

Aus dem  
Institut für klinische Molekularbiologie  
(Direktorium: Prof. Dr. Stefan Schreiber,  
Prof. Dr. Andre Franke & Prof. Dr. Philip Rosenstiel)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Bedeutung der Oxidoreduktase  
Peroxiredoxin-4 im Rahmen der Lipopolysaccharid-  
induzierten Entzündungsreaktion**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von **Steffen Pfeuffer**  
aus **Braunschweig**

Kiel, August 2014

1. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel  
2. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Jobst Sievers  
Tag der mündlichen Prüfung : 25. November 2016  
Zum Druck genehmigt : 25. November 2016

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

---

Steffen Pfeuffer

## **Meinen Eltern**

<b>I</b>	<b>Inhalt</b>	<b>5</b>
I	Inhaltsverzeichnis	5
II	verwendete Abkürzungen	7
III	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	9
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1	Vorwort	11
1.2	<i>severe inflammatory response syndrom (SIRS)</i>	12
1.2.1	Epidemiologie	13
1.2.2	Die Frühphase des SIRS: „ <i>cytokine storm</i> “	13
1.2.3	Die Spätphase des SIRS: „ <i>immune paralysis</i> “	14
1.2.4	Aktuelle Therapieansätze	15
1.3	Das Inflammasom	16
1.3.1	Aufbau und Funktion des Inflammasoms	16
1.3.2	Regulatoren des NLRP3-Inflammasoms	18
1.4	Peroxiredoxin-4	19
1.4.1	Die Familie der Peroxiredoxine	19
1.4.2	Bedeutung von Prdx4 für die ER-basierte Proteinsynthese	21
1.4.3	Regulation der Entzündungsantwort	22
1.5	Ziele dieser Arbeit	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	<i>In vivo</i> -Untersuchungen der <i>Prdx4</i> <sup>-/-</sup> - und <i>Prdx4</i> <sup><math>\Delta</math>M<math>\Phi</math>/Y</sup> -Maus	24
2.1.1	Verwendete Versuchstiere	24
2.1.2	Induktion des Endotoxin-Schocks durch Gabe von LPS	26
2.2	Isolation von <i>bone marrow-dependent macrophages</i> (BMDM)	27
2.3	Auswertung von Expressionsmustern auf Nukleinsäureebene	28
2.3.1	Isolation von RNA aus Zellkulturen und Gewebeproben	28
2.3.2	Reverse Transkription	29
2.3.3	Transkriptlevelbestimmung mittels vollquantitativer <i>real-time</i> PCR	30
2.4	Auswertung von Signalantworten auf Proteinebene	32
2.4.1	Isolation von Proteinen aus Zellkulturen und Gewebeproben	32
2.4.2	Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting	34
2.5	Untersuchung von Plasma und Zellkulturüberstand via ELISA	36
2.6	Messung der Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies mittels Durchflusszytometrie	38
2.7	Untersuchung der Ko-Lokalisation von Proteinen mittels CLSM	39
2.8	Statistische Auswertung	40

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Phänotypisierung der <i>Prdx4</i> <sup>-Y</sup> und der <i>Prdx4</i> <sup>ΔMΦ/Y</sup> Maus	41
3.1.1	LPS-Endotoxin-Schock im konstitutiven Knockout-Modell	41
3.1.2	LPS-Endotoxin-Schock im konstitutiven Knockout-Modell unter Gabe von Anakinra	43
3.1.3	LPS-Endotoxin-Schock im konditionalen Knockout-Modell	46
3.2	Charakterisierung des Einflusses von Prdx4 auf murine Makrophagen	48
3.2.1	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB	49
3.2.2	Aktivierung der Caspase-1	50
3.2.3	Einfluss von Prdx4 auf die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren	51
3.2.4	Expression des NLRP3-Inflammasoms nach Stimulation mit Lipopolysaccharid	54
3.3	Charakterisierung der Regulation des Inflammasoms durch Peroxiredoxin-4	55
3.3.1	Hemmung der Caspase-1	55
3.3.2	Beeinflussung der Immunantwort durch exogene Zufuhr von Prdx4	57
3.3.3	Untersuchung des Einflusses reaktiver Sauerstoffspezies	59
3.4	Untersuchungen zur Lokalisation von Peroxiredoxin-4	61
3.4.1	Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose	61
3.4.2	Hemmung der Freisetzung von Prdx4 durch Hemmung des ER-Golgi-Transportes	64
3.4.3	Dynamische Regulation von Erp44 im Rahmen der Entzündungsantwort	65
3.4.4	Ko-Lokalisation von Caspase-1 und Peroxiredoxin-4	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1	Begründung der Wahl des LPS-Endotoxin-Modells und Limitationen	68
4.2	Prdx4 schützt vor einer überschießenden Immunreaktion nach LPS-Injektion <i>in vivo</i>	69
4.3	Prdx4 hemmt die LPS-abhängige Signalantwort in Makrophagen	70
4.4	Prdx4 moduliert das Inflammasom nicht über die Neutralisation von ROS	72
4.5	Sekretion und Phagozytose stellen Bedingungen für die Wirkung von Prdx4 dar	74
4.6	Ausblick	76
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
	<b>verwendete Materialien</b>	<b>90</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>93</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>94</b>

## II verwendete Abkürzungen

AOE372	<i>antioxidant-enzyme 372</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-spaltendes Enzym
BSA	bovines Serum-Albumin
CARD	<i>caspase-activating and recruitment domain</i>
Casp1	Caspase-1
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cre	<i>cyclic recombination enzyme</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif chemokine 1</i>
DCD	Monodansylcadaverin
DCF	Dichlorofluorescin (oxidiert)
DCHF	Dichlorofluorescin (reduziert)
DCFH-DA	Dichlorofluorescin-diacetat
DLB	<i>denaturing lysis buffer</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nucleotidtriphosphat
DSS	<i>dextrane sodium sulfate</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence reaction</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERO1	<i>endoplasmic oxidoreductin 1</i>
ERp44	<i>ER-protein of 44kDa</i>
F <sub>c</sub>	<i>fraction crystalizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung (Zentrifuge)
GAPDH	<i>glycerine-3-aldehyde dehydrogenase</i>
GBP5	<i>guanylate-binding protein 5</i>
HMGB1	<i>high mobility group box-1</i>
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-10	Interleukin-10
IL-18	Interleukin-18
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
NOS2	<i>inducible nitric oxide synthetase</i>
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LD <sub>50</sub>	mittlere Letalitätsdosis

LL-37	<i>antibacterial protein LL-37</i>
LoxP	<i>locus of X-over P1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MDP	Muramyl-dipeptid
miR-223	micro-RNA 223
MMP	Magermilchpulver
MSU	<i>monosodium urate</i>
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumvanadat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-κB	<i>nuclear factor (kappa-light-chain-enhancer) of activated B-cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRP	<i>NOD-like receptor containing a pyrin-domain</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>
<i>p</i>	p-Wert
P2X7	P2X-Purinorezeptor 7
PBS	<i>phosphate balanced solution</i>
PCR	<i>polymerase-chain reaction</i>
PDI	<i>protein-disulfide isomerase</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
Prdx4	Peroxiredoxin-4
Prdx5	Peroxiredoxin-5
Prdx6	Peroxiredoxin-6
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	<i>quantitative reverse-transcription PCR</i>
rh-PRDX4	<i>recombinant human Peroxiredoxin-4</i>
rmM-CSF	<i>recombinant murine macrophage colony stimulating factor</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel-electrophoresis</i>
SIRS	<i>severe inflammatory response syndrom</i>
SOD1	<i>superoxide-dismutase 1</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzellen-Supgruppe 1
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzellen-Supgruppe 2
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TXNIP	<i>thioredoxin-interacting protein</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TTBS	<i>tris balanced solution with Tween20</i>
WB	Western-Blotting

### III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### Abbildungen

1	Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere	25
2	Entwicklung des relativen Körpergewichts nach LPS-Injektion	42
3	Bestimmung der Plasmakonzentration inflammatorischer Zytokine	43
4	Entwicklung des relativen Körpergewichts nach LPS- und Anakinra-Injektion	45
5	Untersuchung des Milzgewichtes nach LPS- und Anakinra-Injektion	45
6	Bestimmung der Plasmakonzentration inflammatorischer Zytokine	46
7	Entwicklung des relativen Körpergewichts in <i>Prdx4</i> <sup>ΔMφ/Y</sup> -Mäusen	47
8	Untersuchung des Milzgewichtes nach LPS-Injektion in <i>Prdx4</i> <sup>ΔMφ/Y</sup> -Mäusen	48
9	Bestimmung der Plasmakonzentration inflammatorischer Zytokine in <i>Prdx4</i> <sup>ΔMφ/Y</sup> -Mäusen	48
10	WB-Untersuchung der NF-κB-Aktivierung in BMDM	49
11	WB-Untersuchung der Caspase-1-Aktivierung in BMDM	50
12	ELISA-Untersuchung der Zytokin-Freisetzung in BMDM nach LPS-Stimulation	51
13	ELISA-Untersuchung der Zytokin-Freisetzung in BMDM nach LPS- und ATP-Stimulation	53
14	Untersuchung der Genexpression von <i>Nlrp3</i> , <i>Asc</i> und <i>Casp1</i> in BMDM	54
15	WB-Untersuchung der NF-κB-Aktivierung nach YVAD-Behandlung in BMDM	56
16	ELISA-Untersuchung der Zytokin-Freisetzung in BMDM nach YVAD-Behandlung	57
17	WB-Untersuchung der Caspase-1-Aktivierung nach Behandlung mit rh-PRDX4	58
18	Untersuchung der Bildung von ROS in BMDM nach LPS-Stimulation mittels CDCFH-DA-Assay	59
19	ELISA-Untersuchung der Zytokin-Freisetzung in BMDM nach Behandlung mit NAC und rh-PRDX4	61
20	WB-Untersuchung der Resorption von rh-PRDX4 in BMDM nach Cadaverin-Behandlung	62
21	ELISA-Untersuchung der Aufnahme von rh-PRDX4 und der Freisetzung von IL-1β in BMDM	63
22	WB-Untersuchung der Prdx4-Freisetzung in BMDM nach Brefeldin-A-Behandlung	65
23	Untersuchung der Genexpression von <i>Erp44</i> in BMDM nach Stimulation mit LPS und ATP	66
24	Untersuchung der Ko-Lokalisation von rh-PRDX4 und Casp1 in BMDM	67

## Tabellen

1	Reaktionsansatz für die SYBR-Green-basierte <i>real-time</i> PCR	31
2	Reaktionsansatz für die TaqMan-basierte <i>real-time</i> PCR	32
3	Standardreihe für den LOWRY-Assay	33
4	Zusammensetzung des Trenngels	34
5	Zusammensetzung des Sammelgels	34
6	Aufbau des Western-Blotting-Sandwiches	35
7	Versuchsgruppen für die intraperitoneale LPS-Injektion	41
8	Versuchsgruppen für die intraperitoneale LPS-Injektion unter Anakinra-Therapie	44
9	Versuchsgruppen für die intraperitoneale LPS-Injektion im konditionalen Knockout	47
10	Übersicht über die verwandten Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung	67

## 1. Einleitung

### 1.1 Vorwort

Die Modifikation des Immunsystems zur Behandlung von Krankheitszuständen ist ein etabliertes therapeutisches Werkzeug, welches stetiger Weiterentwicklung unterliegt. Seitdem KENDALL, REICHSTEIN und HENCH 1950 für die Entdeckung des Cortisols den Nobelpreis für Medizin erhalten haben, wurden die Möglichkeiten der Immunsuppression oder -Modifikation stetig weiterentwickelt. Das in der heutigen Zeit vorliegende Verständnis der molekularbiologischen Grundlagen des Phänomens „Entzündung“ hat zu der Entwicklung von sogenannten „*targeted therapies*“ geführt. So stellt die selektive Neutralisierung des Zytokins TNF- $\alpha$  durch den Antikörper Adalimumab in der Behandlung zahlreicher entzündlicher Systemerkrankungen, wie zum Beispiel des Morbus CROHN, derzeit eine der effektivsten Behandlungsmöglichkeiten dar [1].

Diesen Erfolgen zum Trotz versagen diese Therapien bei den hochakuten und lebensbedrohlichen Verläufen einer Vielzahl unterschiedlichster Grunderkrankungen, die in der Intensivmedizin als *severe inflammatory response syndrom* (SIRS) bezeichnet werden [2]. Dies ist neben zahlreichen anderen ein Grund für die nach wie vor ausgesprochen hohe Mortalität intensivmedizinischer SIRS-Patienten und Anlass genug, neue Therapieoptionen zu ergründen.

In dieser Arbeit soll das murine Knockout-Modell für das Gen *Prdx4*, welches für das Protein Peroxiredoxin-4 codiert, charakterisiert werden. Diesem Protein konnte in einer Vorarbeit ein antientzündlicher Effekt nachgewiesen werden und von daher soll untersucht werden, welche Rolle es in Zuständen hoher systemischer Entzündungsaktivität spielt [3].

In dieser Einleitung wird zunächst das Krankheitsbild des SIRS cursorisch dargestellt, des Weiteren wird kurz der zelluläre Signalkomplex, der den Entzündungsbotenstoff Interleukin-1 $\beta$  produziert, erläutert: das Inflammasom. Diesem wird im Verlauf dieser Arbeit große Bedeutung zukommen. Abschließend wird der aktuelle Kenntnisstand bezüglich des Proteins Peroxiredoxin-4 zusammengefasst und die detaillierte Zielsetzung formuliert.

## 1.2 severe inflammatory response syndrom (SIRS)

Der Begriff des SIRS beschreibt prinzipiell einen Zustand, der durch einen fulminanten Verlauf einer Vielzahl, ätiologisch höchst inhomogener Erkrankungen induziert werden kann. Klinisch manifest werden hierbei die außerordentliche Störung der Homöostase des Patienten und die reaktive Aktivierung des Immunsystems. Ein SIRS kann einerseits durch physikalische Noxen ausgelöst werden, wie zum Beispiel ausgedehnte Verbrennungen solche sind; andererseits können auch generalisierte Infektionen, wie zum Beispiel eine Endokarditis oder exazerbierte Systemerkrankungen, wie die Colitis ulcerosa, Auslöser eines SIRS sein. Tritt ein SIRS auf und wird ein als kausal anzusehender Krankheitserreger nachgewiesen, ist im Allgemeinen der Begriff „Sepsis“ üblich. Diese Vielzahl möglicher Ursachen erklärt, warum ein SIRS mit einem breiten Spektrum von Symptomen einhergehen kann.

Das körpereigene Immunsystem führt allerdings regelhaft zu charakteristischen Symptomen, die zur Diagnosestellung eines SIRS herangezogen werden. Die Herzfrequenz eines Patienten ist häufig erhöht, wobei ein Grenzwert von 90 Schlägen pro Minute definiert wurde. Parallel dazu liegt häufig ein gesteigerter Atemantrieb vor, der sich in einer Atemfrequenz von mehr als 20 Zügen pro Minute oder einer durch Hyperventilation bedingten Hypokapnie äußert. Die Körpertemperatur wird durch die systemische Entzündungsreaktion auf Werte von (deutlich) über 38,0°C gesteigert, paradoxerweise können auch hypotherme Zustände mit Werten von unter 36,5°C vorkommen. Ein weiterer, vielbeachteter Parameter ist die Leukozytenzahl im peripheren Blut. Hier können meist Leukozytosen mit Werten von über 12.000 Zellen pro Kubikmillimeter gesehen werden, allerdings kann es auch zu Leukopenien mit unter 4000 Zellen pro Kubikmillimeter kommen. Gemäß der ACCP/SCCM-Konsensus-Kriterien müssen zwei dieser vier Kriterien erfüllt sein, um die Diagnose SIRS stellen zu dürfen.

Treten zusätzlich Zeichen manifester Organdysfunktionen auf, wie zum Beispiel Kreislauf- oder Niereninsuffizienz (in Form einer Oligurie), wird von einer „schweren Sepsis“ gesprochen. Lässt sich eine aufgetretene Kreislaufinsuffizienz nicht durch adäquate Intensivtherapie beheben und besteht weiterhin eine Hypotonie mit Hypoperfusion der Organe, wird von einem „septischen Schock“ gesprochen [4].

### 1.2.1 Epidemiologie

Bezüglich der Inzidenz und Mortalität des SIRS beziehungsweise der Sepsis sind auf nationaler und internationaler Ebene zahlreiche Studien durchgeführt worden.

So sind für die Inzidenz einer Sepsis innerhalb der ersten 24 Stunden eines Aufenthaltes auf der Intensivstation Werte von 51 bis 300 Fällen pro 100.000 Einwohnern und Jahr ermittelt worden [5, 6]. ENGEL und Kollegen prognostizieren 2007 aufgrund einer deutschlandweit durchgeführten Studie, die 3.877 Patienten einschloss, eine Inzidenz von 76 bis 110 Fällen pro 100.000 Einwohnern und Jahr; die Mortalität lag in dieser Studie bei 55,2% [7]. Andere Studien kommen in Bezug auf die Mortalität auf Werte von 38 bis 59% [8, 9]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass – laut den Ergebnissen der meisten Studien – mehr als die Hälfte der Patienten an einer Sepsis/einem SIRS versterben.

### 1.2.2 Die Frühphase des SIRS: „cytokine storm“

Ein etabliertes Modell, auf dessen Grundlage zahlreiche Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Sepsis gewonnen wurden, ist die Applikation des in gramnegativen Bakterien vorkommenden Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS). Systemisch appliziert, vermag es die Plasmakonzentrationen zahlreicher proinflammatorischer Zytokine, insbesondere der Proteine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), erheblich zu steigern. Vermittelt wird dieser Effekt durch den *toll like*-Rezeptor 4 (TLR4), der vornehmlich auf der Oberfläche monozytärer Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Zirkulierendes LPS wird an das in der Leber synthetisierte LPS-binding protein (LBP) gebunden und dieser Komplex tritt wiederum unter Zuhilfenahme weiterer Proteine mit dem TLR-4 in Wechselwirkung [10].

Die Injektion von Lipopolysaccharid erzeugt bei gesunden Patienten eine Konstellation proinflammatorischer Zytokine im Plasma, die dem von SIRS-Patienten weitgehend gleicht [11]. Darüber hinaus kann die Injektion dieser gemessenen Zytokine, insbesondere der oben bereits genannten Substanzen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  klassische Symptome des SIRS, wie zum Beispiel Hypotension, Fieber oder Tachykardie, auslösen [12].

Diese Annahmen führten zu der Hoffnung, dass die Neutralisation entweder des Lipopolysaccharids, oder aber der freigesetzten Entzündungsmediatoren zu einer deutlichen Besserung des klinischen Zustandes führen würden. Die daraufhin durchgeführten klinischen Studien konnten allerdings in der größten Zahl der Fälle keine Besserung dokumentieren [13].

Die grundlegende Berechtigung dieser Therapieversuche wurde daraufhin nicht gänzlich in Frage gestellt, jedoch änderte sich das Verständnis des SIRS dahingehend, dass nicht bloß eine gesteigerte Aktivität des angeborenen Immunsystems vorliegt, sondern dass die massive Freisetzung von Zytokinen („*cytokine storm*“) lediglich eine Frühphase des SIRS darstellt, die in der klinischen Situation verpasst wird. Darüber hinaus setzte sich auch die Erkenntnis durch, dass nicht ein einzelner Entzündungsmediator für die Gesamtheit der Symptome verantwortlich sein kann [14].

### 1.2.3 Die Spätphase des SIRS: „*immune paralysis*“

Die in klinischen Studien gemachte Beobachtung, dass der Großteil der an einem SIRS oder einer Sepsis erkrankten Patienten nicht in der Frühphase dieser Erkrankung, in der typischerweise die stark erhöhten Plasmaspiegel der oben genannten Zytokine nachgewiesen werden können, versterben, führte zu der Abgrenzung eines Spätstadiums des SIRS. Tatsächlich treten die letztendlich tödlichen Verläufe gehäuft in einer Spätphase der Erkrankung auf, in der das Immunsystem eher supprimiert zu sein scheint [15]. Diese Immunsuppression wird einerseits durch ein massives Absterben von Immunzellen verursacht. So geht eine Großzahl von dendritischen Zellen und Lymphozyten im Rahmen des SIRS unter, während Makrophagen sich als resistent gegen dieses Phänomen erwiesen [16, 17]. Letztere werden durch dieses Phänomen aber insofern betroffen, als dass Zelltod zu einer Verminderung der Freisetzung von Zytokinen, die die Makrophagen unterstützen, führt.

Andererseits konnte beobachtet werden, dass das erworbene Immunsystem sich dahingehend wandelt, als dass die T<sub>H</sub>1-Zellen-basierte Immunantwort zu einer T<sub>H</sub>2-Zellen-basierten Form wandelt.

Während T<sub>H</sub>1-Zellen typischerweise Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-12 freisetzen, die zu einer hohen Aktivität des angeborenen Immunsystems führen, scheinen T<sub>H</sub>2-Zellen durch die Freisetzung von Interleukin-4 und -10 (IL-4, IL-10) zu einer Immunsuppression zu führen [18].

Klinisch gewinnen diese Beobachtungen insofern Relevanz, als dass Therapien, die das Immunsystem aktivieren, einen positiven Einfluss auf das Krankheitsgeschehen haben können. Diese Beobachtung konnte dadurch unterstützt werden, dass die Behandlung mit Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) den klinischen Verlauf eines SIRS bessern kann [19].

#### 1.2.4 Aktuelle Therapieansätze

Es besteht Einigkeit darüber, dass neue Therapieansätze, die die frühe Phase des SIRS betreffen, nur dann erfolgreich sein werden, wenn das therapeutische Fenster groß genug ist, um im klinischen Alltag sicher eingehalten werden zu können. Die zuvor beschriebenen Therapiekonzepte sind mit hoher Wahrscheinlichkeit (auch) hieran gescheitert. Aktuell ist unter anderem das Protein „*high mobility group box-1*“ (HMGB1) als therapeutische Zielstruktur in der Diskussion [20]. Dieses Zytokin wird vorrangig durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten freigesetzt, wobei der Kontakt zu nekrotischen Zellen oder aber die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine entscheidende Stimuli darstellen [21]. Die Anwesenheit von HMGB1 bewirkt wiederum eine erhebliche Potenzierung der Wirkung dieser Zytokine (insbesondere der von IL-1 $\beta$ ) [22]. Die Plasmaspiegel von HMGB1 sind nach sechs Tagen noch stark erhöht, sie fallen allerdings auch nach der Rekonvaleszenz nicht zwangsläufig ab [23]. Im Tiermodell konnte die Inhibition dieses Proteins zu einer deutlichen Steigerung der Überlebensrate führen [24].

Neben der Verbesserung der intensivmedizinischen Möglichkeiten hat sich für die Behandlung der späten Phase des SIRS die bereits beschriebene Behandlung mit IFN- $\gamma$  als mögliche Therapieoption dargestellt.

### 1.3 Das Inflammasom

Das Zytokin Interleukin-1 $\beta$  ist bereits mehrmals im Zusammenhang mit dem Begriff des SIRS in diesem Kapitel erwähnt worden. Aufgrund der Relevanz des Proteins für diese Studie soll an dieser Stelle auf die Produktion dieses Mediators durch das Inflammasom eingegangen werden. Darüber hinaus soll die Regulation des Inflammasoms durch bekannte Interaktionspartner dargestellt werden.

#### 1.3.1 Aufbau und Funktion des Inflammasoms

Reifes Interleukin-1 $\beta$  wird in zwei Schritten synthetisiert: zunächst wird das 35kDa schwere Pro-Interleukin-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) an freien Ribosomen hergestellt. Die Expression der zugehörigen mRNA steht hierbei im Wesentlichen unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Pro-IL-1 $\beta$  wird anschließend proteolytisch zu reifem IL-1 $\beta$  umgesetzt [25]. Dieser Prozess findet in der Regel an zytosolisch lokalisierten Proteinkomplexen statt, die als Inflammasomen bezeichnet werden und in einer Vielzahl von Geweben, insbesondere aber in Zellen der angeborenen Immunität vorkommen. Diese werden in aller Regel durch drei unterschiedliche Proteine aufgebaut: das Adapterprotein ASC verbindet die Caspase-1 mit einem Sensormolekül [26]. Die letztgenannte Rolle können zahlreiche Proteine einnehmen, wobei sich in dieser Arbeit auf die Mitglieder der Pyrin-Domänen-tragenden-NOD-like-Rezeptoren (NLRP) konzentriert werden wird. Diese weisen in aller Regel drei Domänen auf: eine NACHT-Domäne (*nucleotide-binding domain also found in NAIP, CIITA, HET-E and TP1*), eine Pyrin-Domäne und eine LRR-Domäne (*leucine-rich repeat domain*). Der NLRP und ASC treten über ihre jeweiligen Pyrin-Domänen in Wechselwirkung, ASC bindet zusätzlich durch seine CARD-Domäne (*caspase-activation and recruitment domain*) die Procaspase-1. Diese kann sich hierdurch proteolytisch autoaktivieren und die heterotetramere reife Caspase-1 formen [27]. Der LRR-Domäne werden Funktionen in der Ligandenerkennung und Bindung zugeschrieben und die NACHT-Domäne scheint durch ihre ATPase-Aktivität eine Rolle für die Dimerisierung der NLR zu spielen, die Voraussetzung für die Formung des Inflammasoms ist [28].

Die unterschiedlichen NLR erkennen eine Vielzahl strukturell und biologisch äußerst inhomogener molekularer Strukturen, deren größte Gemeinsamkeit zu sein scheint, dass ihre Anwesenheit eine potenzielle Gefahr für die zelluläre Homöostase darstellt. So bindet NLRP1 den Bakterienwandbestandteil Muramyl-dipeptid (MDP) [29], NLRP7 erkennt bakterielle Lipopeptide [30] und für NLRP3 ist eine Vielzahl von Stimuli identifiziert worden, wozu unter anderem extrazelluläres Adenosin-triphosphat (ATP), welches im Rahmen des Zellerfalls freigesetzt werden kann, Harnsäure-Kristalle (MSU),  $\beta$ -Amyloid oder auch Silikate zählen [31]. Der Abfall der intrazellulären Kalium-Ionen-Konzentration führt ebenfalls zu einer Aktivierung des Inflammasoms. Dieser in der Natur im Rahmen der Nekrose vorkommende Prozess kann durch Ionophore wie zum Beispiel Nigericin, aber auch durch antimikrobielle Peptide, wie zum Beispiel das Cathelicidin LL-37 hervorgerufen werden [32, 33]. Über den Mechanismus, der die Erkennung strukturell so heterogener Stoffe durch ein einzelnes Protein ermöglicht, herrscht derzeit keine Einigkeit, es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die Erkennung verschiedener Stimuli, die keinen kristallinen Charakter besitzen, durch Adapterproteine, wie zum Beispiel GBP5 (*guanylate-binding protein*) unterstützt wird [34]. Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Adenosin-triphosphat wird offensichtlich durch den P2X7-Purinorezeptor vermittelt [35]. Darüber hinaus scheint die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies für die Erkennung insbesondere von Asbest, Silikaten und Harnsäurekristallen eine besondere Rolle zu spielen. Diese werden im Rahmen der Phagozytose durch aktivierte NADPH-Oxidasen erzeugt [36].

NLRP3 unterscheidet sich von den weiteren NLR insbesondere dadurch, als dass seine Expression in ruhenden Zellen zu niedrig ist, um einen relevanten Beitrag zur Entzündungsantwort leisten zu können. Die Bildung von NLRP3 wird allerdings unter inflammatorischen Bedingungen, zum Beispiel der Anwesenheit von LPS, NF- $\kappa$ B-abhängig gesteigert [37]. Hierdurch wird deutlich, dass für die Bildung von IL-1 $\beta$  durch das NLRP3-Inflammasom zwei Stimuli notwendig sind: Einerseits müssen pro-IL-1 $\beta$  (wie bereits zuvor beschrieben) und NLRP3 durch einen ersten Stimulus exprimiert werden („*priming*“) und andererseits muss ein definitiver Stimulus NLRP3 und damit das Inflammasom aktivieren, eine Ausnahme scheint das  $\beta$ -Amyloid zu bilden [38]. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass Interleukin-1 $\beta$  nicht das einzige Zytokin ist, dass durch das Inflammasom gereift wird; unter anderem wird auch das konstitutiv exprimierte pro-Interleukin-18 (pro-IL-18) in seine aktive Form überführt, welche wiederum T-Zellen zur Produktion von Interferon- $\gamma$  anregt [39].

Die Sekretion beider Zytokine erfolgt anschließend über eine „nicht-klassische“ Sekretion, deren Mechanismus nach wie vor ungeklärt ist [25].

Die Reifung von Interleukin-1 $\beta$  scheint *in vivo* nicht vollständig von der Aktivität des Inflammasoms abzuhängen, da unter anderem auch die Caspase-8 in der Lage ist, pro-IL-1 $\beta$  zu spalten [40]. Auf diese „nicht-kanonischen“ Wege der IL-1 $\beta$ -Produktion soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden.

Das NLRP3-Inflammasom spielt neben seiner herausragenden Bedeutung für die angeborene Immunität im Generellen bei zahlreichen Erkrankungen eine spezielle und sehr zentrale Rolle. So ist zum Beispiel die Erkennung von Harnsäurekristallen durch das angeborene Immunsystem ursächlich für das Krankheitsbild der *Arthritis urica* (Gicht) [41]. Mutationen im NLRP3-Gen sind darüber hinaus mit den autosomal-dominanten vererbten Leiden, wie zum Beispiel dem Familiären Mittelmeerfieber oder dem MUCKLE-WELLS-Syndrom assoziiert. Diese Erkrankungen, die durch rezidivierende sterile Entzündungen der Schleimhäute und Gelenke und im Falle des MUCKLE-WELLS-Syndroms einen progredienten Hörverlust auffallen, führen aufgrund einer sich entwickelnden Amyloidose vom Typ AA zu einer verkürzten Lebenserwartung [42].

### 1.3.2 Regulatoren des NLRP3-Inflammasoms

Zahlreiche Protein-artige und nicht-Protein-artige Regulatoren des NLRP3-Inflammasoms sind identifiziert worden (Übersicht bei [43]). Im Folgenden sollen einige ausgewählte dargestellt werden, wobei der Fokus auf die Negativ-Regulatoren gelegt wird. Als nicht-proteinartige Regulatoren wurden unter anderem die micro-RNA miR-223 und das kleine Molekül Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert. miR-223 vermittelt über die Bindung an die NLRP3-mRNA deren vorzeitigen Abbau und reduziert damit die Menge an verfügbarem NLRP3. Die Expression dieser micro-RNA erfolgt in Abhängigkeit des Zelltyps, so weisen im Bereich der myeloiden Zellen dendritische Zellen die niedrigste Expression auf, neutrophile Granulozyten hingegen die höchste. Dies erklärt wahrscheinlich die erheblichen Unterschiede in der Sensibilität bezüglich Inflammasom-abhängiger Stimuli in diesen Zellen [44].

Stickstoffmonoxid, das in Immunzellen vorrangig durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS2) unter Verwendung von Arginin als Substrat gebildet wird und aufgrund seines bakteriziden Charakters eine wesentliche Rolle in der antimikrobiellen Abwehr spielt, scheint die Aktivität von NLRP3 durch die Nitrosylierung von Cystein-Resten zu hemmen [45].

Des Weiteren wurden die Proteine *superoxide-dismutase 1* (SOD1) und *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP) als Interaktionspartner identifiziert. SOD1 ist üblicherweise an der Neutralisation reaktiver Sauerstoffspezies, die im Rahmen der Immunantwort gebildet werden, beteiligt. Der Knockout dieses Proteins führt ebenfalls zu einer Modifikation der Cystein-Reste, wobei in diesem Fall die katalytisch aktiven Mercapto-Gruppen der Caspase-1 betroffen sind. Hieraus resultiert eine reduzierte Bildung der Inflammasom-abhängigen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 [46].

Auch wenn diese Ergebnisse zeigen, dass ROS – sofern sie bei mangelnder Elimination in großer Menge anfallen – das Inflammasom hemmen, gelten sie in physiologischen Mengen als notwendiger Aktivator von NLRP3 [47]. In Abwesenheit von ROS geht das Protein TXNIP einen Komplex mit reduziertem Thioredoxin, einer Cystein-haltigen Oxidoreduktase, ein. Steigende Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies führen allerdings zu einer Oxidation von Thioredoxin und einer Freisetzung von TXNIP, welches anschließend an NLRP3 bindet und dieses aktiviert [48].

## 1.4 Peroxiredoxin-4

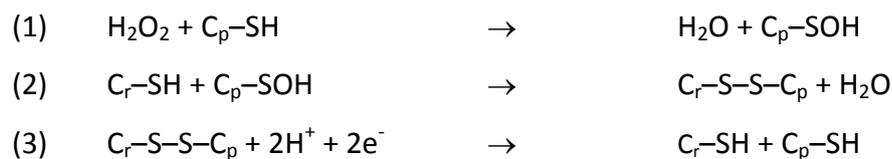
Dieser Abschnitt soll sich dem bisherigen Wissensstand bezüglich des Aufbaus und der bekannten Funktionen des Proteins Peroxiredoxin-4, welches im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen wird, widmen.

### 1.4.1 Die Familie der Peroxiredoxine

Die Familie der humanen Peroxiredoxine umfasst derzeit sechs Mitglieder, die fortlaufend nummeriert wurden. Die Einteilung erfolgte in der Reihenfolge der Entdeckung, allerdings ergibt sich hieraus auch auf dem Ablauf des katalytischen Zyklus resultierende Einteilung in drei Gruppen.

Die Vertreter Prdx1-4 gehören in die Familie der typischen 2C-Peroxiredoxine, die jeweils einen reduzierenden ( $C_p$ ) und einen regenerierenden ( $C_r$ ) Cystein-Rest tragen [49, 50]. Im Rahmen der katalytischen Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies, zu welcher alle Mitglieder dieser Gruppe zu einem Homodimer zusammentreten interagiert ein  $C_p$  mit dem  $C_r$  des jeweils anderen Monomers. Prdx5 wird als „atypisches“ 2C-Peroxiredoxin bezeichnet, da es nicht dimerisiert, sondern seine Cystein-Reste durch interne Interaktion regeneriert [51]. Prdx6 trägt nur einen Cystein-Rest (1C-Peroxiredoxin), es bildet ähnlich der ersten Gruppe üblicherweise ein Homodimer [52].

Die Katalyse eines 2C-Peroxiredoxins soll kurz skizziert werden: Im Dimer ( $\alpha\beta$ ) liegen sich  $C_p(\alpha)$  und  $C_r(\beta)$  jeweils direkt gegenüber. Reaktive Sauerstoffspezies reagieren exemplarisch nach folgendem Schema:



Elektronendonator ist in aller Regel das Protein Thioredoxin, dessen Mercapto-Gruppen anschließend NADPH-abhängig durch eine Thioredoxin-Reduktase regeneriert werden [53]. Diese Reaktion zeigt für die 2C-Peroxiredoxine eine katalytische Effizienz (gemessen an der Neutralisierung von Wasserstoffperoxid pro Zeiteinheit), die mindestens zwei Zehnerpotenzen unter den Werten für die Katalase liegen [54]. Es gibt zwei weitere Beobachtungen, die die Bedeutung der Peroxiredoxine – insbesondere von Prdx4 – für die Aufrechterhaltung des physiologischen Redoxstatus der Zelle in Frage stellen: einerseits verändert sich das zelluläre ROS-Niveau nach Ausschaltung von Prdx4 nicht signifikant [55], andererseits setzt bei der Exposition von Zellen gegenüber steigen ROS-Konzentrationen relativ schnell eine stabile Oxidation der reduzierenden Mercapto-Gruppen zu Sulfonsäuregruppen ein [56, 57]. Diese kann nicht mehr durch Thioredoxin, jedoch noch durch die Proteine Sulfiredoxin und Sestrin regeneriert werden [58, 59].

#### 1.4.2 Bedeutung von Prdx4 für die ER-basierte Proteinsynthese

Prdx4 hat innerhalb der Peroxiredoxin-Familie eine besondere Stellung. So ist es der einzige Vertreter, der aufgrund eines entsprechenden Signalpeptides in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums gelangt und damit prinzipiellen Zugang zum sekretorischen System erhält. Auch wenn bisherige Arbeiten nahe legen, dass trotz des Fehlens eines Retentionsmotives die Sekretion von Prdx4 selbst ausbleibt, erlangt dieses Protein damit die Möglichkeit zur Interaktion mit Proteinen innerhalb des ER. Scheinbar existieren zwei Wege der Interaktion mit dem für die korrekte Ausbildung der Cystin-Brücken entscheidenden Enzym *protein-disulfide isomerase* (PDI): einerseits kann dies durch das Enzym endoplasmic-oxidoredoxin 1 (ERO1) regeneriert werden, wobei Prdx4 die entstehenden ROS neutralisiert [55], andererseits kann oxidiertes Prdx4 direkt PDI regenerieren, wobei das reduzierte Prdx4 in diesem Fall durch ERO1 erneut oxidiert wird [60]. Bemerkenswerterweise verfügt keines der hieran beteiligten Proteine über ein Retentionsmotiv; der Ausschluss vom sekretorischen System erfolgt durch die Aktivität des Proteins ERp44 (*ER-protein of 44kDa*) [61, 62]. Allerdings wurde auch in verschiedenen Publikationen der Nachweis von Prdx4 im Cytosol erbracht, wobei in diesem Zusammenhang von einer unreifen Vorläuferform ausgegangen wurde [63].

Es existieren weitere Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass Prdx4 auf mehreren Ebenen in die Faltung von sekretorischen Proteinen eingreift. So führt die zuvor bereits beschriebene vollständige Oxidation der Cystein-Reste scheinbar zu einer Veränderung der Quartärstruktur, in deren Rahmen fünf ( $\alpha\beta$ )-Dimere zu einem ( $\alpha\beta$ )<sub>5</sub>-Tetramer zusammentreten. Diesem wird eine Funktion als Faltungshelfer („*chaperone*“) zugeschrieben [55, 64]. Diese geschilderten Befunde basierten auf *in vitro*-Studien, da bisher davon ausgegangen wurde, dass sich die Zucht einer konstitutiven Knockout-Maus aufgrund einer eingeschränkten Fertilität als schwierig gestaltet [65]. In einer Studie wurde allerdings der Versuch unternommen, sowohl PDI und ERO1, als auch Prdx4 *in vivo* auszuschalten.

Die resultierende Triple-Knockout-Maus präsentierte einen Phänotyp, der als „atypischer Skorbut“ bezeichnet wurde, da es zu einer ausgeprägten Störung der Kollagen-Synthese zu kommen scheint [66].

### 1.4.3 Regulation der Entzündungsantwort

Die Erkenntnis, dass Prdx4 einen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B hat, ist inzwischen fast 20 Jahre bekannt – die initiale Beschreibung von Prdx4 (unter dem Namen *antioxidative protein 372* (AOE372)) zeigte dieses Protein primär als Regulator des Proteins *inhibiting factor of NF- $\kappa$ B- $\alpha$*  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), welches dessen Phosphorylierung und in der Folge die Aktivierung des eigentlichen Transkriptionsfaktors hemmt [50]. Interessanterweise wurde kurze Zeit später die gegensätzliche Rolle für Prdx4 beschrieben, als es unter dem Namen TRANK als sezernierter NF- $\kappa$ B-Aktivator beschrieben wurde [67].

Weitere Publikationen bestätigten aber überwiegend die Rolle des Inhibitors von NF- $\kappa$ B [3, 68], wobei stets angenommen wurde, dass die Neutralisierung von ROS, welche für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung notwendig sind, den zu Grunde liegenden Mechanismus darstellt, auch wenn zuvor bereits dargestellt wurde, dass es keinen messbaren Unterschied der zellulären ROS-Exposition gibt.

Diese Auffassung, dass Prdx4 seinen biologischen Effekt über die Neutralisierung von ROS ausübt, findet sich auch in der zunehmenden Anzahl klinischer Studien, die auf eine Korrelation von Prdx4 zu entzündlichen Krankheitsbildern zielen, ihre Mehrheit. So konnte in einer Studie die gesteigerte Expression von PRDX4 in der Synovia von Patienten, die an rheumatoider Arthritis erkrankt sind, demonstriert werden [69].

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bestimmung von Prdx4 im Serum von Patienten, die an einem SIRS erkrankt sind, hochsignifikant mit etablierten Serumparametern, die eine Entzündung anzeigen, wie zum Beispiel Procalcitonin oder Interleukin-6, korreliert. Hohe Serumspiegel von Prdx4 korrelieren dabei mit einer deutlich höheren Krankheitsaktivität und einer schlechteren Prognose [70]. Darüber hinaus korreliert ein erhöhter Serumspiegel von Prdx4 scheinbar auch mit einer gesteigerten Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse [71], insbesondere bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 [72].

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

In diesem Kapitel wurde zunächst die Bedeutung des Krankheitsbildes SIRS dargestellt und mit dem Inflammasom (sofern nicht anders definiert, wird hiermit stets das NLRP3-Inflammasom gemeint) über einen Signalkomplex, der für die Synthese eines der zentralen Mediatoren dieser Erkrankung verantwortlich ist, berichtet. Abschließend wurde gezeigt, dass das Protein Prdx4 einerseits offensichtlich antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und außerdem zu dem vormals beschriebenen Krankheitsbild in Beziehung gesetzt werden konnte. Aufgrund dessen soll diese Arbeit nun im Wesentlichen der Klärung dreier Fragen dienen:

1. Lässt sich in einem murinen Knockout-Modell für Peroxiredoxin-4 im Rahmen eines SIRS-Modells ein signifikanter Einfluss des Proteins auf die Schwere der Erkrankung nachweisen?
2. Welchen Einfluss hat Peroxiredoxin-4 auf die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege in Makrophagen und die daraus resultierende Freisetzung von Zytokinen?
3. Ist ein eventuell gefundener Phänotyp durch die gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies bedingt oder existiert ein bisher unbekannter Mechanismus, durch den Peroxiredoxin-4 die Entzündungsreaktion hemmt?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 In-vivo-Untersuchungen der *Prdx4*<sup>-/-</sup>- und *Prdx4* <sup>$\Delta$ M $\Phi$ /Y</sup>-Maus

#### 2.1.1 Verwendete Versuchstiere

*Prdx4*<sup>-/-</sup>-Mäuse (konstitutiver, d.h. alle Zellen des Körpers betreffender Knockout) wurden unter der Zuhilfenahme eines kommerziellen Anbieters (genOway (Lyon, F) bezogen und entsprechende Weibchen mit Männchen der Rasse C57Bl/6N (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) über zehn Generationen zurückgekreuzt. Zur Generation des konditionalen Knockouts (*Prdx4*-Defizienz lediglich in den myeloiden Zellen) wurden Weibchen, deren Exon-1 des *Prdx4*-Gens von LoxP-detection-sites flankiert wurde, mit Männchen, die eine an die Aktivität des Lysozym2-Promotors gekoppelte cre-Recombinase exprimierten, verpaart [73]. Die aufgrund der Promotoraktivität nur in den myeloiden Zellen aktive Recombinase bindet hierbei an die LoxP-detection-sites und entfernt die flankierte Sequenz selektiv aus dem Genom [74].

Für die Versuche wurden anschließend sechs bis acht Wochen alte Männchen, die unter SPF-Bedingungen gemäß den FELASA-Richtlinien in isoliert ventilierten Käfigen gehalten wurden, verwendet. Aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation des murinen *Prdx4*-Gens wird bei den Ergebnissen stets der hemizygote Genotyp notiert. In allen Versuchen wurden Geschwistertiere der jeweiligen Genotypen eingesetzt. Es wurde eine für Nagetiere übliche Standard-Diät gefüttert. Alle Versuche fanden unter Einhaltung der jeweils geltenden Gesetze und nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission des zuständigen Landesministeriums statt.

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde den drei Wochen alten Tieren im Rahmen der Markierung zur späteren zweifelsfreien Identifikation eine Gewebeprobe aus der Ohrmuschel entnommen und die darin enthaltene genomische DNA unter Verwendung des Dneasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, NL) gemäß des Herstellerprotokolls isoliert. Die gewonnene DNA wurde im Rahmen einer Polymerase-Kettenreaktion (für eine kursorische Erläuterung siehe Kapitel 2.3.3) amplifiziert, wobei die PCR-Produkte anschließend auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt wurden.

Anschließend wurden diese unter einer UV-Lampe durch einen dem Gel zugesetzten interkalierenden Farbstoff (SYBR Safe, Invitrogen, USA) sichtbar gemacht. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind den Anhängen zu entnehmen.

Die verwendeten Primer wurden im Falle des konstitutiven Knockouts um und in das Exon-1 (welches im Knockout entfernt wurde), so dass in einer ersten Reaktion der Nachweis einer etwaigen Deletion und in einer zweiten Reaktion der Nachweis eines etwaigen Erhalts des Exons möglich war. Diese Reaktionen konnten erfolgreich in einem Ansatz durchgeführt werden, da sich beide Reaktionen den gleichen *reverse*-Primer teilen. In der Zusammenschau konnte anschließend der Genotyp (Weibchen: homozygoter/heterozygoter Knockout oder Wildtyp, Männchen: hemizygoter Knockout oder Wildtyp) bestimmt werden.

Der Nachweis des konditionalen LysM-cre-Knockouts erfolgte ebenfalls über zwei Reaktionen, wobei in der ersten Reaktion die Anwesenheit von *LoxP-detection-sites* im *Prdx4*-Gen (ebenfalls das Exon-1 flankierend) nachgewiesen wurde und in einer zweiten Reaktion die Anwesenheit der unter dem Lysozym2-Promotor stehenden Cre-Recombinase untersucht wurde. Der konditionale Knockout (Genotyp: *Prdx4*<sup>ΔMΦ/Y</sup>) wurde angenommen, sobald die Tiere homozygot (Weibchen) oder hemizygot (Männchen) für *LoxP-detection-sites* waren und die cre-Recombinase nachgewiesen wurde.

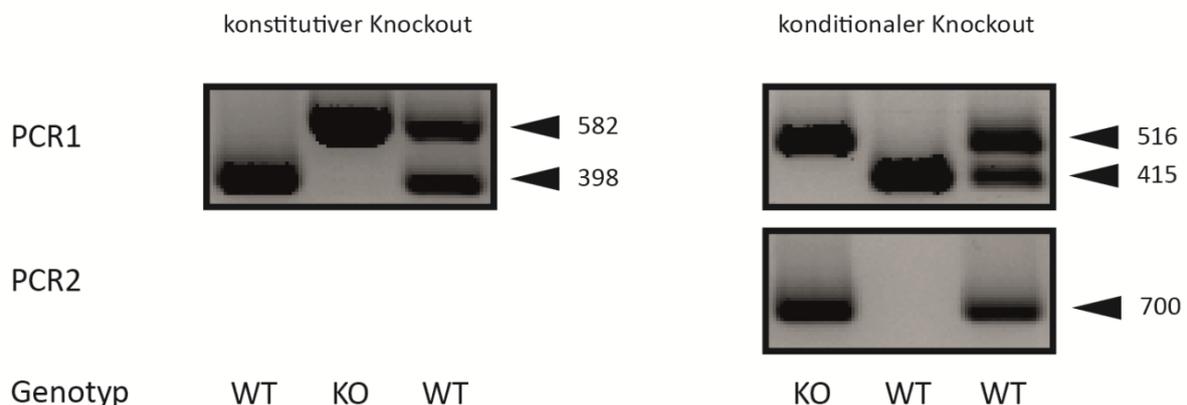


Abbildung 1: Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere. Länge der PCR-Produkte in Basenpaaren angegeben. Konstitutiver Knockout: von links nach rechts betrachtet ergibt sich folgendes Bild der Genotypen für *Prdx4*: +/+ (Wildtyp homozygot), -/- (Knockout homozygot), +/- (Wildtyp, heterozygot). Konditionaler Knockout: von links nach rechts betrachtet zeigt sich in der oberen Reihe (Nachweis der *LoxP*-Schnittstellen): +/+ (homozygot die Schnittstelle tragend), -/- (homozygoter Wildtyp), +/- (heterozygot die Schnittstelle tragend). In der unteren Reihe ergibt sich: +/? (Cre-positiv), -/? (Cre-negativ), +/? (Cre-positiv). Daraus resultierend ist Tier 1 (links) ein konditionaler KO, Tier 2 (Mitte) ein Wildtyp und Tier 3 aufgrund des verbleibenden Wildtyp-*Prdx4*-Allels trotz Anwesenheit von Cre phänotypisch ein Wildtyp (Expression von *Prdx4* durch das Wildtyp-Allel). Tiere des letztgenannten Genotyps wurden nicht in Versuche einbezogen.

## 2.1.2 Induktion des Endotoxin-Schocks durch Gabe von LPS

Für die Induktion des Lipopolysaccharid-abhängigen Endotoxin-Schocks wurde sich an dem Protokoll von SCHNEIDER und Kollegen orientiert, obgleich eine Vielzahl von etablierten Protokollen existiert [75]. Prinzipiell beruht der Mechanismus dieses Tiermodells auf einer TLR4-abhängigen Aktivierung von intraperitonealen Makrophagen mit starker Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  und nachfolgendem SIRS, welches je nach gewählter Dosis ( $LD_{50}(LPS)=50\mu g/g$ ) üblicherweise zum Tod von Wildtyp-Tieren führt („high-dose“) [76].

In dieser Arbeit wurde ein „low-dose“-Modell eingesetzt, bei dem die mittlere Letalitätsdosis um den Faktor Zehn unterschritten wurde. Hierzu wurde den Versuchstieren aufgereinigtes Lipopolysaccharid (aus *E. coli*, LFI Borstel, DE) in einer Dosierung von 4,5 $\mu g$  pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert, wobei die entsprechende Menge LPS in einem Volumen von 250 $\mu L$  *phosphate balanced solution* (PBS; PAA, Österreich) aufgenommen wurde. Kontrolltiere erhielten eine Injektion mit PBS von ebenfalls 250 $\mu L$ . Anschließend wurden die Tiere alle sechs Stunden gewogen und nach Ablauf der Versuchsdauer von 72 Stunden im Falle des konstitutiven Knockouts und von 48 Stunden im Falle des konditionalen Knockouts mittels zervikaler Dyslokation euthanasiert.

Direkt hiernach wurde das Blut der Tiere über eine Herzpunktion gewonnen und in 500 $\mu L$  Lithium-Heparin-Gel-Röhrchen (Sarstedt, DE) bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 10.000rpm zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde abgenommen, in Polypropylen-Tubes gelagert und zur weiteren Untersuchung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zusätzlich wurden den Tieren Leber und Milz entnommen, indem die Bauchhöhle nach zweimaliger Desinfektion longitudinal eröffnet und Milz und Leber dann stumpf an ihrem jeweiligen Hilus abgesetzt wurden. Das Gewicht der Milz wurde bestimmt, die Organe anschließend in flüssigem Stickstoff asserviert.

Für die Behandlung mit dem rekombinanten Interleukin-1 $\beta$ -Rezeptor-Antagonist Anakinra wurde den Tieren erstmals eine halbe Stunde vor Beginn der LPS-Behandlung und anschließend alle 12 Stunden bis zum Versuchsende Anakinra (Kineret<sup>®</sup>, Swedish Orphan Biovitrum, Schweden) in einer Dosierung von 200 $\mu g$  pro Tier intraperitoneal injiziert.

Das Injektionsvolumen betrug hierbei stets 100µL, wobei die fertige Injektionslösung des Herstellers unter Verwendung von PBS (PAA, Österreich) auf die Zielkonzentration von 2µg/µL eingestellt wurde.

## 2.2 Isolation von *bone marrow-dependent macrophages* (BMDM)

Die Isolation von Makrophagen basiert auf der Isolation der im roten Knochenmark der Tiere vorhandenen Progenitor-Zellen, die in Kultur anschließend durch den Einsatz des Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktors M-CSF in reife Makrophagen ausdifferenziert wurden.

Hierfür wurden die Mäuse mittels zervikaler Dyslokation euthanasiert und anschließend die Ober- und Unterschenkelknochen beidseits vom Hüftkopf bis zum Sprunggelenk entnommen und von Muskulatur und Sehnen befreit. Hierzu wurde nach zweimaliger Hautdesinfektion die Haut bis auf das Peritoneum hin eröffnet und anschließend der Schnitt über den Schenkel bis zum Sprunggelenk erweitert. Die Muskulatur wurde an den Ansätzen von den Knochen entfernt und in situ belassen. Der Hüftkopf wurde dann stumpf exartikuliert und das Sprunggelenk mit der Schere gespalten. Das Kniegelenk wurde vorerst intakt belassen. Die entnommenen Knochenpaare wurden dann bis zur weiteren Verarbeitung in RPMI 1640-Medium (Gibco, Carlsbad, USA) bei +4°C gelagert.

Nach dem Transfer unter die sterile Werkbank wurden die Beine entlang der Epiphysen eröffnet und die Markhöhle mit Makrophagen-Nährmedium (48% Macrophage-SFM-Medium, 48% Dulbeccos Modified Eagle Medium (beide von Gibco), 10% *fetal calf serum* ((FCS), PAA, Österreich), 1% Amphotericin, 1% Penicillin/Streptomycin (beide von Gibco)) gespült. Das extrahierte Mark aller vier Knochen eines Tieres wurde in einem 50mL-Tube aufgefangen und resuspendiert. Anschließend wurde das Volumen auf zwei Tubes aufgeteilt und jeweils auf 40mL mit Nährmedium aufgefüllt. Der Inhalt eines Tubes wurde durch ein 70µm-Zellsieb hindurch in eine unbeschichtete 15cm Petrischale ausgesät und die Zellsuspension dann mit rmM-CSF (ImmunoTools, DE) in einer Konzentration von 20ng/mL versetzt.

Die Zellkulturschalen wurden anschließend für sieben Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei nach 3 Tagen weitere 20mL Medium pro Schale zugegeben wurden.

Die Zellen wurden geerntet, indem nach Entfernung des Nährmediums und einmaliger Spülung mit 5mL auf 37°C angewärmtem PBS 20mL eiskaltes PBS auf die Zellen pipettiert wurden.

Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber gesammelt und die Zellsuspension beider Schalen eines Tieres in einem 50mL-Tube gesammelt und danach bei 4°C für 10 Minuten mit 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde sodann abgenommen und das sedimentierte Zellpellet in 10mL Makrophagen-Nährmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde anschließend unter Verwendung des cell-o-meters (Nexcelom Biosciences, USA) bestimmt. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 2mL Medium pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät (sofern nicht anders beschrieben). Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden inkubiert, bevor sie in Experimente einbezogen wurden.

Zur Stimulation wurden die jeweiligen Stimulantien in 2mL neuen Nährmediums aufgenommen und dieses nach Entfernung des alten Mediums in die Kulturschale gegeben. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Stimulationsversuche in Anwesenheit von Phenolrot und FCS durchgeführt.

## 2.3 Auswertung von Expressionsmustern auf Nukleinsäureebene

### 2.3.1 Isolation von RNA aus Zellkulturen und Gewebeproben

Die Aufreinigung von RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (QIAGEN, NL), welches sich grundsätzlich dem Verfahren von CHOMCZYNSKI und SACCHI bedient [77]. Hierbei werden die Proben durch das stark chaotrop wirksame Guanidiumthiocyanat lysiert und anschließend auf einer Silikat-Säule gereinigt, wobei unter Einsatz von alkoholischen Waschpuffern die RNA mit hoher Selektivität auf der Säule gebunden wird, während Proteine und DNA entfernt werden. Durch den Einsatz von wässrigen Lösungen kann die RNA anschließend eluiert werden.

Zur Isolation von RNA aus Zellkultur-Proben wurden die Zellen mit 500µL warmem PBS gewaschen und anschließend mit 350µL RLT-Lysepuffer (im Kit enthalten, Zugabe von 10µL 2-Mercaptoethanol pro mL Lysepuffer; 2-Mercaptoethanol von Merck, DE) in der Kulturschale lysiert. Das Lysat wurde anschließend mit dem Zellschaber gesammelt und in der QIASHredder-Säule bei 12.000rpm für eine Minute zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde mit 350µL 70% Ethanol p.a. (Merck, DE, mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt) versetzt und auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben und bei 10.000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde anschließend verworfen und die Säule dann zunächst einmal mit 700µL RW1-Waschpuffer und anschließend zweimal mit jeweils 500µL RPE-Waschpuffer bei 10.000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Nach einmaliger Zentrifugation bei 12.000rpm für eine Minute wurden die Säulen in RNase-freie 1,5mL Tubes eingesetzt und anschließend mit 50µL RNase-freiem Wasser (Ambion, USA) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Säulen dann bei 12.000rpm für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss in dem RNase-freien Tube aufgefangen. Dieses wurde sogleich auf Eis gelagert bis zur weiteren Verwendung.

Die Isolation von RNA aus Gewebeproben wurde unter Verwendung des gleichen Kits durchgeführt, die Gewebeproben wurden vorher unter Verwendung des TissueLyser2-Systems (QIAGEN, NL) homogenisiert. Hierzu wurden 30mg tiefgefrorenen Gewebes in 350µL RLT-Lysepuffer (2-Mercaptoethanol wurde zuvor zugesetzt) aufgenommen und eine 5mm Stahlkugel (QIAGEN, NL) in das Tube gegeben. Die Proben wurden im TissueLyser II (QIAGEN, NL) bei 25Hz für zweimal für jeweils eine Minute homogenisiert und die Lysate anschließend wie oben bereits beschrieben aufgeschlossen.

### 2.3.2 Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA wurde mittels des Maxima-H-Minus Kits (Thermo Scientific, USA) durchgeführt, welches sich den Einsatz von Oligo-(dT)<sub>16</sub>-Primern zu Nutze macht, um durch Bindung an die 3'Poly-(A)-Regionen der mRNA die Transkripte faktisch vollständig zu erfassen. Hierzu wurde zunächst die RNA-Konzentration in den vorher aufgereinigten Proben mittels des ND-1000 Spektrofotometers bestimmt (Thermo Scientific, USA). Nach Kalibrierung des Geräts gegen 1,5µL RNase-freies Wasser wurden je 1,5µL Probe gemessen, wobei eine optische Dichte bei  $\lambda=260\text{nm}$  näherungsweise einer Konzentration von 40ng/µL einzelsträngiger RNA entspricht. Zur Bestimmung der Reinheit wurde das Verhältnis der Absorptionwerte bei 260 und 280nm gebildet und nur jene Proben verwendet, bei denen dieser Quotienten zwischen 1,8 und 2,1 lag.

Die reverse Transkription wurde anschließend gemäß der Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde 1µg RNA auf ein Volumen von 6,875µL mit RNase-freiem Wasser eingestellt und anschließend mit 0,125µL Oligo-(dT)<sub>16</sub>-Primer und 0,5µL dNTP-Mix (jeweils im Kit enthalten) versetzt.

Dieses Volumen wurde in einem PCR-Tube mittels Thermocycler (Applied Biosystems, USA) für 5 Minuten auf 65°C erhitzt. Danach wurden 2µL Reaktionspuffer und 0,5µL reverse Transkriptase-Lösung hinzugegeben und mittels Thermocycler folgende Reaktionsbedingungen eingestellt: 25°C für 10 Minuten, 50°C für 15 Minuten, 85°C für 5 Minuten. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Probe auf ein Volumen von 100µL aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 2.3.3 Transkriptlevelbestimmung mittels vollquantitativer *real-time* PCR

Die Quantifizierung der Genexpression in zuvor generierten cDNA-Proben wurde mittels der *polymerase chain reaction* (PCR) durchgeführt. Bei diesem Verfahren kommt eine hitzebeständige DNA-Polymerase bakteriellen Ursprungs zum Einsatz, um spezifische DNA-Abschnitte zu vervielfältigen [78]. Hierzu wird die Probe mit kurzen DNA-Fragmenten, den sog. Primern, welche spezifisch komplementäre Sequenzen der zu vervielfältigenden DNA binden und der DNA-Polymerase ein 3'-Ende zur Elongation anbieten, inkubiert (hybridisiert). Anschließend wird durch die zugegebene DNA-Polymerase unter Verbrauch bereitgestellter desoxy-Nukleotidtriphosphate ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Nach Abschluss der Elongation wird die Probe kurzzeitig so stark erhitzt, dass der neu gebildete DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge denaturiert und nach Absenkung der Temperatur erneut Primer binden kann. Dieser Prozess kann aufgrund der Hitzebeständigkeit des Enzyms solange wiederholt werden, bis Primer und Nukleotidtriphosphate verbraucht wurden, wobei die Kopienanzahl der DNA zu diesem Zeitpunkt näherungsweise  $2^{\text{Zykluszahl}}$  beträgt; d.h. nach 30 Zyklen wurde die DNA um den Faktor  $2^{30} \approx 10^8$  vervielfältigt. Dieser Prozess kann in einem Thermocycler, der definierte Temperaturen für festgelegte Zeiträume erzeugen kann, vollautomatisch erfolgen.

Um den ursprünglich vorhandenen Gehalt einer spezifischen cDNA zu bestimmen, wird der klassische Aufbau des Thermocyclers um eine UV-Lichtquelle und einen *charge-coupled-device* Sensor (CCD) erweitert und dem PCR-Reaktionsgemisch ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert (in diesem Fall SYBR-Green; Life Technologies, USA), hinzugefügt. Erstbeschreiber dieses Verfahrens, welches als *real-time* PCR bekannt wurde, waren HIGUCHI und Kollegen [79].

Da nach jedem Zyklus der Gehalt an doppelsträngiger DNA zunimmt, steigt auch die Intensität der Fluoreszenz an. Vereinbarungsgemäß werden so viele Zyklen durchlaufen, wie benötigt werden, um das messbare Fluoreszenzsignal über eine Nachweisgrenze, bei der es sicher gegen das Hintergrundsignal zu differenzieren ist, anzuheben. Diese als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnete Größe fällt mit zunehmender Ausgangsmenge ab und erlaubt von daher eine präzise Aussage über die ursprünglich vorhandene Kopienzahl.

Als alternatives Verfahren kam das von LIVAK und Kollegen erstmals beschriebene TaqMan-Prinzip zum Einsatz [80]. Hierbei werden spezielle, mit Fluoreszenz-Sonden markierte Primer eingesetzt, deren Farbstoff während der Elongation durch die 5'-Exonuclease-Aktivität der Polymerase aktiviert wird. Die zunehmende Intensität der Fluoreszenz lässt sich nun spezifisch auf die Anzahl synthetisierter Kopien zurückführen und ist nicht für Kontaminationen durch doppelsträngige DNA, wie zum Beispiel durch Dimerisierung von Primern, anfällig.

Für die Durchführung der SYBR-Green-basierten *real-time* PCR (im Folgenden als qRT-PCR bezeichnet) wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt (die Primer wurden unter Zuhilfenahme der PrimerBLAST-Software (NIH, USA) entwickelt und über die Firma Microsynth (Schweiz) bezogen – die Sequenzen sind den Anhängen zu entnehmen):

Komponente	Volumen	Konzentration
SybrSelect-Mastermix	4,5µL	∅
Primer-Mischung	0,5µL	5µmol/L pro Primer
Probe	5,0µL	1ng/µL

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die SYBR-Green-basierte *real-time* PCR

Die Proben wurden anschließend nach folgendem Temperaturschema in die PCR eingebracht: 1) 50°C für 2 Minuten, 2) 95°C für 2 Minuten, 3) 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute. Für Schritt 3 wurden pro Versuch 45 Zyklen durchgeführt.

Für das TaqMan-basierte System wurden vorgefertigte Sonden und kommerziell erhältlicher Master-Mix eingesetzt (Life Technologies, USA). Folgender Reaktionsansatz wurde gewählt:

Komponente	Volumen	Konzentration
GeneExpression Mastermix	4,5µL	∅
TaqMan Gene Detection Assay	0,5µL	∅
Probe	5,0µL	1ng/µL

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die TaqMan-basierte *real-time* PCR

## 2.4 Auswertung von Signalantworten auf Proteinebene

### 2.4.1 Isolation von Proteinen aus Zellkulturen und Gewebeproben

Zur Isolation von Proteinen aus Zellkulturproben wurden die Zellen zunächst mit 500µL warmem PBS gewaschen und anschließend mit 100µL denaturierendem Lysepuffer (im Folgenden als DLB bezeichnet, 1% SDS, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM Tris, pH=7,4, 1% Protease Inhibitor (Roche, DE)) überschichtet. Nach Sammeln mit dem Zellschaber wurden die Proben in einem 1,5mL-Tube aufgenommen und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Anschließend wurden die Proben zweimal mittels Ultraschall-Elektrode bei 20kHz bei einem Pulsintervall für 0,1s insgesamt für 5s homogenisiert (Sonopuls HD 200, Bandelin, DE). Die Tubes wurden danach bei +4°C für 15 Minuten bei 16.000g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen.

Zur Isolation von Proteinen aus Gewebeproben wurden tiefgefrorene Gewebeproben (mit einer Kantenlänge von ungefähr 3mm) mit Mörser und Pistill zunächst zerkleinert, wobei dieser Arbeitsschritt in einem Bad aus flüssigem Stickstoff stattfand. Das pulverisierte Gewebe wurde dann in 120µL DLB-Puffer aufgenommen und wie oben beschrieben weiter verarbeitet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des *detergent compatible protein assay* (Bio-Rad, USA), welcher auf dem System nach LOWRY basiert. Hierbei bildet sich zunächst ein Farbkomplex aus Cu(II)-Ionen und den Peptidbindungen von Proteinen (sog. BIURET-Reaktion).

Anschließend werden die Cu(II)-Ionen zu Cu(I)-Ionen reduziert und diese reduzieren wiederum Folin. Dieses bildet eine kräftige Blaufärbung aus, die bei  $\lambda=650\text{nm}$  quantifiziert werden kann [81].

Zur Durchführung des Assays wurde zunächst die eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serum-Albumin (BSA; Merck, DE) angesetzt. Hierzu wurden  $68\mu\text{L}$  *aqua bidest* mit  $12\mu\text{L}$  BSA-Lösung ( $1\text{mg}/\text{mL}$ ) gemischt und anschließend 6 Verdünnungen von jeweils  $50\mu\text{L}$  in  $20\mu\text{L}$  *aqua bidest* angelegt.

Verdünnungsstufe	Konzentration in mg/mL
1	1,500
2	1,071
3	0,765
4	0,547
5	0,390
6	0,279
7	0,199

Tabelle 3: Standardreihe für den LOWRY-Assay

Die Standardreihe wurde inklusive einer Wasser-Kontrolle in einer transparenten 96-Well Mikrotiterplatte mit rundem Boden aufgetragen ( $5\mu\text{L}/\text{Well}$ ). Anschließend wurden die Proben ebenfalls in Duplikaten mit gleichem Volumen in die Platte pipettiert. Zu jeder Probe wurden nun  $24,5\mu\text{L}$  der Reagenz A (im Kit enthalten) und  $0,5\mu\text{L}$  der Reagenz S gegeben. Abschließend wurden  $200\mu\text{L}$  von Lösung B hinzugegeben und die Platte für 15 Minuten auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte im Infinite Pro 2000 Plattenfotometer (Tecan, Schweiz) bei  $650\text{nm}$ . Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung einer linearen Eichgerade. Proben, die mehr als  $1,5\text{mg}/\text{mL}$  Protein enthielten, wurden verdünnt und erneut vermessen.

Die Proteinlysate wurden anschließend mit PBS und 5x-SDS-Ladepuffer ( $250\text{mM}$  Tris ( $\text{pH}=6,8$ ), 10% SDS, 50% Glycerol,  $500\text{mM}$  DTT) auf eine Konzentration von  $1,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^\circ\text{C}$ .

## 2.4.2 Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting

Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (im Folgenden als SDS-PAGE abgekürzt) wurden zunächst die entsprechenden Gele hergestellt.

Hierzu wurde das diskontinuierliche System nach LÄMMLI verwendet, bei dem ein Tris-Glycin-gepuffertes Sammelgel (pH=6,8; Acrylamid-Gehalt=3%) ein Trenngel (pH=8,8; Acrylamid-Gehalt=12%) überschichtet [82].

Die Proteine binden nach vorheriger Reduktion durch das im Ladepuffer enthaltene DTT an das Detergenz SDS (Natrium-Dodecylsulfat) und bilden dadurch stark negativ geladene Komplexe, deren Laufeigenschaften aufgrund des konstanten Masse-Ladungs-Verhältnisses nur noch von der Größe des jeweiligen Proteins abhängen. Die poröse Polyacrylamid-Matrix trennt die Proteine nach Anlegen einer Spannung in Richtung der Anode auf.

Zwischen zwei Glasplatten wurde zunächst das Trenngel in einer Höhe von 5cm gegossen, wobei die in der Tabelle angegebenen Reagenzien gemischt und anschließend durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat zur Polymerisation angeregt werden.

Reagenz	Volumen
<i>aqua bidest</i>	3,5mL
4x-Trennpuffer (1,5mmol/L Tris, pH=8,8; 0,4% SDS)	2,5mL
(Bis)-Acrylamid (30%)	4,0mL
TEMED	10µL
Ammoniumpersulfat (10%)	100µL

Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenngels.

Das Trenngel wurde während der Polymerisation mit Ethanol p.a. (Merck, DE) überschichtet. Nach 30-Minütiger Inkubation wurde darauf nach Entfernung des Alkohols das Sammelgel angelegt und der Kamm für die Taschen in das noch flüssige Gel eingesetzt.

Reagenz	Volumen
<i>aqua bidest</i>	1,95mL
4x-Sammelbuffer (0,5mmol/L Tris, pH=6,8; 0,4% SDS)	0,75mL
(Bis)-Acrylamid (30%)	0,5mL
TEMED	3µL
Ammoniumpersulfat (10%)	30µL

Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels.

Nach erfolgter Aushärtung des Gels wurde dieses in die Laufkammer eingespannt, mit Tris-Glycin-Laufpuffer (Bio-Rad, USA) umspült und der Kamm entfernt. Die Laufkammern wurden nach Spülung mit Laufpuffer mit den kurz zuvor aufgekochten Proben (95°C für fünf Minuten) geladen (20µg pro Kammer), als Marker wurde die *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* verwendet (Thermo Scientific, USA).

Die Elektrophorese wurde in zwei Phasen durchgeführt: während der ersten 30 Minuten wurde mit einer Stromstärke von 30mA und unbegrenzter Spannung gearbeitet, anschließend wurde die Auftrennung eine Stunde mit einer Stromstärke von 60mA bei unbegrenzter Spannung fortgeführt.

Nach Abschluss der SDS-PAGE wurde der Laufpuffer verworfen, die Glasplatten voneinander getrennt, wobei das Gel auf einer Platte *in toto* zu liegen kam und anschließend das Western-Blotting vorbereitet.

Das Western-Blotting wurde im *semi-dry*-Verfahren unter Verwendung von Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen durchgeführt (Amersham Hybond P®, GE, USA). Prinzipiell wird hierbei das Protein elektrophoretisch aus dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen und durch nicht-kovalente Bindung immobilisiert, um der immunologischen Detektion zugänglich zu sein. Hierzu wurden zunächst Baumwoll-Filterpapiere (Bio-Rad, USA) und PVDF-Membran von der Größe des Trenngels zugeschnitten und in den jeweiligen Blotting-Puffern für mindestens fünf Minuten inkubiert (für die Puffer siehe Anhang). Die PVDF-Membran wurde vorher in Methanol (Merck, DE) 30s aktiviert und anschließend fünf Minuten in *aqua bidest* gewaschen. Das Western-Blotting-Sandwich wurde wie folgt aufgebaut:

<b>Anode</b>	
Anodenpuffer 2 (300mM Tris, 20% Methanol)	Filterpapier
Anodenpuffer 1 (30mM Tris, 20% Methanol)	Filterpapier
Anodenpuffer 1	PVDF-Membran
	Elektrophorese-Gel
Kathodenpuffer (25mM Tris, 40mM 6-Aminocaprinsäure, 20% Methanol)	Filterpapier
<b>Kathode</b>	

Tabelle 6: Aufbau des Western-Blotting-Sandwiches

Das Western-Blotting wurde in der Trans-Blot Turbo Kammer (Bio-Rad, USA) über 20 Minuten mit einer Stromstärke von 100mA und einer Spannung von maximal 25 Volt durchgeführt. Anschließend wurde die Membran entnommen, für 5 Minuten in *Tween-Tris-buffered solution* (im Folgenden TTBS genannt; 1% Tween20, 20mM Tris, 137mM NaCl, pH=7,6) gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit fünfprozentiger Magermilchpulver-TTBS-Lösung (im Folgenden als MMP bezeichnet; Bio-Rad, USA) geblockt.

Die Immunfärbung wurde anschließend in zwei Schritten durchgeführt, wobei zunächst ein Primärantikörper gegen das zu untersuchende Protein eingesetzt wurde (sofern nicht anders angegeben, in fünfprozentigem MMP angesetzt), welcher für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubierte, die anschließend dreimalig für fünf Minuten mit TTBS gewaschen wurde.

Danach wurde die Membran mit einem zweiten Antikörper, welcher spezifisch die F<sub>c</sub>-Region des Primärantikörpers bindet und zusätzlich an eine Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gebunden ist, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Waschung für jeweils zehn Minuten in TTBS wurde die Detektionsreaktion gestartet, bei der mittels der gekoppelten HRP die „*enhanced chemiluminescence reaction*“ (ECL) katalysiert wurde. Als Kit wurde das *Amersham ECL Western blotting reagent Kit* verwendet (GE, USA). Im Rahmen dieser Reaktion kommt es in alkalischem Milieu zu einer Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Die resultierende Chemolumineszenz ( $\lambda=428\text{nm}$ ) wird durch die Zugabe nicht näher veröffentlichter Phenole deutlich verstärkt und anschließend unter Verwendung von Autoradiografie-Filmen (Amersham Hyperfilm ECL, GE, USA) aufgezeichnet. Die geeignete Belichtungsdauer der Filme war für die verschiedenen Färbungen stets unterschiedlich und wurde empirisch bestimmt.

## 2.5 Untersuchung von Plasma und Zellkulturüberstand via ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von Zytokinen oder Peroxiredoxin-4 in Zellkulturüberstand oder murinem Plasma wurde die Technik des *enzyme-linked immunosorbent assay* (im Folgenden kurz als ELISA bezeichnet), welche erstmals durch AVRAMEAS und GUILBERT beschrieben wurde, angewandt [83].

Hierbei wird in einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol (Sigma-Aldrich, USA) ein Antikörper nichtkovalent adsorbiert (Fängerantikörper), die Platte anschließend durch Einsatz einer Albumin-haltigen Lösung gesättigt und anschließend mit den Proben oder Standardlösungen inkubiert. Nach Bindung der Antigene an den Fängerantikörper und Entfernung der Proben kann nach anschließender Waschung der Proben die Detektion des gebundenen Antigens erfolgen.

Hierzu wird ein zweiter, gegen ein weiteres Epitop des Antigens gerichteter Antikörper (Detektionsantikörper) verwendet. Nach Inkubation und weiterer Waschung kann durch Einsatz einer an Streptavidin gekoppelten Meerrettich-Peroxidase die Antigenkonzentration ermittelt werden (da Streptavidin zuverlässig die Biotin-Tags der Detektionsantikörper bindet). Als Substrat der Peroxidase kommt Tetramethylbenzidin (TMB; Life Systems, USA) zum Einsatz; dieses wird nach Zugabe enzymatisch in Tetramethylbenzidindiimin umgesetzt, welches eine kräftige Blaufärbung zeigt. Nach Unterbrechung der Reaktion durch Senkung des pH-Wertes kann die Absorption bei  $\lambda=450\text{nm}$  bestimmt werden. Die gleichzeitige Messung von Standardreihen ermöglicht anschließend die quantitative Bestimmung der in der Probe vorhandenen Zytokin-Konzentration.

In dieser Arbeit wurden für die Bestimmung von Cxcl1 und Tnf- $\alpha$  ELISA-Kits von Invitrogen (USA), für Il-1 $\beta$  Kits von R&D Systems (USA) und für Peroxiredoxin-4 Kits von antibodies-online (USA) verwendet. Die Konzentrationen von Antikörpern und Peroxidasen schwankten chargenabhängig und wurden entsprechend der jeweiligen Empfehlungen eingestellt.

Nach 24-stündiger Inkubation der Polystyrol-Mikrotiterplatten mit 100 $\mu\text{L}$  des in PBS (PAA, Österreich) gelösten Fängerantikörpers bei +4°C wurden die Wells anschließend mit 300 $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer (2,5g BSA + 0,5mL Tween20 *ad* 500mL PBS, pH = 7,4) abgeblockt. Die Proben und die gemäß den Herstellerangaben vorbereitete Standardreihe wurden anschließend in Duplikaten in einem Volumen von 100 $\mu\text{L}$  pro Well aufgetragen. Direkt hiernach wurden zu jeder Probe 50 $\mu\text{L}$  des in Reaktionspuffer angesetzten Detektionsantikörpers gegeben und anschließend die Mikrotiterplatte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal mit 400 $\mu\text{L}$  Waschpuffer (0,5mL Tween20 *ad* 500mL PBS, pH=7,4) gewaschen und nach Entfernung des Waschpuffers 100 $\mu\text{L}$  der in Reaktionspuffer angesetzten Streptavidin-HRP in jedes Well pipettiert.

Nach 30-minütiger Inkubation und anschließender erneuter fünfmaliger Waschung unter oben genannten Bedingungen wurden 100µL Tetramethylbenzidin-Lösung (Life Systems, USA) zu jeder Probe pipettiert und die Platte unter Lichtabschluss inkubiert. Die Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 100µL 0,9-molarer Schwefelsäure (Merck, DE) erfolgte, sobald sich in den Wells, welche die am höchsten konzentrierten Standardproben enthielten, ein blauer Niederschlag zu entwickeln begann.

Die Adsorption wurde im Plattenfotometer bei  $\lambda_1=450\text{nm}$  und  $\lambda_2=650\text{nm}$  gemessen und der Quotient  $\lambda_1/\lambda_2$  für die weitere Berechnung genutzt.

## 2.6 Messung der Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies mittels Durchflusszytometrie

Zur Messung der Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Reaktion auf inflammatorische Stimuli durch Makrophagen wurden diese zunächst in einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät ( $2 \times 10^5$  Zellen/Well) und anschließend nach 24-stündiger Kultur im Brutschrank mit dem ROS-sensitiven Farbstoff Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) gefärbt. Diese Substanz wird durch die Zellen aufgenommen und hydrolysiert, wobei das polare Dichlorofluorescein (DCFH), welches die Zellen nicht mehr verlassen kann, entsteht. In Gegenwart reaktiver Sauerstoffspezies, wie sie zum Beispiel im Rahmen des *oxidative burst* phagozytotisch aktiver Zellen gebildet werden, wird die oxidierte Form des Dichlorofluoresceins (DCF) gebildet, welche aufgrund ihrer Fluoreszenz detektiert werden kann, wobei die resultierende Fluoreszenz der gebildeten Menge reaktiver Sauerstoffspezies proportional ist [84].

Nach einstündiger Inkubation der Zellen mit 20µM DCFH-DA wurden die Zellen gewaschen und anschließend in farblosem Medium weiter inkubiert. Nach einer einstündigen Pause wurde die basale Fluoreszenz der Proben gemessen und anschließend entweder Lipopolysaccharid oder PBS zugegeben. Des Weiteren wurden sowohl ungefärbte Zellen untersucht und eine Positiv-Kontrolle in Form einer Behandlung mit Wasserstoffperoxid (10mM) durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde sofort und nach 30-minütiger Stimulation mittels Durchflusszytometer erfasst. Hierzu wurden die Zellen im FACSCalibur-Durchflusszytometer (BD Biosciences, USA) gescannt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Exzitationswellenlänge von  $\lambda=485\text{nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda=530\text{nm}$  gemessen.

## 2.7 Untersuchung der Ko-Lokalisation von Proteinen mittels CLSM

Das Prinzip „*confocal laser-scanning microscopy*“ (CLSM) stellt im Wesentlichen eine Erweiterung der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie dar. Antigene fixierter Zellen oder Gewebeproben werden hierbei mit Antikörpern markiert, welche wiederum durch den Einsatz von Sekundärantikörpern, die an Fluorophore konjugiert sind, sichtbar gemacht werden. Die Betrachtung erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop, welches im Auflichtverfahren die Proben mit Licht einer definierten Exzitationswellenlänge bestrahlt und die emittierte Fluoreszenz mittels einer CCD-Kamera auffängt.

*Prdx<sup>-/-</sup>*-Makrophagen wurden kultiviert und anschließend in einer Zellzahl von 25.000/Well auf Objektträgern mit Zellkulturaufsatz (*lab-tek chamber slides* (NUNC, USA)). Nach Stimulation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 37°C warmem PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten in vierprozentiger para-Formaldehyd-Lösung (pH=7,4, Merck, DE) fixiert. Hiernach erfolgte die Blockade der F<sub>c</sub>-Rezeptoren der Makrophagen mittels Applikation von 100µL anti-CD-16/32-Antikörper (*CD16/32-Fc-blocking solution* (BD, USA)). 100µL der Primärantikörper-Lösung wurden anschließend für eine Stunde auf die Proben gegeben (1/100 verdünnt in 0,75% BSA + 0,1% Triton-X (Sigma-Aldrich, USA)). Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten wurde anschließend der Sekundärantikörper unter gleichen Bedingungen (jedoch 1/500 verdünnt) hinzugegeben. Nach abschließender einmaliger Waschung wurden die Deckgläschen unter Zugabe des *semipermanent fluorescence mounting medium* (DAKO, Dänemark) aufgelegt. Für die Auswertung wurde das TCS SP5 AOBS von Leica (DE) eingesetzt.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Software PRISM 5 (GraphPad Software, USA). Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte Student's-t-Test inklusive Welch-Korrektur eingesetzt. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Phänotypisierung der $Prdx4^{-/Y}$ und der $Prdx4^{\Delta M\Phi/Y}$ Maus

Im Rahmen der Phänotypisierung der Peroxiredoxin-4 Knockout-Maus wurde zunächst nach einem geeigneten *in vivo*-Krankheitsmodell gesucht, in welchem sich der Einfluss von Peroxiredoxin-4 untersuchen ließ. Nachdem zuvor ein Colitis-Modell unter Verwendung von Dextrannatriumsulfat (DSS) durchgeführt wurde, in welchem sich ein signifikanter Phänotyp zeigte, und zusätzlich durchgeführte *in vitro*-Studien ergeben haben, dass die Expression von Peroxiredoxin-4 in RAW246.7-Zellen (murine, virus-immortalisierte Makrophagen) in Anwesenheit von proinflammatorischen Stimuli, wie zum Beispiel LPS, Tnf- $\alpha$  oder Ifn- $\gamma$  gesteigert wird (nicht in dieser Arbeit gezeigt), wurde die Durchführung eines LPS-vermittelten Endotoxin-Schocks als sinnvoll angesehen. In diesem Modell sollten die Alterationen der Aktivierung von myeloiden Immunzellen und die Auswirkung auf die systemische Immunreaktion der Versuchstiere studiert werden.

##### 3.1.1 LPS-Endotoxin-Schock im konstitutiven Knockout-Modell

Zunächst wurden sechs bis acht Wochen alte  $Prdx4^{-/Y}$  und  $Prdx4^{+/Y}$ -Mäuse in vier Versuchsgruppen aufgeteilt und entweder einer intraperitonealen Injektion mit 4,5 $\mu$ g/g LPS in einem Volumen von 250 $\mu$ L PBS oder aber einer Injektion von 250 $\mu$ L PBS unterzogen.

Gruppe	1. Injektion von LPS		2. Injektion von PBS	
	$Prdx4^{+/Y}$	$Prdx4^{-/Y}$	$Prdx4^{+/Y}$	$Prdx4^{-/Y}$
Anzahl Tiere	7	7	7	7

Tabelle 7: Versuchsgruppen für die intraperitoneale LPS-Injektion

Nach Versuchsbeginn wurden die Tiere engmaschig überwacht und das Körpergewicht mindestens alle sechs Stunden erfasst. Auf die Darstellung der Gewichtsentwicklung der mit PBS behandelten Kontrolltiere wurde aus Gründen der Übersicht verzichtet, es sei jedoch erwähnt, dass es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren in dieser Kohorte kam und innerhalb der Kohorten keine relevante Gewichtsveränderung während der Versuchsdauer festgestellt wurde.

In der Versuchsgruppe der Wildtyp-Tiere begann sich eine negative Entwicklung des Körpergewichtes erstmals nach 8 Stunden zu manifestieren. Dieser Trend ließ sich bis zu einem Zeitpunkt von 40 Stunden *post injectionem* verfolgen, zu welchem dann der Nadir (im Mittel 90,34% des ursprünglichen Körpergewichtes) erreicht wurde. Im weiteren Verlauf des Versuchs nahm das Körpergewicht der Wildtyp-Tiere kontinuierlich zu, so dass zum Abbruchzeitpunkt ein mittleres Körpergewicht von 98,14% des ursprünglichen Wertes erreicht wurde.

Im Gegensatz hierzu setzte der messbare Gewichtsverlust der Knockout-Tiere bereits nach vier Stunden ein und erreichte nach 32 Stunden Versuchsdauer eine statistische Signifikanz gegenüber den Wildtyp-Tieren ( $p=0,0175$ ). Hiernach hielt sich das Körpergewicht für eine Dauer von 28 Stunden auf einem weitgehend unveränderten Niveau von minimal 86,38% des ursprünglichen Wertes, um anschließend erneut anzusteigen. Bei Versuchsende wurde ein durchschnittliches relatives Körpergewicht von 90,6% des ursprünglichen Wertes erreicht. Der Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren war ab dem Zeitpunkt von 32 Stunden *post injectionem* stets statistisch signifikant, wobei das Signifikanzniveau ab dem Zeitpunkt von 44 Stunden einen Wert von  $p<0,01$  und ab 60 Stunden einen Wert von  $p<0,001$  erreichte.

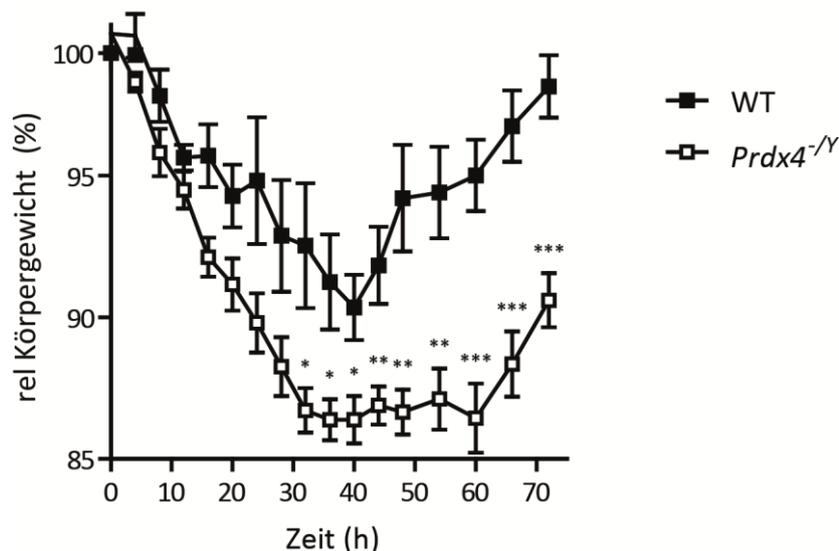


Abbildung 2: Entwicklung des relativen Körpergewichts nach LPS-Injektion. WT: Wildtyp (*Prdx4*<sup>+/-</sup>). \*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ .

Zusätzlich wurde einer weiteren Kohorte von jeweils vier Versuchstieren Lipopolysaccharid intraperitoneal injiziert und diese dann nach einer Beobachtungszeit von 24 Stunden mittels cervicaler Dyslokation euthanasiert. Anschließend wurde den Tieren Blut mittels Herzpunktion entnommen und aus diesem ein Heparinat-Plasma durch Zentrifugation in Lithium-Heparinat-Microvetten erzeugt. Die Proben wurden anschließend mittels ELISA auf die Konzentration der Zytokine Interleukin-1 $\beta$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und des Chemokins Cxcl1 hin untersucht. Eine Probe aus der Kohorte der Knockout-Tiere wurde aufgrund einer Hämolyse des Probenmaterials ausgeschlossen.

Die Analyse ergab, dass nach 24 Stunden die Plasmaspiegel von allen untersuchten Botenstoffen in den Knockout-Mäusen signifikant erhöht waren. Für Interleukin-1 $\beta$  wurde ein mittlerer Plasmaspiegel von 102,25pg/mL (Wildtyp) und 263pg/mL (Knockout) gemessen ( $p<0,0001$ ). Für Tnf- $\alpha$  ergaben sich Mittelwerte von 56,5pg/mL (Wildtyp) und 207pg/mL (Knockout) ( $p=0,0021$ ) und für Cxcl1 von 8274,25pg/mL (Wildtyp) und 13115pg/mL (Knockout) ( $p=0,0038$ ).

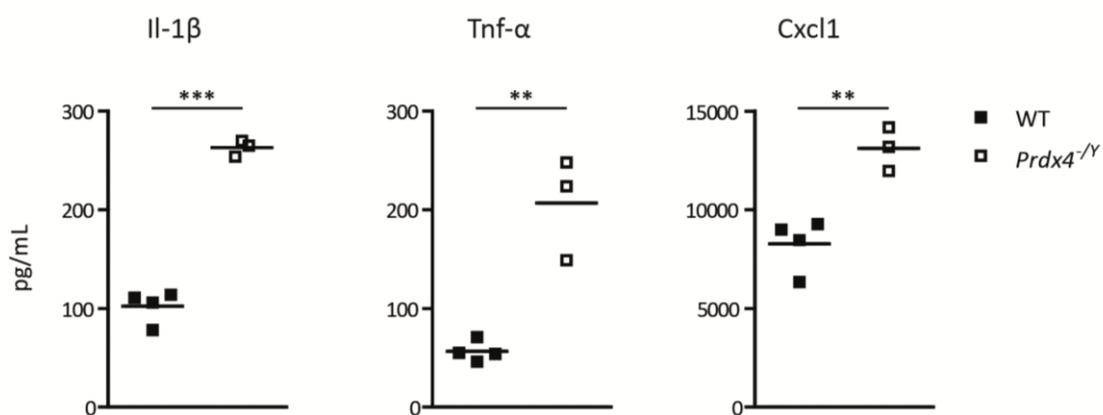


Abbildung 3: Bestimmung der Plasmakonzentration inflammatorischer Zytokine. Entnahme des Probenmaterials nach 24 Stunden durch Herzpunktion.

### 3.1.2 LPS-Endotoxin-Schock im konstitutiven Knockout-Modell unter Gabe von Anakinra

Nachdem die Injektion von LPS einen ausgeprägten Phänotyp in *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Mäusen ergeben hatte, wurde nun zur Klärung der Frage, inwiefern Interleukin-1 $\beta$  hierfür *in vivo* eine Rolle spielt, der vorherige Versuch erweitert.

Zusätzlich zu einer Kohorte von Tieren, die mit Lipopolysaccharid intraperitoneal behandelt wurden, wurde eine weitere Versuchsgruppe mit dem kommerziell erhältlichen rekombinanten Interleukin1-Rezeptorantagonist Anakinra behandelt. Dieser bindet an die extrazelluläre Domäne des Interleukin1-Rezeptors und verhindert dadurch die Bindung der beiden Liganden IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [85]. Hierdurch sollten die Mäuse vor der Wirkung der nachgewiesenen, stark erhöhten Plasmaspiegel des Interleukin-1 $\beta$  geschützt werden, um zu evaluieren, inwiefern diese für den Phänotyp ursächlich sind.

Gruppe	1. Injektion von LPS		2. Injektion von LPS und Anakinra	
	<i>Prdx4</i> <sup>+/-</sup>	<i>Prdx4</i> <sup>-/-</sup>	<i>Prdx4</i> <sup>+/-</sup>	<i>Prdx4</i> <sup>-/-</sup>
Genotyp	<i>Prdx4</i> <sup>+/-</sup>	<i>Prdx4</i> <sup>-/-</sup>	<i>Prdx4</i> <sup>+/-</sup>	<i>Prdx4</i> <sup>-/-</sup>
Anzahl Tiere	7	7	7	7

Tabelle 8: Versuchsgruppen für die intraperitoneale LPS-Injektion unter Anakinra-Therapie

30 Minuten nach der erstmaligen Injektion von Anakinra wurde den Versuchstieren Lipopolysaccharid injiziert. Hiernach setzte in allen Gruppen bereits nach 6 Stunden ein messbarer Gewichtsverlust ein. Nach achtzehn Stunden zeigte sich erstmals ein stärkerer Gewichtsverlust der nur mit LPS behandelten *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Tiere ( $p=0,054$ ), nach 24 Stunden erreichte diese Versuchskohorte einen signifikanten Gewichtsverlust im Vergleich zu den restlichen Kohorten (mittlerer relativer Gewichtsverlust: 88,52%,  $p=0,0004$ ). Dieses Signifikanzniveau wurde anschließend über den gesamten weiteren Beobachtungszeitraum hinweg erhalten, zusätzlich zeigte sich bis zuletzt ein progredienter Gewichtsverlust mit einem mittleren relativen Körpergewicht von 83,78% ( $p<0,0001$ ). Unter Anakinra-Behandlung zeigte sich in den Knockout-Tieren zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zu den Wildtyp-Tieren, unabhängig ob hier eine Behandlung mit Anakinra stattgefunden hat; für das mittlere relative Körpergewicht wurde nach 36 Stunden ein Wert von 93,5% ermittelt.

Die übrigen Versuchsgruppen durchschritten ebenfalls nach einer Versuchsdauer von 36 Stunden den Nadir des relativen Körpergewichtes und nahmen bis zum Ende des Versuchs anschließend zu, wobei im Mittel ein relatives Körpergewicht von 94,9% (Wildtyp) und 96,0% (Wildtyp unter Anakinra-Behandlung) gemessen wurde.

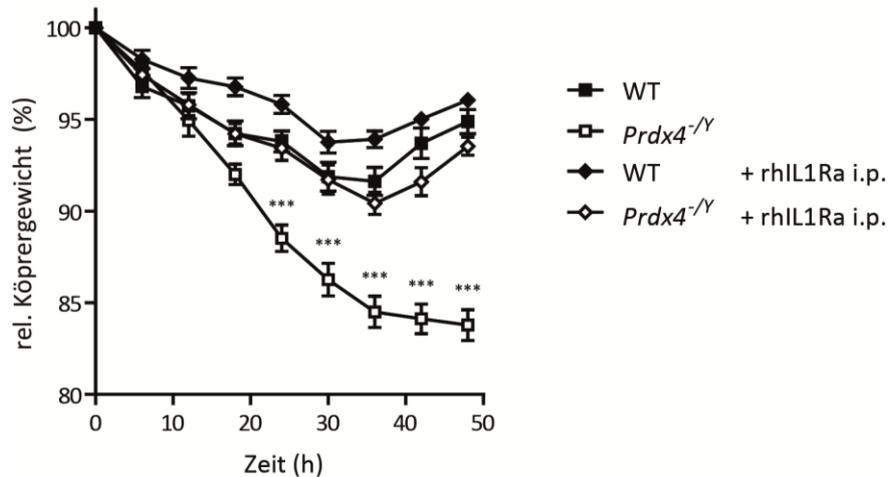


Abbildung 4: Entwicklung des relativen Körpergewichts nach LPS- und Anakinra-Injektion. Die Entwicklung der unbehandelten *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Tiere ist der des Vorversuches vergleichbar. rhIL1Ra: Anakinra.

Nach durchgeführter cervikaler Dyslokation der Tiere und anschließender Blutentnahme wurde den Tieren die Milz entnommen und das Gewicht erfasst. Das mittlere Milzgewicht der mit LPS behandelten Wildtyp-Tiere lag bei 129,4mg. Die entsprechenden Knockout-Tiere präsentierten vergrößerte Organe, hier lag das mittlere Gewicht bei 230mg ( $p=0,0002$ ). Unter Anakinra-Therapie konnte für das Milzgewicht ein Mittelwert von 103,8mg (Wildtyp) und von 124,8mg (Knockout) ermittelt werden ( $p=0,070$ ).

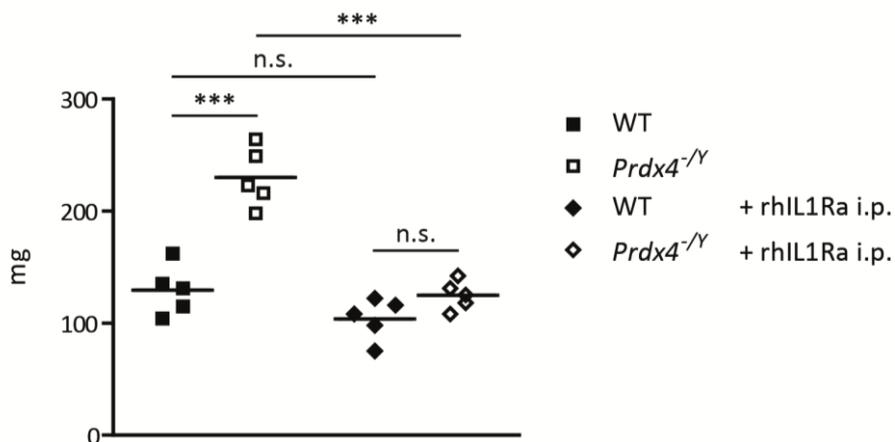


Abbildung 5: Untersuchung des Milzgewichtes nach LPS- und Anakinra-Injektion.

Das Ausmaß der Milzvergrößerung korrelierte in diesem Experiment gut mit dem relativen Gewichtsverlust, dies spiegelte sich insbesondere im Vergleich der mit Anakinra behandelten und der unbehandelten Knockout-Tiere wider. Durch die Anakinra-Therapie konnte das Milzgewicht signifikant reduziert werden ( $p<0,0001$ ).

Auch in diesem Experiment wurde aus dem gewonnenen Blut ein Heparinat-Plasma generiert und anschließend mittels ELISA untersucht. Im Vergleich zwischen den Versuchstieren, die nicht der Anakinra-Therapie unterzogen wurden, zeigten sich zu der oben geschilderten Untersuchung vergleichbare Ergebnisse. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auf eine erneute ausführliche Beschreibung verzichtet. In den behandelten Mäusen wurden für Interleukin-1 $\beta$  mittlere Plasmaspiegel von 149pg/mL (Wildtyp) und 240,6pg/mL (Knockout) gemessen ( $p=0,037$ ). Für Tnf- $\alpha$  ergaben sich Werte von 122,4pg/mL (Wildtyp) und 183,2pg/mL (Knockout) ( $p=0,049$ ) und für Cxcl1 wurden Mittelwerte von 3391,8pg/mL (Wildtyp) und 4883pg/mL (Knockout) erfasst ( $p=0,029$ ). Interessant ist hierbei auch der Vergleich zwischen den Therapiegruppen: während sich in den Wildtyp-Tieren keine statistisch signifikante Reduktion der Zytokinproduktion nachweisen ließ, führte die Behandlung durch den Rezeptorantagonisten in den Knockout-Tieren zu einer hochsignifikanten Minderung der Produktion aller gemessenen Botenstoffe ( $p(\text{Interleukin-1}\beta)<0,0001$ ;  $p(\text{Tnf-}\alpha)=0,027$ ;  $p(\text{Cxcl1})=0,0003$ ).

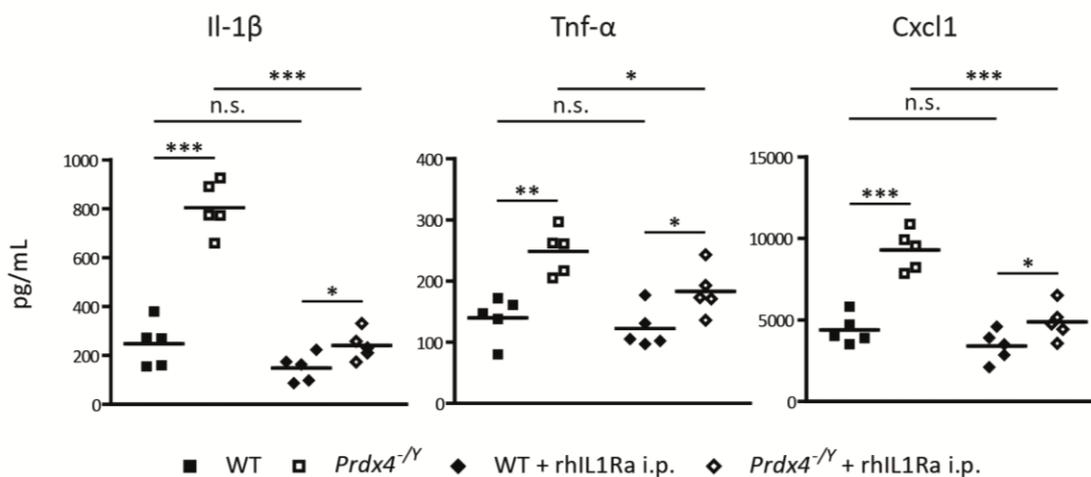


Abbildung 6: Bestimmung der Plasmakonzentration inflammatorischer Zytokine.

### 3.1.3 LPS-Endotoxin-Schock im konditionalen Knockout-Modell

Auch das in Kapitel 2.1.2 beschriebene konditionale Knockout-Maus-Modell, in welchem sich der genetische Knockout von Peroxiredoxin-4 auf myeloide Zellen beschränkt, wurde mittels intraperitonealer LPS-Injektion charakterisiert. Hierzu wurden die in der folgenden Tabelle beschriebenen Versuchsgruppen gebildet.

Genotyp	<i>Prdx4</i> <sup>fl/y</sup>	<i>Prdx4</i> <sup>ΔMΦ/y</sup>
Anzahl Tiere	7	7

Tabelle 9: Versuchsgruppen für die intraperitoneale LPS-Injektion im konditionalen Knockout.

Nach intraperitonealer Applikation von Lipopolysaccharid entwickelte sich das mittlere relative Körpergewicht in beiden Versuchsgruppen mit Ausnahme eines als Messfehler betrachteten Ausreißers der Knockout-Tiere nach achtzehn Stunden weitgehend gleichartig. Während die Wildtyp-Tiere nach 30 Stunden aber bereits wieder zunehmende Körpergewichte präsentierten, fielen die gemessenen Werte in der Knockout-Kohorte weiter deutlich ab und erreichten nach 36 Stunden einen Wert von 86,45% des Ausgangswertes (Wildtyp-Tiere: 94,71% ( $p=0,0074$ )). Dieser Trend setzte sich bis zum Ende des Versuchs fort, nach 48 Stunden wurde für die Knockout-Tiere ein mittleres relatives Gewicht von 84,69% bestimmt (Wildtyp-Tiere: 96,34% ( $p=0,0001$ )).

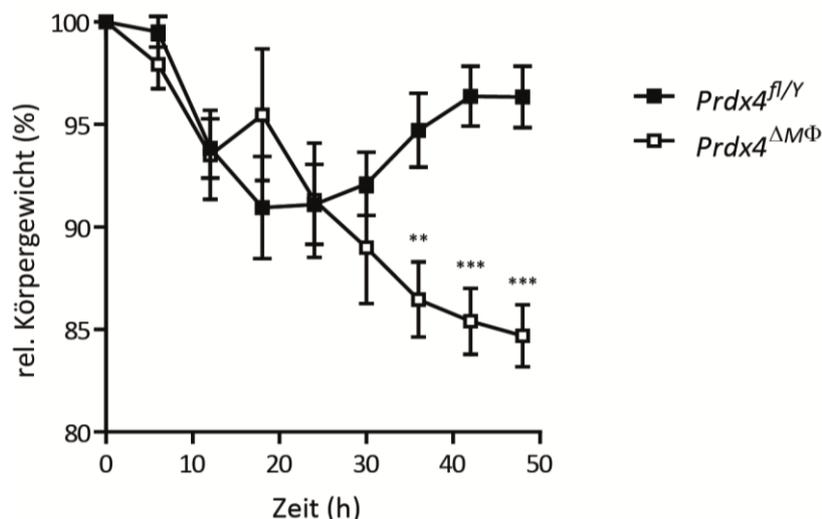


Abbildung 7: Entwicklung des relativen Körpergewichts in *Prdx4*<sup>ΔMΦ/y</sup>-Mäusen.

Postmortal wurde auch hier das Gewicht der entnommenen Milzen bestimmt, der Mittelwert innerhalb der Wildtyp-Tiere lag bei 138mg, in der Knockout-Gruppe wurde ein Mittelwert von 101,857mg erhoben ( $p=0,152$ ). Auffällig war, dass – obgleich keine statistische Signifikanz erreicht wurde – die *Prdx4*<sup>ΔMΦ/y</sup>-Tiere tendenziell leichtere Milzen aufwiesen.

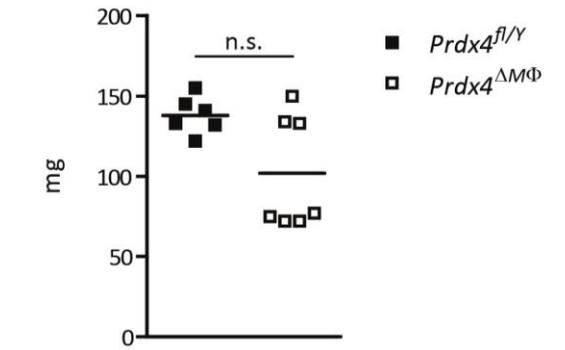


Abbildung 8: Untersuchung des Milzgewichtes nach LPS-Injektion in  $Prdx4^{\Delta M\Phi/y}$ -Mäusen.

In der durchgeführten Untersuchung der Zytokinspiegel im Plasma präsentierten sich den Beobachtungen aus den Untersuchungen des konstitutiven Knockouts vergleichbare Ergebnisse. Die  $Prdx4^{\Delta M\Phi/y}$ -Tiere produzierten alle untersuchten Zytokine in signifikant höherem Maßstab. Für Interleukin-1 $\beta$  wurde im Knockout ein mittlerer Spiegel von 692,3pg/mL gemessen (Wildtyp: 375,43pg/mL ( $p=0,0004$ )), für Tnf- $\alpha$  ergab sich ein Durchschnitt von 226,8pg/mL (Wildtyp: 149,3pg/mL ( $p=0,011$ )) und für Cxcl1 konnte ein mittlerer Spiegel von 8226pg/mL bestimmt werden (Wildtyp: 6358,3pg/mL ( $p=0,024$ )).

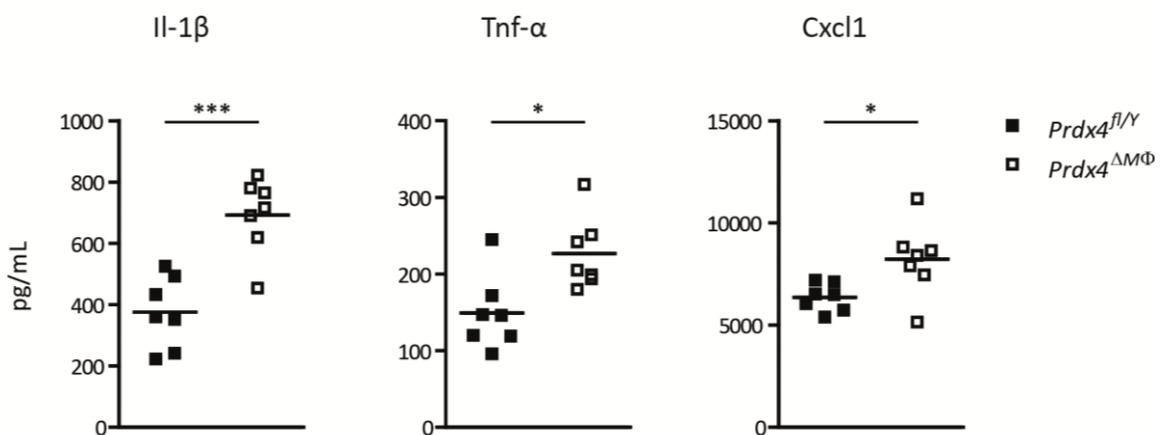


Abbildung 9: Bestimmung der Plasmakonzentration inflammatorischer Zytokine in  $Prdx4^{\Delta M\Phi/y}$ -Mäusen.

### 3.2 Charakterisierung des Einflusses von Prdx4 auf murine Makrophagen

Nachdem die durchgeführten *in vivo*-Endotoxin-Modelle einen ausgeprägten Phänotyp der Peroxiredoxin-4-defizienten Mäuse aufgezeigt haben, wurde nun zur Klärung der zu Grunde liegenden Mechanismen der deutlich gesteigerten Entzündungsantwort und der resultierenden relativ stärkeren klinischen Beeinträchtigung ein *in vitro*-Modell etabliert.

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, gelten Makrophagen als zentrale Mediatoren der Immunantwort im Rahmen der intraperitonealen Lipopolysaccharid-Injektion und des daraus resultierenden SIRS, da diese die Zytokinproduktion nach Bindung des Endotoxins initiieren. Aufgrund der hohen Ausbeute und Qualität wurden für die folgenden Experimente Makrophagenkulturen durch Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen des Knochenmarks mittels des Wachstumsfaktors rmM-CSF erzeugt.

### 3.2.1 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B

Da der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B als ein Ziel des TLR4-Signalweges relevanten Einfluss auf die Entzündungsantwort von Makrophagen, die mit Lipopolysaccharid in Berührung kommen, hat, wurde zunächst untersucht, inwiefern sich die Aktivierung dieses Signalweges in Abwesenheit von Peroxiredoxin-4 verändert. Hierzu wurden *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen und entsprechende Wildtyp-Kontrollen mit 100ng/mL Lipopolysaccharid stimuliert und die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Nach der Herstellung von Proteinlysaten und anschließendem Western-Blotting wurde die Aktivierung von NF- $\kappa$ B mittels der Phosphorylierung der p65-Untereinheit und der Degradation des Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$  untersucht. Zusätzlich wurde der Knockout auf Protein-Ebene validiert.

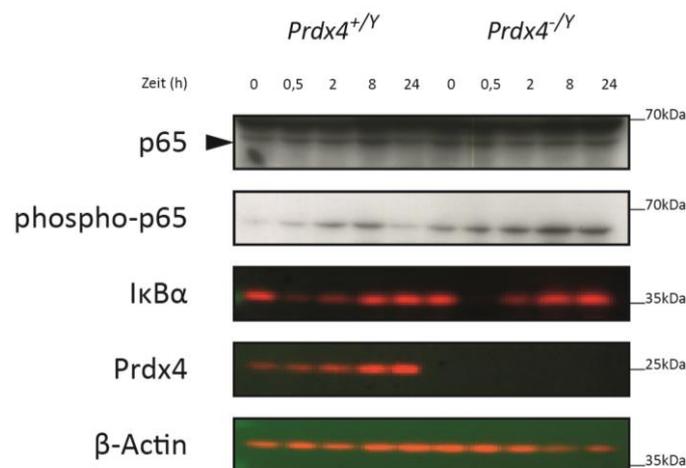


Abbildung 10: WB-Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in BMDM. Die Stimulationszeitpunkte sind in Stunden angegeben.

Es war zu erkennen, dass die defizienten Makrophagen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen eine gesteigerte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges, gemessen an der einerseits früher einsetzenden und andererseits stärker ausgeprägten Phosphorylierung von p65 und an der gesteigerten Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ , aufwiesen. Während *Prdx4*<sup>+/-</sup>-Zellen nach 24 Stunden bereits eine Abnahme des phospho-p65-Levels präsentierten, war dieses in *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Zellen auch zu diesem Zeitpunkt weiterhin stark erhöht. Des Weiteren zeigte sich in den Wildtyp-Proben, dass Peroxiredoxin-4 von den Zellen im Rahmen der Entzündungsantwort selbst erst in größeren Mengen gebildet wird. In den Proben der Knockout-Makrophagen ließ sich erwartungsgemäß kein Peroxiredoxin-4 nachweisen, was die Vollständigkeit des genetischen Knockouts demonstriert.

### 3.2.2 Aktivierung der Caspase-1

Nachdem im *in vivo*-Modell die Abwesenheit von Peroxiredoxin-4 zu stark erhöhten Spiegeln von Interleukin-1 $\beta$  im Plasma der Versuchstiere führte und der Phänotyp der Tiere zuverlässig durch die Blockade der Wirkung dieses Zytokins durch Anakinra gebessert werden konnte, wurde auf zellulärer Ebene untersucht, inwiefern die *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen zu einer gesteigerten Aktivierung der Caspase-1 durch das Inflammasom neigen. Hierzu wurden die Makrophagen wieder mit 100ng/mL LPS stimuliert und zu den gleichen Zeitpunkten Proben geerntet. Die Aufarbeitung der Proben erfolgt analog zu dem vorherigen Versuch. Anschließend wurde die proteolytische Aktivierung der 45kDa großen Procaspase-1 mittels des Nachweises der freien p10-Untereinheit untersucht.

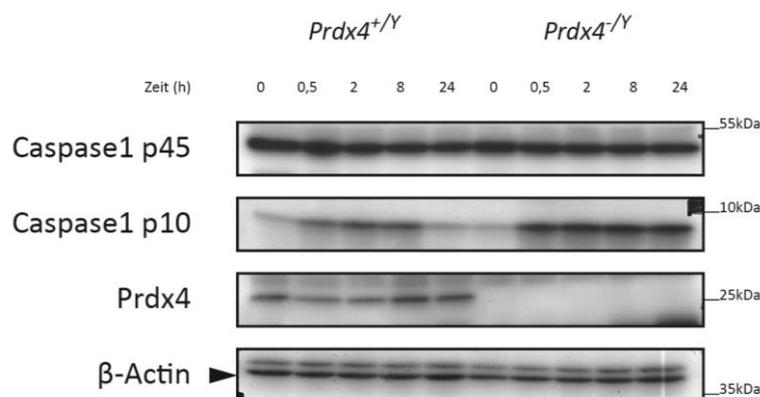


Abbildung 11: WB-Untersuchung der Caspase-1-Aktivierung in BMDM. Die Stimulationszeitpunkte sind in Stunden angegeben.

Bei vergleichbarem Niveau der Procaspase-1 (p45) zeigte sich nach Stimulation mit Lipopolysaccharid ein Unterschied in der Aktivierung der Caspase-1 zwischen Wildtyp- und Knockout-Zellen. In Abwesenheit von Peroxiredoxin-4 befand sich diese bereits nach 30 Minuten auf einem starken Niveau. Dieses wurde auch über 24 Stunden hinweg aufrechterhalten. Die Wildtyp-Zellen hingegen zeigten eine relativ schwächere Aktivierung und darüber hinaus auch ein Sistieren der Signalantwort nach 24 Stunden. Die Induktion von Peroxiredoxin-4 nach der Stimulation wurde ebenfalls erkennbar.

### 3.2.3 Einfluss von Prdx4 auf die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren

Die Zytokinproduktion der Makrophagen-Kulturen, die in den zuvor beschriebenen Experimenten Verwendung fanden, wurde mittels ELISA quantifiziert. Hierzu wurden die Überstände von mindestens 4 wiederholten, unabhängigen Experimenten pro Gruppe zunächst für 10 Minuten bei 4°C und 300g zentrifugiert, um eventuell aufgenommene Zellen zu entfernen und anschließend der Analyse zugeführt.

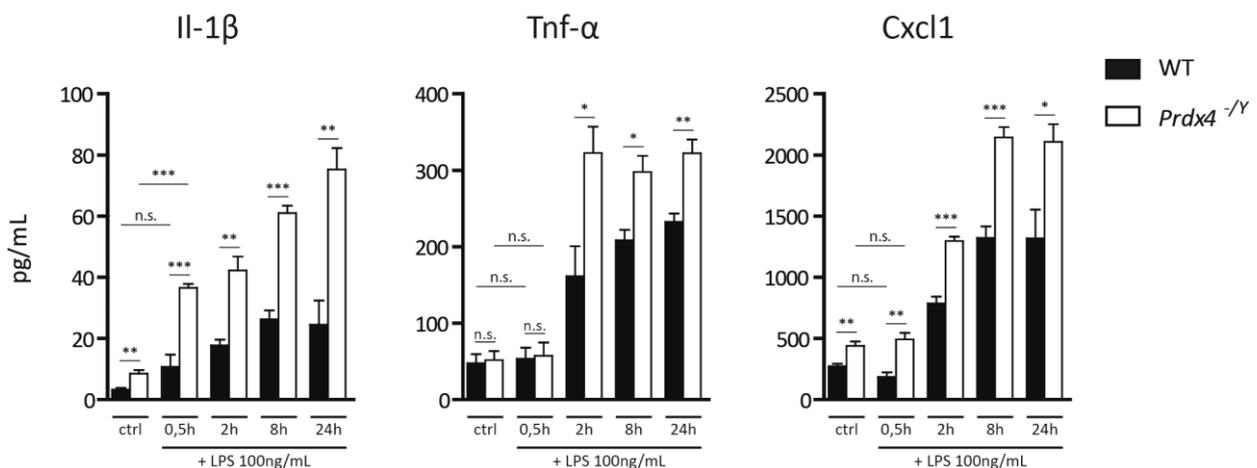


Abbildung 12: ELISA-Untersuchung der Zytokin-Freisetzung in BMDM nach LPS-Stimulation (n=4).

Die Untersuchung der Überstände ergab bereits unter basalen Bedingungen einen signifikanten Unterschied der Konzentrationen von Interleukin-1β ( $p=0,008$ ) und Cxcl1 ( $p=0,0073$ ), während sich für Tnf-α keine signifikanten Differenzen ergaben. Bereits nach halbstündiger Stimulation mit Lipopolysaccharid konnte im Knockout ein hochsignifikanter Anstieg der Interleukin-1β-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden ( $p<0,0001$ ).

Dieser Effekt war auf dieses Zytokin limitiert und fand sich darüber hinaus nicht in den Wildtyp-Proben, obgleich die Cxcl1-Spiegel in Knockout und Wildtyp nach halbstündiger Inkubation signifikant unterschiedlich waren ( $p=0,0031$ ). Im weiteren Zeitverlauf erreichte der Unterschied der Tnf- $\alpha$ -Konzentrationen nach zwei Stunden ebenfalls Signifikanz ( $p=0,0211$ ). Bis zum Zeitpunkt von 24 Stunden zeigten sich signifikant erhöhte Zytokinspiegel in Abwesenheit von Peroxiredoxin-4, am deutlichsten unterschieden sich die Werte zwischen den Genotypen für Il-1 $\beta$  ( $Prdx4^{+/Y}=24,5\text{pg/mL}$ ,  $Prdx4^{-/Y}=75,25\text{pg/mL}$ ;  $p=0,003$ ).

Die gewonnenen Erkenntnisse führten zu einer Modifikation des Experiments dahingehend, dass nach einer 24-stündigen Behandlung mit Lipopolysaccharid (100ng/mL) eine Stimulation mit Adenosintriphosphat (ATP) angeschlossen wurde (100 $\mu\text{mol/L}$ ). Der Einfluss von ATP, welches das Inflammasom mittels des P2X7-Purinorezeptors aktiviert, wurde in Kapitel 1.3.1 bereits erläutert.

Zusätzlich zu den drei bisher stets durchgeführten ELISA für die Proteine Il-1 $\beta$ , Tnf- $\alpha$  und Cxcl1 wurde zusätzlich die extrazelluläre Prdx4-Konzentration gemessen. „Ctrl“ bezeichnet in dieser Abbildung unbehandelte Zellen, „0h“ steht für Makrophagen, die lediglich mit Lipopolysaccharid behandelt wurden und alle weiteren Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer der zusätzlich durchgeführten ATP-Stimulation.

Die Ergebnisse der beiden erstgenannten Versuchsgruppen werden nicht erneut beschrieben. Nach einstündiger Behandlung mit ATP kam es in den Knockout-Zellen im Gegensatz zu den Wildtyp-Kontrollen bereits zu einer Signifikanten Erhöhung der Interleukin-1 $\beta$ -Sekretion ( $p=0,0089$ ), ein derartiger Anstieg war für Tnf- $\alpha$  und Cxcl1 nicht zu verzeichnen.

Für alle weiteren Zeitpunkte und Zytokine wurde zwischen den Gruppen eine Signifikanz erhalten, nach sechsständiger Stimulation konnten deutliche Unterschiede in den Konzentrationen der freigesetzten Entzündungsmediatoren gesehen werden: für Il-1 $\beta$  wurden im Wildtyp Mittelwerte von 133pg/mL erfasst, im Knockout von 390,75pg/mL ( $p=0,0007$ ), Tnf- $\alpha$  konnte im Wildtyp im Mittel auf 62,75pg/mL bestimmt werden, der Knockout ergab hier 209,5pg/mL ( $p=0,0067$ ). Die Messung von Cxcl1 zeigte durchschnittlich 2953pg/mL, in Abwesenheit von Prdx4 lag dieser Wert bei 10243,5pg/mL ( $p=0,0287$ ).

Die Quantifizierung von Peroxiredoxin-4 ergab in den Knockout-Proben erwartungsgemäß Werte, die unterhalb der vom Hersteller empfohlenen Nachweisgrenze von 30pg/mL lagen.

In den Wildtyp-Proben zeigte sich allerdings eine hochsignifikante Steigerung der Sekretion von Peroxiredoxin-4 durch LPS-Stimulation: während die unstimulierten Zellen nach 24 Stunden im Mittel 400,25pg/mL in das Medium abgaben, ergab sich nach LPS-Stimulation eine Steigerung auf durchschnittlich 1499,5pg/mL ( $p=0,0008$ ).

Durch Zugabe von Adenosintriphosphat konnte die Freisetzung abermals gesteigert werden, bereits nach einstündiger Stimulation wurden im Mittel 2657pg/mL bestimmt ( $p=0,0374$ ). Nach sechsständiger ATP-Behandlung waren Werte von 3983,75pg/mL zu messen (das Signifikanzniveau für drei und sechs Stunden ATP-Behandlung wird nicht dargestellt).

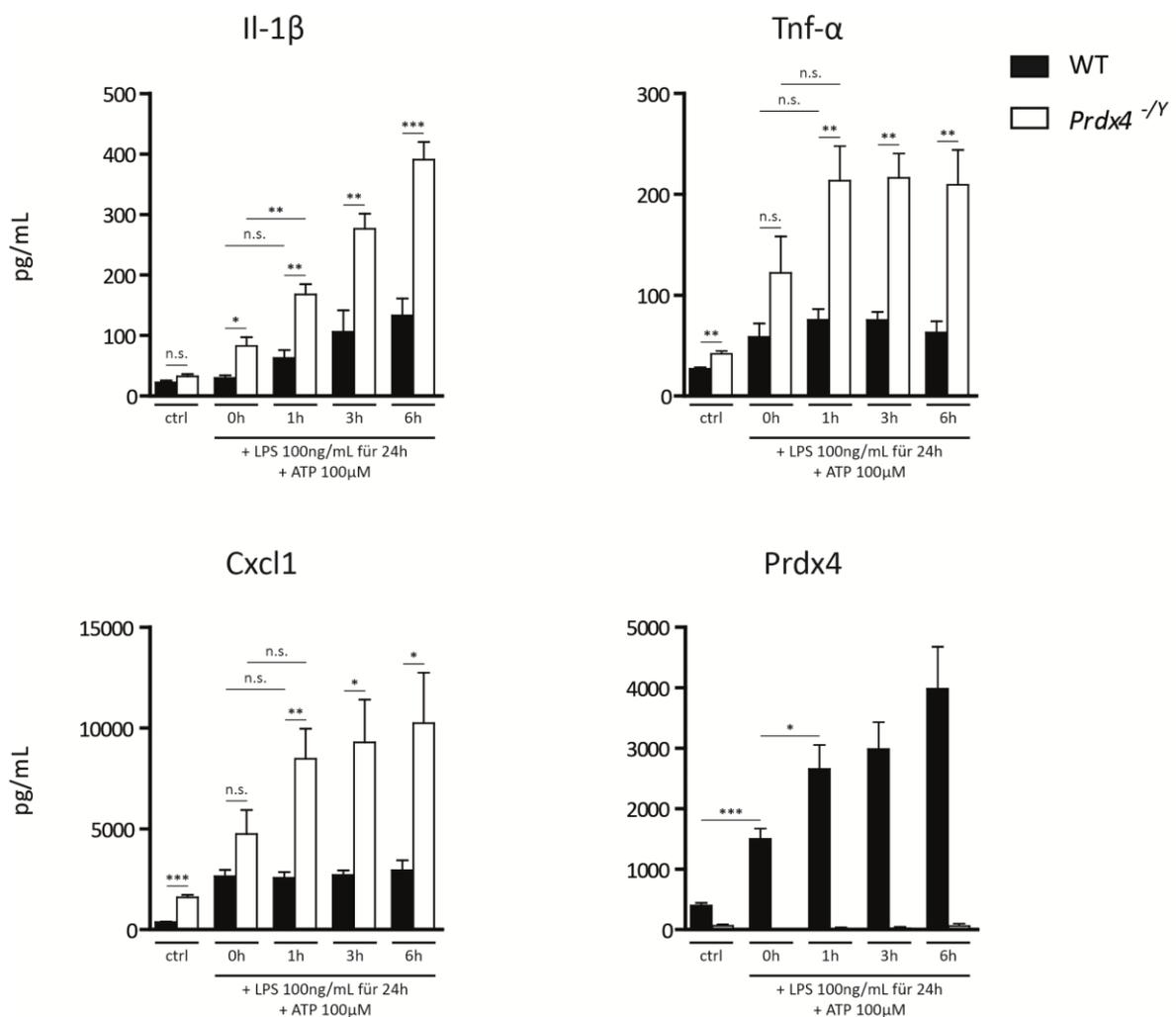


Abbildung 13: ELISA-Untersuchung der Zytokin-Freisetzung in BMDM nach LPS- und ATP-Stimulation (n=4).

### 3.2.4 Expression des NLRP3-Inflammasoms nach Stimulation mit Lipopolysaccharid

Die Expression der hauptsächlich am Aufbau des NLRP3-Inflammasoms beteiligten Gene wurde mittels vollquantitativer *real-time* PCR unter Verwendung der SYBR-Green Technologie ausgewertet. Hierzu wurden Makrophagen für 24 Stunden mit 100ng/mL LPS stimuliert und anschließend die RNA isoliert und eine cDNA generiert.

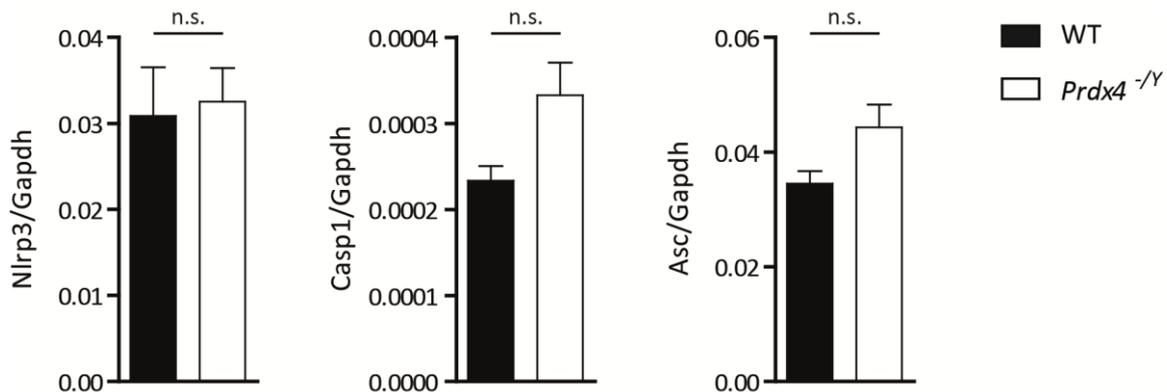


Abbildung 14: Untersuchung der Genexpression von *Nlrp3*, *Asc* und *Casp1* in BMDM (n=4).

Hier werden aus Gründen der Übersicht lediglich die Ergebnisse für die Komponenten des NLRP3-Inflammasoms gezeigt, es sei jedoch erwähnt, dass auch die Expressionsanalyse weiterer NLR, die üblicherweise an der Bildung von Inflammasomen beteiligt sind, vergleichbare Ergebnisse erbrachte.

Die Expression der entsprechenden mRNA wurde auf die des konstitutiv exprimierten „housekeeping“-Enzyms *glycerine-3-aldehyde dehydrogenase (Gapdh)* normiert und als relative Expression dargestellt.

Auch wenn dies aufgrund der vormals gezeigten, stärkeren Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B vielleicht zu erwarten gewesen wäre, unterschied sich die Expression der NLRP3-Inflammasom-Komponenten nicht signifikant ( $p(Nlrp3)=0,8174$ ;  $p(Casp1)=0,0542$ ;  $p(Asc)=0,0726$ ). Der Phänotyp des *Prdx4*-Knockouts scheint sich also nicht auf eine veränderte transkriptionelle Regulation zu gründen, wahrscheinlicher erscheint angesichts dieser Ergebnisse eine direkte Beeinflussung des Proteinkomplexes.

### 3.3 Charakterisierung der Regulation des Inflammasoms durch Peroxiredoxin-4

#### 3.3.1 Hemmung der Caspase-1

Die vorangegangenen Versuche zeigten einen Einfluss von Peroxiredoxin-4 auf die Sekretion von zumindest drei Zytokinen. Während Interleukin-1 $\beta$  durch die aktivierte Caspase-1 des Inflammasoms gebildet wird, wird (lösliches) Tnf- $\alpha$  durch die Abspaltung aus dem membrangebundenen Trimer gebildet – unter anderem als Antwort auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Cxcl1 wird ebenfalls NF- $\kappa$ B-abhängig freigesetzt [86, 87].

Die nun zu klärende Frage war, ob diese beiden Signalwege gleichermaßen durch Peroxiredoxin-4 beeinflusst werden, oder ob die massive Dysregulation eines dieser Signalwege konsekutiv zu einer Überaktivierung des jeweils anderen führt.

Hierzu wurde Inflammasom funktionell inaktiviert, indem durch die Zugabe des Tetrapeptid-Inhibitors zYVAD-FMK (im Folgenden als YVAD bezeichnet) die Funktion der Caspase-1 gehemmt wurde. Der Inhibitor YVAD (YVAD steht für die Sequenz der vier Aminosäuren Tyrosin-Valin-Alanin-Asparaginsäure, die das Grundgerüst des Inhibitors bilden) bindet weitgehend selektiv und irreversibel an das aktive Zentrum der Protease und verhindert dadurch die Proteolyse von pro-Il-1 $\beta$  zu Il-1 $\beta$  [88].

Für die Untersuchung wurden erneut Makrophagen kultiviert und anschließend entweder mit YVAD (20 $\mu$ mol/L; in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst) oder mit einem entsprechenden Volumen DMSO behandelt. Nach zweistündiger Inkubation wurde anschließend mit Lipopolysaccharid für 24 Stunden stimuliert. Zusätzlich wurden Proben nach Ablauf dieser Zeit für 3 Stunden mit ATP behandelt. YVAD wurde alle 12 Stunden erneut zugegeben. Die Stimulationszeitpunkte wurden so organisiert, dass alle Zellen für die gleiche Zeit inkubiert wurden und zur gleichen Zeit geerntet werden konnten. Nach Herstellung von Proteinlysaten wurde mittels Western-Blotting die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, gemessen an der Phosphorylierung von p65, untersucht.

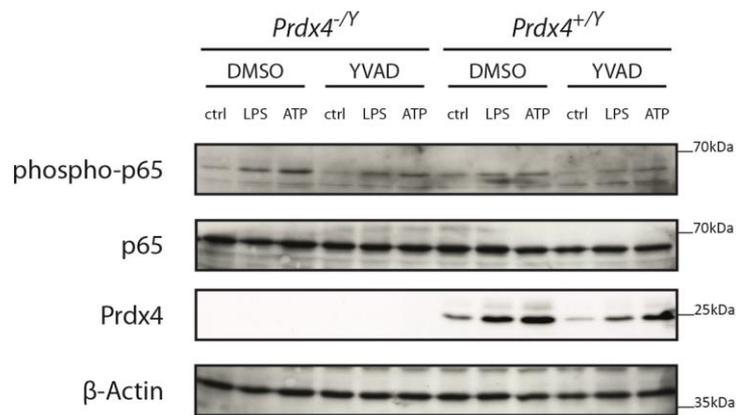


Abbildung 15: WB-Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach YVAD-Behandlung in BMDM.

Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von p65 durch die Zugabe von LPS und ATP gesteigert werden konnte, wobei zusätzlich ein Unterschied zwischen *Prdx4<sup>+/-</sup>* und *Prdx4<sup>-/-</sup>*-Makrophagen dahingehend, dass in Abwesenheit von Peroxiredoxin-4 die Phosphorylierung gesteigert wurde, erkennbar war. Durch die Zugabe des Inhibitors konnten diese Aktivierung des Transkriptionsfaktors reduziert werden, wobei nur noch marginale Differenzen zwischen den Genotypen zu erkennen waren. Die Induktion von Prdx4 erscheint ebenfalls durch die Behandlung mit YVAD reduziert zu werden.

Die Kulturüberstände wurden wieder mittels ELISA untersucht, die gezeigten Ergebnisse sind für mindestens vier unabhängige Untersuchungen pro Gruppe repräsentativ. Da die Ergebnisse der DMSO-behandelten Kulturen weitgehend mit den Ergebnissen aus den Vorversuchen identisch sind, soll nicht im Detail darauf eingegangen werden. Kurz sei gesagt, dass die Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout in bekanntem Maße signifikant sind zugunsten höherer Werte der Prdx4-defizienten Proben; der ELISA bestätigt darüber hinaus die im Western-Blotting bereits gesehene Vollständigkeit des Knockouts.

Die Behandlung mit YVAD erbrachte erwartungsgemäß einen drastischen Abfall der Il-1 $\beta$ -Konzentrationen, des Weiteren wurde zwischen den Genotypen kein signifikanter Unterschied in den Spiegeln mehr gesehen. Bemerkenswerterweise wurden Tnf- $\alpha$  und Cxcl1, die nicht von der Caspase-1 abhängig sind, im Wildtyp nicht signifikant reduziert. Im Knockout führte die Behandlung jedoch zu einer Reduktion der Konzentrationen von Tnf- $\alpha$  und Cxcl1 in die Dimensionen des Wildtyps: nach „maximaler“ Stimulation mit LPS und ATP wurden für YVAD für Tnf- $\alpha$  Werte von 75,25pg/mL (WT) und 216,3pg/mL gemessen ( $p=0,0015$ ), nach Behandlung zeigten sich 4725pg/mL (WT) und 41pg/mL (KO) ( $p=0,6124$ ).

Selbiges ergab sich für Cxcl1: Vor Behandlung wurden hier im Mittel 2709pg/mL (WT) und 9296pg/mL (KO) bestimmt ( $p=0,021$ ), nach YVAD-Stimulation fielen diese Werte auf 1577pg/mL (WT) und 1378pg/mL (KO) ab ( $p=0,3315$ ).

Die Sekretion von Peroxiredoxin-4 zeigte sich durch die Behandlung mit YVAD im Wildtyp ebenfalls rückläufig; wurden zuvor nach Ko-Stimulation mit LPS und ATP noch 2987pg/mL gemessen, lag der Durchschnitt in der YVAD-Gruppe danach bei 1146pg/mL ( $p=0,0073$ ).

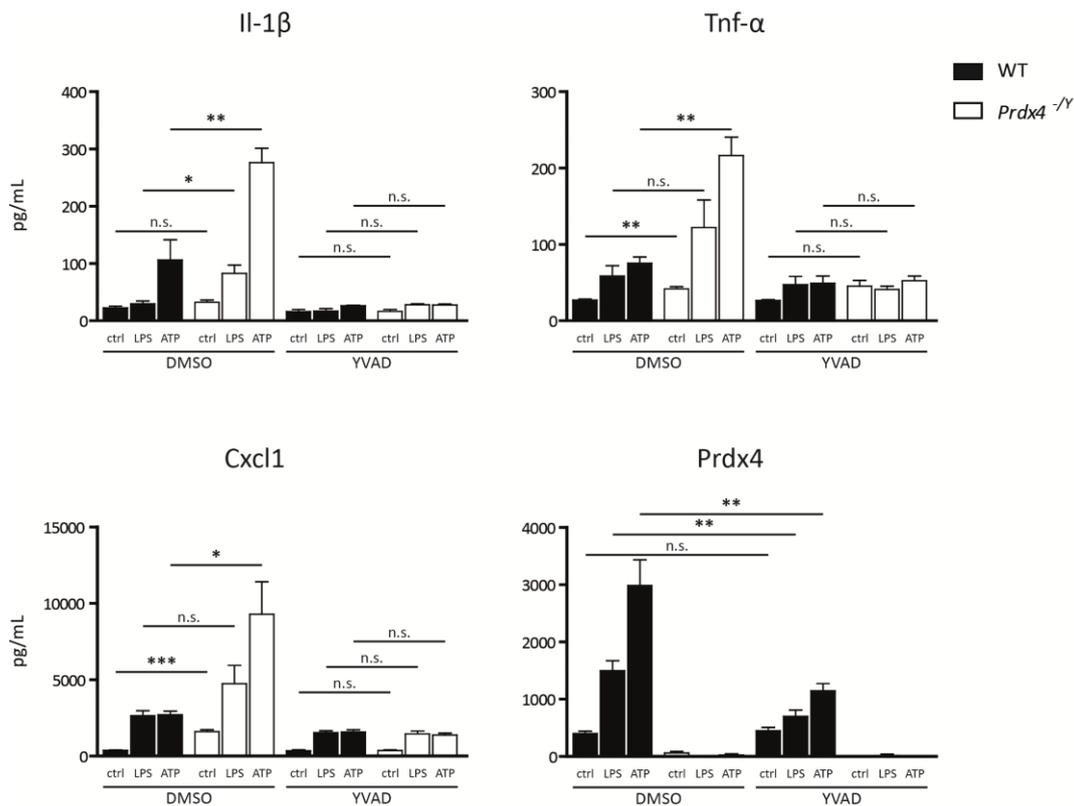


Abbildung 16: ELISA-Untersuchung der Zytokin-Freisetzung in BMDM nach YVAD-Behandlung (n=4).

### 3.3.2 Beeinflussung der Immunantwort durch exogene Zufuhr von Prdx4

Nachdem sich in den zuvor gezeigten Ergebnissen gezeigt hat, dass mit stärker werdender oder länger andauernder inflammatorischer Stimulation der Makrophagen die Produktion und vor allem die Sekretion von Prdx4 zunahm, sollte nun der Versuch unternommen werden, die Signalantwort der Makrophagen durch die Zugabe von rekombinantem Peroxiredoxin-4 dahingehend zu modulieren, dass die Produktion von Interleukin-1β reduziert würde.

Hierzu wurden Makrophagen beider Genotypen kultiviert und ein Teil der Zellen zusätzlich zur Behandlung mit LPS (und ATP) eine halbe Stunde vor Beginn der Behandlung mit LPS mit rekombinantem humanen Prdx4, welches zusätzlich mit einem 6xHis-Tag versehen war, inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, um sämtliche extrazellulär gebundenen Proteine zu entfernen. Humanes Prdx4 weist eine Sequenzhomologie von über 90% auf, die katalytischen Zentren sind vollständig identisch. Die Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums für 5 Minuten mit 2mL 0,5-prozentiger Trypsin-EDTA-Lösung pro Well behandelt und anschließend 5mL Kulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und das Zellpellet wie in Kapitel 2 beschrieben weiter verarbeitet.

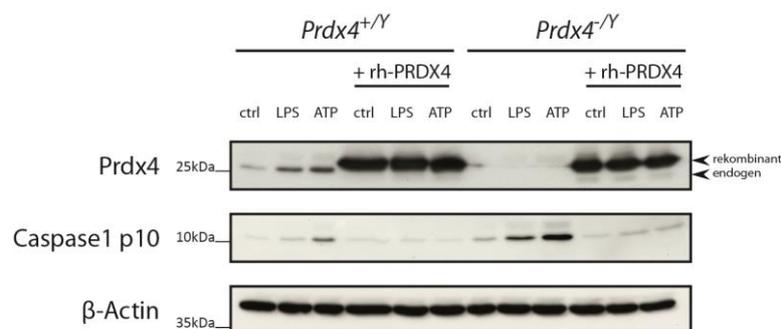


Abbildung 17: WB-Untersuchung der Caspase-1-Aktivierung nach Behandlung mit rh-PRDX4. Das rekombinante Peroxiredoxin-4 kann von endogenem Protein trotz des identischen Verhaltens gegenüber dem Antikörper aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts unterschieden werden (zusätzlich vorhandener His-Tag).

In den Ergebnissen ist zu erkennen, dass Zellen das im Überstand angebotene Prdx4 offensichtlich in großer Menge aufnehmen. Interessanterweise scheint das exogen zugeführte Protein zusätzlich die Produktion des endogenen Prdx4 zu unterdrücken, da in den Wildtyp-Proben trotz ausreichender Separation des Gels keine Bande auf der Höhe, auf der das natürliche Prdx4 zu erwarten wäre, sichtbar wird.

Sowohl *Prdx4*<sup>-/*Y*</sup>- als auch *Prdx4*<sup>+/*Y*</sup>-Makrophagen reagierten darüber hinaus mit einer deutlich reduzierten Aktivierung der Caspase-1 auf die Zugabe; auch nach Stimulation bleibt die Menge der freien p10-Untereinheit in beiden Genotypen auf einem niedrigen Niveau.

### 3.3.3 Untersuchung des Einflusses reaktiver Sauerstoffspezies

Auch wenn bisher gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von exogenem, gar xenogenem Peroxiredoxin-4 im Stande ist, den Phänotyp der Knockout-Makrophagen zu bessern, war die Frage zu klären, welcher Mechanismus diesem Effekt zu Grunde liegt. In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits cursorisch auf die Peroxidase-Aktivität von Prdx4 hingewiesen, darüber hinaus wurde auch der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* (ROS)) auf die Aktivierung des Inflammasoms dargestellt.

Aus diesem Grund wurde nun evaluiert, inwiefern die antioxidative Funktion von Prdx4 für die beobachteten Effekte verantwortlich ist und ob der Phänotyp der Prdx4-defizienten Makrophagen durch Zugabe einer anderen, stark antioxidativ wirkenden Substanz ebenfalls beeinflusst werden kann.

Dafür sollte zunächst geklärt werden, ob in *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen die Bildung von ROS signifikant gesteigert ist. Hierzu wurden Makrophagen gemäß des in Kapitel Zwei beschriebenen Verfahrens mit dem Farbstoff cDCFH-DA gefärbt und anschließend entweder mit Lipopolysaccharid (100ng/mL) oder PBS behandelt. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer.

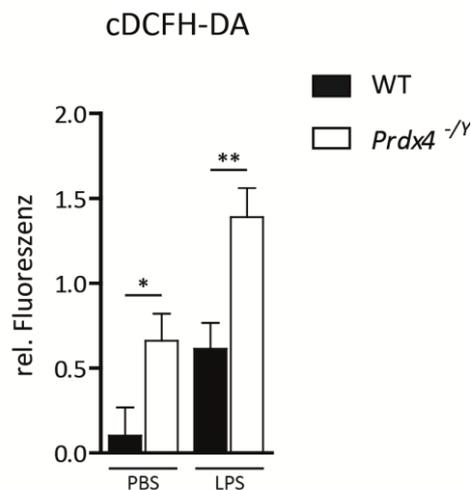


Abbildung 18: Untersuchung der Bildung von ROS in BMDM nach LPS-Stimulation mittels cDCFH-DA-Assay. Auf die Darstellung der (durchgeführten) Positiv- und Negativ-Kontrollen wurde verzichtet. Die Stimulation erfolgte über einen Zeitraum 0,5 Stunden. (n=6)

In den Prdx4-defizienten Makrophagen zeigte sich sowohl unter basalen ( $p=0,0352$ ) als auch unter proinflammatorischen ( $p=0,0069$ ) Bedingungen eine signifikant gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.

Für die Überprüfung der Frage, inwiefern die antioxidative Wirkung von Prdx4 für die Regulation der Immunantwort relevant ist, wurden *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen entweder ohne zusätzliche Behandlung oder aber unter Inkubation von entweder rekombinantem Peroxiredoxin-4 (5ng/mL) oder N-Acetylcystein (NAC; 10mmol/L, pH=7,4) mit LPS (und ATP) stimuliert. Anschließend wurden die Kulturüberstände mittels ELISA auf den Gehalt von Interleukin-1 $\beta$  hin untersucht.

Die unbehandelten Zellen zeigten nach Stimulation das bereits bekannte Verhalten. Durch die Behandlung mit NAC konnten unter basalen Bedingungen und unter Stimulation mit LPS keine signifikanten Veränderungen der Il-1 $\beta$ -Spiegel erwirkt werden. Die Zytokinproduktion nach Stimulation mit ATP konnte jedoch auf einen Mittelwert von 779,5pg/mL reduziert werden (Kontrolle: 872,75pg/mL ( $p=0,0113$ )). Die zusätzliche Behandlung mit rh-PRDX4 hingegen vermochte die Interleukin-1 $\beta$ -Produktion nach Stimulation mit LPS (und ATP) bereits deutlich reduzieren. So wurden in der mit lediglich mit LPS behandelten Kohorte Spiegel von 99,25pg/mL nach Prdx4-Gabe bestimmt (Kontrolle: 251,5pg/mL ( $p=0,0273$ )). Für die Zellen, die zusätzlich noch ATP erhielten, war der Effekt noch deutlich ausgeprägter: hier wurden nach Prdx4-Gabe durchschnittlich 176,5pg/mL gemessen (Kontrolle: 872,75pg/mL ( $p<0,0001$ )).

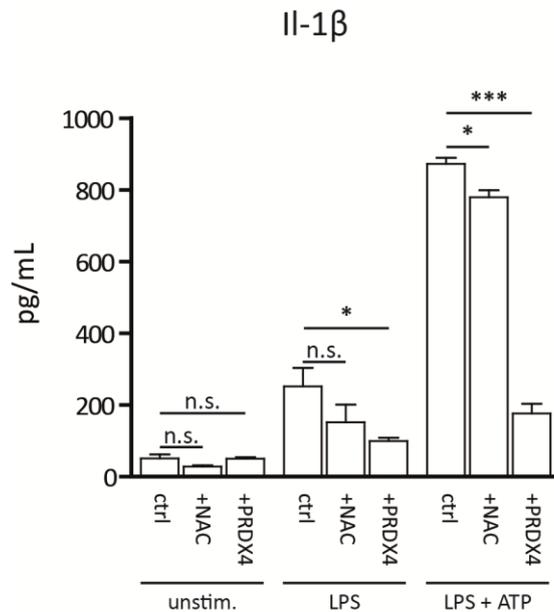


Abbildung 19: ELISA-Untersuchung der Zytokin-Freisetzung in BMDM nach Behandlung mit NAC und rh-PRDX4 (n=4).

### 3.4 Untersuchungen zur Lokalisation von Peroxiredoxin-4

#### 3.4.1 Hemmung der Endocytose extrazellulärer Substanzen

Die bisherigen Experimente deuteten an, dass Peroxiredoxin-4 seine Wirkung nicht im Extrazellularraum entfaltet, sondern durch die Zellen aufgenommen wird.

Um zu untersuchen, inwiefern es sich hier um einen Prozess aktiver Endocytose handelt, wurden *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen kultiviert und anschließend entweder für 24 Stunden mit Lipopolysaccharid (100ng/mL) stimuliert oder im ursprünglichen Medium belassen. Nach Ablauf dieses Zeitraumes erhielten die Zellen neues Medium; die bereits mit LPS vorbehandelten Zellen erhielten hiermit zusätzlich ATP (100 $\mu$ mol/L), während die unbehandelten Zellen keine weitere Behandlung erhielten. Zusätzlich wurden die Kulturen in vier Gruppen aufgeteilt: mit Ausnahme einer Gruppe erhielten alle Zellen 5ng/mL rh-PRDX4. Hiervon wiederum wurde eine Gruppe zusätzlich mit 100 $\mu$ M Monodansylcadaverin (DCD) behandelt und eine weitere Gruppe wurde für 30 Minuten bei +4°C und für weitere 30 Minuten bei +37°C inkubiert.

Monodansylcadaverin (DCD) ist als potenter Inhibitor der Clathrin-abhängigen Endocytose bekannt, wobei dies offensichtlich über eine Hemmung der zellulären Transglutaminase vermittelt wird [89]. Die Senkung der Temperatur ist ebenfalls ein etabliertes Mittel zur Hemmung der Endocytose, da unterhalb einer Temperatur von 10°C keine Bildung endocytotischer Vesikel erfolgt [90].

Nach Ablauf einer Stunde wurden die Überstände asserviert, die Zellen gewaschen, mit Trypsin behandelt (wie zuvor beschrieben) und anschließend Proteinlysate für Western-Blotting erzeugt. Die Ergebnisse sind für mindestens drei unabhängige Experimente repräsentativ.

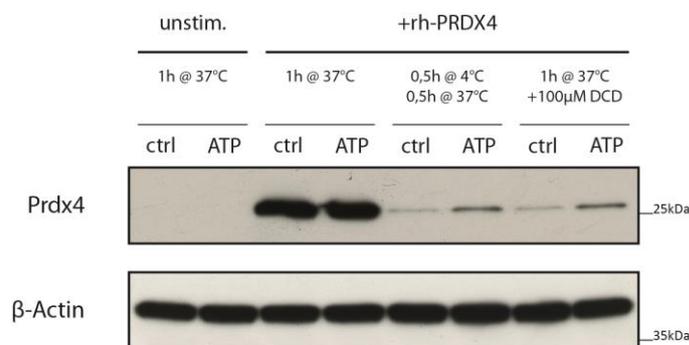


Abbildung 20: WB-Untersuchung der Resorption von rh-PRDX4 in BMDM nach Cadaverin-Behandlung.

Erwartungsgemäß ließ sich in den Kontrollen kein Nachweis von endogenem Peroxiredoxin-4 erbringen.

Die Zugabe des rekombinanten Prdx4 führte sowohl unter basalen als auch unter stimulierten Bedingungen zu einer starken Aufnahme. Dieser Effekt konnte erfolgreich sowohl durch die Absenkung der Temperatur als auch durch die Zugabe von Monodansylcadaverin behindert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Aufnahme von Prdx4 unter proinflammatorischen Bedingungen immer noch gesteigert zu sein scheint im Vergleich zu basalen Umständen. Dieser Effekt ließ sich bisher aufgrund der hohen Signalstärke der Proben, die ohne Inhibitor mit Prdx4 behandelt wurden, nicht erkennen.

Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihren Gehalt an Interleukin-1β und Prdx4 hin untersucht, wobei die vorherige Zentrifugation bei 300g und +4°C für 10 Minuten der Abscheidung ungewollt mitgenommenen Zeller dienen sollte.

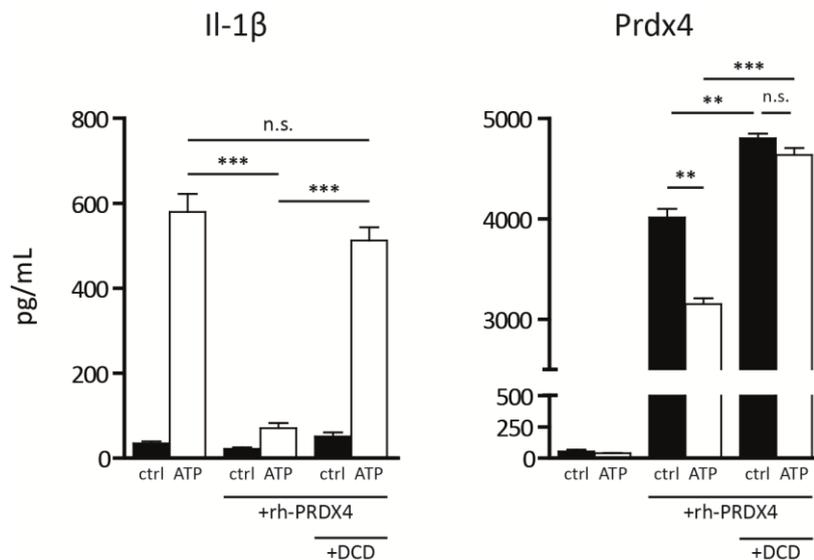


Abbildung 21: ELISA-Untersuchung der Aufnahme von rh-PRDX4 und der Freisetzung von IL-1 $\beta$  in BMDM. (n=4)

Nach einstündiger Inkubation fanden sich in den unstimulierten Kontrollen im Mittel 35pg/mL Interleukin-1 $\beta$ , durch Stimulation mit LPS und ATP konnte dieser Wert auf durchschnittlich 579,67pg/mL gesteigert werden. Die Zugabe von rekombinatem Peroxiredoxin-4 konnte auch in diesem Versuch die Menge des freigesetzten Zytokins deutlich reduzieren; in den Proben, die sowohl LPS und ATP als auch Peroxiredoxin-4 erhielten, fiel der mittlere IL-1 $\beta$ -Spiegel auf 71pg/mL ab ( $p=0,0003$ ). Die weitere Zugabe von Dansylcadaverin war hingegen im Stande, den durch Prdx4 vermittelten anti-inflammatorischen Effekt fast vollständig aufzuheben. In den stimulierten Proben konnten erneut hohe Zytokinkonzentrationen von im Mittel 512,67pg/mL nachgewiesen werden. Dies führte dazu, dass zu den Proben, die mit PRDX4 behandelt wurden, erneut ein hochsignifikanter Unterschied bestand ( $p=0,0002$ ) und darüber hinaus die ursprünglichen Verhältnisse faktisch wiederhergestellt wurden ( $p=0,2724$ ).

War Prdx4 mittels ELISA in den Kontrollen nicht nachweisbar, zeigte sich nach Zugabe des rekombinanten Proteins in den unstimulierten Proben nach einer Stunde noch eine Konzentration von 4014,67pg/mL. Dieser Wert fiel nach Stimulation auf 3152pg/mL, was sich als signifikant erwies ( $p=0,0011$ ). Der Einsatz von Dansylcadaverin führte hingegen dazu, dass nach einer Stunde noch durchschnittlich 4802,33pg/mL in den unstimulierten Proben ( $p=0,0013$ ) und 4637,67pg/mL in den stimulierten Proben ( $p<0,0001$ ) nachweisbar waren.

Unter der Annahme, dass die Degradation des exogen zugeführten Peroxiredoxin-4 im Überstand zu vernachlässigen sei und darüber hinaus in allen Proben in vergleichbarem Rahmen ablaufen würde, konnte die Abnahme der extrazellulären Konzentration als Korrelat zur zellulären Aufnahme des Proteins betrachtet werden. In der Zusammenschau der Befunde ergab sich damit einerseits, dass Peroxiredoxin-4 für die Entfaltung seiner antiinflammatorischen in das Zellinnere gelangen muss und andererseits, dass die Aufnahme mittels Endozytose geschieht, wobei diese mit hoher Wahrscheinlichkeit Clathrin-abhängig verläuft.

#### 3.4.2 Hemmung der Freisetzung von Prdx4 durch Hemmung des ER-Golgi-Transportes

Nachdem die vorherigen Experimente gezeigt haben, dass Peroxiredoxin-4 insbesondere in Abhängigkeit proinflammatorischer Stimuli aktiv sezerniert wird, sollte an dieser Stelle die Frage gestellt werden, auf welchem Wege dies geschieht. Der nahe liegende Mechanismus der klassischen Sekretion wurde insbesondere in zwei Arbeiten untersucht und dort ausgeschlossen: Einerseits konnten TAVENDER und BULLEID eine erfolgreiche Retention des Proteins im endoplasmatischen Retikulum nachweisen, andererseits identifizierten KAKIHANA und Kollegen mit dem Protein ERp44 einen möglichen Mediator der Retention von PRDX4 und anderen Proteinen, die kein klassisches Retentionsmotiv aufweisen, identifizieren [61, 64]. Da beide Arbeiten allerdings weder auf Makrophagen noch auf andere primäre Zellkulturen zurückgriffen, wurde in dieser Arbeit trotzdem untersucht, ob die nachgewiesene Freisetzung von Peroxiredoxin-4 mittels klassischer Sekretion erfolgt.

Hierzu wurden Makrophagen untersucht, die zusätzlich zu der Stimulation mit LPS (100ng/mL für 24 Stunden) und ATP (100µM für 3 Stunden) mit dem Antibiotikum Brefeldin A (in DMSO gelöst) oder DMSO behandelt wurden. Brefeldin A bindet an Arf-Proteine ("*ADP-ribosylation factor*") und verhindert dadurch die Abschnürung von Vesikeln, welche dem Transport von Proteinen aus dem endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat dienen. Hierdurch wird die Sekretion von Proteinen effektiv unterbunden, allerdings nach einer gewissen Zeit auch eine erhebliche Zytotoxizität erwirkt [91].

Nach Abschluss des Versuches wurden Überstände und Zellen zu Proteinlysaten aufgeschlossen und anschließend mittels Western-Blotting untersucht.

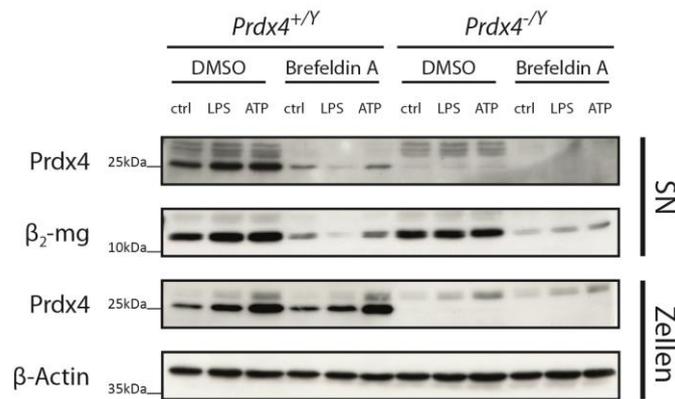


Abbildung 22: WB-Untersuchung der Prdx4-Freisetzung in BMDM nach Brefeldin-A-Behandlung. SN: Überstand; cells: Zellen;  $\beta_2$ -MG: beta2-Mikroglobulin.

Während sich im Wildtyp im Gegensatz zum Knockout Peroxiredoxin-4 jederzeit nachweisen ließ und die Induktion durch Stimulation ungestört ablief, zeigte sich in den Überständen nach Einsatz von Brefeldin A eine Abnahme der Prdx4-Menge. Das überwiegend konstitutiv sezernierte beta2-Mikroglobulin, welches auch über das ER-Golgi-System freigesetzt wird, findet sich nach Behandlung mit Brefeldin A ebenfalls vermindert im Überstand. Diese Ergebnisse legen eine klassische, vom Golgi-Apparat abhängige Form der Sekretion nahe.

### 3.4.3 Dynamische Regulation von ERp44 in Makrophagen

Um den Widerspruch zur bekannten Datenlage zu klären, wurde untersucht, inwiefern Erp44, welches die Retention verantworten soll, unter entzündlichen Bedingungen beeinflusst wird. Zunächst wurde hierzu die Expression des Proteins mittels vollquantitativer *real-time* PCR untersucht. Wildtyp-Makrophagen wurden kultiviert und anschließend entweder unstimuliert belassen, oder mit Lipopolysaccharid (100ng/mL) behandelt. Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen nach 24-stündiger LPS-Behandlung mit ATP (100 $\mu$ mol/L) für 3 Stunden inkubiert.

Anschließend wurde die RNA isoliert und eine cDNA generiert. Die Analyse fand unter Verwendung der TaqMan-Technologie statt.

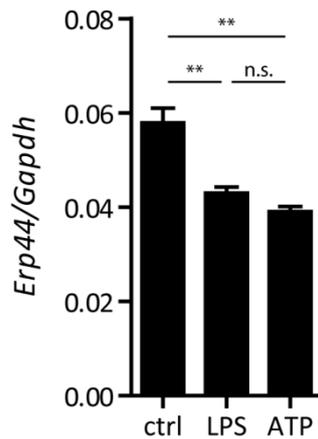


Abbildung 23: Untersuchung der Genexpression von *Erp44* in BMDM nach Stimulation mit LPS und ATP (n=4).

Bereits nach Zugabe von Lipopolysaccharid konnte eine signifikante Abnahme der *Erp44*-Expression beobachtet werden ( $p=0,0044$ ), wobei eine zusätzliche Stimulation mit Adenosintriphosphat keinen zusätzlichen Effekt im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung ergab ( $p=0,0615$ ).

#### 3.4.4 Ko-Lokalisation von Caspase-1 und Peroxiredoxin-4

Abschließend sollte in dieser Studie geklärt werden, in welchem Kompartiment Prdx4 letztendlich verbleibt. Üblicherweise verschmelzen Endosomen nach erfolgter Phagozytose mit Lysosomen und dieser Prozess führt zu einem Abbau der aufgenommenen Proteine durch lysosomale Proteasen [92]. Angesichts der bisherigen Ergebnisse, die eine Beeinflussung des NLRP3-Inflammasoms nahe legen, sollte jedoch untersucht werden, ob Peroxiredoxin-4 nicht eventuell im Stande ist, die endosomale Membran zu überwinden und in das Cytosol überzutreten, da hier eine direkte Einwirkung auf das streng zytosolisch lokalisierte Inflammasom möglich wäre.

*Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen wurden hierzu für 24 Stunden mit Lipopolysaccharid (100ng/mL) und anschließend für drei Stunden mit Adenosintriphosphat (100μM) behandelt. Zeitgleich zur Gabe von LPS wurde einem Teil der Zellen zusätzlich rh-PRDX4 zugesetzt (5ng/mL). Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen wie in Kapitel 2.7 beschrieben fixiert und mit den in der Tabelle aufgeführten Antikörpern gefärbt.

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Fluorophor (Darstellung)
Prdx4	anti-Prdx4	anti-rabbit-IgG	Alexa 488 (grün)
Caspase-1	anti-Caspase1	anti-mouse-IgG	Alexa 555 (rot)

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung.

Sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Makrophagen exprimierten Caspase-1. Während sich jedoch in den unbehandelten Zellen kein Prdx4 nachweisen ließ, zeigte sich nach 27 Stunden nach Zugabe des rekombinanten Proteins ein deutliches Signal, welches sich über die gesamte Zelle verteilt und einen etwas inhomogenen Charakter besitzt, was für eine Speicherung des Proteins in Vesikeln sprechen könnte. Darüber hinaus lassen sich in der weiteren Analyse (Leica Application Suite, Leica Microsystems) deutliche Signalüberlagerungen feststellen, welche für eine Ko-Lokalisation beider Proteine sprechen.

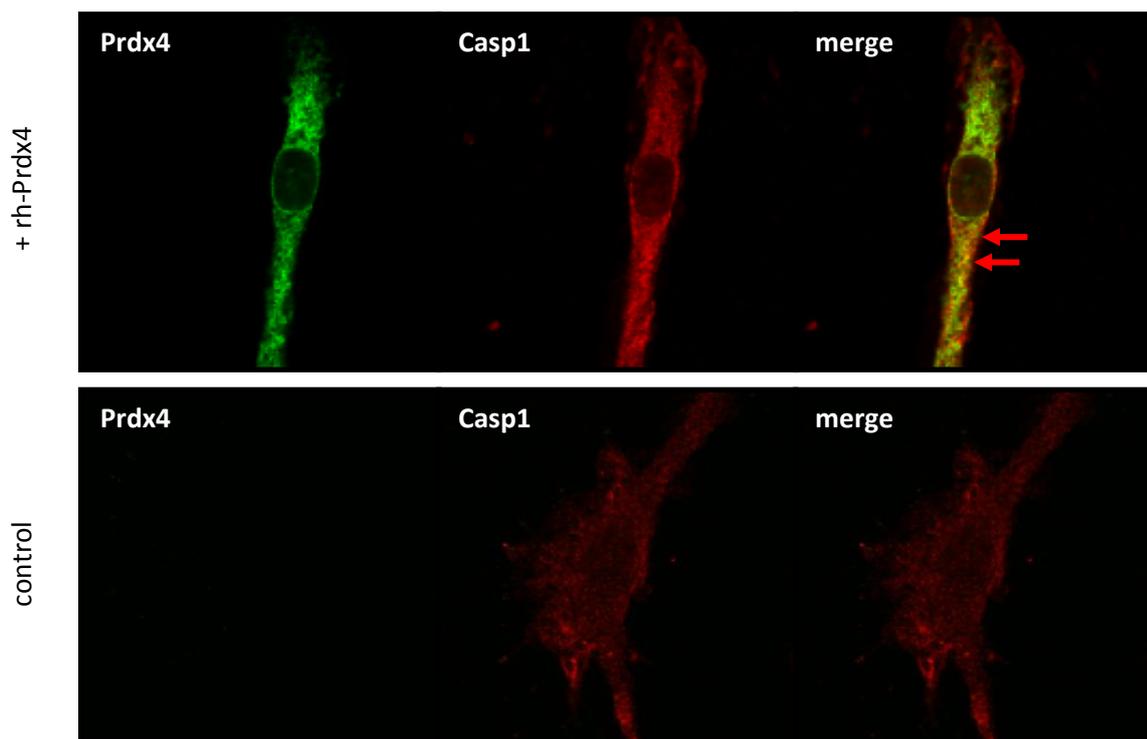


Abbildung 24: Untersuchung der Ko-Lokalisation von rh-PRDX4 und Casp1 in BMDM.

Diese Befunde legen nahe, dass Prdx4 zumindest teilweise im Stande ist, das endosomale Kompartiment zu verlassen und sich im Zytosol der Makrophagen in direkte räumliche Nähe zur Caspase-1 und damit höchstwahrscheinlich dem Inflammasom zu begeben.

## 4. Diskussion

Peroxiredoxin-4 wurde in der jüngeren Vergangenheit als möglicher Einflussfaktor auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems diskutiert und darüber hinaus mit zahlreichen Krankheitsbildern, einschließlich des SIRS, assoziiert. In dieser Arbeit wurde unter Zuhilfenahme verschiedener Knockout-Mäuse der zugrundeliegende Mechanismus, über den Prdx4 seinen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen ausübt, untersucht.

### 4.1 Begründung der Wahl des LPS-Endotoxin-Modells und dessen Limitationen

Murine Endotoxin-Versuche stellen in jedem Fall eine Vereinfachung des Krankheitsbildes „SIRS“ dar. Der solitäre Einsatz potenter Noxen zur Auslösung einer systemischen Immunreaktion bildet typischerweise nicht das multifaktorielle Geschehen, dass zur Manifestation eines SIRS führt, ab.

Jedoch können durch die Behandlung mit starken proinflammatorischen Stimuli, wie zum Beispiel Lipopolysaccharid, zahlreiche Symptome eines SIRS erzeugt werden. Hierzu gehören unter anderem Hypo- oder Hyperthermie, Gewichtsverlust und Hypotonie [93]. Dies liegt darin begründet, dass unterschiedliche Noxen im Bereich des angeborenen Immunsystems konservierte Signalwege ansprechen und die gleichen Zytokine ausgeschüttet werden, welche schließlich die klinische Symptomatik diktieren.

So spielen zum Beispiel Signalwege wie die TLR4-NF- $\kappa$ B-Achse oder die NLRP3-Caspase-1-Achse sowohl im klinischen Setting als auch im Versuchsmodell tragende Rollen [94]. Die Bedeutung des TLR4 im Rahmen der Endotoxinämie wird zum Beispiel an der ausgeprägten Resistenz von C3H/HeJ-Mäusen, die einen genetischen Defekt in diesem Rezeptor aufweisen, gegenüber diesem Modell deutlich [10].

Um auch die Ätiologie des SIRS besser abzubilden, wurden ferner Modelle etabliert, in denen eine gezielte systemische Infektion mit Bakterien eine Immunreaktion auslöst, oder aber durch die chirurgische Zerstörung der Darmbarriere eine endogene Infektion der Bauchhöhle provoziert werden kann [93]. Der Phänotyp einer Maus kann sich für die jeweiligen Modelle stark voneinander unterscheiden, so ist die vormals genannte C3H/HeJ-Maus hochgradig anfällig für die letztgenannten Modelle, was im deutlichen Widerspruch zu der Resistenz gegenüber LPS steht [95].

Da zahlreiche Studien der jüngeren Vergangenheit, die sich mit dem Einfluss von NF- $\kappa$ B [96] oder des NLRP3-Inflammasoms [46] beschäftigten, das LPS-Endotoxin-Modell angewandt haben und dieses schnell und unkompliziert durchzuführende Modell sich als geeignet erwiesen hat, die Makrophagenfunktion *in vivo* abzubilden, wurde es für diese Studie ausgewählt.

#### 4.2 Prdx4 schützt vor einer überschießenden Immunreaktion nach LPS-Applikation *in vivo*

Nach der Applikation von Lipopolysaccharid zeigten *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Mäuse sowohl einen signifikant stärkeren und prolongierten relativen Gewichtsverlust, als auch eine deutliche stärkere systemische Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine. Diese Beobachtung stützt bereits die initial aufgestellte Hypothese, dass Prdx4 im Rahmen einer systemischen Entzündung einen protektiven Einfluss ausübt. Derartige Untersuchungen haben für zahlreiche Negativ-Regulatoren der angeborenen Immunität, wie zum Beispiel NLRC3 oder CD44, welche die NF- $\kappa$ B-Signalantwort beeinflussen sollen, ähnliche Phänotypen ergeben [96, 97].

Da sowohl die Sekretion von Zytokinen wie Cxcl1 und TNF- $\alpha$ , welche vorrangig unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B stehen, als auch die Produktion von IL-1 $\beta$ , welches durch das Inflammasom gebildet wird, im Knockout gesteigert sind, sind an dieser Stelle vorrangig zwei Erklärungen zu diskutieren: einerseits könnten beide „Stützen“ der Immunantwort durch Prdx4 beeinflusst werden. Andererseits könnte es aufgrund der gesteigerten Aktivität eines der beiden Signalwege zu einer konsekutiven Aktivierung des jeweils anderen Systems kommen. Letzteres wäre allerdings nicht die Regel, da zum Beispiel für die *Nos2*<sup>-/-</sup>- und die *Sod1*<sup>-/-</sup>-Maus gezeigt wurde, dass in ihnen nach LPS-Injektion lediglich IL-1 $\beta$ , nicht jedoch Tnf- $\alpha$  signifikant erhöht ist [46, 98]. Umgekehrt weist die *Nlrc3*<sup>-/-</sup>-Maus im LPS-Modell erhöhte Tnf- $\alpha$  und IL-6-Spiegel auf, jedoch der Kontrollgruppe vergleichbare IL-1 $\beta$ -Level [96]. Da die Interleukine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  jedoch über den IL-1-Rezeptor klassische Aktivatoren von NF- $\kappa$ B darstellen [99], wurde mittels des IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra untersucht, inwiefern der Phänotyp der *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Mäuse IL-1( $\beta$ )-abhängig ist. Erwartungsgemäß führte der Einsatz von Anakinra generell zu einem mildereren klinischen Verlauf, *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Tiere profitierten allerdings erheblich stärker von dieser Behandlung als die Kontrolltiere.

So konnte nicht nur der Gewichtsverlust hochgradig abgeschwächt werden, sondern auch die Sekretion aller beteiligten Zytokine gesenkt und das zuvor deutlich unterschiedliche Milzgewicht reduziert werden. Diese Möglichkeit zur Besserung des Phänotyps der *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Maus zeigt dessen deutliche Abhängigkeit von Interleukin-1 $\beta$ .

Um zu untersuchen, inwiefern der beobachtete Phänotyp durch eine alterierte Makrophagenfunktion verursacht wird, wurden unter Verwendung des LysMcre-Systems *Prdx4* <sup>$\Delta$ M $\phi$ /Y</sup>-Mäuse generiert. Derartige Verfahren wurden bereits in der Vergangenheit erfolgreich zur Charakterisierung der Makrophagenfunktion *in vivo* im Rahmen von LPS-Schock-Modellen eingesetzt, so zum Beispiel durch SACHITHANANDAN und Kollegen. [100].

Die *Prdx4* <sup>$\Delta$ M $\phi$ /Y</sup>-Mäuse wiesen einen den *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Tieren vergleichbaren Phänotyp aus gesteigerter Zytokinproduktion und stärkerem Gewichtsverlust auf, zeigten jedoch keine vergrößerte Milz.

Zusammenfassend kann aus diesen Versuchen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass *Prdx4* antientzündliche Eigenschaften im Rahmen des Endotoxin-Schock-Modells offenbart und dass diese Effekte offensichtlich im Zusammenhang mit Makrophagen und der Interleukin-1 $\beta$ -Produktion stehen.

#### 4.3 Prdx4 hemmt die LPS-abhängige Signalantwort in Makrophagen

Die bisherige Datenlage, die besagt, dass *Prdx4* die NF- $\kappa$ B-Aktivierung hemmt, sollte zunächst in primären Makrophagen verifiziert werden. Hierzu wurde untersucht, wie sowohl die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ , als auch die Phosphorylierung von p65 durch den Knockout beeinflusst werden. Die *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen bestätigten die Erwartungen und wiesen eine verstärkte NF- $\kappa$ B-Aktivierung auf, die darüber hinaus auch bis zu 24 Stunden anhielt.

Zusätzlich hierzu wurde ebenfalls die Aktivierung der Caspase-1, die als Maß für die Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms angesehen werden kann, untersucht. Die Zugabe von Lipopolysaccharid führte zu einer gesteigerten proteolytischen Aktivierung der Caspase in Knockout-Makrophagen. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als dass bisher angenommen wurde, dass ein solitärer Stimulus wie LPS zwar mittels der Induktion der Genexpression aller beteiligten Inflammasom-Komponenten im Sinne eines *primings* bedeutend sei, eine suffiziente Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, die in einer messbaren IL-1 $\beta$ -Produktion mündet aber zwingend eines weiteren Stimulus bedürfe [37].

In jedem Falle scheinen die *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen eine gesteigerte Sensitivität der NLRP3-abhängigen Immunantwort zu besitzen.

Da sich in einer durchgeführten *real-time* PCR-Analyse kein signifikanter Unterschied in der Expression der gemeinhin am Aufbau des NLRP3-Inflammasoms beteiligten Proteine zeigte, ist nicht davon auszugehen, dass eine NF-κB-vermittelte Überexpression diesen Phänotyp begründet. Vielmehr scheint eine Störung der Interaktion dieser Signalwege durch die Abwesenheit von Prdx4 bewirkt zu werden. Dies äußert sich darin, dass die Aktivierung des Inflammasoms in Knockout-Makrophagen auch zu einer Form von NF-κB-Aktivierung führt, die in Wildtyp-Zellen nicht nachzuweisen ist. Nicht nur, dass IL-1β sowohl nach solitärer LPS-Stimulation als auch nach zusätzlichem Einsatz von ATP signifikant innerhalb der ersten Messzeitpunkte ansteigt, bewirkt die ATP-Zugabe in *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Zellen einen weiteren Anstieg von Tnf-α und Cxcl1. Dieser Effekt wird im Wildtyp nicht beobachtet, genauso wenig ein signifikanter Anstieg der IL-1β-Sekretion zum frühesten Messzeitpunkt nach Stimulation. Die gegenwärtig verfügbare Literatur weist zwar auch ATP als potenten NF-κB-Aktivator aus, aber eine ausgeprägte Inflammasom-Aktivität soll die NF-κB-Aktivität teilweise sogar hemmen – ein hier vollständig fehlender Effekt [101, 102].

Die Expression von Peroxiredoxin-4 wurde in allen Versuchen untersucht und mittels Western-Blotting konnte während der Versuche eine Zunahme der intrazellulären Menge nachgewiesen werden. Darüber hinaus neigen Wildtyp-Makrophagen zu einer Sekretion von Prdx4, welche durch proinflammatorische Stimulation signifikant gesteigert werden kann. Diese Beobachtungen widersprechen Studien, die eine Sekretion von Prdx4 ausschlossen [61, 64]. Dieser Punkt soll an späterer Stelle erneut aufgegriffen werden.

Um nachzuweisen, dass die NF-κB-Aktivierung in *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Makrophagen Inflammasom-abhängig ist, wurde die Aktivität dieses Proteinkomplexes durch den Einsatz von YVAD gehemmt. Nachdem die Aktivität des Inflammasoms, gemessen an der Freisetzung von IL-1β nach Stimulation, durch YVAD ausreichend reduziert wurde, konnte die Produktion von Tnf-α und Cxcl1 auf ein Wildtyp-Maß gesenkt werden. Dieser Effekt betraf sowohl die solitäre LPS-Stimulation als auch die Ko-Stimulation mit Adenosintriphosphat. Die Sekretion von Prdx4 nahm durch die Hemmung des Inflammasoms ebenfalls ab. Im Western-Blotting wurde darüber hinaus eine geringere Phosphorylierung von p65 nach YVAD-Behandlung sichtbar.

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die Abwesenheit von Prdx4 offensichtlich primär die Aktivität des Inflammasoms betrifft und dass NF- $\kappa$ B als Konsequenz hieraus sekundär aktiviert wird. Eine direkte Beeinflussung von NF- $\kappa$ B durch Peroxiredoxin-4 wird unwahrscheinlicher, da diese nicht durch YVAD hätte beeinflusst werden sollen.

YVAD gilt als relativ spezifisch für die Caspase-1, lediglich die Caspase-4 zusätzlich beeinträchtigt [103]. Letztere scheint insbesondere im Bereich der ER-Stress-induzierten Apoptose eine Rolle zu spielen, jedoch keinen direkten Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion zu besitzen [104]. Das eingesetzte Lösungsmittel Dimethylsulfoxid wurde vor kurzem als Inhibitor von NLRP3 beschrieben [105], dieser Effekt konnte hier nicht beobachtet werden, da in den Kontrollversuchen, in denen ebenfalls DMSO eingesetzt wurde, eine regelrechte IL-1 $\beta$ -Produktion zu beobachten war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das unter inflammatorischen Bedingungen vermehrt gebildete und freigesetzte Prdx4 offensichtlich ein Negativ-Regulator des Inflammasoms darstellt und die Abwesenheit nicht nur zu einer verstärkten und verlängerten Immunantwort, sondern auch zu einer sekundären Steigerung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt.

#### 4.4 Prdx4 moduliert das Inflammasom nicht über die Neutralisation von ROS

Nachdem sich gezeigt hat, dass Peroxiredoxin-4 durch die Makrophagen im Rahmen der zellulären Entzündungsreaktion sezerniert wird, sollte untersucht werden, inwiefern die Zugabe von extrazellulärem Prdx4 einen Einfluss auf dieses Geschehen nehmen kann. In diesem Versuch zeigte sich nicht nur, dass Prdx4 die Aktivierung der Caspase-1 deutlich zu reduzieren vermochte, es wurde darüber hinaus auch innerhalb der Zellen mittels Western-Blotting nachweisbar. Da die Zellen mit Trypsin-EDTA behandelt wurden und im Rahmen der Aufarbeitung mehrmals gewaschen wurden, ist eine Kontamination der Proben durch an den Zellmembranen adhärentes Peroxiredoxin-4 unwahrscheinlich. Viel wahrscheinlicher ist eine aktive Aufnahme des Proteins. Die Tatsache, dass die Expression des endogenen Prdx4 in Wildtyp-Makrophagen durch exogene Zufuhr unterdrückt werden konnte, ist vermutlich Konsequenz einer allgemein unterdrückten Immunantwort, welche an sich die Expression von Prdx4 in Makrophagen erst induziert.

Reaktive Sauerstoffspezies spielen aus zahlreichen Gründen eine zentrale Rolle für diese Arbeit. Einerseits ist Peroxiredoxin-4 als zunächst als Peroxidase beschrieben worden, auch wenn die Bedeutung dieser Eigenschaft bereits in Frage gestellt wurde [57]. Andererseits stellen reaktive Sauerstoffspezies relevante Einflussfaktoren auf die Entzündungsantwort dar, wobei sie für die Aktivierung sowohl von NF- $\kappa$ B als auch des NLRP3-Inflamasoms Bedeutung besitzen. So ist die Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  ROS-abhängig und eine reduzierte Fähigkeit, ROS abzubauen, führt zu einer stärkeren Entzündungsantwort [106]. Die Aktivierung des Inflamasoms durch ROS scheint unter anderem durch das Protein TXNIP vermittelt zu sein [48].

Die Messung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Makrophagen und Verwendung von DCFH-DA zeigte eine deutlich gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowohl unter basalen als auch unter inflammatorischen Bedingungen. Hierbei ist stets zu diskutieren, inwiefern eine gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies Ursache einer Immunantwort oder deren Resultat ist, da die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch NADPH-Oxidasen ein wesentlicher Mechanismus der antimikrobiellen Abwehr ist [107].

Wäre Peroxiredoxin-4 an der Modulation der Immunantwort durch seine ROS-neutralisierende Funktion beteiligt, so sollte der Phänotyp der Monozyten durch die Zugabe alternativer reduzierender Substanzen zu beheben sein. Neben anderen wurde in dieser Arbeit hauptsächlich N-Acetylcystein (NAC) zur Inaktivierung von ROS eingesetzt [108]. Weitere Substanzen wurden untersucht, aber aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt, die Ergebnisse waren stets vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

NAC war in diesen Versuchen im Stande, die Immunantwort nach Ko-Stimulation mit ATP und LPS signifikant zu reduzieren, allerdings war der beobachtete Effekt im Vergleich zu der durch rekombinantes Prdx4 ausgelösten Reduktion der IL-1 $\beta$ -Produktion marginal. Dies legt nahe, dass Peroxiredoxin-4 nicht aufgrund seiner Peroxidase-Aktivität antiinflammatorisch wirksam ist. Stattdessen scheinen andere Effekte hierfür eine Rolle zu spielen. Zu diskutieren wäre an dieser Stelle insbesondere in Zusammenschau mit der Tatsache, dass Prdx4 in den Intrazellularraum aufgenommen wird, eine direkte Interaktion mit einem der am Aufbau des Inflamasoms beteiligten Proteine, wie dies zum Beispiel für TXNIP beschrieben wurde [48].

#### 4.5 Sekretion und Phagocytose stellen Bedingungen für die Wirkung von Prdx4 dar

Es wurde bereits mehrmals auf die Kontroverse die Sekretion von Peroxiredoxin-4 betreffend hingewiesen. Da in dieser Arbeit bisher gesehen wurde, dass exogen zugeführtes Peroxiredoxin-4 in seinem Effekt dem endogenen Protein gleichwertig ist, wurde untersucht, auf welchem Weg es in das Zellinnere gelangt. Aufgrund der Größe von Prdx4 wurde zunächst Phagozytose als verantwortlicher Mechanismus vermutet.

Durch die Applikation von Kälte nach Exposition der Zellen gegenüber Prdx4 oder die Anwendung von Dansylcadaverin konnte die Menge des intrazellulär nachweisbaren Peroxiredoxin-4 deutlich reduziert werden. Dementsprechend war nach Behandlung mit diesen bekannten Inhibitoren der Endozytose die extrazelluläre Konzentration von Prdx4 höher. Das im Überstand „gefangene“ Prdx4 führte jedoch nicht zu einer sichtbaren Reduktion der IL-1 $\beta$ -Produktion. Parallel zu der gesteigerten Produktion von Prdx4 unter inflammatorischen Bedingungen schien auch die Aufnahme nach Stimulation gesteigert. Dies war angesichts der unter entzündlichen Bedingungen generell gesteigerten phagozytotischen Aktivität von Immunzellen jedoch zu erwarten [109].

Auf welche Art und Weise die Aufnahme von Prdx4 initiiert wird und welcher Rezeptor hierfür verantwortlich ist, ist nach wie vor unklar, allerdings wurde erkannt, dass extrazelluläres Peroxiredoxin-1 im Stande ist, die Internalisierung von TLR4 auszulösen, hierbei könnte es in den entsprechenden Vesikeln aufgenommen werden [110]. Die Internalisierung von TLR4 findet üblicherweise in Abhängigkeit von Clathrin statt [111]. Dies wäre mit dem Befund, dass die Aufnahme von Prdx4 durch Dansylcadaverin gehemmt werden kann, vereinbar.

Die Sekretion von Peroxiredoxin-4 durch Wildtyp-Makrophagen wurde bereits dargestellt. Auch wenn in zahlreichen Publikationen die Sekretion abgestritten wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Prdx4 mittels klassischer Sekretion freigesetzt wird. Da KAKIHANA und Kollegen mit ERp44 den Mediator der von ihnen beobachteten Retention identifizieren konnten [61], wurde mittels quantitativer real-time PCR untersucht, ob eventuell eine reduzierte Expression dieses Proteins die Sekretion von Peroxiredoxin-4 ermöglicht.

Nachdem die Transkription von *Erp44* tatsächlich negativ durch die entzündliche Stimulation beeinflusst werden konnte, scheint dies neben einer gesteigerten Expression der Prdx4-mRNA die Ursache für die Freisetzung dieses Proteins zu sein. Ob weitere Proteine, die durch Erp44 retiniert werden, an der antiinflammatorischen Wirkung beteiligt sind, ist allerdings unklar.

Aufgrund der Kombination aus Sekretion und anschließender Phagozytose führt erwartungsgemäß zu einem Verbleib von Prdx4 im endosomalen Kompartiment, welches durch die Anwesenheit von *RAS-related protein Rab-7* (Rab7) gekennzeichnet ist [92]. Dieses konnte mittels der Kolo-kalisation von Prdx4 und Rab7 in der konfokalen Lasermikroskopie nachgewiesen werden (in dieser Arbeit nicht dargestellt).

Allerdings konnte im weiteren Verlauf auch gezeigt werden, dass exogen zugeführtes, rekombinantes Peroxiredoxin-4 nach Stimulation mit Lipopolysaccharid und Adenosintriphosphat in *Prdx4<sup>-/-</sup>*-Makrophagen mit der Caspase-1 kolo-kalisiert. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die Caspase-1 (beziehungsweise das NLRP3-Inflammasom) im Zytosol lokalisiert ist und keine Assoziation zu Zellorganellen bekannt ist [112].

Die Kolo-kalisation gibt insofern Anlass zu der Annahme, dass Prdx4 im Stande ist, das Endosom zu verlassen und in das Zytosol zu gelangen. Dies ist bisher lediglich für Di- oder Tripeptide wie zum Beispiel den Bakterienbestandteil Muramyl-dipeptid (MDP) bekannt. Hier übernehmen spezialisierte Transportproteine, maßgeblich SLC15A3 und SLC15A4 den Transfer über die endosomale Membran [113].

Für einige Proteine des endoplasmatischen Retikulums ist jedoch ein retrograder Transfer in das Cytosol beschrieben, unter anderem für Calreticulin [114]. Dieser Weg scheint für Prdx4 allerdings weniger wahrscheinlich zu sein, als dass die biologischen Effekte dann nicht derartig von einer intakten Phagozytose abhängig sein sollten.

Neben der Caspase-1 existieren weitere Proteine des Zellplasmas, die als mögliche Interaktionspartner von Peroxiredoxin-4 identifiziert wurden. So besteht zwischen der C-terminalen Domäne des *granulocyte-colony stimulating factor-receptor* (G-CSFR) und Peroxiredoxin-4 die Möglichkeit zur Interaktion mit der Konsequenz, dass die Wirkung des Rezeptors hierdurch abgeschwächt wird [115]. Dieser Befund legt nahe, dass zytosolisch lokalisiertes Prdx4 auf vielfältige Art und Weise eine antientzündliche Funktion ausübt und dass dieser Effekt nicht auf reife Makrophagen limitiert zu sein scheint, sondern möglicherweise weitere Zellen des angeborenen Immunsystems einschließt.

## 4.6 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses der Oxidoreduktase Peroxiredoxin-4 (Prdx4) auf die Reaktion des angeborenen Immunsystems der Maus im Rahmen des LPS-vermittelten Endotoxinschocks und die Untersuchung der molekularen Grundlagen.

Die durchgeführten *in vivo*-Studien zeigten eine erhebliche Beeinträchtigung der *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern, beziehungsweise von *Prdx4*<sup>ΔMφ/-</sup>-Tieren und den entsprechenden Kontrolltieren. Der Phänotyp der *Prdx4*<sup>-/-</sup>-Maus konnte hierbei durch die Blockade des IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra deutlich gemildert werden.

Die durchgeführten *in vitro*-Studien zeigten, dass Makrophagen in Abwesenheit von Prdx4 zu einer beeindruckenden Freisetzung von Zytokinen neigen. Peroxiredoxin-4 selbst wurde in Wildtypmakrophagen im Rahmen der Entzündung ebenfalls sezerniert. Die weitergehenden Untersuchungen zeigten, dass für den biologischen Effekt von Prdx4 ein komplexes Zusammenspiel aus Sekretion, Phagozytose und einem bisher ungeklärten Endosom-Zytosol-Transport notwendig ist. Die biologischen Effekte von Prdx4 scheinen dabei nicht im Zusammenhang mit seiner antioxidativen Fähigkeit zu stehen.

Die antiinflammatorische Potenz von Prdx4 wurde bereits erfolgreich in weiteren Tiermodellen, die aufgrund des Umfangs nicht in dieser Arbeit dargestellt wurden, insbesondere der DSS-induzierten Colitis, bewiesen. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass offensichtlich das angeborene Immunsystem eine entscheidende Rolle spielt (Daten nicht gezeigt).

Unklar ist allerdings, ob Prdx4 durch eine direkte Interaktion mit einem der am Aufbau des Inflammasoms beteiligten Proteine die Interleukin-1 $\beta$ -Bildung beeinflusst, oder ob weitere Proteine daran beteiligt sind.

Darüber hinaus erwächst aus der Tatsache, dass Prdx4 möglicherweise parakrin oder gar endokrin wirksam ist und damit selbst den Charakter eines antiinflammatorisch wirksamen Zytokins zeigt, die Frage, inwiefern die Applikation des rekombinanten Proteins im Stande ist, Entzündungsreaktion *in vivo* zu mildern und ob Prdx4 möglicherweise eine therapeutische Rolle im Rahmen des SIRS oder anderen Krankheitsbildern annehmen kann.

## 5. Zusammenfassung

Peroxiredoxine stellen eine Familie hochgradig konservierter, antioxidativer Enzyme dar. Die Höhe der Serumspiegel von Peroxiredoxin-4 (Prdx4) wurde kürzlich mit dem Schweregrad einer Sepsis beziehungsweise des septischen Schocks assoziiert. Die antiinflammatorische Wirkung dieses Proteins *in vitro* wurde bereits in früheren Studien demonstriert. Gegenstand dieser Arbeit war die Evaluation dieser Funktion *in vivo*.

Hierzu wurden *Prdx4*<sup>-/-</sup>- und *Prdx4*<sup>ΔMφ/Y</sup>-Mäuse im Rahmen von Lipopolysaccharid-induzierten Endotoxämie-Modellen bezüglich des klinischen Verlaufes und der Bildung von Entzündungsmediatoren charakterisiert. Darüber hinaus wurden Makrophagen aus *Prdx4*-defizienten Mäusen isoliert und unter Verwendung verschiedener molekularbiologischer Techniken (ELISA, RT-PCR, Western-Blotting, Konfokale Laser-mikroskopie) untersucht.

*Prdx4*<sup>-/-</sup>- und *Prdx4*<sup>ΔMφ/Y</sup>-Mäuse zeigten eine erheblich stärkere Beeinträchtigung mit stärkerem Gewichtsverlust und signifikant höherer Zytokin-Freisetzung. Dieser Phänotyp konnte durch Behandlung mit dem IL1-Rezeptorantagonist Anakinra deutlich gebessert werden. Isolierte Makrophagen zeigten ebenfalls eine stark gesteigerte Zytokin-Produktion. Darüber hinaus zeigten Wildtyp-Makrophagen unter inflammatorischen Bedingungen eine Sekretion von *Prdx4* in das umgebende Medium. Das sezernierte Protein wies eine starke anti-inflammatorische Wirkung auf, welche sich nicht durch die antioxidative Wirkung erklären ließ. Die Sekretion von Peroxiredoxin-4 wurde durch eine verminderte Expression des Proteins Erp44 ausgelöst. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *Prdx4* nach erfolgter Endozytose die endosomale Membran überwindet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Peroxiredoxin-4 eine starke anti-inflammatorische Wirkung besitzt. Im Widerspruch zur gängigen Literatur wird dies nicht über die antioxidative Kapazität des Proteins vermittelt. Vielmehr scheint der bisher unbekannt Mechanismus aus Sekretion und Phagozytose, der zu einer Lokalisation des Proteins im Zytosol der Makrophagen führt, ursächlich zu sein. Die nachgewiesene Ko-Lokalisation mit dem Protein Caspase-1 scheint hierbei eine zentrale Rolle zu spielen. Da Peroxiredoxin-4 nach dieser Studie ein sezerniertes Protein mit der Fähigkeit zur Beeinflussung von Immunzellen darstellt, erfüllt es zumindest in der Theorie wichtige Kriterien, um als Zytokin bezeichnet zu werden. Für ein umfassenderes Verständnis der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch weitere Studien nötig.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Hanauer, S.B., W.J. Sandborn, P. Rutgeerts, R.N. Fedorak, M. Lukas, D. MacIntosh, R. Panaccione, D. Wolf, and P. Pollack, *Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(2): p. 323-33; quiz 591.
2. Abraham, E., R. Wunderink, H. Silverman, T.M. Perl, S. Nasraway, H. Levy, R. Bone, R.P. Wenzel, R. Balk, R. Allred, and et al., *Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group*. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 1995. **273**(12): p. 934-41.
3. Weichart, D., J. Gobom, S. Klopffleisch, R. Hasler, N. Gustavsson, S. Billmann, H. Lehrach, D. Seegert, S. Schreiber, and P. Rosenstiel, *Analysis of NOD2-mediated proteome response to muramyl dipeptide in HEK293 cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(4): p. 2380-9.
4. Committee, A.S.C.C., *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*. *Critical care medicine*, 1992. **20**(6): p. 864-74.
5. Angus, D.C., W.T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M.R. Pinsky, *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. *Critical care medicine*, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
6. Padkin, A., C. Goldfrad, A.R. Brady, D. Young, N. Black, and K. Rowan, *Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland*. *Critical care medicine*, 2003. **31**(9): p. 2332-8.
7. Engel, C., F.M. Brunkhorst, H.G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, and K. Reinhart, *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. *Intensive care medicine*, 2007. **33**(4): p. 606-18.

8. Finfer, S., R. Bellomo, J. Lipman, C. French, G. Dobb, and J. Myburgh, *Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units*. Intensive care medicine, 2004. **30**(4): p. 589-96.
9. Brun-Buisson, C., F. Doyon, J. Carlet, P. Dellamonica, F. Gouin, A. Lepoutre, J.C. Mercier, G. Offenstadt, and B. Regnier, *Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1995. **274**(12): p. 968-74.
10. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler, *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
11. Slifka, M.K. and J.L. Whitton, *Clinical implications of dysregulated cytokine production*. Journal of molecular medicine, 2000. **78**(2): p. 74-80.
12. Lin, E., S.E. Calvano, and S.F. Lowry, *Inflammatory cytokines and cell response in surgery*. Surgery, 2000. **127**(2): p. 117-26.
13. Cohen, J., *Adjunctive therapy in sepsis: a critical analysis of the clinical trial programme*. British medical bulletin, 1999. **55**(1): p. 212-25.
14. Remick, D.G., *Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: why has nothing worked?* Current pharmaceutical design, 2003. **9**(1): p. 75-82.
15. Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson, *Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis*. Nature reviews. Immunology, 2006. **6**(11): p. 813-22.
16. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, M.H. Grayson, D.F. Osborne, T.H. Wagner, J.P. Cobb, C. Coopersmith, and I.E. Karl, *Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis*. Journal of immunology, 2002. **168**(5): p. 2493-500.
17. Hotchkiss, R.S., S.B. Osmon, K.C. Chang, T.H. Wagner, C.M. Coopersmith, and I.E. Karl, *Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways*. Journal of immunology, 2005. **174**(8): p. 5110-8.
18. Ferguson, N.R., H.F. Galley, and N.R. Webster, *T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis*. Intensive care medicine, 1999. **25**(1): p. 106-9.

19. Docke, W.D., F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H.D. Volk, and W. Kox, *Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment*. *Nature medicine*, 1997. **3**(6): p. 678-81.
20. Wang, H., O. Bloom, M. Zhang, J.M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K.R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J. Andersson, U. Andersson, P.E. Molina, N.N. Abumrad, A. Sama, and K.J. Tracey, *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*. *Science*, 1999. **285**(5425): p. 248-51.
21. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
22. Sha, Y., J. Zmijewski, Z. Xu, and E. Abraham, *HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines*. *Journal of immunology*, 2008. **180**(4): p. 2531-7.
23. Sunden-Cullberg, J., A. Norrby-Teglund, A. Rouhiainen, H. Rauvala, G. Herman, K.J. Tracey, M.L. Lee, J. Andersson, L. Tokics, and C.J. Treutiger, *Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock*. *Critical care medicine*, 2005. **33**(3): p. 564-73.
24. Yang, H., M. Ochani, J. Li, X. Qiang, M. Tanovic, H.E. Harris, S.M. Susarla, L. Ulloa, H. Wang, R. DiRaimo, C.J. Czura, J. Roth, H.S. Warren, M.P. Fink, M.J. Fenton, U. Andersson, and K.J. Tracey, *Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(1): p. 296-301.
25. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. *Annual review of immunology*, 2009. **27**: p. 519-50.
26. Vajjhala, P.R., R.E. Mirams, and J.M. Hill, *Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein*. *The Journal of biological chemistry*, 2012. **287**(50): p. 41732-43.
27. Martinon, F. and J. Tschopp, *Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases*. *Cell*, 2004. **117**(5): p. 561-74.

28. Ting, J.P., R.C. Lovering, E.S. Alnemri, J. Bertin, J.M. Boss, B.K. Davis, R.A. Flavell, S.E. Girardin, A. Godzik, J.A. Harton, H.M. Hoffman, J.P. Hugot, N. Inohara, A. Mackenzie, L.J. Maltais, G. Nunez, Y. Ogura, L.A. Otten, D. Philpott, J.C. Reed, W. Reith, S. Schreiber, V. Steimle, and P.A. Ward, *The NLR gene family: a standard nomenclature*. *Immunity*, 2008. **28**(3): p. 285-7.
29. Hsu, L.C., S.R. Ali, S. McGillivray, P.H. Tseng, S. Mariathasan, E.W. Humke, L. Eckmann, J.J. Powell, V. Nizet, V.M. Dixit, and M. Karin, *A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. **105**(22): p. 7803-8.
30. Khare, S., A. Dorfleutner, N.B. Bryan, C. Yun, A.D. Radian, L. de Almeida, Y. Rojanasakul, and C. Stehlik, *An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages*. *Immunity*, 2012. **36**(3): p. 464-76.
31. Horvath, G.L., J.E. Schrum, C.M. De Nardo, and E. Latz, *Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes*. *Immunological reviews*, 2011. **243**(1): p. 119-35.
32. Perregaux, D.G., K. Bhavsar, L. Contillo, J. Shi, and C.A. Gabel, *Antimicrobial peptides initiate IL-1 beta posttranslational processing: a novel role beyond innate immunity*. *Journal of immunology*, 2002. **168**(6): p. 3024-32.
33. Perregaux, D. and C.A. Gabel, *Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity*. *The Journal of biological chemistry*, 1994. **269**(21): p. 15195-203.
34. Shenoy, A.R., D.A. Wellington, P. Kumar, H. Kassa, C.J. Booth, P. Cresswell, and J.D. MacMicking, *GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals*. *Science*, 2012. **336**(6080): p. 481-5.
35. Wewers, M.D. and A. Sarkar, *P2X(7) receptor and macrophage function*. *Purinergic signalling*, 2009. **5**(2): p. 189-95.
36. Dostert, C., V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B.T. Mossman, and J. Tschopp, *Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica*. *Science*, 2008. **320**(5876): p. 674-7.

37. Bauernfeind, F.G., G. Horvath, A. Stutz, E.S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B.G. Monks, K.A. Fitzgerald, V. Hornung, and E. Latz, *Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 787-91.
38. Halle, A., V. Hornung, G.C. Petzold, C.R. Stewart, B.G. Monks, T. Reinheckel, K.A. Fitzgerald, E. Latz, K.J. Moore, and D.T. Golenbock, *The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta*. Nature immunology, 2008. **9**(8): p. 857-65.
39. Gu, Y., K. Kuida, H. Tsutsui, G. Ku, K. Hsiao, M.A. Fleming, N. Hayashi, K. Higashino, H. Okamura, K. Nakanishi, M. Kurimoto, T. Tanimoto, R.A. Flavell, V. Sato, M.W. Harding, D.J. Livingston, and M.S. Su, *Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme*. Science, 1997. **275**(5297): p. 206-9.
40. Gringhuis, S.I., T.M. Kaptein, B.A. Wevers, B. Theelen, M. van der Vlist, T. Boekhout, and T.B. Geijtenbeek, *Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome*. Nature immunology, 2012. **13**(3): p. 246-54.
41. Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp, *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
42. Hoffman, H.M., J.L. Mueller, D.H. Broide, A.A. Wanderer, and R.D. Kolodner, *Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome*. Nature genetics, 2001. **29**(3): p. 301-5.
43. Latz, E., T.S. Xiao, and A. Stutz, *Activation and regulation of the inflammasomes*. Nature reviews. Immunology, 2013. **13**(6): p. 397-411.
44. Bauernfeind, F., A. Rieger, F.A. Schildberg, P.A. Knolle, J.L. Schmid-Burgk, and V. Hornung, *NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223*. Journal of immunology, 2012. **189**(8): p. 4175-81.
45. Mishra, B.B., V.A. Rathinam, G.W. Martens, A.J. Martinot, H. Kornfeld, K.A. Fitzgerald, and C.M. Sasseti, *Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta*. Nature immunology, 2013. **14**(1): p. 52-60.

46. Meissner, F., K. Molawi, and A. Zychlinsky, *Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 866-72.
47. Petrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, and J. Tschopp, *Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration*. Cell death and differentiation, 2007. **14**(9): p. 1583-9.
48. Zhou, R., A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, and J. Tschopp, *Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 136-40.
49. Chae, H.Z., H.J. Kim, S.W. Kang, and S.G. Rhee, *Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin*. Diabetes Res Clin Pract, 1999. **45**(2-3): p. 101-12.
50. Jin, D.Y., H.Z. Chae, S.G. Rhee, and K.T. Jeang, *Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30952-61.
51. Seo, M.S., S.W. Kang, K. Kim, I.C. Baines, T.H. Lee, and S.G. Rhee, *Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20346-54.
52. Choi, H.J., S.W. Kang, C.H. Yang, S.G. Rhee, and S.E. Ryu, *Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(5): p. 400-6.
53. Wood, Z.A., E. Schroder, J. Robin Harris, and L.B. Poole, *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(1): p. 32-40.
54. Kumsta, C. and U. Jakob, *Redox-regulated chaperones*. Biochemistry, 2009. **48**(22): p. 4666-76.
55. Tavender, T.J. and N.J. Bulleid, *Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced during disulphide formation*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 15): p. 2672-9.
56. Rabilloud, T., M. Heller, F. Gasnier, S. Luche, C. Rey, R. Aebersold, M. Benahmed, P. Louisot, and J. Lunardi, *Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19396-401.
57. Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus, *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*. Science, 2003. **300**(5619): p. 650-3.

58. Biteau, B., J. Labarre, and M.B. Toledano, *ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by S. cerevisiae sulphiredoxin*. *Nature*, 2003. **425**(6961): p. 980-4.
59. Budanov, A.V., A.A. Sablina, E. Feinstein, E.V. Koonin, and P.M. Chumakov, *Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD*. *Science*, 2004. **304**(5670): p. 596-600.
60. Zito, E., E.P. Melo, Y. Yang, A. Wahlander, T.A. Neubert, and D. Ron, *Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin*. *Mol Cell*, 2010. **40**(5): p. 787-97.
61. Kakihana, T., K. Araki, S. Vavassori, S. Iemura, M. Cortini, C. Fagioli, T. Natsume, R. Sitia, and K. Nagata, *Dynamic regulation of Ero1alpha and peroxiredoxin 4 localization in the secretory pathway*. *The Journal of biological chemistry*, 2013. **288**(41): p. 29586-94.
62. Otsu, M., G. Bertoli, C. Fagioli, E. Guerini-Rocco, S. Nerini-Molteni, E. Ruffato, and R. Sitia, *Dynamic retention of Ero1alpha and Ero1beta in the endoplasmic reticulum by interactions with PDI and ERp44*. *Antioxidants & redox signaling*, 2006. **8**(3-4): p. 274-82.
63. Fujii, J. and Y. Ikeda, *Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein*. *Redox report : communications in free radical research*, 2002. **7**(3): p. 123-30.
64. Tavender, T.J., A.M. Sheppard, and N.J. Bulleid, *Peroxiredoxin IV is an endoplasmic reticulum-localized enzyme forming oligomeric complexes in human cells*. *Biochem J*, 2008. **411**(1): p. 191-9.
65. Iuchi, Y., F. Okada, S. Tsunoda, N. Kibe, N. Shirasawa, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Ikeda, and J. Fujii, *Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress*. *The Biochemical journal*, 2009. **419**(1): p. 149-58.
66. Zito, E., H.G. Hansen, G.S. Yeo, J. Fujii, and D. Ron, *Endoplasmic reticulum thiol oxidase deficiency leads to ascorbic acid depletion and noncanonical scurvy in mice*. *Molecular cell*, 2012. **48**(1): p. 39-51.
67. Haridas, V., J. Ni, A. Meager, J. Su, G.L. Yu, Y. Zhai, H. Kyaw, K.T. Akama, J. Hu, L.J. Van Eldik, and B.B. Aggarwal, *TRANK, a novel cytokine that activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase*. *J Immunol*, 1998. **161**(1): p. 1-6.

68. Yu, S., Y. Mu, J. Ao, and X. Chen, *Peroxiredoxin IV regulates pro-inflammatory responses in large yellow croaker (Pseudosciaena crocea) and protects against bacterial challenge*. Journal of proteome research, 2010. **9**(3): p. 1424-36.
69. Chang, X., Y. Cui, M. Zong, Y. Zhao, X. Yan, Y. Chen, and J. Han, *Identification of proteins with increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues*. The Journal of rheumatology, 2009. **36**(5): p. 872-80.
70. Schulte, J., J. Struck, J. Kohrle, and B. Muller, *Circulating levels of peroxiredoxin 4 as a novel biomarker of oxidative stress in patients with sepsis*. Shock, 2011. **35**(5): p. 460-5.
71. Abbasi, A., E. Corpeleijn, D. Postmus, R.T. Gansevoort, P.E. de Jong, R.O. Gans, J. Struck, J. Schulte, H.L. Hillege, P. van der Harst, L.M. Peelen, J.W. Beulens, R.P. Stolk, G. Navis, and S.J. Bakker, *Peroxiredoxin 4, a novel circulating biomarker for oxidative stress and the risk of incident cardiovascular disease and all-cause mortality*. Journal of the American Heart Association, 2012. **1**(5): p. e002956.
72. Gerrits, E.G., A. Alkhalaf, G.W. Landman, K.J. van Hateren, K.H. Groenier, J. Struck, J. Schulte, R.O. Gans, S.J. Bakker, N. Kleefstra, and H.J. Bilo, *Serum Peroxiredoxin 4: A Marker of Oxidative Stress Associated with Mortality in Type 2 Diabetes (ZODIAC-28)*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89719.
73. Clausen, B.E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, and I. Forster, *Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice*. Transgenic Res, 1999. **8**(4): p. 265-77.
74. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
75. Schneider, M., A.G. Zimmermann, R.A. Roberts, L. Zhang, K.V. Swanson, H. Wen, B.K. Davis, I.C. Allen, E.K. Holl, Z. Ye, A.H. Rahman, B.J. Conti, T.K. Eitas, B.H. Koller, and J.P. Ting, *The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF-kappaB*. Nature immunology, 2012. **13**(9): p. 823-31.

76. Beigneux, A.P., A.H. Moser, J.K. Shigenaga, C. Grunfeld, and K.R. Feingold, *Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **293**(1): p. 145-9.
77. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical biochemistry, 1987. **162**(1): p. 156-9.
78. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim, *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
79. Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh, and R. Griffith, *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Bio/technology, 1992. **10**(4): p. 413-7.
80. Livak, K.J., S.J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz, *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. PCR methods and applications, 1995. **4**(6): p. 357-62.
81. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. The Journal of biological chemistry, 1951. **193**(1): p. 265-75.
82. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
83. Avrameas, S. and B. Guilbert, *A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies*. European journal of immunology, 1971. **1**(5): p. 394-6.
84. Rosenkranz, A.R., S. Schmalldienst, K.M. Stuhlmeier, W. Chen, W. Knapp, and G.J. Zlabinger, *A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate*. Journal of immunological methods, 1992. **156**(1): p. 39-45.
85. Dinarello, C.A., A. Simon, and J.W. van der Meer, *Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases*. Nature reviews. Drug discovery, 2012. **11**(8): p. 633-52.

86. Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti, *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells.* Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
87. Ohmori, Y., S. Fukumoto, and T.A. Hamilton, *Two structurally distinct kappa B sequence motifs cooperatively control LPS-induced KC gene transcription in mouse macrophages.* Journal of immunology, 1995. **155**(7): p. 3593-600.
88. Walker, N.P., R.V. Talanian, K.D. Brady, L.C. Dang, N.J. Bump, C.R. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, M.C. Hackett, L.D. Hammill, and et al., *Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer.* Cell, 1994. **78**(2): p. 343-52.
89. Davies, P.J., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, and I.H. Pastan, *Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones.* Nature, 1980. **283**(5743): p. 162-7.
90. Silverstein, S.C., R.M. Steinman, and Z.A. Cohn, *Endocytosis.* Annual review of biochemistry, 1977. **46**: p. 669-722.
91. Klausner, R.D., J.G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz, *Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure.* The Journal of cell biology, 1992. **116**(5): p. 1071-80.
92. Stenmark, H., *Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2009. **10**(8): p. 513-25.
93. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock.* The Journal of surgical research, 1990. **49**(2): p. 186-96.
94. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
95. Baker, C.C., T. Niven-Fairchild, C. Caragnano, and T.S. Kupper, *Outcome following femur fracture and subsequent cecal ligation and puncture in endotoxin-sensitive (C3H/HeN) and endotoxin-resistant (C3H/HeJ) mice.* The Journal of surgical research, 1991. **50**(2): p. 170-4.

96. Schneider, M., A.G. Zimmermann, R.A. Roberts, L. Zhang, K.V. Swanson, H. Wen, B.K. Davis, I.C. Allen, E.K. Holl, Z. Ye, A.H. Rahman, B.J. Conti, T.K. Eitas, B.H. Koller, and J.P. Ting, *The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF-kappaB*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(9): p. 823-31.
97. Liang, J., D. Jiang, J. Griffith, S. Yu, J. Fan, X. Zhao, R. Bucala, and P.W. Noble, *CD44 is a negative regulator of acute pulmonary inflammation and lipopolysaccharide-TLR signaling in mouse macrophages*. *Journal of immunology*, 2007. **178**(4): p. 2469-75.
98. Mao, K., S. Chen, M. Chen, Y. Ma, Y. Wang, B. Huang, Z. He, Y. Zeng, Y. Hu, S. Sun, J. Li, X. Wu, X. Wang, W. Strober, C. Chen, G. Meng, and B. Sun, *Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock*. *Cell research*, 2013. **23**(2): p. 201-12.
99. Muzio, M., J. Ni, P. Feng, and V.M. Dixit, *IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling*. *Science*, 1997. **278**(5343): p. 1612-5.
100. Sachithanandan, N., K.L. Graham, S. Galic, J.E. Honeyman, S.L. Fynch, K.A. Hewitt, G.R. Steinberg, and T.W. Kay, *Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance*. *Diabetes*, 2011. **60**(8): p. 2023-31.
101. O'Connor, W., Jr., J.A. Harton, X. Zhu, M.W. Linhoff, and J.P. Ting, *Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties*. *Journal of immunology*, 2003. **171**(12): p. 6329-33.
102. Liu, Y., Y. Xiao, and Z. Li, *P2X7 receptor positively regulates MyD88-dependent NF-kappaB activation*. *Cytokine*, 2011. **55**(2): p. 229-36.
103. Villa, P., S.H. Kaufmann, and W.C. Earnshaw, *Caspases and caspase inhibitors*. *Trends in biochemical sciences*, 1997. **22**(10): p. 388-93.
104. Martinon, F. and J. Tschopp, *Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation*. *Cell death and differentiation*, 2007. **14**(1): p. 10-22.
105. Ahn, H., J. Kim, E.B. Jeung, and G.S. Lee, *Dimethyl sulfoxide inhibits NLRP3 inflammasome activation*. *Immunobiology*, 2014. **219**(4): p. 315-22.

106. Schreck, R., P. Rieber, and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1*. EMBO J, 1991. **10**(8): p. 2247-58.
107. Anrather, J., G. Racchumi, and C. Iadecola, *NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5657-67.
108. Park, E., K.H. Yu, K. Kim do, S. Kim, K. Sapkota, S.J. Kim, C.S. Kim, and H.S. Chun, *Protective effects of N-acetylcysteine against monosodium glutamate-induced astrocytic cell death*. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 2014. **67**: p. 1-9.
109. Doyle, S.E., R.M. O'Connell, G.A. Miranda, S.A. Vaidya, E.K. Chow, P.T. Liu, S. Suzuki, N. Suzuki, R.L. Modlin, W.C. Yeh, T.F. Lane, and G. Cheng, *Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38*. The Journal of experimental medicine, 2004. **199**(1): p. 81-90.
110. Riddell, J.R., X.Y. Wang, H. Minderman, and S.O. Gollnick, *Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4*. Journal of immunology, 2010. **184**(2): p. 1022-30.
111. Wang, Y., Y. Yang, X. Liu, N. Wang, H. Cao, Y. Lu, H. Zhou, and J. Zheng, *Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling pathway*. Cellular immunology, 2012. **274**(1-2): p. 121-9.
112. Wang, Y., C. Yang, K. Mao, S. Chen, G. Meng, and B. Sun, *Cellular localization of NLRP3 inflammasome*. Protein & cell, 2013. **4**(6): p. 425-31.
113. Nakamura, N., J.R. Lill, Q. Phung, Z. Jiang, C. Bakalarski, A. de Maziere, J. Klumperman, M. Schlatter, L. Delamarre, and I. Mellman, *Endosomes are specialized platforms for bacterial sensing and NOD2 signalling*. Nature, 2014.
114. Afshar, N., B.E. Black, and B.M. Paschal, *Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(20): p. 8844-53.
115. Palande, K., O. Roovers, J. Gits, C. Verwijmeren, Y. Iuchi, J. Fujii, B.G. Neel, R. Karisch, J. Tavernier, and I.P. Touw, *Peroxiredoxin-controlled G-CSF signalling at the endoplasmic reticulum-early endosome interface*. Journal of cell science, 2011. **124**(Pt 21): p. 3695-705.

## Verwendete Materialien

### Antikörper

#### Primärantikörper

Antigen	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
$\beta$ -Actin	Maus	Sigma-Aldrich, USA	1/10.000 in 5% MMP (WB)
$\beta_2$ -Mikroglobulin	Maus	SCBT, USA	1/1.000 in 5% MMP (WB)
Caspase1 (p10+p45)	Maus	SCBT	1/1.000 in 5% MMP (WB) 1/100 in BSA/Triton-X (IIF)
I $\kappa$ B $\alpha$	Kaninchen	CST, USA	1/2.000 in 5% MMP (WB)
NF- $\kappa$ B p65	Kaninchen	CST	1/2.000 in 5% MMP (WB)
NF- $\kappa$ B phospho-p65	Kaninchen	CST	1/1.000 in 5% BSA (WB)
Peroxiredoxin-4	Kaninchen	AbCam, UK	1/5.000 in 5% MMP (WB) 1/100 in BSA/Triton-X (IIF)

WB: Western-Blotting, IIF: indirekte Immunfluoreszenz

#### Sekundärantikörper

Antigen	Ursprung	Hersteller	Farbstoff	Verdünnung
Maus-IgG	Ziege	GE, USA	HRP	1/5.000 in 5% MMP (WB)
Kaninchen-IgG	Schaf	GE, USA	HRP	1/5.000 in 5% MMP (WB)
Maus-IgG	Esel	Invitrogen, USA	Alexa 555	1/500 in BSA/Triton-X (IIF)
Kaninchen-IgG	Ziege	Invitrogen, USA	Alexa 488	1/500 in BSA/Triton-X (IIF)

HRP: horseradish peroxidase

## Primer

Name	Sequenz	T <sub>Anneal</sub> (°C)	Verwendung
Prdx4KO_1	CTA CGG ACC TCC AGA AAG CG	60	Genotypisierung
Prdx4KO_2	GAT TTC GGG AGA GGT AGC GG		Genotypisierung
Prdx4KO_3	TAC CAC CAA CCC AAC TGT GC		Genotypisierung
Prdx4floxed_f	TCT CTG AAC AGA TTT CGG GAG AGG TAGC	59	Genotypisierung
Prdx4floxed_r	CAA GAT TTA CCA ACC CAA CTG TGC		Genotypisierung
LysMcre_f	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG	62	Genotypisierung
LysMcre_r	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC		Genotypisierung

Name	Sequenz	T <sub>Anneal</sub> (°C)	Verwendung
NLRP3_f	GGC GAG ACC TCT GGG AAA AA	60	SYBR-Green
NLRP3_r	CGT GTA GCG ACT GTT GAG GT	60	SYBR-Green
ASC_f	TGA GCA GCT GCA AAC GAC TA	60	SYBR-Green
ASC_r	CAC GAA CTG CCT GGT ACT GT	60	SYBR-Green
Caspase-1_f	TGT ATT CAC GCC CTG TTG GA	60	SYBR-Green
Caspase-1_r	GTC CCG TGC CTT GTC CAT AG	60	SYBR-Green

Für die TaqMan-basierte Expressionsanalyse der Erp44-mRNA wurden folgende Sonden von der Firma Applied Biosystems (USA) bezogen:

Gen	Genprodukt	Referenznummer	Länge des Produktes
<i>Erp44</i>	Erp44	Mm00466483_m1	82bp
<i>Gapdh</i>	Gapdh	Mm99999915_g1	107bp

Verwendete Chemikalien, sofern nicht anderswo beschrieben

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
6-Aminocapronsäure	Merck
Ammoniumpersulfat	Merck
Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich
Brefeldin A	Enzo Lifesciences
Monodansylcadaverin	Sigma-Aldrich
DCFH-DA	Invitrogen
DEPC-H <sub>2</sub> O	Ambion
Dimethylsulfoxid	Merck
dNTP-Mix	Thermo Fischer
DTT	Merck
Methanol	Merck
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Merck
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich
NaCl	Merck
rh-Prdx4	Abcam
SDS	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	Merck
Trypsin-EDTA	Gibco
zYVAD-FMK	Enzo Lifesciences

## Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater **Prof. Dr. Philip Rosenstiel** für die herausragende Betreuung danken. Ohne die stets konstruktive und erfrischende Diskussion und die Gewährung außerordentlicher wissenschaftlicher Freiheiten wäre dieses Projekt in seiner Form nicht möglich gewesen. Darüber hinaus gilt ihm mein tiefer Dank für seinen Rat und seine Hilfe bei der Gestaltung meiner akademischen Ausbildung.

Neben Prof. Dr. Rosenstiel gilt mein Dank des Weiteren den Professoren **Dr. Stefan Schreiber** und **Dr. Andre Franke** für die Möglichkeit, diese Arbeit in dem exzellenten Umfeld des IKMB anfertigen zu dürfen und Prof. Dr. Schreiber darüber hinaus für die Gewährung eines Forschungsstipendiums.

Mein ganz besonderer Dank geht auch an **Frau Dr. Simone Lipinski**, die nicht nur durch ihre außerordentliche fachliche Betreuung und stets kritische und erkenntnisreiche Diskussion, sondern auch mit ihrer Hilfsbereitschaft und Motivation den Erfolg dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

**Dr. Konrad Aden** danke ich ebenfalls für die Diskussion, Kritik und Rat. Vor allem danke ich ihm jedoch für die Geduld und Unterstützung im Umgang mit den Tieren und seine Anregungen zur Gestaltung meiner Karriere abseits des Labors.

Auch wenn ich nicht alle weiteren Mitglieder der **Arbeitsgruppe für Molekulare Zellbiologie** hier namentlich würdigen kann, sei ihnen jedoch allen mein tiefster Dank für die freundliche Aufnahme und Anleitung und Diskussion sicher.

Meinen **Eltern** und auch meinem lieben **Großvater** danke ich vor allem dafür, dass sie mich jederzeit während dieses Studiums so bedingungslos unterstützt haben und auch stets an den Erfolg dieser Arbeit geglaubt haben.

Zuletzt möchte ich meiner lieben **Claudia** für ihre Geduld und Ausgeglichenheit danken und dafür, dass ich mir bei allen Unwägbarkeiten ihres Beistandes so sicher sein durfte.

## Curriculum Vitae

### Persönliche Informationen

---

Name : Steffen Pfeuffer  
Geburtsdatum : 11. April 1988  
Geburtsort : Braunschweig  
Nationalität : deutsch  
Adresse : Feldstraße 56, 24105 Kiel  
Kontakt : Tel. : 0176-703675280;  
E-Mail : steffenpfeuffer@gmail.com

### Ausbildung

---

1994-2000 : Primarstufe (Grundschule Schandelah + Orientierungsstufe  
Sickte)  
2000-2007 : Gymnasium Gaußschule, Braunschweig, Abiturnote: 1,2  
2007-2008 : Zivildienst, ev.-luth. Krankenhaus Marienstift, Braunschweig  
2008-2010 : Studium der Humanmedizin, CAU Kiel, vorklinischer Abschnitt,  
Gesamtnote der 1. ÄP: 1,0  
2010-2013 : Studium der Humanmedizin, CAU Kiel, klinischer Abschnitt  
2013-2014 Praktisches Jahr:  
Chirurgie : Universitätsklinik SH, Kiel  
Innere Medizin : Städtisches Krankenhaus, Kiel  
Neurologie : Institute of Neurology, Queen Square,  
University College London, England

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

---

**Pfeuffer S.**, Trost N., Aden, K., Schreiber S., Lipinski, S., Rosenstiel, P., *A role for Peroxiredoxin-4 in a murine colitis model of intestinal inflammation.* Gut, 2014. 63: A172-3.

Aden K., Rehman A., Haesler R., Tran F., **Pfeuffer S.**, Billmann S., Paulsen M., Lipinski S., Kaser A., Schreiber S., Rosenstiel P., *The epithelial IL-23R mediates intestinal immune defense and epithelial regeneration.* Gastroenterology, 2014. 146(5), S-48.