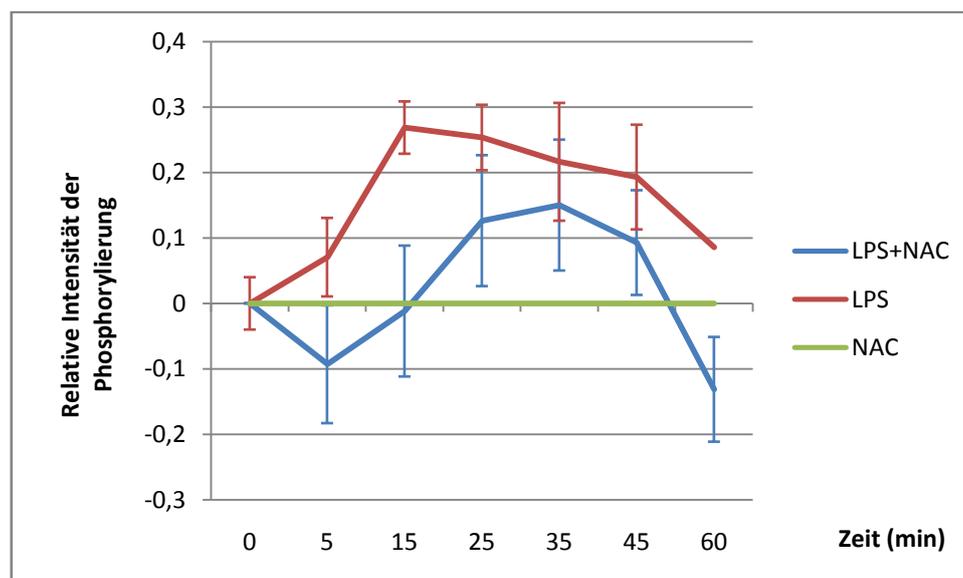


Abb.4.17 **Vergleich der Kinetik der Phosphorylierung von ERK 1 in LPS und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen.** Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der zeitlichen Verläufe in der Kinetik der ERK1-Phosphorylierung in LPS, NAC und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen. Die LPS stimulierten THP-1 Zellen zeigen einen schnelleren Anstieg der Phosphorylierung mit früherem Maximum und fallen schwächer ab. Im Vergleich dazu stehen die LPS +NAC stimulierten Zellen mit einer langsameren Aktivierung und schnelleren Abfall der Phosphorylierung mit Grundphosphorylierung. Die Signalstärke ist annähernd identisch. NAC allein induziert keine Phosphorylierung.

## 4.4 pStat3 und STAT3

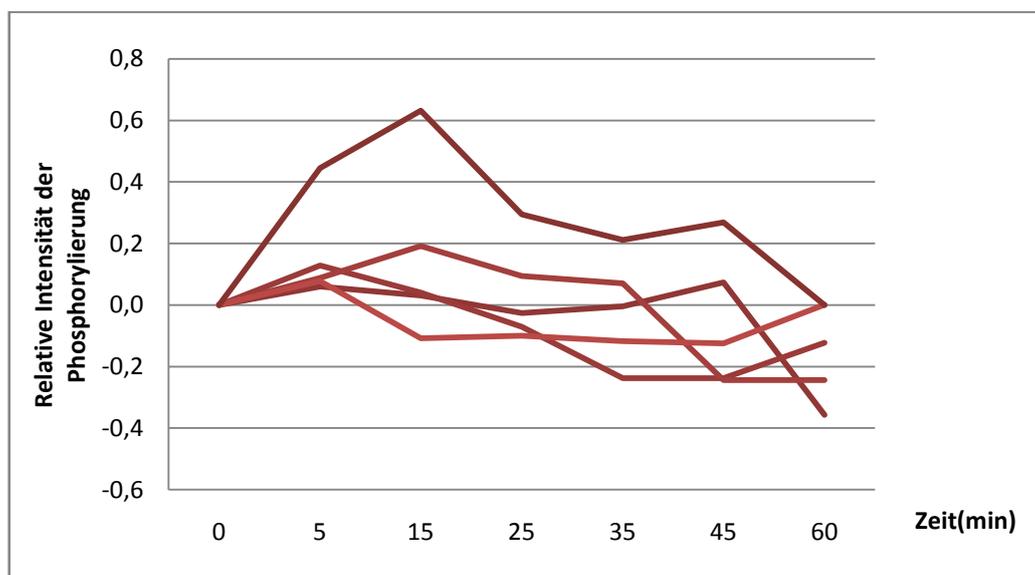
### 4.4.1 LPS-Stimulation der THP-1 Zellen

Zur Analyse des Einflusses von LPS auf die Aktivierung des Signalmoleküls STAT3 des JAK/STAT-Weges wurde die Makrophagenzelllinie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 1 $\mu$ g/ml LPS stimuliert um eine Entzündungsreaktion zu inkubiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran gebロットet. Durch die spezifischen Antikörper anti-STAT3 und anti-pSTAT3 wurde die Expression und Phosphorylierung von STAT3 mittels Chemilumineszenz-Reaktion detektiert und densitometrisch ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

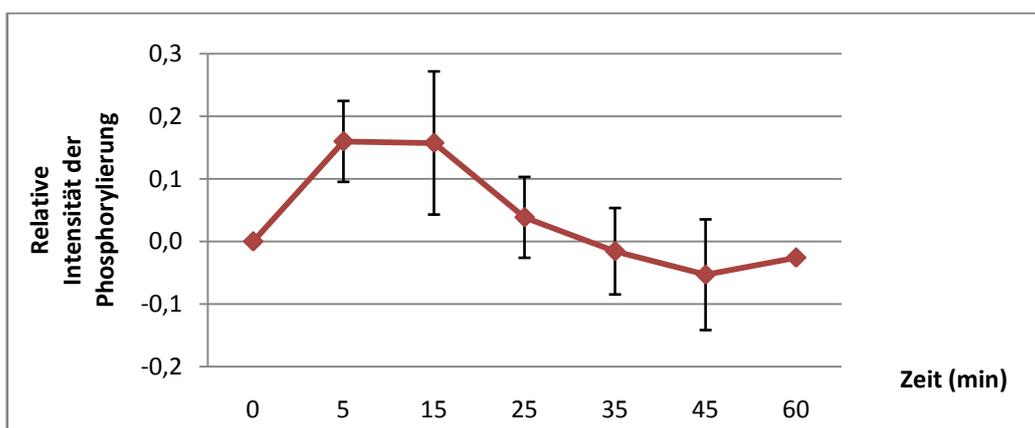
Die Zugabe von LPS an THP-1 Zellen (n=5) zeigt in der Densitometrie aller Experimente einen Anstieg der Phosphorylierung von STAT3 mit Maximum bei 5-15 Minuten. Im letzten Drittel kommt es zum Rückgang der Phosphorylierung. Einige Experimente weisen eine bereits zuvor bestehende konstitutive Phosphorylierung auf (siehe Abb. 4.19 **a**). Die Analyse der Mittelwerte in der Densitometrie ergibt eine starke schnelle Aktivierung von STAT3 bis zu dem Zeitpunkt von 15 Minuten. Im späteren Verlauf kommt es zum langsamen Abfall mit anschließendem erneuten geringen Anstieg der Aktivierung (siehe Abb. 4.19 **b**). Optisch lässt sich auch in der Auswertung der Blot Membranen eine Phosphorylierung in dem ersten Drittel der Zeit feststellen, der im Verlauf abnimmt um bei 60 Minuten erneut anzusteigen (siehe Abb. 4.19 **c**).

LPS führt zur Phosphorylierung von STAT3 und damit zur Stimulation des JAK/STAT-Weges in THP-1-Zellen.

a)



b)



c)

Stimulation in min                    0    5    15    25    35    45    60

pStat 3

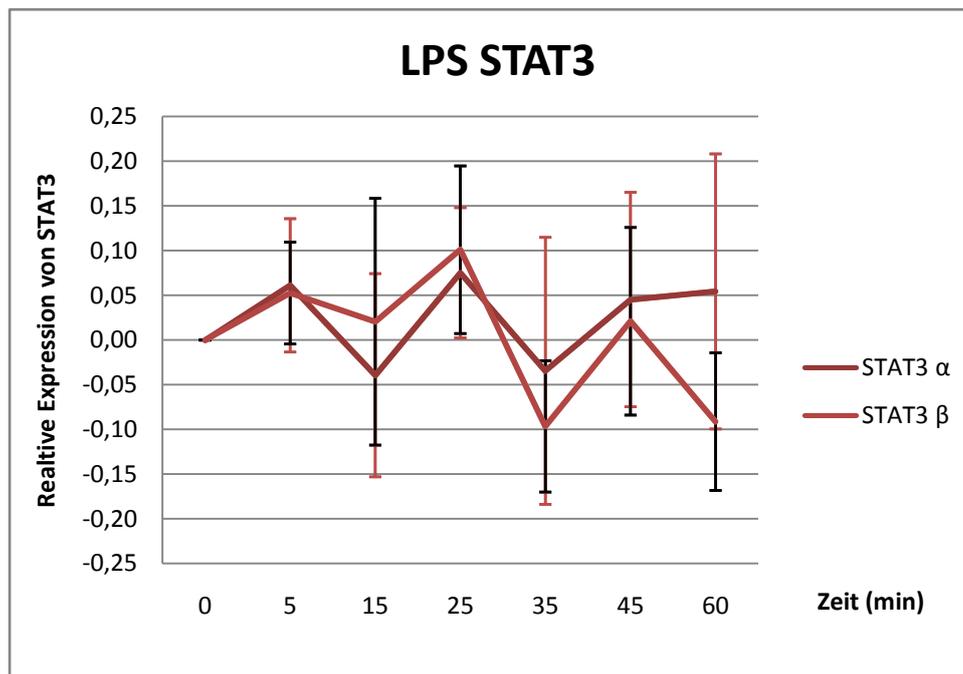


**Abb.4.19 Relative Phosphorylierung von STAT3 in LPS stimulierten THP-1-Zellen.**

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der STAT3-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach LPS Stimulierung (n=5) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. a) Die Experimente weisen auf einen Anstieg der Phosphorylierung hin. b) Nach 5 Minuten kommt es zur Aktivierung der Phosphorylierung von STAT3 bis zu dem Zeitwert 15 Minuten und anschließend langsamen Abfall der Phosphorylierung. Ähnlich nach zu verfolgen in der optischen Western Blot-Auswertung.

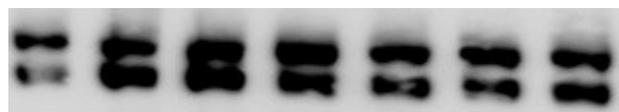
Die Stimulation der THP-1 Zellen mit LPS (n=8) hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der beiden Splicingformen von STAT3, ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Form). Die Signalstärke ist bei STAT3 $\alpha$  und STAT3 $\beta$  nahezu identisch.

Optisch fällt vor allem ein variables Bild mit Doppelbandenstruktur auf (siehe Abb. 4.20).



Stimulation in min      0    5    15    25    35    45    60

STAT3



#### Abb.4.20 STAT3 $\alpha$ und $\beta$ in LPS stimulierten THP-1 Zellen

Das Diagramm stellt die densitometrische Auswertung von Western Blots der beiden Proteine STAT3  $\alpha$  und  $\beta$  in den ersten 60 Minuten nach LPS Stimulation (n=8) dar und zeigt den Mittelwert und den Standardfehler der Experimente. Darunter befindet sich ein repräsentativer Western Blot. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. Sowohl optisch als auch in der Densitometrie war es möglich, die beiden Splicingformen von STAT3  $\alpha$  und  $\beta$  nachzuweisen. Sie zeigen teilweise eine variable Ausprägung der Banden.

#### 4.4.2 NAC-Stimulation der THP-1 Zellen

Zur Untersuchung einer Wirkung der alleinigen Gabe von NAC auf den JAK/STAT-Weg über STAT3 wurde die Makrophagenzelllinie THP-1 für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 15 mM NAC inkubiert. Die Trennung der Zelllysate erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf eine Membran geblottet. Durch die spezifischen Antikörper anti-STAT3 und anti-pStat3 wurde die Phosphorylierung von STAT3 mittels Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen und Densitometrie ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

Die Behandlung der THP-1 Zellen mit NAC (n=3) zeigt einen Anstieg der Phosphorylierung von STAT3 mit Maximum bei 5-15 Minuten. Nachfolgend kommt es zum langsamen Abfall und erneutem geringen Anstieg bei 60 Minuten (siehe Abb. 4.21a). Bei der Auswertung der Mittelwerte in der Densitometrie kann man dementsprechend einen starken Anstieg der Phosphorylierung von STAT3 innerhalb der ersten 5 Minuten wahrnehmen. Daraufhin fällt die Aktivität langsam, aber stetig wieder ab und steigt im hinteren Drittel der Zeit erneut an (siehe Abb. 4.21 b).

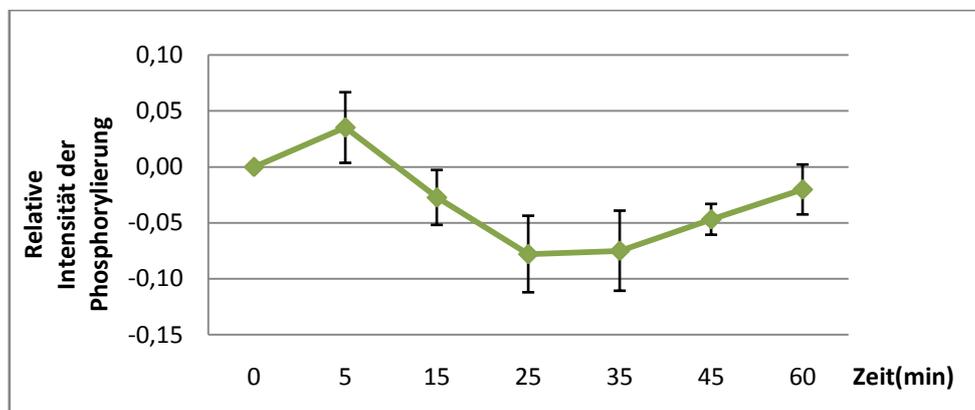
Optisch lässt sich in den geblotteten Membranen ein ähnliches Verhalten erkennen. Während der bestehenden konstitutiven Phosphorylierung mit schwachen Banden kommt es zur Abnahme des Signals und zur späteren erneuten Zunahme im hinteren Drittel der Zeit (siehe Abb. 4.21c).

NAC stimuliert kurzzeitig die Phosphorylierung von STAT3. Diese fällt anschließend unter Grundniveau ab und NAC scheint einen inhibierenden Effekt auf den JAK/STAT-Weg in THP-1 Zellen zu haben.

a)



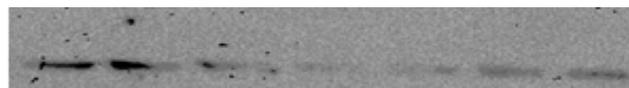
b)



c)

Stimulation in min            0     5     15     25     35     45     60

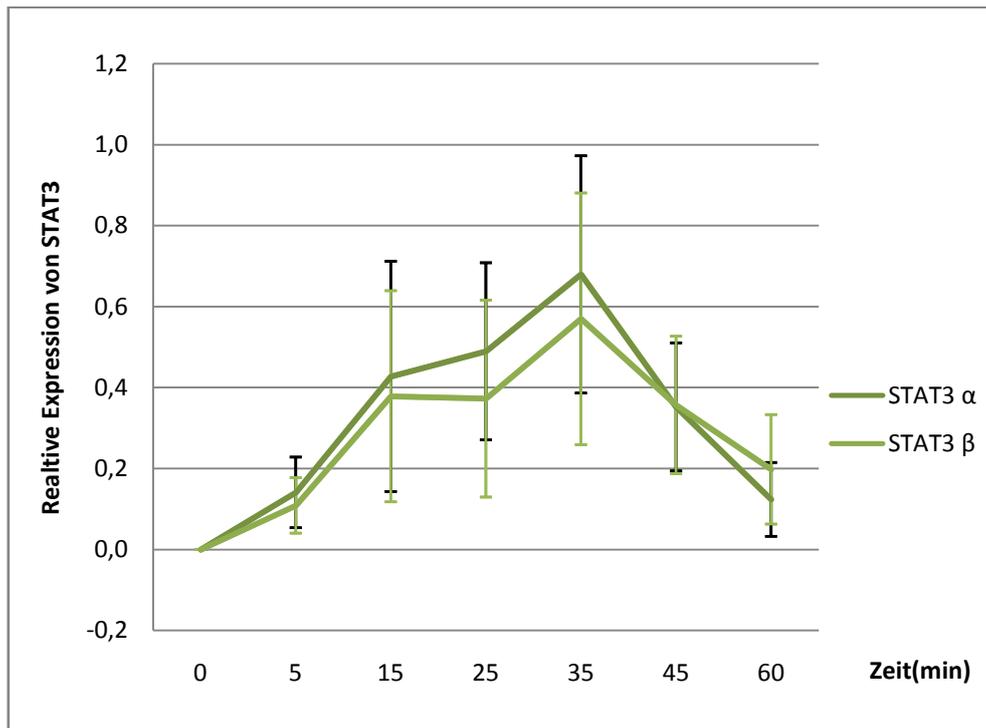
pStat3



#### Abb. 4.21 Relative Phosphorylierung von STAT3 in NACstimulierten THP-1-Zellen

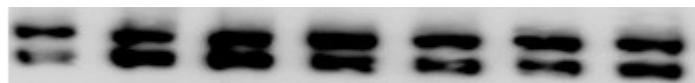
Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der STAT3-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach NAC Stimulierung (n=3) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. a) Die Messreihen zeigen einen schnellen Anstieg der Phosphorylierung in dem ersten Drittel der Zeit mit anschließendem Abfall und erneutem Anstieg der Aktivierung im hinteren Drittel. Dies wird ebenfalls in der Mittelwertanalyse und den Western Blots sichtbar.

Nach Behandlung von THP-1 Zellen mit NAC (n=8) lassen sich die beiden Splicingformen von STAT3, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form, nachweisen. Beide Formen zeigen einen ansteigenden Verlauf der Expression über die gesamte Zeit mit Maximum bei 35 Minuten und anschließendem Abfall, wobei das Signal für die  $\alpha$ -Form stärker ist als für die  $\beta$ -Form (siehe Abb. 4.22).



Stimulation in min 0 5 15 25 35 45 60

STAT3



**Abb. 4.22 STAT3  $\alpha$  und  $\beta$  in NAC stimulierten THP-1 Zellen**

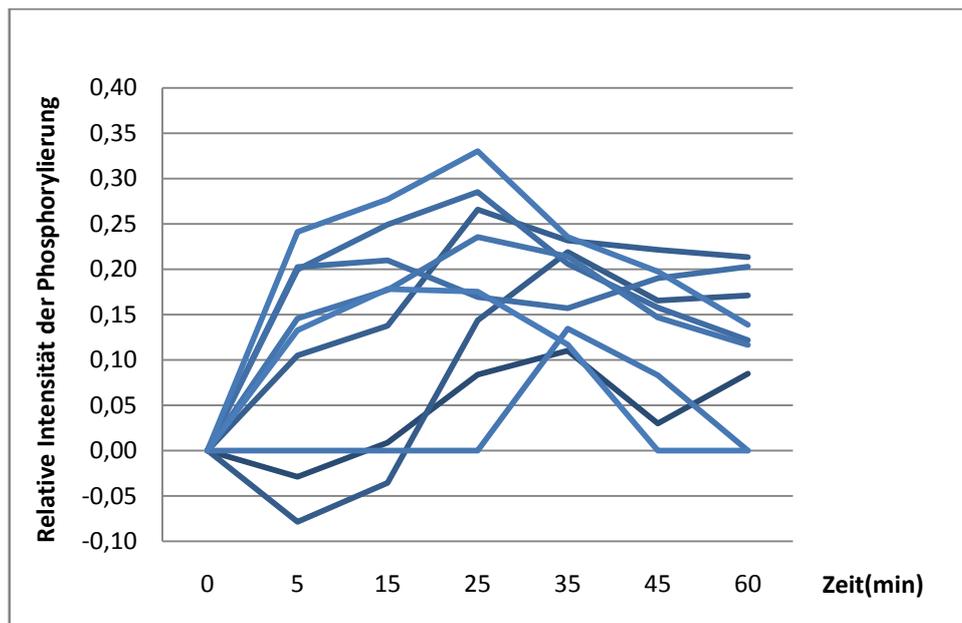
Das Diagramm stellt die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Detektion der beiden Proteine STAT3  $\alpha$  und  $\beta$  in den ersten 60 Minuten nach NAC Stimulierung (n=8) dar und zeigt den Mittelwert und den Standardfehler der Experimente. Darunter befindet sich ein repräsentativer Western Blot. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. Mit der NAC-Stimulierung lassen sich die beiden Splicingformen von STAT3,  $\alpha$  und  $\beta$ , nachweisen. Beide zeigen einen ansteigenden und abfallenden Verlauf über die Zeit, wobei die Signalstärke von der  $\alpha$ -Form stärker ist als von der  $\beta$ -Form.

#### 4.4.3 LPS+NAC-Stimulation der THP-1 Zellen

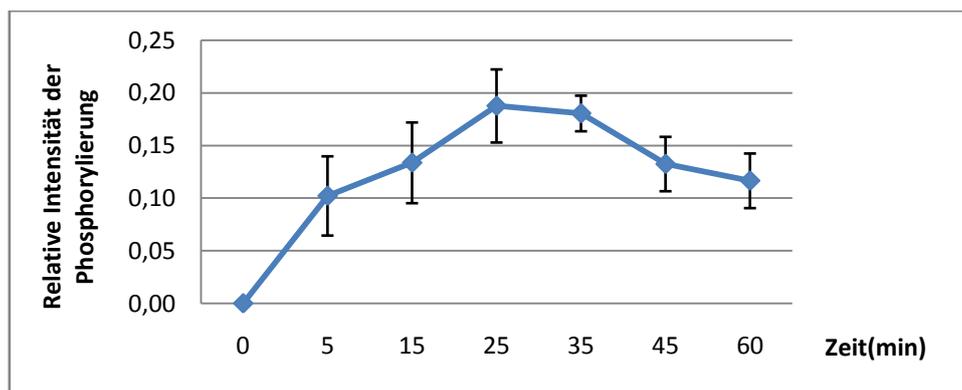
Zur Analyse des Einflusses von NAC auf die Expression und Phosphorylierung von STAT3 in LPS-stimulierten THP-1 Zellen wurden diese für 0, 5, 15, 25, 35, 45 und 60 Minuten mit 1 µg/ml LPS zur Simulation einer Entzündungsreaktion und mit 15 mM NAC zur Untersuchung von dessen inhibierender Wirkung inkubiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran geblottet. Durch die spezifischen Antikörper anti-STAT3 und anti-pStat3 wurde die Phosphorylierung von STAT3 mittels Chemilumineszenz-Reaktion detektiert und mit Hilfe der Densitometrie ausgewertet. Die Werte wurden anhand des Housekeeping Proteins  $\beta$ -Aktin und gegen die Zeit normalisiert, dabei wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten als „0“ definiert. Die weiteren Zeitwerte wurden durch Berechnung des Differenzbetrages zu diesem Wert ermittelt.

Die gemeinsame Zugabe von NAC und LPS zu THP-1 Zellen (n=9) führt bei den meisten Versuchen zu einem Anstieg der Phosphorylierung von STAT3 innerhalb des ersten Drittels der Zeit mit Maximum bei 25-35 Minuten. Danach erfolgt ein uneinheitlicher Verlauf bei den verschiedenen Experimenten (siehe Abb. 4.23 a). Bei der Mittelwertbestimmung der Densitometrie sieht man einen starken Anstieg der Phosphorylierung in den ersten 25 Minuten mit anschließendem Abfall der Aktivierung (siehe Abb. 4.23 b). Optisch lässt sich in den Blot Membranen ein ähnlicher Verlauf beobachten (siehe Abb. 4.23 c.). Die Signalstärke der LPS-stimulierten Zellen unter NAC-Gabe ist stärker ausgeprägt bei reiner LPS-Exposition. Ein hemmender Effekt von NAC auf die STAT3-Phosphorylierung nach LPS-Stimulation ist nicht zu erkennen. Die Phosphorylierung verläuft unter NAC-Behandlung jedoch langsamer und erreicht erst später den maximalen Wert.

a)



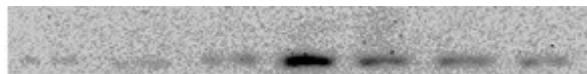
b)



c)

Stimulation in min                    0     5     15     25     35     45     60

pStat3



**Abb. 4.23 Relative Phosphorylierung von STAT3 in LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen**

Die Diagramme stellen die densitometrische Auswertung von Western Blots zur Kinetik der STAT3-Phosphorylierung in den ersten 60 Minuten nach LPS+NAC Stimulierung (n=9) dar. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. a) bildet alle Zeitverläufe und b) die Mittelwertanalyse mit Standardfehler der Versuche ab. c) zeigt einen repräsentativen Western Blot. a) Die Experimente zeigen einen Anstieg der Phosphorylierung im ersten Drittel der Zeit mit einem Maximum bei 25 Minuten und einem späteren Abfall der Phosphorylierung von STAT3.

Nach der Zugabe von LPS+NAC ist die Expression der beiden Splicingformen von STAT 3 $\alpha$ - und  $\beta$  deutlich nachweisbar. Die Signalstärke der  $\beta$ -Form übersteigt die  $\alpha$ -Form. Die Expression der  $\beta$ -Form verläuft konstant, die der  $\alpha$ -Form zeigt hingegen einen leicht absteigenden Verlauf über die Zeit.

Optisch lässt sich nur schwer die typische Doppelbande ausmachen. Die Signale der einzelnen Splicingformen liegen sehr nah beieinander und lassen sich dadurch schwer voneinander trennen (siehe Abb.4.24).

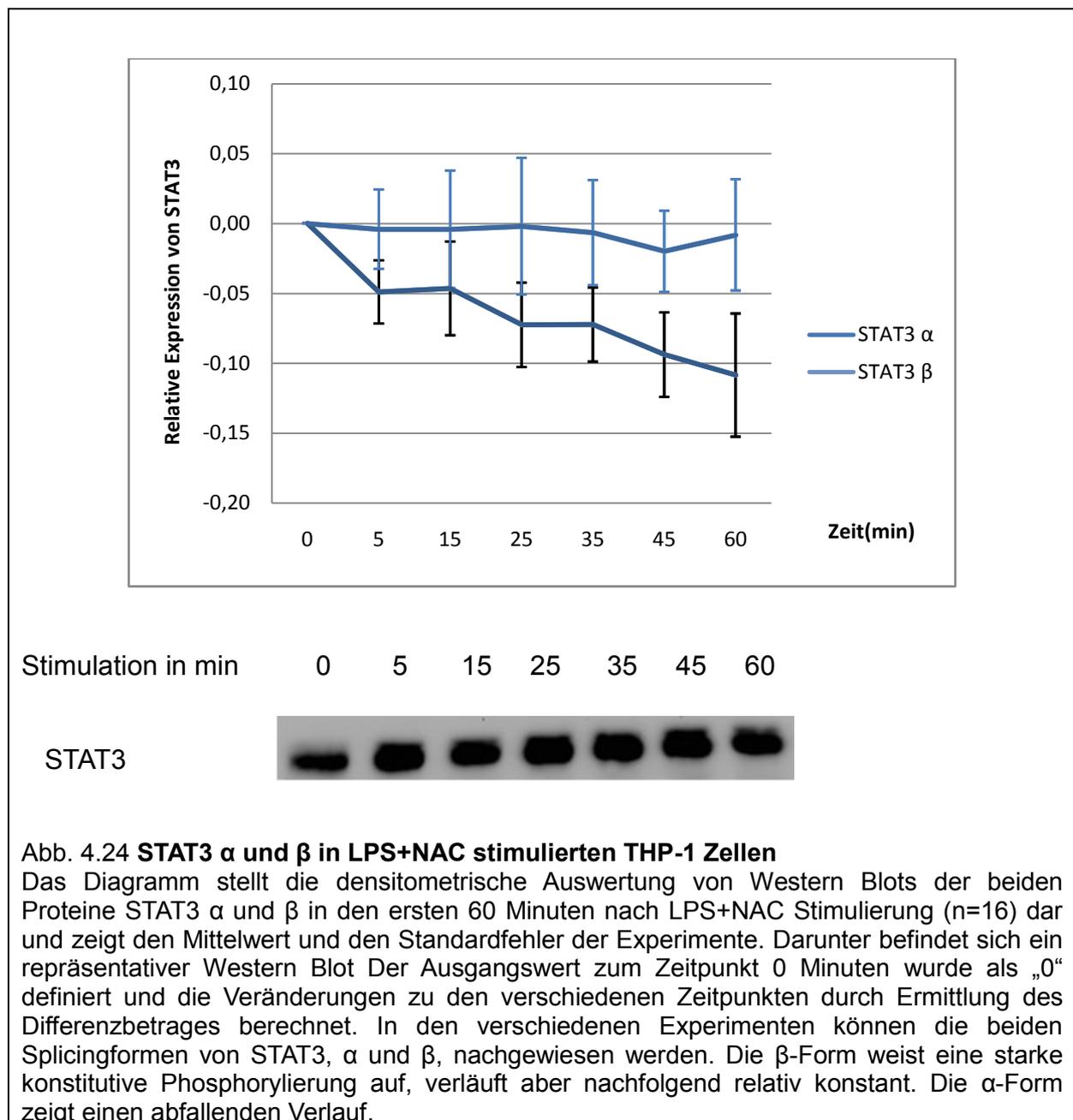


Abb. 4.24 **STAT3  $\alpha$  und  $\beta$  in LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen**

Das Diagramm stellt die densitometrische Auswertung von Western Blots der beiden Proteine STAT3  $\alpha$  und  $\beta$  in den ersten 60 Minuten nach LPS+NAC Stimulierung (n=16) dar und zeigt den Mittelwert und den Standardfehler der Experimente. Darunter befindet sich ein repräsentativer Western Blot. Der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde als „0“ definiert und die Veränderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten durch Ermittlung des Differenzbetrages berechnet. In den verschiedenen Experimenten können die beiden Splicingformen von STAT3,  $\alpha$  und  $\beta$ , nachgewiesen werden. Die  $\beta$ -Form weist eine starke konstitutive Phosphorylierung auf, verläuft aber nachfolgend relativ konstant. Die  $\alpha$ -Form zeigt einen abfallenden Verlauf.

#### 4.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Zugabe von LPS führt zu einem Anstieg der Phosphorylierung von STAT3 und zur Aktivierung der THP-1 Zellen.

Die Wirkung von NAC erzeugt einen kurzzeitigen Anstieg der Phosphorylierung von STAT3, die anschließend unter das Ausgangsniveau absinkt, was auf eine Hemmung schließen lässt. Die Signalstärke der Phosphorylierung von STAT3 nach alleiniger Gabe NAC-Zugabe liegt unter der nach LPS und LPS+NAC Zugabe.

Unter Behandlung mit NAC zeigt sich in LPS-stimulierten THP-1 Zellen ein langsamer Anstieg der Aktivierung von STAT3 in dem ersten Drittel der Zeit. Nach Abfall der Phosphorylierung bleibt diese über dem Ausgangsniveau.

In der Gegenüberstellung der Kinetik der Phosphorylierung von STAT3 in LPS und LPS+ NAC stimulierten THP-1 Zellen ist auffällig, dass die LPS-Stimulation zu einem steileren Anstieg und Abfall führt. Die LPS+NAC Exposition zeigt im Gegensatz dazu einem langsamen Anstieg und Abfall, ohne innerhalb der untersuchten Zeit wieder das Ausgangsniveau zu erreichen.

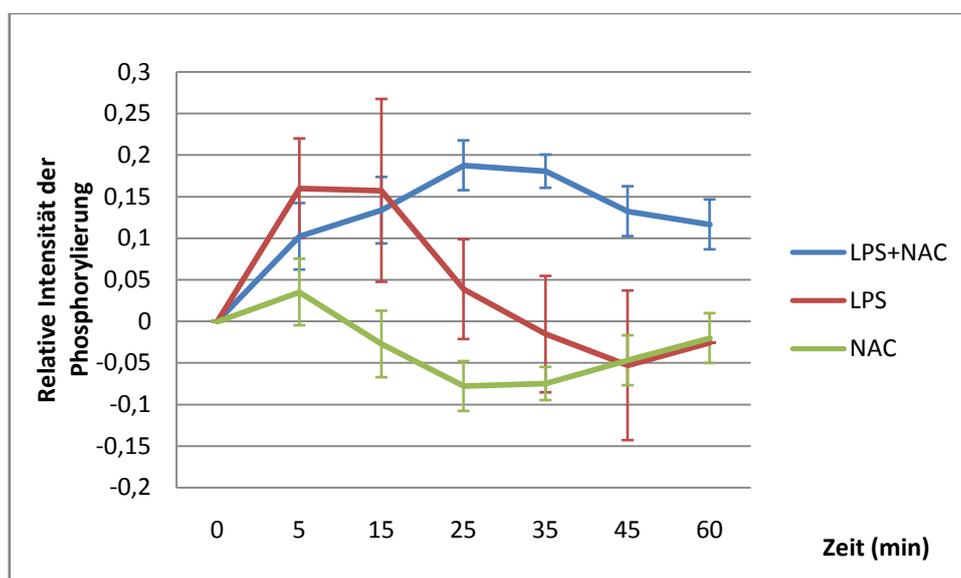


Abb.5.25 Vergleich der Kinetik der Phosphorylierung von STAT3 in LPS und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der zeitlichen Verläufe in der Kinetik der STAT3-Phosphorylierung in LPS, NAC und LPS+NAC stimulierten THP-1 Zellen. Der Verlauf von LPS gestaltet sich allgemein steiler in Anstieg und Abfall der Phosphorylierung als bei LPS+NAC, deren Aktivität eher langsamer verläuft. Die Signalstärke von LPS+NAC ist ausgeprägter als bei LPS. NAC zeigt einen Anstieg der Aktivität von STAT3, das Signal ist schwächer als bei LPS und LPS+NAC.

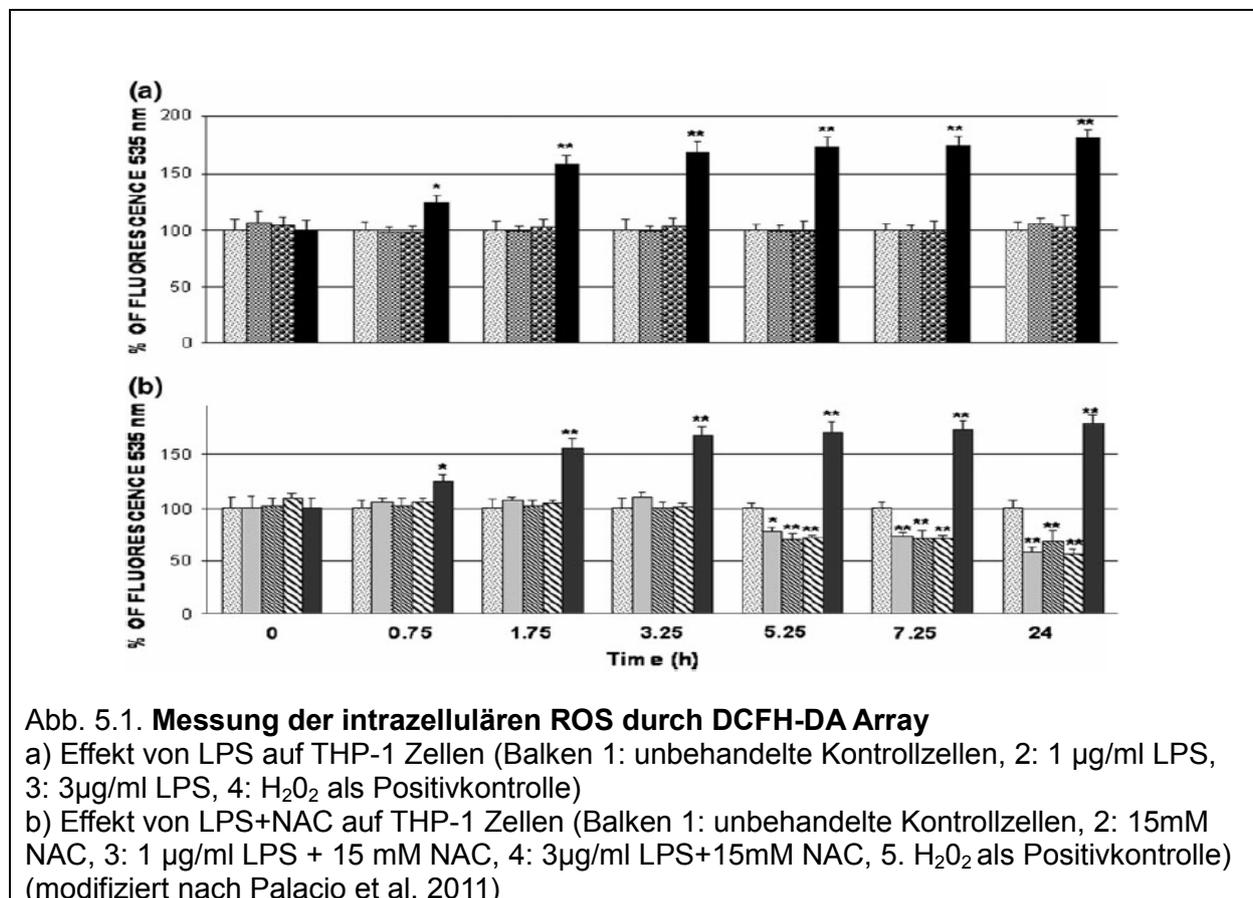
## 5 Diskussion

### 5.1. Zytokinsekretion und ROS/NOS-Produktion in LPS-stimulierten THP-1 Zellen unter NAC-Behandlung

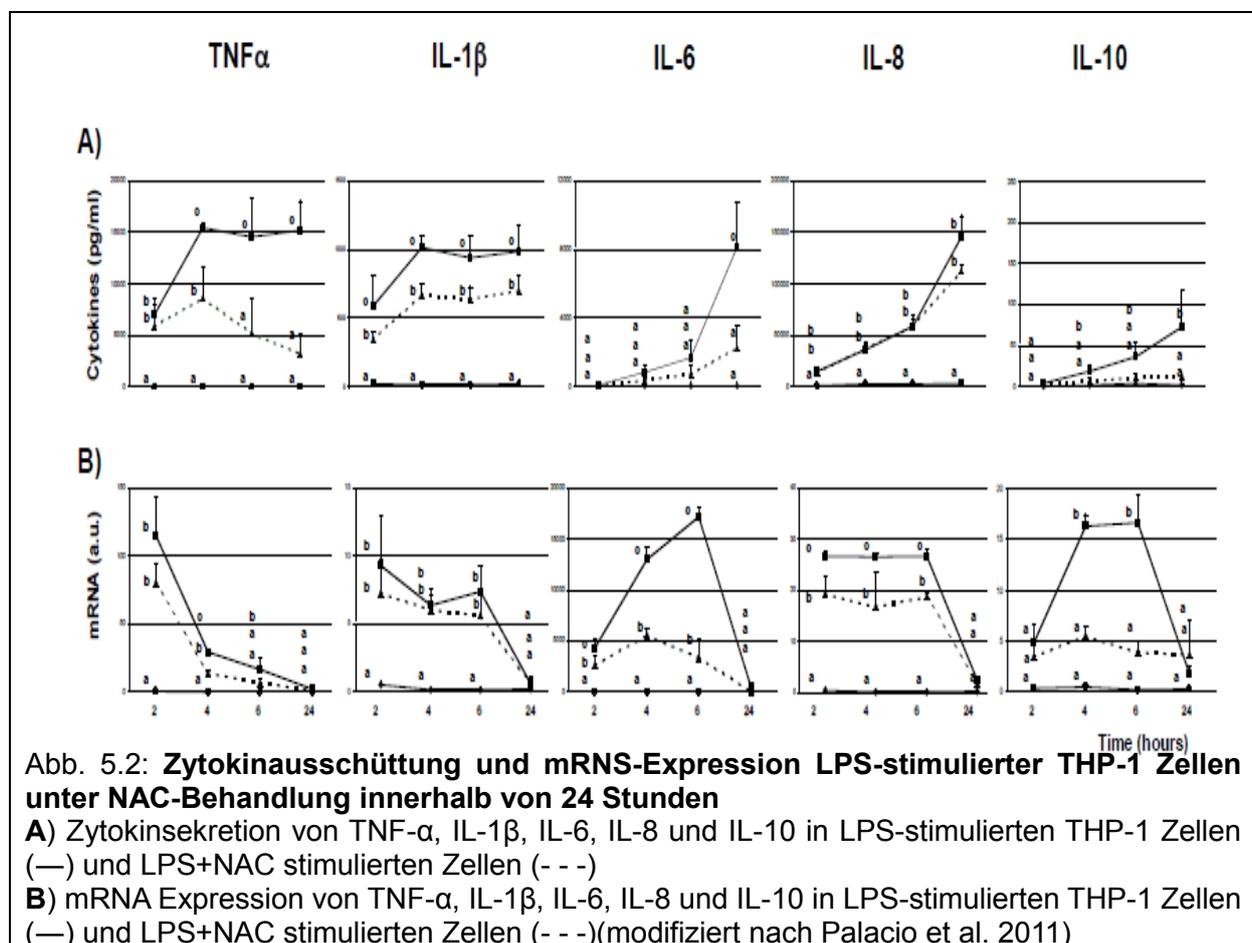
In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Palacio et al. der Autonomen Universität Barcelona wurde weiterführend die Wirkung von NAC auf entzündungsfördernde Signaltransduktionsweg in THP-1 Makrophagen untersucht.

Palacio et al. zeigten einen anti-entzündlichen Effekt von NAC auf die Expression und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und IL-10 sowie auf die ROS und NOS-Produktion in LPS-stimulierten THP-1 Zellen unter milden oxidativen Bedingungen (Palacio et al. 2011).

Im direkten Vergleich mit der Kontrolle zeigte die LPS-Stimulation keine Unterschiede bei den Nitraten, sowie bei iNOS und ROS Expression. Die NAC-Behandlung beeinflusste weder die Nitritkonzentration noch die iNOS Expression. Die intrazellulären basalen ROS-Werte konnten dagegen nach LPS oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition um 20-40% gesenkt werden (siehe Abb. 5.1).



Bei der Analyse des Zytokinprofils wurde deutlich, dass die Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und IL-10 unabhängig von der LPS-Konzentration verläuft. LPS induziert die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit Maximum nach 4-24 h, NAC hemmte signifikant die Sekretion. Die mRNA-Expression beider Zytokine beschrieb nach LPS-Exposition einen Peak bei 2 Stunden, der unter NAC-Behandlung leicht, aber nicht signifikant fiel. Die IL-6 Sekretion verlief abhängig von der LPS-Konzentration, eine höhere Konzentration beschleunigte diese. Die mRNA Expression von IL-6 zeigte die höchste Ausprägung nach LPS-Induktion bei 6 Stunden. Diese konnte durch Behandlung mit NAC signifikant vermindert werden. Der Peak der IL-8 Ausschüttung nach LPS-Stimulation bei 24 h konnte mit Hilfe von NAC gesenkt werden. Die mRNA-Expression zeigte die höchste Ausprägung bereits bei 2 Stunden, welche nach NAC-Gabe ebenfalls signifikant niedriger ausfiel. LPS induziert konzentrationsabhängig den Anstieg der Ausschüttung von IL-10 mit dem Maximum bei 24 Stunden. Nach Behandlung mit NAC konnte keine Sekretion von IL-10 nachgewiesen werden. Der Peak bei 4-6 h in der mRNA Expression war nach NAC Behandlung nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 5.2).



## 5.2 Interpretation und Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Signaltransduktion während einer LPS-Stimulation in THP-1 Zellen

Zu den Zielen dieser Arbeit gehört die Untersuchung des Einflusses von LPS auf entzündungs-assoziierte Signalwege und auf den Transkriptionsfaktor NFκB in THP-1 Makrophagen.

Die LPS-Stimulation führt zur Aktivierung aller untersuchten Signalwege und des Transkriptionsfaktors NFκB. Die Phosphorylierung der NFκB-Untereinheit p65 erfolgt innerhalb der ersten 25 Minuten und die Aktivität fällt anschließend rapide ab. Ryan et al. zeigte in einer Studie eine Induktion der NFκB-Translokation bei THP-1 Zellen 15 Minuten nach LPS-Exposition. Totales NFκB stieg dabei im Zellkern kontinuierlich bis zu einem Zeitpunkt von 60 Minuten an (Ryan et al. 2004). NFκB als redox-sensitiver Transkriptionsfaktor kann durch oxidativen Stress, insbesondere durch Peroxide und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert werden (Schreck et al. 1991, Kaul und Forman 1996). Das durch den Respiratorischen Burst entstandenes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert die Untereinheit p65, dessen Konzentration in der Zelle zunimmt (Koay et al. 2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert zudem die Phosphorylierung von p105, der Vorgängerstufe von p50 und fördert so die Überführung in die aktive Form. Die p65-Phosphorylierung wird im Gegensatz dazu direkt durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert (Ogura und Kitamura 1998, Kobayashi et al. 2001). Dadurch wird die Translokationsrate und die DNS-Bindung von NFκB im Zellkern erhöht (Kaul et al. 1998). Durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und die verstärkte Produktion weiterer Sauerstoff- und Stickstoffspezies wird der Entzündungsprozess eingeleitet.

Die Aktivierung der entzündungsfördernden Transkriptionsfaktoren wie NFκB geschieht über verschiedene Wege. Einer der Hauptwege ist die Erkennung eines Pathogens wie LPS durch den TLR-4. In unseren Versuchen wurde IRAK-1 als Teil des Rezeptors innerhalb kürzester Zeit nach LPS-Exposition aktiviert und erreicht das Maximum bei 25 Minuten. Verschiedene Studien berichten ebenfalls von der ansteigenden IRAK-1-Aktivität nach LPS-Gabe innerhalb der ersten 5-10 Minuten (Li et al. 2000, Medvedev et al. 2002, Asehnoune et al. 2004). Die Angaben des Abfalls der Phosphorylierung variieren zwischen 20 (Medvedev et al. 2002) und 60 Minuten (Li et al. 2000). Ob der Redoxstatus oder ob radikale Sauerstoff- und Stickstoffspezies einen Einfluss auf die Aktivität von IRAK-1 haben, wurde noch nicht eingehend untersucht.

Die ebenfalls zu den redox-sensitiven Signalmoleküle gehörenden Proteine ERK1/2 sind in dieser Hinsicht besser erforscht. Wie NFκB kann ERK1/2 ebenfalls durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert werden. Bereits geringe Konzentrationen reichen aus, um die Zusammensetzung der NADPH-Oxidase zu fördern und einen respiratorischen Burst zu generieren. Dieser steigert die Phosphorylierung von ERK (Guyton et al. 1996, Tournier et al. 1997) und leitet die Gentranskription ein. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass dies durch Aktivierung eines vorgeschalteten Aktivator geschieht, der den Signalweg der ERK-Aktivierung kreuzt (Iles und Forman 2002). In unseren Versuchen steigt nach LPS-Exposition die Phosphorylierung von ERK1/2 in den Versuchen rapide bis 15 Minuten an und fällt anschließend langsam ab. Verglichen mit den anderen Signalwegen zeigt ERK1/2 die stärkste Aktivierung. Neben ähnlichen Ergebnissen mit schneller Aktivierung (Feng et al. 1999, Guha et al. 2001) wurden auch Studien mit längeren Aktivierungszeiten von ERK1/2 veröffentlicht (Park et al. 2008, Kuriakose et al. 2013).

Der JAK/STAT-Weg ist hinsichtlich einer entzündungsfördernden Aktivität noch nicht hinreichend untersucht. Die LPS-Stimulation von THP-1 Zellen führt zur schnellen Aktivierung in den ersten 15 Minuten. Verglichen mit der Positivkontrolle kann man sagen, dass LPS bevorzugt die β-Form von STAT3 phosphoryliert. Andere Studien konnten ebenfalls eine Aktivierung von STAT3 durch LPS nachweisen (Park et al. 2008, Kuriakose et al. 2013). Weiterhin wurde berichtet, dass STAT3 die Expression der iNOS und der NO-Synthese in Raw 264.7 Zellen regulieren kann (Park et al. 2008). Die iNOS-Aktivität wird nicht nur durch STAT3 stimuliert. Es ist wahrscheinlich, dass mehrere Signalwege beteiligt sind, bspw. kann ERK1/2 die transkriptionale Aktivität von STAT3 beeinflussen (Wen et al. 1995). In Lymphozyten konnten Carbarello et al. bereits die verstärkte Tyrosinphosphorylierung von STAT3 und die Translokation in den Zellkern durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigen. Daraus kann geschlossen werden, dass STAT3 wahrscheinlich ebenfalls zu den redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren gehört (Carballo et al. 1999).

Verglichen mit der Vorarbeit von Palacio et al., die während einer LPS-Stimulation einen Anstieg der proinflammatorischen Zytokinausschüttung nachgewiesen haben (Palacio et al. 2011), ist es möglich zu sagen, dass vermutlich verschiedene Signaltransduktionswege in die Aktivierung der Gentranskription involviert sind. Die Aktivierung kann sowohl durch Erkennung des LPS am TLR-4, als auch durch

Stimulation der Signalwege durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die bei der Beseitigung des eingedrungenen Pathogens entstehen, erfolgen. Eine genaue Aussage kann nicht getroffen werden, da zwischen den einzelnen Signalwegen Quervernetzungen bestehen. So kann der TLR-4 NFκB direkt oder indirekt über den RAS/MEK/ERK-Weg aktiviert werden. Es existieren zudem auch Verbindung zwischen den RAS/MEK/ERK-Weg und dem JAK/STAT-Weg (Xuan et al. 2007).

### **5.2.2 Signaltransduktion während einer NAC-Stimulation in THP-1 Zellen**

In dieser Arbeit soll zudem die Wirkung einer alleinigen Gabe von NAC auf die inflammation-assoziierten Signalwege gezeigt werden.

Der Effekt von NAC gestaltet sich unterschiedlich auf die verschiedenen Wege. Während in den Experimenten mit dem Signalmolekül ERK1/2 keine Expression nachgewiesen werden können, zeigen die anderen Signalwege und der Transkriptionsfaktor NFκB eine Aktivität. Die Phosphorylierung von IRAK-1 und NFκB erreicht bei 25 Minuten die maximale Ausprägung und fällt anschließend auf Ausgangsniveau bzw. oberhalb von diesem ab. Im Gegensatz dazu bewirkt die NAC-Stimulation auf STAT3 einen schnellen Anstieg der Phosphorylierung innerhalb von 5 Minuten. Danach kommt es zu einem Abfall der Aktivität deutlich unterhalb des Grundniveaus, was für eine Hemmung sprechen könnte. Die Signalausprägung aller Experimente mit einer alleinigen NAC-Gabe ist deutlich geringer als bei den Messreihen mit LPS und LPS+NAC.

Diese Ergebnisse zeigen, dass NAC verschiedene Effekte auf die untersuchten Signalwege ausübt. Die alleinige Gabe von NAC hemmt tendenziell den JAK/STAT-Weg. Gleichzeitig aktiviert es IRAK-1 und den Transkriptionsfaktor NFκB und hat keinen nachweisbaren Einfluss auf den RAS/MEK/ERK-Weg in THP-1 Makrophagen. Palacio et al. konnten keine Auswirkung der alleinigen Gabe von NAC auf die Zytokinausschüttung und mRNA Expression in THP-1 Zellen feststellen (Palacio et al. 2011). In anderen Arbeiten konnte keine Wirkung von NAC ohne Gabe eines anderen Stimulus nachgewiesen werden (Abe et al. 1998, Sprong et al. 1998).

### **5.2.3 Signaltransduktion LPS-stimulierter THP-1 Zellen unter NAC-Behandlung**

Kernstück dieser Arbeit ist die Analyse der Veränderung der Signaltransduktion LPS-stimulierter THP-1 Makrophagen unter Behandlung mit NAC.

Die NFκB-Aktivierung in LPS-stimulierten THP-1 Zellen unter Gabe von NAC weist im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit LPS eine geringere Ausprägung auf. Der Kurvenlauf der Kinetik ist nahezu identisch, aber auf niedrigerem Niveau. Anhand dieser Ergebnisse kann man annehmen, dass NAC die Aktivierung der NFκB-Untereinheit p65 in LPS-stimulierten Makrophagen hemmt. Verschiedene Studien zeigen ebenfalls eine Hemmung der LPS-induzierten verstärkten NFκB-Aktivierung unter NAC Behandlung (Ryan et al. 2004). Im Anschluss kommt es zu einer gehemmten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und IL-10 sowie zu einem Anstieg des intrazellulären GSH-Spiegels und der Verbesserung des Redoxstatus der Zelle (Victor et al. 2003, Cui et al. 2009). NAC ist in der Lage, die TNF-α induzierte Aktivierung von IκKα und IκKβ, die Phosphorylierung (Asehnoune et al. 2004) und den Abbau von IκB sowie die Translokation von NFκB in den Zellkern und die DNA-Bindung zu hemmen (Sprong et al. 1998). Diese Vorgänge sind entscheidend für die Regulation der ROS, die Induktion von iNOS und die Ausschüttung entzündungsfördernde Zytokine. Parmentier et al. konnten zeigen, dass eine NAC-Behandlung in aktivierten Makrophagen zu einem Anstieg der NFκB p50 und p65 Biosynthese führt und darüber die IL-1β-Sekretion moduliert werden kann. Hohe Dosen NAC führten zu einer Steigerung der LPS-induzierten NFκB-Bindung und zu vermehrter IL-1 Sekretion in THP-1 Zellen, niedrige Dosen zu einer Senkung der Ausschüttung. Es wird angenommen, dass NAC die Signalkaskade zwischen TLR-4 und MyD88 stört und der Anstieg der IL-1-Sekretion durch einen autokrinen Schleifenmechanismus verstärkt wurde (Parmentier et al. 2000).

Der Einfluss von NAC auf die LPS-aktivierten Signalwege ist in unseren Untersuchungen unterschiedlich. Der Verlauf der Phosphorylierung von IRAK-1 unter NAC-Behandlung verglichen mit der Aktivierung durch LPS ist nahezu identisch, jedoch sind Unterschiede in der Signalstärke und konstitutive Phosphorylierung sichtbar. Die Stimulation nur mit LPS verfügt im Gegensatz zu der LPS+NAC Messreihe über eine konstitutive Phosphorylierung. Die Behandlung von NAC in LPS-stimulierten THP-1 Zellen führt zur Verstärkung der Aktivierung von IRAK-1.

Zum jetzigen Zeitpunkt wurde die Auswirkung von NAC auf die TLR-4-Aktivierung in LPS-stimulierten Makrophagen noch nicht eingehend untersucht. Asehnoune et al. führten ähnliche Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten durch. Hierbei konnte die in den ersten 15 Minuten stark angestiegene IRAK-1 Aktivität unter LPS-Stimulation nach NAC Gabe deutlich gehemmt werden. Es wird vermutet, dass

IRAK-1 ebenso zu den redox-sensitiven Signalmolekülen gehört und durch andere Signalwege wie den RAS/MEK/ERK-Weg beeinflusst werden kann (Asehnoune et al. 2004).

ERK1/2 als Signalmolekül des RAS/MEK/ERK-Wegs in LPS-stimulierten THP-1 Zellen unter NAC-Gabe wird gleich stark phosphoryliert. Jedoch wird die Aktivierung von ERK1/2 verzögert, das heißt, die maximale Ausprägung der Aktivierung wird später erreicht als unter alleiniger LPS-Stimulation. In der LPS+NAC Messreihe wurde eine konstitutive Phosphorylierung nachgewiesen, diese ist wahrscheinlich auf die später beschriebene Probeninkongruenz zwischen den Lieferungen aus Barcelona zurückzuführen (siehe Abb. 5.5). Eine Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung nach NAC Behandlung in LPS-stimulierten Immunzellen wurde in anderen Studien beobachtet (Bonner et al. 2001, Hsu und Wen 2002, Asehnoune et al. 2004). Hsu und Wen vermuten, dass NAC neben der Hemmung der LPS-induzierten Tyrosinphosphorylierung auch die ROS neutralisiert, die bei der Aktivierung von ERK 1/2 involviert sind (Hsu und Wen 2002).

Vergleicht man die Kurvenverläufe der Phosphorylierung von STAT3, fällt auf, dass durch die Gabe von NAC der unter LPS-Stimulation steile und schnelle Anstieg der Aktivierung verzögert wird. Erst im späteren Verlauf wird das Maximum erreicht. Die Signalstärke ist unter NAC-Behandlung stärker ausgeprägt als unter alleiniger LPS-Exposition. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass NAC die LPS-induzierte Aktivierung verstärkt. Die Wirkung von NAC auf STAT3-Phosphorylierung in Makrophagen war noch nicht Gegenstand der bisherigen Forschung. Die Phosphorylierung von STAT3, hervorgerufen durch verschiedene oxidativen Stress erzeugende Stimuli, konnte in renalen Tubulusepithelzellen (Huang et al. 2007), Lungenepithelzellen (Choi et al. 2012) und Lymphozyten (Bonnaure und Néron 2013) durch NAC blockiert werden. Xie et al. vermuten, dass die oxidative Modifizierung eines Cysteinrests an STAT3 durch S-Glutathionylation zur Abnahme der Tyrosinphosphorylierung und zu der Translokation in den Zellkern führt, so dass die Transkriptionsfunktion von STAT3 gehemmt wird (Xie et al. 2009).

Der verstärkende Effekt von NAC auf die Phosphorylierung der Signalmoleküle IRAK-1 und STAT3 nach LPS-Exposition wurde bereits in anderen Studien nachgewiesen. Zu hohe Dosen von NAC zeigten eine Verstärkung des oxidativen Stresses und der Toxizität von LPS. Dies geschieht aufgrund dessen, dass NAC in vitro die Reduktion von Fe (III)-Citrat zu den katalytisch aktiveren Fe<sup>2+</sup>-Ionen fördert

und so die Generation von  $\cdot\text{OH}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Fenton-Reaktion katalysiert (Sprong et al. 1998).

Zusammenfassend kann man sagen, dass NAC eine Hemmung der Gentranskription über NF $\kappa$ B bewirkt. Der genaue Mechanismus der Aktivierung über die verschiedenen anderen Signalwege ist aus den Ergebnissen nicht zu identifizieren. Wahrscheinlich geschieht die Regulation über den RAS/MEK/ERK-Weg oder eventuell durch das Zusammenspiel verschiedener Signalwege. Die Hemmung des Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B unter NAC-Einfluss in LPS-stimulierten Makrophagen unterstützt die Ergebnisse von Palacio et al. (Palacio et al. 2011), die eine Inhibierung der proinflammatorischen Zytokinausschüttung und von IL-10 sowie die ROS-Produktion feststellten.

LPS modifiziert nach Aktivierung der Makrophagen den intrazellulären Redoxstatus, dabei wird Glutathion verbraucht (Tomasi et al. 2013). NAC steigert den zellulären GSH-Spiegel (Song et al. 2004), jedoch nur in GSH-defizienten Zellen. Dieses Defizit kann neben Endotoxinexposition auch durch verschiedene Erkrankungen wie chronische obstruktive Lungenerkrankung (Bridgeman et al. 1994) und Ischämie (Ceconi et al. 1988) bedingt sein. Es existieren unterschiedliche Meinungen über den Einfluss von GSH auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B. Einige Untersuchungen zeigten, dass die Synthese von GSH für die NF $\kappa$ B-vermittelten Aktivierung durch LPS nicht erforderlich ist bzw. die Suppression der NF $\kappa$ B-Aktivierung nicht parallel zur Änderung des GSH-Status verläuft (Blackwell et al. 1996, NeuschwanderTetri et al. 1996). Das würde bedeuten, dass NAC unabhängig vom Redoxstatus der Zelle agiert oder nur durch geringfügige Veränderungen. Andere Studien wiederum assoziieren die NF $\kappa$ B-Regulierung mit dem GSH-Status (Israël et al. 1992). Während einer Ischämie-Reperfusion-Studie konnte beobachtet werden, dass die Translokation von NF $\kappa$ B parallel zur Verringerung der GSH- und GSSG-Erhöhung anstieg (Cargnoni et al. 2002). Víctor et al. untersuchte die Funktionsänderung LPS-aktivierter Makrophagen unter NAC-Gabe und konnte zeigen, dass NAC zur Verbesserung des Redoxstatus der Zelle führte. Dies geschah über das Auffüllen der verbrauchten GSH-Reserven und durch die Erhöhung des GSSG/GSH-Verhältnisses. Zusätzlich wurde die Produktion von ROS und TNF- $\alpha$  sowie die Induktion von iNOS gehemmt. Gleichzeitig wird die SOD und CAT-Aktivität gesteigert und die Zelle so vor der Lipidperoxidation geschützt (Victor et al. 2003). Zudem

bedingt oxidativer Stress eine Veränderung diverser Makrophagenfunktionen wie Adhärenz, Chemotaxis und Phagozytose (De la Fuente und Victor 2000). NAC reduziert die durch LPS erhöhte Adhärenz der Makrophagen. Dieser Effekt kann entweder direkt durch NAC bedingt sein oder indirekt durch Hemmung der TNF- $\alpha$  Synthese (Vojdani et al. 2000). Die LPS-induzierte Steigerung der Chemotaxis (Meydani et al. 1995, Victor et al. 2003b) wird durch NAC abgeschwächt. Dies wird durch den inhibierenden Effekt von NAC auf die TNF- $\alpha$  Synthese und den daraus resultierenden gesenkten Zytokinspiegel erklärt (Fidelus und Tsan 1987). Unter LPS-Exposition steigt die Phagozytose (Yu 1994, Meydani et al. 1995) und ROS-Produktion an, die NAC senken kann. Die Aktivität der iNOS und der NO-Ausschüttung wird sowohl durch entzündungsfördernde Zytokine als auch durch den Thiolstatus der Zelle reguliert (Vos et al. 1999). Niedrige Konzentrationen von NAC inhibieren die NO-Produktion durch direkten Einfluss auf die Signaltransduktion, vor allem durch Transkriptionsfaktoren (Lee et al. 2004). Im Gegensatz dazu führen höhere Konzentrationen zur Induktion von iNOS durch die Regulierung des GSSG/GSH-Status der Zelle (Chen et al. 2000).

Die NAC-Wirkung scheint abhängig von der LPS-Konzentration zu sein. NAC ist nur fähig die Zytokinausschüttung zu regulieren, die durch geringe Mengen LPS hervorgerufen wird. Auf höhere Konzentrationen hat es keine Wirkung (Cui et al. 2009). Es ist zudem fraglich, ob NAC den selben Effekt sowohl in vivo und als auch in vitro besitzt, da NAC in vivo schnell metabolisiert wird. Nach oraler Einnahme von 600 mg zeigte sich ein Peak nach 60 Minuten (4,6 mM) und nach 90 Minuten begann der Abfall der Konzentration (Tsikas et al. 1998). Die intravenöse Applikation dagegen wies höhere Konzentrationen auf und erreichte bereits nach 15 Minuten einen Peak sowie eine HWZ von 5,7h (Prescott et al. 1989). Verschiedene in vitro Studien unterstützen die These, dass NAC durch Regulation des zellulären Redoxstatus die redox-sensitiven Signalwege und Transkriptionsfaktoren beeinflusst. In vivo zeigten sich bisher in Hinblick auf die Hemmung einer Entzündung weniger explizite Daten (Sadowska et al. 2007). Beispielsweise zeigen in vitro Untersuchungen in Mono Mac 6 Zellen die Unterdrückung der NF $\kappa$ B-Aktivierung und TNF- $\alpha$  Synthese. Im Tiermodell wurde dagegen die TNF- $\alpha$  Serumaktivität durch NAC Behandlung nicht gesenkt (Sprong et al. 1998). Die Dosis spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Wirkung von NAC. In in vitro Studien waren hohe NAC-Dosen notwendig um die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu hemmen (MacNee et al.

1991, Sprong et al. 1998). Dabei werden zur Hemmung der Entzündungsreaktion höhere Dosen benötigt als für die alleinige Senkung des oxidativen Stresses.

Bei akuten entzündlichen Geschehnissen müssen im Vergleich zu chronischen Erkrankungen höhere Dosen appliziert werden um die gleiche Wirkung zu erzielen. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich die kumulative Wirkung von NAC, sodass geringere Konzentrationen über längere Zeit gegeben werden können (Sadowska et al. 2007).

Als geeignetste Applikationsform bei akuten Entzündungen hat sich die intraperitoneale oder intravenöse Gabe hoher Dosierungen herauskristallisiert. Dabei müssen zur Hemmung des respiratorischen Bursts 200-1000mg/kg intraperitoneal (Blackwell et al. 1996) oder 6g/Tag i.v. über mehrere Tage gegeben werden. Wird NAC im Gegenzug kontinuierlich in niedrigen Dosen (300mg/Tag) i.v. verabreicht, verschwindet der hemmende Effekt und die Entzündungsparameter steigen wieder an (Heller et al. 2001). Der Zeitpunkt der NAC-Gabe scheint unabhängig von der Wirkung zu sein, da sowohl die NAC-Gabe während des Entzündungsprozesses (Victor et al. 2003, Palacio et al. 2011) als auch die prophylaktische Gabe wirksam ist. Im Tierversuch schützte prophylaktisch appliziertes NAC die Tiere vor den hämodynamischen (Zhang et al. 1994) und letalen Effekten von LPS (Peristeris et al. 1992).

### **5.3. Bestimmung der Signaltransduktion durch das Western Blot-Verfahren**

#### **5.3.1 Anpassung der Methode**

Zur Bestimmung der Signalkaskaden in THP-1 Zellen wurden die in Barcelona vorbehandelten Lysate mittels Elektrophorese aufgetrennt und mit den Blot-Verfahren auf eine Membran übertragen. Diese wurde mit verschiedenen Antikörpern behandelt und im Anschluss mit Hilfe der Densitometrie die Ergebnisse ermittelt. Dabei stellte sich das im Labor für andere Zellen und Antigene etablierte Verfahren als nicht effektiv genug heraus und wurde an die Bedürfnisse der Aufgabenstellung angepasst. Zunächst wurde mit Hilfe anderer Doktoranden die Zusammensetzung der Gelrezeptur und des Probenpuffers umgestellt, um eine bessere Auftrennung der Proteine zu gewährleisten und die Laufzeit der Elektrophorese zu verbessern (siehe Abb. 5.3).

Gegenüberstellung der Gelrezepturen:

Sammelgel	alte Rezeptur	neue Rezeptur
AA/BAA 40%	0,25 ml	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	1,6 ml	2,33 ml
4x Upper Tris	6,25µl	-
Sammelgelpuffer	-	0,94 ml
SDS 20%	-	18,6 µl
APS 40%	60 µl	60 µl
TEMED	6 µl	6 µl

Trenngel	alte Rezeptur	neue Rezeptur
AA/BAA 40%	1,13 ml	2,5 ml
dH <sub>2</sub> O	1,62 ml	3,6 ml
4x Lower Tris	1,25 ml	-
Trenngelpuffer	-	1,43 ml
SDS 20%	-	37,5 µl
APS 40%	60 µl	60 µl
TEMED	6 µl	6 µl

Zusammensetzung der Puffer:

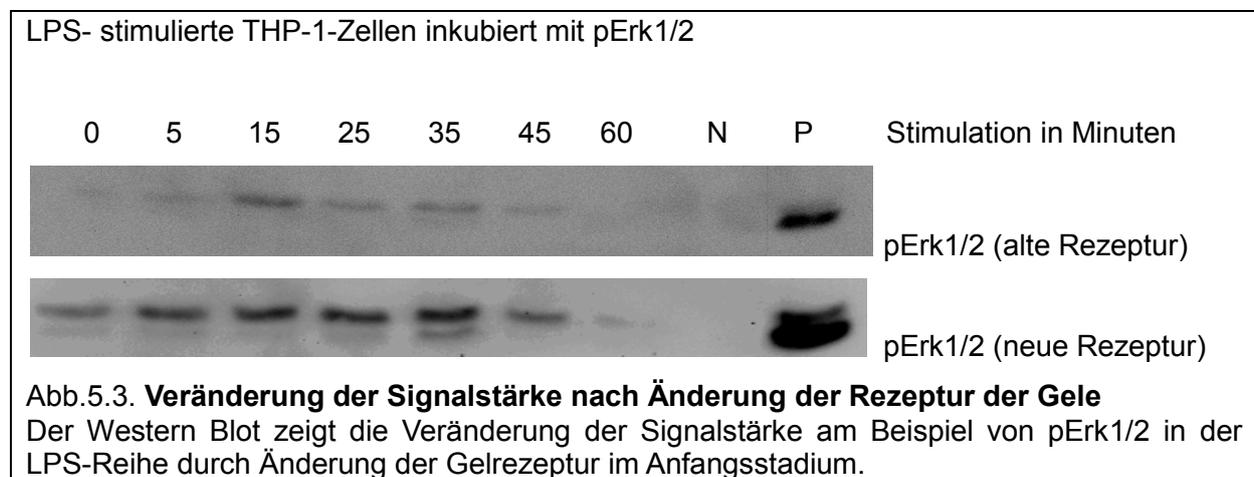
4x Lower Tris (200 ml Lösung)	Tris	1,5 M	36,3g
	SDS	0,40%	0,8g
	pH 8,8 mit 3 M HCl eingestellt		
4x Upper Tris (100 ml Lösung)	Tris	0,5 M	6,06g
	SDS	0,40%	0,4g
	pH 6,8 mit 3 M HCl eingestellt		
Glycerin 87% (50 ml Lösung)	Glycerin 98%		44,4 ml

Trenngelpuffer (1L Lösung)	Tris	1,26 M	152,6 g
	Tris HCl	0,24M	37,8 g
	pH 8,8 mit 3 M HCL eingestellt		
Sammelgelpuffer (1L Lösung)	Tris	0,5 M	15,3 g
pH 6,8 mit 3 M HCL eingestellt			
SDS 20g (100ml Lösung)	SDS	20%	20 g

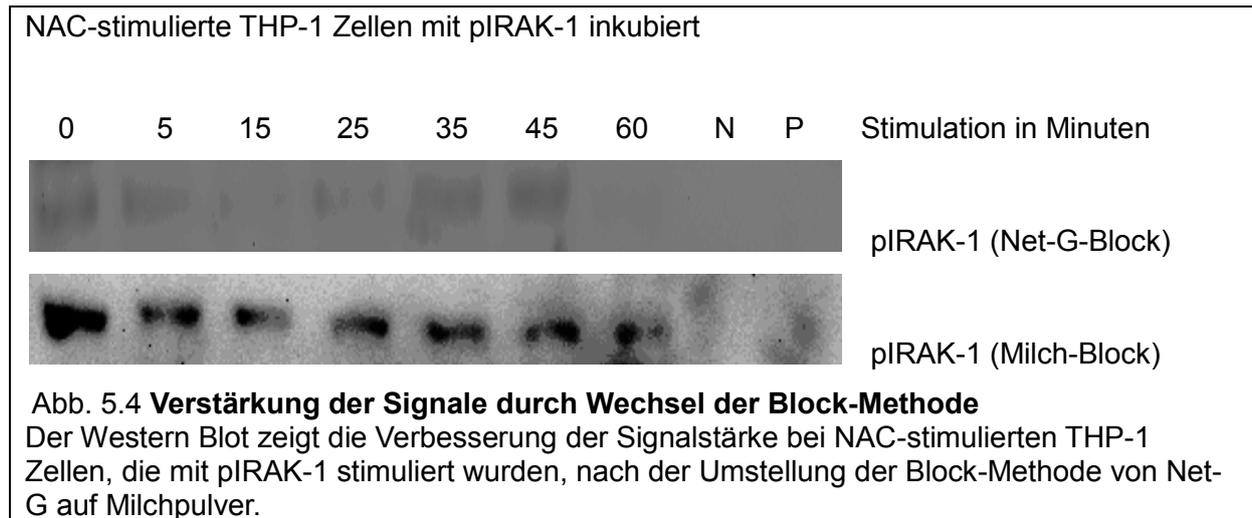
Die Umstellung des Probenpuffers:

5x SDS-Page Probenpuffer: 15 ml Lösung			
Tris	0,25 M		0,454 g
SDS	10%		1,5 g
DTT	0,5 M		1,16 g
Bromphenolblau	0,1 mg/ml		0,015 g
pH 6,8 mit 3 M HCl und 3 NaOH eingestellt			
Zugabe von Glycerin	10 % (v/v)		7,5 ml

Umgestellter Probenpuffer 10 ml Lösung			
Tris	0,5 M		0,61 g
Glycerin	30%		3 ml
SDS	10%		1 g
DTT	0,6 M		0,93 g
Brompheolblau	0,1 mg/ml		0,015g



Anschließend wurden die einzelnen Antikörper auf die Signalausprägung nach Lumineszenz-Behandlung detektiert. Dabei stellte sich heraus, dass bei dem Antikörper pIRAK-1 nach Wechsel der Blockier- und Waschsubstanz von Net-G auf Milchpulver und TBS/Tween deutlich bessere Signale detektiert werden konnten (siehe Abb. 5.4).



### 5.3.2 Diskussion und Fehleranalyse der Methode

Zur Bestimmung einer Aktivierung einzelner Signalwege und Transkriptionsfaktoren über die Phosphorylierung spezifischer Signalmoleküle der einzelnen Signaltransduktionswege mittels spezieller Antikörper eignet sich die Methode der SDS-Page und des Western Blots sehr gut.

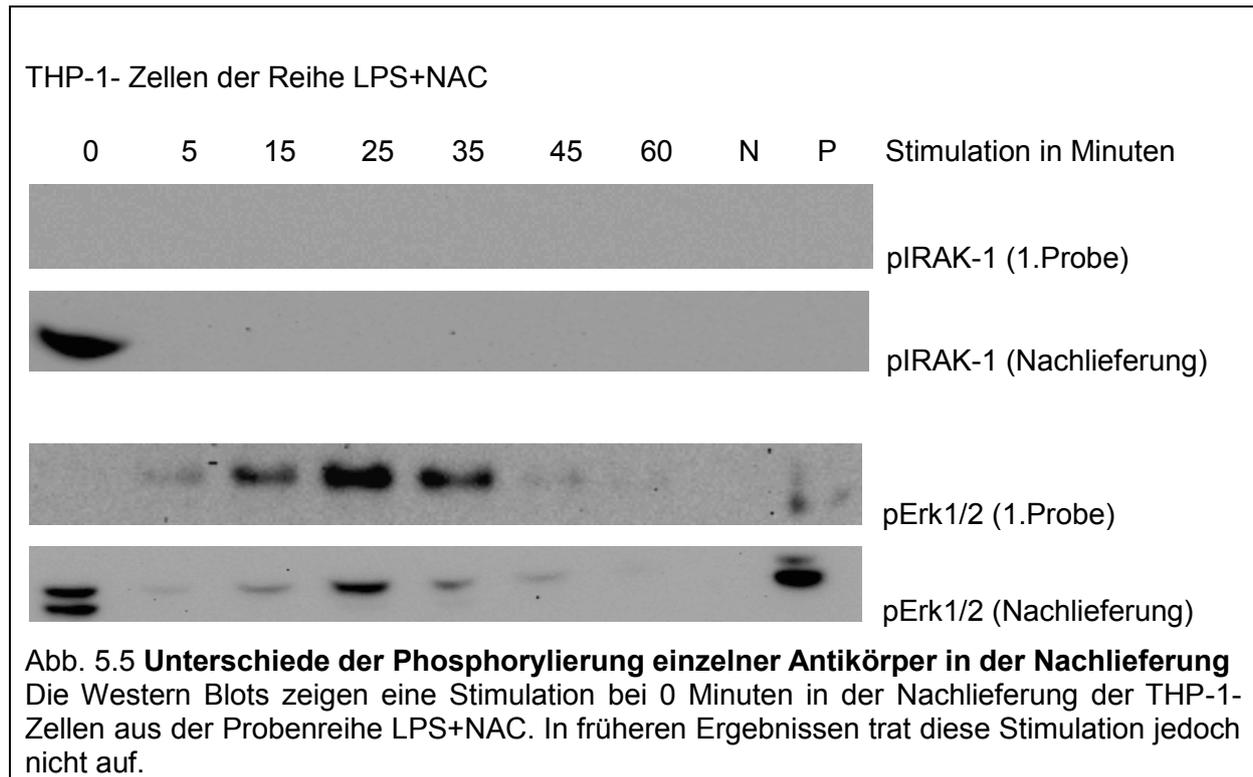
Eventuelle Unterschiede in den Ergebnissen können durch die unterschiedliche Behandlung der einzelnen Antikörper entstanden sein. Diese war jedoch notwendig um die Signaldetektion zu verbessern.

Hinsichtlich einer differenzierten Betrachtungsweise auf die Entwicklung der Phosphorylierung der Proteine IRAK-1 und NFκB könnte man neben den phosphorylierten auch die totale Expression der Proteine bestimmen.

Während der experimentellen Phase wurden die unstimulierten Lysate (0 Minuten) aufgebraucht. In Barcelona wurde daraufhin, nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll, neue Lysate hergestellt und ins Plazentalabor geschickt.

Nach einem Test der gelieferten Proben stellte sich heraus, dass diese, verglichen mit den alten Lysaten, über eine bereits bestehende Phosphorylierung verfügten (siehe Abb. 5.5).

Dieser Umstand ist eventuell darauf auf eine Autophosphorylierung der Makrophagen zurückzuführen, beispielweise am Ser 376 -Rest des p-IRAK-1 Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology Inc. 2010). Dadurch wurden vor allem bei der Untersuchung der Proben LPS+NAC Unterschiede in der Phosphorylierung sichtbar, im Gegensatz zu anderen Proben, was die Interpretation der Ergebnisse erschwerte.



## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

### 6. 1 Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation von Signaltransduktionswegen in Makrophagen der THP-1 Linie mit Hilfe von SDS-Page und Western Blot.

Hierbei wurde explizit der Einfluss von N-Acetylcystein auf entzündungs-assoziierte Signalkaskaden in LPS-stimulierten Makrophagen analysiert. Im Fokus stand insbesondere der TLR-4-Weg über IRAK-1, der RAS/MEK/Erk-Weg über ERK 1/2, der JAK/STAT-Weg über STAT3 und der Transkriptionsfaktor NFκB über den Zeitverlauf einer Stunde. Es wurde die alleinige Stimulation durch LPS und NAC sowie die Gabe von NAC nach LPS-Exposition untersucht.

Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit lässt folgende Schlüsse bezüglich der Signaltransduktionswege in THP-1 Zellen unter LPS und NAC-Stimulation zu:

- LPS führt zur Aktivierung aller untersuchten Signalmoleküle der einzelnen Signalkaskaden und des Transkriptionsfaktors NFκB in THP-1 Zellen
- NAC allein besitzt in THP-1 Zellen keine Wirkung auf ERK1/2, führt allerdings zur Aktivierung der Signalmoleküle IRAK-1 sowie STAT3 und des Transkriptionsfaktor NFκB. Die Phosphorylierung ist geringer ausgeprägt als unter LPS und LPS+NAC Stimulation.
- NAC zeigt in THP-1 Zellen eine hemmende Wirkung auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, welche die Ergebnisse von Palacio et al bestätigen. Die Auswirkung auf den RAS/MEK/Erk-Weg ist gering, aber es ist nicht auszuschließen, dass die hemmende Wirkung von NAC in LPS-stimulierten THP-1 Zellen über diesen Weg, bzw. über ein Zusammenspiel verschiedener Signaltransduktionswege initiiert wird. Im Gegensatz dazu steht die Phosphorylierung von STAT3 und IRAK-1, welche unter NAC-Behandlung verstärkt wird. Dies könnte ein Zeichen auf eine eventuell vorhandene Dosisabhängigkeit von NAC zur Aktivierung der Signalwege hindeuten und bedarf weiterer Forschung.

## 6. 2 Ausblick

Neben den zugelassenen Indikationen als Schleimlöser und Antidot bei Paracetamolintoxikation kann NAC durch Beeinflussung des intrazellulären Redoxsystems und durch Hemmung der NFκB-Aktivierung hilfreich bei der Behandlung entzündlicher Erkrankungen sein. Hier bedarf es noch einiger Forschungsarbeit.

Als Off-Label-Use findet NAC bereits Anwendung bei der Prophylaxe des akuten Nierenversagens bei Risikopatienten vor Kontrastmittelgabe, dieser Einsatz ist allerdings derzeit noch umstritten (Fishbane 2008).

Zudem wurden Untersuchungen zur Wirksamkeit von NAC nach Organtransplantationen, parasitären Infektionskrankheiten, ischämischen Hirnschäden und bei psychischen Erkrankungen durchgeführt. NAC konnte das frühe Outcome bei Nierentransplantationen mit verstorbenen Spendern durch Senkung des oxidativen Stresses deutlich verbessern (Danilovic et al. 2011). In Tierversuchen wurde NAC bereits als Mittel gegen Malaria eingesetzt. Dabei schützte NAC die Leberzellen vor überschüssigem freien Häm der zerstörten Erythrozyten (Seixas et al. 2009). Auch bei hypoxisch-ischämischen Hirnschäden bei Neugeborenen konnte NAC mittlerweile erfolgreich getestet werden (Jatana et al. 2006). In der Psychiatrie wird verstärkt geforscht, um die Wirkung von Acetylcystein auf den Glutaminstoffwechsel im Gehirn zu untersuchen. Es soll bei Erkrankungen wie Schizophrenie (Berk et al. 2008) und Bipolaren Störungen (Berk et al. 2008) eingesetzt werden.

Bei NAC handelt es sich um ein vielseitig einsetzbares Medikament, das richtig dosiert nebenwirkungsarm und gut verträglich ist. In der Forschung sollte verstärkt die Wirksamkeit bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, insbesondere in bei Sepsis, untersucht werden. NAC könnte das Potenzial haben, erfolgreich in der Behandlung entzündlicher Erkrankungen mitzuwirken.

Molekular-biologisch wäre die weiterführende Untersuchung der Signaltransduktionswege, hier insbesondere der Einfluss des Redoxstatus auf den TLR-4 und den JAK/STAT-Weg, von großem Interesse bei der Erforschung der Wirksamkeit von NAC.

## Literatur – und Quellenverzeichnis

- Abe T**, Yamamura K, Gotoh S, Kashimura M, Higashi K. 1998. Concentration-dependent differential effects of N-acetyl-L-cysteine on the expression of HSP70 and metallothionein genes induced by cadmium in human amniotic cells. *Biochim Biophys Acta -General Subjects*, 1380:123-32.
- Adams D**, Hamilton T. 1987. Molecular transductional mechanisms by which IFN-gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol Rev*, 97:5-27.
- Aderem A**, Ulevitch RJ. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406:782-7.
- Aderem A**, Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17:593-623.
- Akerboom TPM**, Bilzer M, Sies H. 1982. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused-rat-liver. *J Biol Chem*, 257:4248-52.
- Akiyama H**. 2000. Inflammation in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 10:707-8.
- Alderton WK**, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357:593-615.
- Angel P**, Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072:129-57.
- Aruoma OI**, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine - Its reaction with hydrogen-peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, 6:593-7.
- Asehnoune K**, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E. 2004. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol*, 172:2522-9.
- Atkuri KR**, Mantovani JJ, Herzenberg LA. 2007. N-Acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol*, 7:355-9.
- Babior BM**. 1999. NADPH oxidase: An update. *Blood*, 93:1464-76.
- Badaloo A**, Reid M, Forrester T, Heird WC, Jahoor F. 2002. Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition. *Am J Clin Nutr*, 76:646-52.
- Baggiolini M**, Dewald B, Moser B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*, 15:675-705.
- Baggiolini M**, Dewald B, Moser B. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*, 55:97-179.
- Baldrige CW**, Gerhard RW. 1933. The extra respiration of phagocytosis. *Am J*

Physiol, 103:235–6.

**Balligand JL**, Ungureanu-longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, Smith TW, Michel T. 1994. Cytokine-inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes-Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in-vitro. *J Biol Chem*, 269:27580-8.

**Beckman JS**, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol*, 271:C1424-C37.

**Berk M**, Copolov D, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Judd F, Katz F, Katz P, Ording-Jespersen S, Little J, Conus P, Cuenod M, Do KQ. 2008. Bush, A. I. N-acetyl cysteine as a glutathione precursor for schizophrenia--a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry*, 64:361-8.

**Berk M**, Copolov DL, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt, M. Bush AI. 2008. N-acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder--a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry*, 64:468-75.

**Bernhagen J**, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia. *Nature*, 365:756-9.

**Beutler B**, Milsark IW, Cerami AC. 1985. Passive-immunization against cachectin tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*, 229:869-71.

**Bevilacqua MP**, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA. 1986. Recombinant tumor-necrosis-factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium-characterization and comparison with the actions of interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:4533-7.

**Blackwell TS**, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW. 1996. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol*, 157:1630-7.

**Blanco RA**, Ziegler TR, Carlson BA, Cheng PY, Park Y, Cotsonis GA, Accardi CJ, Jones DP. 2007. Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasmas. *Am J Clin Nutr*, 86:1016-23.

**Blander J**, Medzhitov R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors. *Science*, 304:1014-8.

**Blough N**, Zafiriou O. 1985. Reaction of superoxide with nitric-oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous-solution. *Inorg. Chem.*, 24:3502-4.

**Bogdan C**. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2:907-16.

**Bogoyevitch M**, Court N. 2004. Counting on mitogen-activated protein kinases - ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal*, 16:1345-54.

**Bonnaure G**, Neron S. 2013. N-acetylcysteine modulation of JAK2 and JAK3 results in decreased STAT3 activation in human B lymphocytes. *J Immunol*, 190:174.20

- Bonner S**, Yan SR, Byers DM, Bortolussi R. 2001. Activation of extracellular signal-related protein kinases 1 and 2 of the mitogen-activated protein kinase family by lipopolysaccharide requires plasma in neutrophils from adults and newborns. *Infect Immun*, 69:3143-9.
- Bozza M**, Satoskar AR, Lin GS, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. 1999. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*, 189:341-6.
- Bradford M**. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-54.
- Bridgeman MM.**, Marsden M, Selby C, Morrison D, MacNee W. 1994. Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue. *Thorax*, 49:670-5.
- Brivanlou A**, Darnell J. 2002. Transcription - Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, 295:813-8.
- Calandra T**, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. 1994. Macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage-migration inhibitory factor. *J Exp Med*, 179:1895-902.
- Caldenhoven E**, vanDijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JAM, Lammers JWJ, Koenderman L, deGroot RP. 1996. STAT3 beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem*, 271:13221-7.
- Carballo M**, Conde M, El Bekay R, Martin-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirin J, Conde J, Bedoya FJ, Sobrino F. 1999. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J Biol Chem*, 274:17580-6.
- Cargnoni A**, Ceconi C, Gaia G, Agnoletti L, Ferrari R. 2002. Cellular thiols redox status: a switch for NF-kappaB activation during myocardial post-ischaemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 34:997-1005.
- Cassatella MA**, Meda L, Gasperini S, Dandrea A, Ma XJ, Trinchieri G. 1995. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *European J Immunol* 25:1-5.
- Ceconi C**, Curello S, Cargnoni A, Ferrari R, Albertini A, Visioli O. 1988. The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: effects of N-acetyl cysteine. *J Mol Cell Cardiol*, 20:5-13.
- Chen G**, Wang SH, Warner TD. 2000. Regulation of iNOS mRNA levels in endothelial cells by glutathione, a double-edged sword. *Free Radic Res*, 32:223-34.
- Chen ZJ**, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I-kappa-B-alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, 9:1586-97.

- Choi JS**, Lee HS, Seo KH, Na JO, Kim YH, Uh ST, Park CS, Oh MH, Lee SH, Kim YT. 2012. The effect of post-treatment N-acetylcysteine in LPS-induced acute lung injury of rats. *Tuberc Respir Dis*, 73:22-31.
- Chu CQ**, Field M, Feldmann M, Maini RN. 1991. Localization of tumor-necrosis-factor-alpha in synovial tissue and at the cartilage pannus junction in patiens with rheumatoid-arthritis. *Arthritis Rheum*, 34:1125-1132.
- Cui A**, Ye Q, Sarria R, Nakamura S, Guzman J, Costabel U. 2009. N-acetylcysteine inhibits TNF-alpha, sTNFR, and TGF-beta 1 release by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis in vitro. *Sarcoidosis Vasc Dif*, 26:147-54.
- Danilovic A**, Lucon AM, Srougi M, Shimizu MHM, Ianhez LE, Nahas WC, Seguro AC. 2011. Protective Effect of N-acetylcysteine on Early Outcomes of Deceased Renal Transplantation. *Transplant. Proc*, 43:1443-9.
- Darnell J**, Kerr I, Stark G. 1994. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in responce to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264:1415-21.
- De la Fuente M**, Victor VM. 2000. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Bio*, 78:49-54.
- Dean RT**, Fu SL, Stocker R, Davies MJ. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, 324:1-18.
- DeCoursey T**, Ligeti E. 2005. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci*, 62:2173-93.
- DeLeo FR**, Allen LAH, Apicella M, Nauseef WM. 1999. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol*, 163:6732-40.
- Desjardins M**. 1995. Biogenesis of phagolysosomes-The kiss and run hypothesis. *Trends Cell Biol*, 5:183-6.
- Dhainaut JF**, Shorr AF, Macias WL, Kollef MJ, Levi M, Reinhart K, Nelson DR. 2005. Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: Relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med*, 33:341-8.
- Downward J**, Graves JD, Warne PH, Rayter S, Cantrel DA. 1990. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 346:719-23.
- Dunkelberger J**, Song W. 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20:34-50.
- Estany S**, Palacio JR, Barnadas R, Sabes M, Iborra A, Martínez P. 2007. Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and alpha-tocopherol on endometrial cells in culture. *J Reprod Immunol*, 75:1-10.
- Fantuzzi G**, Zheng H, Faggioni R, Benigni F, Ghezzi P, Sipe JD, Shaw AR, Dinarello CA. 1996. Effect of endotoxin in IL-1 beta-deficient mice. *J Immunol*, 157:291-6.
- Fearon D**, Locksley R. 1996. Elements of immunity - The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272:50-4.

- Feng GJ**, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY. 1999. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol*, 163:6403-12.
- Fidelus RK**, Tsan MF. 1987. Glutathione and lymphocyte activation: a function of ageing and auto-immune disease. *Immunology*, 61:503-8.
- Finkel T**, Holbrook N. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408:239-47.
- Fishbane S**. 2008. N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3:281-7.
- Freedman AR**, Sharma RJ, Nabel GJ, Emerson SG, Griffin GE. 1992. Cellular-distribution of nuclear factor-kappa-B binding-activity in rat-liver. *Biochem J*, 287:645-9
- Fuentes ME**, Durham SK, Swerdel MR, Lewin AC, Barton DS, Megill JR, Bravo R, Lira SA. 1995. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol*, 155:5769-76.
- Fujiwara N**, Kobayashi K. 2005. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4:281-6.
- Gan H**, Newman G, Remold H. 1995. Plasminogen-activator inhibitor type-2 prevents programmed cell-death of human macrophages infected with Mycobacterium-Avium, Serovar-4. *J Immunol*, 155:1304-15.
- Gardner AM**, Vaillancourt RR, Lange-Carter CA, Johnson G L. 1994. MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell*, 5:193-201.
- Gassmann M**, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. 2009. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*, 30:1845-55.
- Geissmann F**. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327: 656-661.
- Geppert TD**, Whitehurst CE, Thompson P, Beutler, B. 1994. Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol Med*, 1:93-103.
- Gillissen A**, Jaworska M, Orth M, Coffiner M, Maes P, App EM, Cantin AM, Schultze-Werninghaus G. 1997. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Resp Med*, 91:159-68.
- Gordon S**, Martinez F. 2010. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*, 32:593-604.
- Guha M**, O'Connell M, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D,

Mackman N. 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*, 98:1429-39.

**Guschin D**, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR, Ihle JN, Kerr IM. 1995. A major role for the protein-tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal-transduction pathway in response to interleukin-6. *Embo Journal*, 14:1421-9.

**Gutteridge J**. 1995. Lipid-peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue-damage. *Clin Chem*, 41:1819-28.

**Guyton K**, Liu Y, Gorospe M, Xu QB, Holbrook NJ. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*, 271:4138-42.

**Haber F**, Weiss J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Ser. A*, 147:332-51.

**Halliwell B**, Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3. Auflage. New York: Oxford University Press.

**Hamid Q**, Springall D, Riverosmoreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak, JM. 1993. Induction of nitric-oxide synthase in asthma. *Lancet*, 342:1510-3.

**Hampton RY**, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CRH. 1991. Recognition and plasma-clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*, 352:342-4.

**Hausmann M**, Spottl T, Andus T, Rothe G, Falk W, Scholmerich J, Herfarth H, Rogler G. 2001. Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages. *Clin Exp Immunol*, 125:48-55.

**Hedges S**, Svensson M, Agace W, Svanborg, C. 1995. Cytokines induce an epithelial cell cytokine response. *Adv Exp Med Biol*, 371A:189-93.

**Heimer R**. 1989. Proteoglycan profiles obtained by electrophoresis and triple immunoblotting. *Anal. Biochem*, 180:211-5.

**Heller AR**, Groth G, Heller SC, Breitzkreutz R, Nebe T, Quintel M, Koch T. 2001. N-acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. *Crit Care Med*, 29:272-6.

**Holme J**, Dahlin D, Nelson S, Dybing E. 1984. Cytotoxic effects of N-acetyl-para-benzoquinone imine, a common arylating intermediate of paracetamol and N-hydroxyparacetamol. *Biochem Pharm*, 33:401-6.

**Holtmann H**, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, Malinin NL, Cooper JA, Resch K, Kracht M. 1999. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol*, 19:6742-53.

- Hsu H**, Wen M. 2002. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J Biol Chem*, 277:22131-9.
- Huang J**, Chuang L, Guh J, Huang YJ, Hsu MS. 2007. Antioxidants attenuate high glucose-induced hypertrophic growth in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293:F1072-F82.
- Huang X**, Atwood C, Hartshorn M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI. 1999. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*, 38:7609-16.
- Hultqvist M**, Olofsson P, Holmberg J, Backstrom BT, Tordsson J, Holmdahl R. 2004. Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:12646-51.
- Hunot S**, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72:355-63.
- Iles K**, Forman H. 2002. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res*, 26:95-105.
- Irie T**, Muta T, Takeshige K. 2000. TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappa B in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Letters*, 467:160-4.
- Israël N**, Gougerot-Pocidallo MA, Aillet F, Virelizier JL. 1992. Redox status of cells influences constitutive or induced NF-kappa B translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocytic cell lines. *J Immunol*, 149:3386-93.
- Jakoby W**. 1978. Glutathione Transferases in detoxification. *Biol. Chem*, 359:1038-38.
- Janeway C**. 1992. The immune-system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 13:11-6.
- Jatana M**, Giri S, Ansari M, Elango C, Singh AK, Singh I, Khan, M. 2006. Inhibition of NF-kappa B activation by 5-lipoxygenase inhibitors protects brain against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neuroinflammation*, 3:12-25.
- Jones D**. 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species, Pt B, Thiol Enzymes and Proteins*, 348:93-112.
- Kalyanaraman B**, Karoui H, Singh R, Felix CC. 1996. Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols - A high resolution ESR spin-trapping study at Q-band (35 GHz). *Analytical Biochemistry*, 241:75-81.
- Kamada N**, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A,

- Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T. 2008. Unique CD14(+) intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Inv*, 118:2269-80.
- Kaplowitz N**, Fernandez Checa J, Kannan R, Garcia Ruiz C, Ookhtens M, Yi JR. 1996. GSH transporters: Molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol. Chem*, 377:267-73.
- Karin M**. 1999. How NF-kappa B is activated: the role of the I kappa B kinase (IKK) complex. *Free Radic. Biol. Med*, 18:6867-74.
- Kaul N**, Forman H. 1996. Activation of NF kappa B by the respiratory burst of macrophages. *Free Radic Biol Med*, 21:401-5.
- Kaul N**, Gopalakrishna R, Gundimeda U, Choi J, Forman HJ. 1998. Role of protein kinase C in basal and hydrogen peroxide-stimulated NF-kappa B activation in the murine macrophage J774A.1 cell line. *Arch Biochem Biophys*, 350:79-86.
- Klebanoff S**. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77:598-625.
- Kleinert H**, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodriguez-Pascual F, Geller DA, Forstermann U. 1998. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappa B-signaling pathways. *Br J Pharmacol*, 125:193-201.
- Koay M**, Christman J, Segal. B, Venkatakrisnan A, Blackwell TR, Holland SM, Blackwell TS. 2001. Impaired pulmonary NF-kappa B activation in response to lipopolysaccharide in NADPH oxidase-deficient mice. *Infect Immun*, 69:5991-6.
- Kobayashi T**, Tsunawaki S, Seguchi H. 2001. Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Rep*, 6:27-36.
- Kumar A**, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. 1996. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*, 183:949-58.
- Kuriakose S**, Muleme H, Onyilagha C, Okeke E, Uzonna JE. 2013. Diminazene aceturate (Berenil) modulates LPS induced pro-inflammatory cytokine production by inhibiting phosphorylation of MAPKs and STAT proteins. *Innate Immun*, 0: 1753425913507488v1-1753425913507488.
- Laemmli U**. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227:680-5.
- Lee JY**, Je JH, Jung KJ, Yu BP, Chung HY. 2004. Induction of endothelial iNOS by 4-hydroxyhexenal through NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med*, 37:539-48.
- Leonard W**, O'Shea J. 1998. Jaks and stats: biological implications. *Ann Rev Immunol*, 16:293-322.
- Levy D**, Darnell J. 2002. STATs:Transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3:651-62.

- Li L**, Cousart S, Hu J, McCall CE. 2000. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem*, 275:23340-5.
- Lichanska A**, Browne C, Henkel G, Murphy KM, Ostrowski MC, McKercher SR, Maki RA, Hume DA. 1999. Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: The role of transcription factor PU.1. *Blood*, 94:127-38.
- Lien E**, Means T, Heine H, Yoshimura, A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. 2000. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 105:497-504.
- Liu MK**, Herrera-Velit P, Brownsey RW, Reiner NE. 1994. CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 153:2642-52.
- Lottspeich F**, Engels JWH. 2006. *Bioanalytik*. 2. Auflage. München: Spektrum Akademischer Verlag.
- Luster AD**.1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-45.
- MacMicking J**, Xie Q, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol*, 15:323-50.
- MacNee W**, Bridgeman MM, Marsden M, Drost E, Lannan S, Selby C, Donaldson K. 1991. The effects of N-acetylcysteine and glutathione on smoke-induced changes in lung phagocytes and epithelial cells. *Am J Med*, 91:60S-6S.
- Malefyt R**, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Devries JE. 1991. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes - An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174:1209-20.
- Mantovani A**, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25:677-86.
- Matthews J**, Altman D, Campbell M, Royston P. 1990. Analysis of serial measurements in medical-research. *Br Med J*, 300:230-5.
- McCord J**, Fridovic I. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244:6049-55.
- Medvedev A**, Lentschat A, Wahl L, Golenbock DT, Vogel SN. 2002. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol*, 169:5209-16.
- Medzhitov R**, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen CQ, Ghosh S, Janeway CA. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, 2:253-8.
- Medzhitov R**, Preston Hurlburt P, Janeway CA. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388:394-7.

- Meister A**, Anderson M. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52:711-60.
- Metcalf D**. 1986. The molecular-biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*, 67:257-67.
- Meydani SN**, Wu D, Santos MS, Hayek MG. 1995 Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr*, 62:1462S-76S.
- Michalek SM**, Moore RN, McGhee JR, Rosenstreich DL, Mergenhagen SE. 1980. The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. *J Infect Dis*, 141:55-63.
- Moron M**, Depiere J, Mannervik B. 1979. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochim Biophys Acta*, 582:67-78.
- Muller W**, Weigl S, Deng X, Phillips DM. 1993. PEGAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *Faseb Journal*, 7:A640-A.
- Murakami Y**, Imamichi T, Nagasawa S. 1993. Characterization of C3A anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. *Immunology*, 79:633-8.
- Murphy KM**, Travers P, Walport M. 2009. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage . Frankfurt: Spektrum Akademischer Verlag.
- Muzio M**, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. 1998. The human Toll signaling pathway: Divergence of NF- $\kappa$ B and JNK/SAPK activation upstream of TRAF6. *J Exp Med*, 187:2097-101.
- Müller JM**, Ziegler-Heitbrock HW, Baeuerle PA. 1993. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology*, 187:233-56.
- Nathan C**, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD. 1989. Cytokine-induced respiratory burst of human-neutrophils-dependence on extracellular-matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol*, 109:1341-9.
- Nathan C**, Xie Q. 1994. Nitric-oxide synthases - Roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-8.
- Neuschwander Tetri B**, Bellezzo J, Britton R, Bacon BR, Fox ES. 1996. Thiol regulation of endotoxin-induced release of tumour necrosis factor alpha from isolated rat Kupffer cells. *Biochem J*, 320:1005-10.
- O'Connell M**, Bennett B, Mercurio F, Manning AM, Mackman N. 1998. Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells. *J Biol Chem*, 273:30410-4.
- Ogura M**, Kitamura M. 1998. Oxidant stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*, 161:3569-74.
- Okusawa S**, Gelfand J, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. 1988. Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits-Synergism with tumor necrosis factor and the

effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest*, 81:1162-72.

**Palacio JR**, Markert UR, Martínez P. 2011. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res*, 60:695-704.

**Palmer R**, Ashton D, Moncada S. 1988. Vascular endothelial-cells synthesize nitric-oxide from L-arginine. *Nature*, 333:664-6.

**Park S**, Baik Y, Cho J, Kim S, Lee KS, Han JS. 2008. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis by nicotine through S6K1-p42/44 MAPK pathway and STAT3 (Ser 727) phosphorylation in Raw 264.7 cells. *Cytokine*, 44:126-34.

**Parmentier M**, Hirani N, Rahman I, Donaldson K, MacNee W, Antonicelli F. 2000. Regulation of lipopolysaccharide-mediated interleukin-1 beta release by N-acetylcysteine in THP-1 cells. *Eur Respir J*, 16:933-9.

**Peristeris P**, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. 1992. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol*, 140:390-9.

**Petrache I**, Birukova A, Ramirez S, Garcia JGN, Verin AD. 2003. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am. J Respir Cell Mol*, 28:574-81.

**Pober J**, Sessa W. 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol*, 7:803-15.

**Prescott LF**, Illingworth R, Critchley J, Stewart MJ, Adam RD, Proudfoot AT. 1979. Intravenous N-acetylcysteine-Treatment of choice for paracetamol poisoning. *Brit Med J*, 2:1097-100.

**Prescott LF**, Donovan JW, Jarvie DR, Proudfoot AT. 1989. The disposition and kinetics of intravenous N-acetylcysteine in patients with paracetamol overdose. *Eur J Clin Pharmacol*, 37:501-6.

**Re F**, Jack L, Strominger Y. 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem*, 276:37692-9.

**Rehm H**, Letzel T. 2010. *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics*. 6. Auflage Frankfurt: Spektrum Akademischer Verlag.

**Richman P**, Meister A. 1975. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by non-allosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem*, 250:1422-6.

**Rietschel E**, Brade H. 1992. Bacterial-endotoxins. *SciAm*, 267:54-61.

**Rubbo H**, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. 1994. Nitric-oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid-peroxidation-formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269:26066-75.

**Ryan K**, Smith M, Sanders M, Ernst PB. 2004. Reactive oxygen and nitrogen

species differentially regulate toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun.* 72:2123-30.

**Sadowska A**, Manuel-Y-Keenoy B, De Backer W. 2007. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in vitro and in vivo dose-effects: A review. *Pulm Pharmacol Ther*, 20:9-22.

**Sakurai H**, Kohsaka H, Liu M, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N. 1995. Nitric-oxide production and inducible nitric-oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest*, 96:2357-63.

**Santa Cruz Biotechnology Inc.** 2010. p-IRAK-1 (Ser 376): sc-130197.[Katalog]

**Savill J.** 1997. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull*, 53:491-508.

**Schmidt H**, Nau H, Wittfoht W, Gerlach, J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, Bohme E. 1988. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric-oxide. *Eur. J. Pharmacol*, 154:213-6.

**Schmidt H**, Walter U. 1994. NO at work. *Cell*, 78:919-25.

**Schoonbroodt S**, Ferreira V, Best-Belpomme M, Boelaert JR, Legrand-Poels S, Korner M, Piette J. 2000. Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol*, 164:4292-300.

**Schreck R**, Rieber P, Baeuerle P. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messenger in the activation of the NF-kappa-B transcription factor and HIV-1. *Embo Journal*, 10:2247-58.

**Schumann R**, Leong S, Flaggs G, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding-proteine. *Science* 249:1429-31.

**Scott J**, McCormack D. 1999. Selective in vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. *J. Appl. Physiol*, 86:1739-44.

**Seixas E**, Gozzelino R, Chora A, Ferreira, A., Silva G, Larsen R, Rebelo S, Penido C, Smith NR., Coutinho A., Soares MP. 2009. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:15837-42.

**Sheffner A.** 1963. Biochemistry of mucus and related substances-Reduction in vitro in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 106:298- 310.

**Shimazu R**, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med*, 189:1777-82.

**Shuai K**, Horvath C, Huang L, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE. 1994. Interferon activation of the transcription factor STAT91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*, 76:821-8.

**Smilkstein M**, Knapp G, Kulig K, Rumack BH. 1988. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose-Analysis of the national multicenter study (1976 to1985). *New Engl J Med*, 319:1557-62.

**Smith CW**, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. 1989. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest*, 83:2008-17.

**Sommer K**, Guo B, Pomerantz J, Bandaranayake, AD, Moreno-Garcia ME, Ovechkina YL, Rawlings DJ. 2005. Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappa B activation. *Immunity*, 23:561-74.

**Song M**, Kellum J, Kaldas H Fink MP. 2004. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Pharm. Exp. The*, 308:307-16.

**Spooner C**, Markowitz N, Saravolatz L. 1992. The role of tumor-necrosis-factor in sepsis. *Clin Immunol Immunop*, 62:S11-S7.

**Sprong R**, Winkelhuyzen-Janssen A, Aarsman C, van Oirschot JFLM, van der Bruggen T, van Asbeck B. 1998. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:1283-93.

**Stahl PD**, Ezekowitz RA. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*, 1998; 10:50-5.

**Stuehr D**, Cho H, Kwon N, Weise MF, Nathan CF. 1991.Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric-oxide synthase - An FAD-containing and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:7773-7.

**Stuehr D**, Marletta M. 1985. Mammalian nitrate biosynthesis-Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherischia-Coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82:7738-42.

**Swanson J**, Baer S. 1995, Phagocytosis by zippers and triggers.*Trends Cel Biol*, 5:89-93.

**Sweet M**, Hume D. 1996.Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol*, 60:8-26.

**Takeda K**, Clausen B, Kaisho T Ts,ujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999, 10:39-49.

**Tateishi N**, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H, Sakamoto Y. 1977.Rat-liver glutathione-Possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr*, 107:51-60.

**Tayeh M**, Marletta M. 1989. Macrophage oxidation of L-Arginine to nitric-oxide, and nitrate-Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem*, 264:19654-8.

**Tomasi ML**, Ryoo M, Yang H, Iglesias Ara A, Ko KS, Lu SC. 2013. Molecular

mechanisms of lipopolysaccharide-mediated inhibition of glutathione synthesis in mice. *Free Radic Biol Med*, 68C:148-58.

**Tournier C**, Thomas G, Pierre J, Jacquemin C, Pierre M, Saunier B. 1997. Mediation by arachidonic acid metabolites of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stimulation of mitogen-activated protein kinases (extracellular-signal-regulated kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase). *Eur. J. Biochem*, 244:587-95.

**Towbin H**, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets-Procedure and some applications NS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:4350-4.

**Tracey K**, Beutler B, Lowry S, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, Zentella A, Albert JD, Shires GT, Cerami A. 1986. Shock and tissue-injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, 234:470-4.

**Trombetta E**, Mellman I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*, 23:975-1028.

**Tsikis D**, Sandmann J, Ikic M, Fauler J, Stichtenoth DO, Frölich JC. 1998. Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 708:55-60.

**Tsuchiya S**, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26:171-6.

**Ullrich R**, Scherrer-Crosbie M, Bloch K, Ichinose, F, Nakajima H, Picard MH, Zapol WM, Quezado ZMN. 2000. Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circ*, 102:1440-6.

**Valko M**, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160:1-40.

**van der Bruggen T**, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS. 1999. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun*, 67:3824-9.

**Victor V**, De la Fuente M. 2003. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. *Physiol Res*, 52:789-96.

**Victor V**, Rocha M, De la Fuente M. 2003. Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. *Int. Immunopharmacol*, 3:97-106.

**Victorov A**, Hoek J. 1995. Secretion of prostaglandins elicited by lipopolysaccharide and ethanol in cultured rat Kupffer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 215(2):691-7.

**Vojdani A**, Bazargan M, Vojdani E, Wright J. 2000. New evidence for antioxidant

properties of vitamin C. *Cancer Detect Prev*, 24:508-23.

**Vollmar A**, Zündorf I, Dingermann T. 2013. *Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe*. 2. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

**Vos TA**, Van Goor H, Tuyt L, De Jager-Krikken A, Leuvenink R, Kuipers F, Jansen, PL, Moshage H. 1999. Expression of inducible nitric oxide synthase in endotoxemic rat hepatocytes is dependent on the cellular glutathione status. *Hepatology* 29:421-6.

**Wen Z**, Zhong Z, Darnell JE. 1995. Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82:241-50.

**Wiseman H**, Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J*, 313:17-29.

**Wright S**, Ramos R, Tobias P, Ulevitch RJ, Mathison JC, Tobias PS. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding-protein. *Science*, 249:1431-3.

**Wu G**, Fang Y, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr*, 134:489-92.

**Wynn T**, Barron L. 2010. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis*, 30:245-57.

**Xia D**, Samols D. 1997. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:2575-80.

**Xie Y**, Kole S, Precht P, Pazin MJ, Bernier M. 2009. S-Glutathionylation Impairs Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation and Signaling. *Endocrinology*, 150:1122-31.

**Xuan Y**, Guo Y, Zhu Y, Wang OL, Rokosh G, Bolli R. 2007. Endothelial nitric oxide synthase plays an obligatory role in the late phase of ischemic preconditioning by activating the protein kinase C epsilon-p44/42 mitogen-activated protein kinase-pSer-signal transducers and activators of transcription1/3 pathway. *Circ*, 116:535-44.

**Yamaoka S**, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israel A. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the I kappa B kinase complex essential for NF-kappa B activation. *Cell*, 93:1231-40.

**Yim M**, Chae H, Rhee S, Chock PB, Stadtman ER. 1994. On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. *J. Biol. Chem.* 269:1621-6.

**Yoshida M**, Westlin W, Wang N, ngber DE, Rosenzweig A, Resnick N, Gimbrone MA. 1996. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol*, 133:445-55.

**Yu BP**. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74:139-62.

**Zafarullah M**, Li W, Sylvester J, Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*, 60:6-20.

**Zhang H**, Spapen H, Nguyen DN, Benlabeled M, Buurman WA, Vincent JL. 1994. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine in endotoxemia. *Am J Physiol*, 266:H1746-54.

**Zhong Z**, Wen Z, Darnell J. 1994. STAT3-A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to Epidermal Growth-Factor and Interleukin-6. *Science* 264:95-8.

### **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies  
aus Fang FC. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2, 820-832 (modifiziert).

Abb.1.2 Strukturformel N-Acetylcystein  
[http://www.arzneistoffe.net/images/Acetylcysteine\\_Structural\\_Formulae.png](http://www.arzneistoffe.net/images/Acetylcysteine_Structural_Formulae.png)

Abb.1.3 Signaltransduktionswege in Makrophagen  
aus Rosenberger CM, Finlay BB. 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 385-396 (modifiziert).

Abb.1.4 TLR-4 Signalweg  
aus Rosenberger CM, Finlay BB. 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 385-396. (modifiziert)

Abb.1.5 NFκB-Aktivierung  
aus Bhoj VG, Chen ZJ. 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458, 430-437 (modifiziert)

Abb.1.6 MAP-Kinase-Weg  
aus Rosenberger CM, Finlay BB. 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 385-396. (modifiziert)

Abb.1.7 JAK/STAT-Weg  
aus Levy DE, Darnell JE Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662 (modifiziert)

Abb. 3.1 THP-1 Zelle  
aus Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y et al. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26:171-6.

Abb.5.1 Ergebnisse ROS nach NAC-Gabe

aus Palacio JR, Markert UR, Martínez P. 2011. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res*,60:695–704 (modifiziert).

Abb.5.2. Zytokinausschüttung nach NAC-Gabe

aus Palacio JR, Markert UR, Martínez P. 2011. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res*, 60:695–704 (Abb. nicht veröffentlicht).

Bei allen nicht im Abbildungsverzeichnis aufgeführten Abbildungen handelt es sich um eigene Fotos oder Darstellungen.

## Anhang

### Verwendete Geräte und Materialien

Absorbanzspectrophotometer	
SpectroStar Omega	BMG-Labtech
Software „Omega Data Analysis 1.2.R3	
Blotkammer	Biometra
Fastblot B34	
Elektrophoresekammer	
Perfect Blue Doppelgelsystem Twin S	Peqlab Biotechnologie
SE 260 Serie Mighty Small 2	Hoefer
Folienschweißgerät Folio	Severin
Gel-Dokumentationssystem	
MF-ChemiBIS 3.2	Biostep
Auswertungssoftware „Gel Capture“	DNR Bio-Imaging Systems
Inkubator	
Heraeus H12	Heidolph
Laborabzug	Köttermann
Magnetrührer	Heidolph
MR 3001	
Mikrozentrifuge	Roth
Orbitalschüttler	Heidolph
Polymax 1040	
pH-Messgerät	Mettler Toledo
FE 20 Five Easy	
Pipetierhilfe	Sarstedt, Hirschmann
Pipetten	Eppendorf, Brand
Spannungsquellen	
Power Source	VWR
CibroBRL PS 305	Life Technology
Sterilwerkbank	HeraSafe, Thermo
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortexer	Scientific Industries, Inc.
Vortex-Genie 2	

Waage	Satorius Basic
	Kern
Wasserbad	Huber Medingen
Western-Blot-Quantifizierung	Nonlinear Dynamics
Totallab TL 10	

### Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße	Sarstedt
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	
Falcon-Tubes	Greiner
15 ml, 50 ml	
Membran Hybond-P	Amersham Pharmacia
Biotech	
Spezial-Vernichtungsbeutel	Nerbe Plus
Pipetten	Greiner
2 ml, 5 ml, 15 ml, 25 ml	
Zellkulturplatte	Greiner
6-well	

### Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Beta-Mercaptoethanol	Roth
Bis-/Acrylamid (AA/BAA)	Serva
Bromphenolblau	Roth
Chemilumineszenz Luminata Forte	Millipore Corporation
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	BDH Laboratory
Gelatine	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
HCL	Roth

Human-LIF	Immunotools
KCL	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Molekulargewichtsmarker	
Precision Plus Protein Standards	BIO-RAD
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermen
NaCl	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Merck
PBS	PAA Laboratories
NaOH	Roth
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roth, Serva
TEMED	Serva
TRIS Base	Roth
TRIS HCL	Sigma
Trypsin	PAA
Triton X 100	AppliChem
Tween 20	Sigma
Zelllysepuffer	Cell Signaling Technology
Zelltyp-spezifisches Medium (epidermal cell growth medium, DMEM, F12, RPMI)	Invitrogen, PAA
FCS	PAA

## Antikörper

### 1. Antikörper:

anti-p-STAT 3 (Y705) Rabbit-Ab	Cell Signaling Technology
anti-STAT 3 Rabbit-Ab	Cell Signaling Technology
anti-P-p44/42 MAPK (T202/Y204) (197G2 Rabbit mAb)	Cell Signaling Technology
anti-p-44/42 MAPK (ERK 1/2) Rabbit-Ab	Cell Signaling Technology
anti-NFκB p65 (A), sc-109	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit polyglonal IgG	
anti-p-IRAK-1 (Ser 376), sc-130197	Santa Cruz Biotechnology

Rabbit polygonal IgG

anti- $\beta$ -Aktin (13 E5) Rabbit mAb

Cell Signaling Technology

## 2. Antikörper:

Anti-Rabbit IgG; HRP-linked Antibody

Cell Signaling Technology

**Lösungen und Puffer**Alle Reagenzien wurden mit d H<sub>2</sub>O hergestellt.

SDS-Page: Lower Tris, Upper Tris, Glycerin 87%, AA/BAA

4x Lower Tris :	200 ml Lösung		
	Tris	1,5 M	36,3 g
	SDS	0,4 %	0,8 g
	pH 8,8 mit 3 M HCl eingestellt		

4x Upper Tris :	100 ml Lösung		
	Tris	0,5 M	6,06 g
	SDS	0,4 %	0,4 g
	pH 6,8 mit 3 M HCl eingestellt		

Glycerin 87%:	50 ml Lösung		
	Glycerin 98%		44,4 ml

Umstellung des Trenngelpuffers, Sammelgelpuffers, SDS, AA/BAA auf

Trenngelpuffer:	1l Lösung		
	Tris	1,26 M	152,6 g
	Tris HCl	0,24 M	37,8 g
	pH 8,8 mit 3 M HCL eingestellt		

Sammelgelpuffer:	1l Lösung		
	Tris	0,5 M	15,3 g

	pH 6,8 mit 3 M HCL eingestellt		
SDS 20g:	100 ml Lösung		
	SDS	20%	20 g
APS 40 %:	1 ml Lösung		
	Ammoniumperoxodisulfat	40%	0,4 g
5x SDS-Page Probenpuffer:	15 ml Lösung		
	Tris	0,25 M	0,454 g
	SDS	10 %	1,5 g
	DTT	0,5 M	1,16 g
	Bromphenolblau	0,1 mg/ml	0,015 g
	pH 6,8 mit 3 M HCl und 3 M NaOH eingestellt		
	Zugabe von Glycerin	10 % (v/v)	7,5 ml
Umstellung auf:			
Probenpuffer:	10 ml Lösung		
	Tris	0,5 M	0,61 g
	Glycerin	30 %	3 ml
	SDS	10%	1 g
	DTT	0,6 M	0,93 g
	Bromphenolblau	Spatelspitze	
10x Laufpuffer:	1l Lösung		
	Tris	0,25 M	30,3 g
	Glycin	2 M	150,1 g
	SDS	1%	10 g
	pH 8,3 mit 3 M HCl eingestellt		
1x Laufpuffer:	1l Lösung		
	Tris	0,025 M	3,02 g
	Glycin	0,2 M	15,01 g

	SDS	0,1 %	1 g
10x Tris/Glycin-Puffer :	1l Lösung		
	Tris	0,12 M	14,54g
	Glycin	0,96 M	72,07g
	pH 8,3 mit 3 M HCl eingestellt		
Blotting-Puffer :	1l Lösung		
	10x Tris/Glycin Buffer	100 ml	
	Methanol	200 ml	
10x Net-G:	1l Lösung		
	NaCl	1,5 M	87,66 g
	EDTA	0,05 M	14,61 g
	Tris	0,5 M	60,57 g
	Tris HCl	0,2 M	31,5 g
	pH 7,5 mit 3 M HCl einstellen		
	Gelantine	0,2 %	2 g
	Triton X	0,5 %	5 g
1x Net-G:	1l Lösung		
	NaCl	0,15 M	8,77 g
	EDTA	0,005 M	1,46 g
	Tris	0,05 M	6,06 g
	Tris HCl	0,02 M	3,15 g
	Gelantine	0,02 %	0,2 g
	Triton X	0,05 %	0,5 g
10x TBS-Tween:	1 l Lösung		
	Tris	0,25 M	30,29 g
	Tris HCl	0,25 M	39,4 g
	NaCl	1,4 M	81,82 g
	KCl	0,027 M	2 g
	Tween 20	1 %	10 ml

pH 7,6 mit 3 M HCl eingestellt

1x TBS-Tween:

1 l Lösung

Tris	0,025 M	3,03 g	
Tris HCl		0,025 M	3,94 g
NaCl		0,14 M	8,18 g
KCl		0,0027 M	0,2 g
Tween 20		0,1%	1 ml

Milch-Blockierung:

150 ml Lösung

10x TBS-Tween			15 ml
Milchpulver			7,5 g

Mild-Stripping-Puffer:

1l Lösung

Glycin		0,2 M	15 g
SDS		0,1 %	1 g
Tween 20		1 %	10 ml

pH 2,2 mit 3 M HCl eingestellt

Stripping-Puffer:

1l Lösung

Tris		0,625 M	7,5 g
SDS		2%	20 g
$\beta$ -Mercaptoethanol		0,1 M	7,8 ml

PBS:

1l Lösung

NaCl		0,137 M	8,01 g
KCl		0,0027 M	0,20 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0,01 M	1,78 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$		0,002 M	0,27 g

## Danksagung

Ich danke Professor Dr. Udo Markert für die Bereitstellung des Themas und die gute wissenschaftliche Betreuung sowie Professor José Ramon Palacio des Institutes für Biotechnologie und Biomedizin der Autonomen Universität Barcelona für die reibungslose Zusammenarbeit an diesem Projekt.

Für die gute Zusammenarbeit und die offene und kollegiale Atmosphäre bedanke ich mich beim gesamten Team des Placenta-Labors, insbesondere bei

- Sebastian für die vielen hilfreichen Tipps, Lösungen für kleine und große Probleme sowie die andauernde Motivation und Unterhaltung während des Schreibens
- Claudia für ihre Hilfe und Ratschläge bei allem Experimentellen, angefangen von Gelrezepturen, Puffern und Lösungen bis hin zur Zellkultur
- Anja und Tina für die Einführung in die Welt der SDS-Page und Western Blots

Außerdem danke ich Rebecca Els für ihre wachsamen Augen im Hinblick auf die Rechtschreibung und Grammatik in diesem Dokument.

Mein Dank gilt meiner Familie für die finanzielle und motivierende Unterstützung und meinen Freunden, die mich ab und zu erfolgreich vom Schreiben abgelenkt haben.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Professor Dr. Udo Markert, Dr. Sebastian Hölters und Claudia Göhner,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers