

In Kooperation zwischen dem  
Institut für Experimentelle Endokrinologie der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
und der  
BRAHMS GmbH, Part of Thermo Fisher Scientific

DISSERTATION

Charakterisierung von Peroxiredoxin 4 als Biomarker für  
oxidativen Stress

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janin Schulte

aus Potsdam

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle

2. Prof. Dr. med. Ch. J. Strasburger

3. Prof. Dr. med. T. Grune

Datum der Promotion: 07.09.2012

## Vorwort

Bei der aktuellen Arbeit handelt es sich um eine kumulative Dissertation, welche die Ergebnisse meiner Untersuchung zu zellulärer und subzellulärer Lokalisation sowie Sekretion und Regulation des antioxidativen Enzyms Peroxiredoxin 4 im physiologischen und pathophysiologischen Kontext zusammenfasst. Die Veröffentlichung einer Auswahl der Resultate erfolgte in nachstehenden Publikationen:

- [I] **Schulte, J.**, Struck, J., Bergmann, A., Köhrle, J. (2010). "Immunoluminometric assay for quantification of peroxiredoxin 4 in human serum." Clin Chim Acta **411**(17-18): 1258-63.
  
- [II] **Schulte, J.**, Struck, J., Köhrle, J., Müller, B. (2011). "Circulating levels of peroxiredoxin 4 as a novel biomarker of oxidative stress in patients with sepsis." Shock **35**(5): 460-5.
  
- [III] Nickel, C. H., Ruedinger, J., Misch, F., Blume, K., Maile, S., **Schulte, J.**, Köhrle, J., Hartmann, O., Giersdorf, S., Bingisser, R. (2011). "Copeptin and peroxiredoxin-4 independently predict mortality in patients with nonspecific complaints presenting to the emergency department." Acad Emerg Med **18**(8): 851-9.

Darüber hinaus bezieht sich die vorliegende Dissertation auf Ergebnisse, die in Abstractform präsentiert wurden:

- [IV] **Schulte, J.**, Struck, J., Kinne, A., Tedelind, S., Brix, K. und Köhrle, J. (2010). "Secretion of peroxiredoxin 4 in response to oxidative stress." 17th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine. Free Radic Biol Med **49**(suppl 1): S197.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	5
1 Abstract.....	6
2 Einleitung.....	7
2.1 Oxidativer Stress.....	7
2.2 Peroxiredoxine.....	7
2.2.1 Peroxiredoxin 4.....	8
2.3 Patienten auf der Intensivstation und Notaufnahme.....	12
3 Zielstellung.....	13
4 Material und Methoden.....	13
4.1 Messung von Peroxiredoxin 4 im Immunoassay.....	13
4.2 Weitere Labormessungen.....	13
4.3 Protein-biochemische und molekularbiologische Methoden.....	14
4.4 Zellkultur.....	14
4.5 Probanden und Studiendesign.....	15
4.6 Statistische Analyse.....	16
5 Ergebnisse.....	16
5.1 Entwicklung eines Immunoassays zum Nachweis von Peroxiredoxin 4.....	16
5.2 Peroxiredoxin 4 in gesunden und erkrankten Individuen.....	19
5.3 Struktur, Lokalisation und Regulation von Peroxiredoxin 4.....	22
6 Diskussion.....	24
6.1 Immunoassay zum Nachweis von Peroxiredoxin 4.....	24
6.2 Sekretion von Peroxiredoxin 4.....	25
6.3 Peroxiredoxin 4 als Biomarker.....	27
6.4 Funktion von Peroxiredoxin 4.....	30
7 Ausblick.....	31
Literaturverzeichnis.....	33
Anteilerklärung.....	43
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen.....	45
Lebenslauf.....	46
Komplette Publikationsliste.....	47
Selbstständigkeitserklärung.....	49
Danksagung.....	50

## Abkürzungen

ADL	Activities of Daily Living
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
arb. U/L	Arbeitseinheiten
AUC	Area Under the Curve
BANC	Basel Non-Specific Complaints
Cath	Cathepsin
CCI	Charlson Comorbidity Index
CI	Konfidenzintervall
C-Index	Concordance-Index
CRP	C-reaktives Protein
DTT	Dithiothreitol
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Emergency Severity Index
HMGB1	High-Mobility Group Box Protein 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL-6	Interleukin-6
IQR	Interquartil-Spanne
LPS	Lipopolysaccharid
LR	Likelihood-Ratio
PCT	Procalcitonin
Prx	Peroxiredoxin
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment

## 1 Abstract

Die Früherkennung schwerer Krankheitsverläufe kann erheblich zur Anpassung der Therapie und zur Verringerung von Mortalitätsraten beitragen, ist nicht zuletzt aufgrund des Mangels geeigneter Biomarker jedoch oftmals nur unzureichend möglich. Es wird angenommen, dass oxidativer Stress als Zeichen eines Ungleichgewichtes zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und Antioxidantien vielfältig in Krankheitsgeschehen involviert ist. Derzeit besteht Uneinigkeit über die Lokalisation und Funktion des antioxidativen Enzyms Peroxiredoxin 4 (Prx4), welches als möglicher Biomarker für oxidativen Stress infrage kommt.

Zum quantitativen Nachweis von Prx4 wurde daher zunächst ein sensitiver Chemilumineszenz-Immunoassay entwickelt und validiert. Im Serum Gesunder wiesen Frauen leicht höhere Prx4-Konzentrationen auf als Männer. Auf der Intensivstation waren erhöhte Prx4-Serumwerte in Sepsis-Patienten mit dem Schweregrad und der Mortalität assoziiert und zeigten Korrelationen mit gängigen klinischen Punktesystemen (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, APACHE II; Sequential Organ Failure Assessment, SOFA) anderen antioxidativen Substanzen (Albumin, Bilirubin), Infektions- (Procalcitonin) sowie Entzündungsparametern (C-reaktives Protein, Interleukin-6). Auch bei Patienten, welche mit unspezifischen Beschwerden in die Notaufnahme kommen und in der Regel ein hohes Alter, viele Begleiterkrankungen sowie eine umfangreiche medikamentöse Behandlung aufweisen, zeigte Prx4 einen von Alter, Geschlecht, klinischen Punktesystemen (Charlson Comorbidity Index, CCI; Activities of Daily Living, ADL) und Krankenhausentlassung unabhängigen kurzzeitprognostischen Nutzen und ermöglicht dem behandelnden Notaufnahmearzt damit eine Risikostratifizierung der Patienten und eine verbesserte Ressourcenallokation.

Neben dem Nachweis von Prx4 in der Zirkulation konnte das Enzym in Epithelzellen intrazellulär in Kompartimenten des klassischen Sekretionsweges sowie extrazellulär im Kulturmedium lokalisiert werden und wird folglich als sezerniertes Protein eingeschätzt. Die ansteigende Prx4-Sekretion durch Behandlung von MDCK1-Zellen mit Wasserstoffperoxid unterstützt die im Weiteren zu validierende Annahme, dass die deutlich erhöhten Prx4-Serumwerte in erkrankten Individuen auf vermehrten oxidativen Stress zurückzuführen sind.

## 2 Einleitung

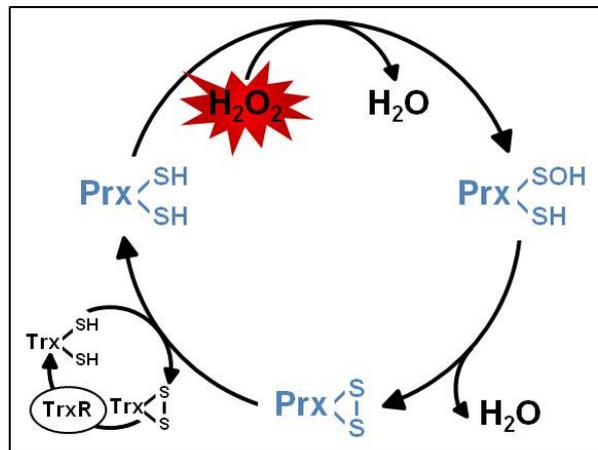
### 2.1 Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden in allen aeroben Lebewesen unter physiologischen Bedingungen gebildet, passiv als Nebenprodukt der Atmungskette in den Mitochondrien oder aktiv durch Immun- und andere Zellen, um eindringende Pathogene zu zerstören und Signale weiterzugeben. Wasserstoffperoxid, selbst ein schwach oxidatives Molekül, wird durch Superoxiddismutase aus dem Superoxid-Radikal gebildet und kann anschließend in der Fenton-Reaktion weiter zu dem hochreaktiven Hydroxyl-Radikal umgewandelt werden (Rhee et al. 2005). Da ROS in aller Regel unspezifisch mit Makromolekülen in ihrer Umgebung reagieren, haben Organismen verschiedene antioxidative Schutzmechanismen entwickelt, welche zelleigene Moleküle vor dieser schädigenden Wirkung bewahren und ein Redox-Gleichgewicht aufrecht erhalten. Diese Schutzmechanismen umfassen antioxidative Enzyme wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase oder Peroxiredoxine (Prx) und nicht-enzymatische Substanzen wie Albumin, Bilirubin und Thioredoxin. Viele Krankheiten, inklusive dem normalen Alterungsprozess, sind dadurch gekennzeichnet, dass diese sensible Balance gestört ist und mehr ROS gebildet werden als durch körpereigene Antioxidantien entfernt oder abgebaut werden können (Dalle-Donne et al. 2006; Giustarini et al. 2009; Valko et al. 2007). Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet und kann durch den Nachweis von reaktiven Spezies und deren oxidierten Produkten (z.B. Nitrit/Nitrat-Plasmaspiegel) sowie durch Detektion von Antioxidantien (z.B. Thioredoxin, totale antioxidative Kapazität) gemessen werden.

### 2.2 Peroxiredoxine

Peroxiredoxine sind eine vergleichsweise spät entdeckte Familie ubiquitär exprimierter, Thiol-abhängiger Peroxidasen, die durch Abbau von Peroxiden zur Verminderung von oxidativem Stress beitragen und in verschiedene zelluläre Signalprozesse, Apoptose, Zelldifferenzierung und -proliferation involviert sind (Rhee et al. 2005; Wood et al. 2003). Säugetier-Prx unterteilen sich in sechs Isoformen (Prx1-6), welche in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten zu finden sind. Vertreter der Gruppe typischer 2-Cys-Prx (Prx1-4) werden als obligate Homodimere beschrieben, deren Untereinheiten durch Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinresten miteinander verbunden sind (Rhee et al. 2005; Wood et al. 2003). An der katalytischen Reaktion sind der bedingt Lösungsmittel-zugängliche peroxidative Cysteinrest im aktiven Zentrum (Position 124 in Prx4) der einen und ein regenerierender Cysteinrest (Position 245 in Prx4) aus dem beweglichen C-Terminus der anderen Untereinheit beteiligt. Im Verlauf der Katalyse wird der peroxidative Cysteinrest oxidiert und bildet eine Disulfidbrücke mit dem regenerierenden

Cysteinrest (Abb. 1). Die Reduktion erfolgt durch zellspezifische Disulfid-Oxidoreduktasen und deren Kofaktoren Thioredoxin oder Glutathion (Rhee et al. 2005; Wood et al. 2003).



**Abb. 1 Abbau von Wasserstoffperoxid durch Peroxiredoxin 1-5**

Das während der Katalyse oxidierte Peroxiredoxin (Prx) wird durch das Thioredoxinreduktase (TrxR)- oder Glutathionreduktase-System regeneriert. Für 2-Cys-Prx (Prx1-4) erfolgt die Bildung einer Disulfidbindung zwischen benachbarten Untereinheiten, für Prx5 innerhalb der gleichen Untereinheit.

Im Fall einer inaktivierenden Überoxidation aufgrund hoher lokaler Peroxidkonzentrationen werden 2-Cys-Prx energieabhängig durch Sulfiredoxin reaktiviert (Woo et al. 2005). Der oligomere Status typischer 2-Cys-Prx (Dimer, ringförmige Anordnung von fünf Dimeren zu einem Dekamer oder Multimerer höherer Ordnung) verändert sich redox-abhängig (Wood et al. 2002) und wurde kürzlich als transkriptionsunabhängiger Mechanismus des zirkadianen Rhythmus identifiziert (O'Neill et al. 2011). Es wird vermutet, dass die Dimer-Dimer-Verbindung durch hydrophobe Wechselwirkungen und eventuell zusätzlich stabilisierende Disulfidbrücken zwischen nicht-katalytischen Cysteinresten gebildet wird (Lee et al. 2007; Tavender et al. 2008; Wood et al. 2003).

### 2.2.1 Peroxiredoxin 4

Für alle Prx-Isoformen wurden Veränderungen der Expression (Bast et al. 2010; Brixius et al. 2007; Cha et al. 2009; Diet et al. 2007; Dreja et al. 2010; Jarvela et al. 2010; Karihtala et al. 2003; Pylväs et al. 2010; Xie et al. 2008) und des Oxidationsstatus (Cordray et al. 2007; Diet et al. 2007; Jamaluddin et al. 2010; Lehtonen et al. 2004; Mitsumoto et al. 2001; O'Flaherty et al. 2011; Rabilloud et al. 2002; Tavender et al. 2010) sowie teilweise der subzellulären Lokalisationen (Cha et al. 2000; Matte et al. 2010; Rocha et al. 2009) im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen (z.B. Herzversagen, Krebs, Diabetes, Störung der Hämoglobin-Synthese), oxidativer und inflammatorischer Stimuli beschrieben, deren vollständige Nennung an dieser Stelle zu weit führen würde (siehe Überblick für Prx4 in Tab. 1).

Tab. 1 Peroxiredoxin 4 im klinischen Zusammenhang

Indikation	Referenz	Studieninhalte
<b>Diabetes</b>	(Dreja et al. 2010)	Pankreas im Diet-induzierten diabetischen Mausmodell: Erhöhte Prx4 <sup>a</sup> -mRNA-Expression
	(Jiang et al. 2011; Xie et al. 2008)	Pankreas im Diabetes Typ 1-Maus- bzw. Rattenmodell: Verringerte Prx4-Proteinexpression
	(Ding et al. 2010)	Pankreatische Prx4-Überexpression im Diabetes Typ 1-Mausmodell: Schutz gegenüber dem Voranschreiten der Krankheit
<b>Gastrointestinal-Erkrankungen</b>	(Meneses-Lorente et al. 2004)	Medikamenten-induzierte Leberverfettung im Rattenmodell: Verringerte Prx4-Proteinexpression in der Membranfraktion
	(Lee et al. 2007)	HFE-Genmutation (Hämochromatose) in Neuronenzellen: Erhöhte Prx4-mRNA-Expression
<b>Immunologische Erkrankungen</b>	(Iizuka et al. 2010; Karasawa et al. 2005)	Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis, primäre Vaskulitis, Morbus Behçet: Prx4-Autoantikörper im Serum
	(Chang et al. 2009)	Rheumatoide Arthritis: Erhöhte Prx4-Werte in Plasma und Synovialflüssigkeit
	(Simula et al. 2010)	Zöliakie, Duodenumbiopsie: Erhöhte Prx4-Proteinexpression
<b>Infektion und Inflammation</b>	(Jin et al. 1997)	Humanes Immundefizienz-Virus-Infektion von T-Zelllinien: Verringerte Prx4-Proteinexpression; Überexpression von Prx4 hemmt Virus
	(Knight et al. 2009)	Parasitäre Infektion im Schneckenmodell: Erhöhte Prx4-Proteinexpression im Hepatopankreas resistenter Tiere
	(Mota et al. 2009)	Hepatitis D-Virus-Infektion von Leberzellen: Erhöhte Prx4-Proteinexpression
	(Jamaluddin et al. 2010)	Respiratory-Syncytial-Virus-Infektion von Lungenepithelzellen: Verschiebung des isoelektrischen Punktes von Prx4
	(Qiu et al. 2010)	LPS-Stimulation im Garnelenmodell: Erhöhte Prx4-mRNA-Expression im Hepatopankreas
	(Yu et al. 2010)	Bakterielle Infektion im Fischmodell: Erhöhte Prx4-Proteinexpression in der Milz; Injektion von Prx4 verbessert Prognose
	(Wang et al. 2011)	Tollwutvirus-Infektion von Neuroblastomzellen: Stammabhängig erhöhte Prx4-Proteinexpression
<b>Kardiovaskuläre Erkrankungen</b>	(Brixius et al. 2007)	Herzmuskelschwäche: Verringerte Prx4-Proteinexpression
	(Full et al. 2010)	Atherosklerotische Plaques: Erhöhte Prx4-

		Oxidation in glatten Muskelzellen
<b>Krankheiten der Genitalorgane</b>	(Matsuki et al. 2002)	Lageanomalie des Hodens im Mausmodell, Hodenbiopsie: Unprozessierte Prx4-Form verringert
	(Huo et al. 2007)	Azoospermie, Hodenbiopsie: Unprozessierte Prx4-Form verringert
	(Iuchi et al. 2009)	Prx4-Knockout im Mausmodell: Hodenatrophie, Oligoozospermie, Spermientod durch erhöhten oxidativen Stress
<b>Krebs</b>	(Soini et al. 2011)	Blasenkrebs: Positive Prx4-Proteinexpression (Korrelation mit Tumorgrad, -größe und Prognose)
	(Cha et al. 2009; Karihtala et al. 2011; Karihtala et al. 2003)	Brustkrebs: Erhöhte Prx4-Proteinexpression (Korrelation mit Progesteronrezeptor, Tumordifferenzierung und Prognose)
	(Karihtala et al. 2009; Pylväs et al. 2010)	Eierstocktumor: Positive Prx4-Proteinexpression (intra- und extrazelluläre Form; Korrelation mit Prognose)
	(Li et al. 2004)	Darmkrebs: Erhöhte Prx4-mRNA-Expression in metastasierenden Tumoren
	(Jarvela et al. 2010; Khalil et al. 2007)	Gehirntumor: Erhöhte Prx4-Proteinexpression
	(Chen et al. 2002; Lehtonen et al. 2004; Park et al. 2008)	Lungenkrebs: Erhöhte Prx4-Proteinexpression (prozessierte und unprozessierte Form; Korrelation mit Tumordifferenzierung)
	(Jang et al. 2004)	Magenkrebs: Verringerte Prx4-Proteinexpression
	(Liu et al. 2009)	Osteosarkom: Erhöhte Prx4-Proteinexpression
	(Chen et al. 2009; Chung et al. 2008)	Pankreaskrebs: Verringerte Prx4-Proteinexpression
	(Chang et al. 2011)	Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle: Erhöhte Prx4-Proteinexpression (Korrelation mit pathologischem Nodal-Status und Prognose)
	(Palande et al. 2011)	Promyelozytenleukämie: Verringerte Prx4-Proteinexpression
(Basu et al. 2010; Lin et al. 2007; Pritchard et al. 2009)	Prostatakrebs: Erhöhte Prx4-Proteinexpression (Korrelation mit Alter, Tumorstadium und Gleason-Score)	
<b>Zerebrovaskuläre Krankheiten</b>	(Rowe et al. 2010)	Kombinierter Sauerstoff- und Glucoseentzug in Oligodendrozyten, Schlaganfall-Rattenmodell: Erhöhte Prx4-Proteinexpression nach Behandlung mit humanem Nabelschnurblut

<sup>a</sup> Prx4, Peroxiredoxin 4; LPS, Lipopolysaccharid

Verschiedene Prx-Isoformen wurden darüber hinaus im Plasma bzw. Serum lokalisiert (Chang et al. 2006; Riddell et al. 2010; Robinson et al. 2010), jedoch mangelt es an einer systematischen Untersuchung mit validierten Methoden. Dabei erscheint die Sekretion von Prx4 (auch AOE372, TRANK; 271 Aminosäuren, 31 kDa inklusive der 4 kDa Signalsequenz) am wahrscheinlichsten, da es sich um die einzige Isoform mit einer N-terminalen Signalsequenz handelt (Haridas et al. 1998; Jin et al. 1997). Das Enzym wurde als Regulator des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors NF-kappaB mit pro- sowie antiinflammatorischer Wirkung beschrieben (Haridas et al. 1998; Jin et al. 1997; Yu et al. 2010). Eine dekamere Struktur, gebildet aus mehreren Mono- und Dimeren (Ikeda et al. 2010; Tavender et al. 2008), sowie eine Thioredoxin- und Glutathion-abhängige Peroxidasefunktion wurden nachgewiesen (Knight et al. 2009; Okado-Matsumoto et al. 2000; Tavender et al. 2010). Darüber hinaus wurde vermutet, dass hochmolekulares Prx4 als Chaperon fungiert (Tavender et al. 2008). Es herrscht Uneinigkeit über die Lokalisation von Prx4, welches intrazellulär im Zytosol/Zytoplasma (Chang et al. 2011; Jamaluddin et al. 2010; Jin et al. 1997; Karihtala et al. 2009; Kinnula et al. 2002; Lehtonen et al. 2004; O'Flaherty et al. 2011; Oberley et al. 2001; Park et al. 2008; Pylväs et al. 2010; Rowe et al. 2010; Shen et al. 2002; Tavender et al. 2008; Wong et al. 2000), im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Giguère et al. 2007; Matsumoto et al. 1999; Sasagawa et al. 2001; Tavender et al. 2008; Yu et al. 2010), im Golgi-Apparat (Okado-Matsumoto et al. 2000; Sasagawa et al. 2001), im perinuklearen Raum (O'Flaherty et al. 2011; Sasagawa et al. 2001), in Mitochondrien-Nähe und nukleär (Kinnula et al. 2002; Oberley et al. 2001), in Lysosomen (Oberley et al. 2001), in Peroxisomen (Yu et al. 2010) oder anderen Organellen außerhalb des Zellkerns gefunden wurde. Darüber hinaus wurde Prx4 als sezerniert (Chang et al. 2006; Chang et al. 2009; Dhar-Mascareno et al. 2009; Fujii et al. 2002; Haridas et al. 1998; Karihtala et al. 2009; Matsumoto et al. 1999; O'Flaherty et al. 2011; Okado-Matsumoto et al. 2000; Shen et al. 2002) und Zelloberflächen-gebunden (Fujii et al. 2002; Lehtonen et al. 2004; Okado-Matsumoto et al. 2000; Sasagawa et al. 2001) beschrieben. Auf Basis von in vitro-Versuchen mit Endothelzellmembran-gebundenem Prx4 wurde der bislang einzige Mechanismus einer redox-abhängigen Prx4-Sekretion in das Blutssystem vorgeschlagen (Fujii et al. 2002; Okado-Matsumoto et al. 2000). Tatsächlich wurde im Verlauf der Anfertigung der aktuellen Arbeit Prx4 im Blutplasma und in Synovialflüssigkeit (Chang et al. 2009; Okado-Matsumoto et al. 2000) sowie in Seminalplasma (O'Flaherty et al. 2011) nachgewiesen, jedoch kein Zusammenhang zwischen sezerniertem Prx4 und pathologischen Veränderungen gezeigt. Diesbezüglich erscheint eine systematische Untersuchung der Prx4-Sekretion unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen nach Etablierung eines validierten Prx4-Analysesystems sinnvoll und nutzbringend.

## 2.3 Patienten auf der Intensivstation und Notaufnahme

Verschiedene Krankheitsbilder sind durch eine vermehrte ROS-Bildung gekennzeichnet, die das Krankheitsgeschehen verursacht und/ oder vorantreibt. Ein Beispiel hierfür sind das Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und Sepsis (Berger et al. 2007; Crimi et al. 2006; Mishra 2007; Oldham et al. 1998), die mit einer Mortalität von zum Teil über 50 Prozent zu den Haupttodesursachen auf Intensivstationen weltweit zählen (Cepinskas et al. 2008; Mishra 2007). In der als „Blutvergiftung“ bekannten Sepsis werden durch infektiöse Erreger Immunezellen angeregt, ROS, NF-kappaB und andere inflammatorische Promotoren zu bilden, in deren Folge weitere ROS und Entzündungsmediatoren produziert werden und das System überreagiert (Cepinskas et al. 2008; Mishra 2007; Oldham et al. 1998; Pinsky 2004; Riedemann et al. 2003). In dem Versuch, diesen Inflamationsprozessen durch Ausschüttung anti-entzündlicher und antioxidativer Faktoren entgegen zu steuern, wird der Organismus häufig anfällig für Sekundärinfektionen und das antioxidative Schutzsystem erschöpft (Berger et al. 2007; Cepinskas et al. 2008; Riedemann et al. 2003). Die schwerwiegende Störung pro- und antiinflammatorischer Immunprozesse führt in vielen Fällen innerhalb kürzester Zeit zu einem Organversagen (Cepinskas et al. 2008; Crimi et al. 2006; Pinsky 2004). Trotz intensiver Forschung mangelt es noch immer an dem vollen Verständnis zugrunde liegender biochemischer Veränderungen und der Früherkennung des Infektionsstatus und der Krankheitsverschlechterung von SIRS (körperweite Entzündung) über Sepsis (SIRS begleitet durch eine Infektion) hin zu schwerer Sepsis (Sepsis in Kombination mit unzureichender Organdurchblutung) und septischem Schock (Sepsis mit anhaltend niedrigem systemischem Blutdruck). Die Erforschung von Prx4 als Marker für die Stärke des oxidativen Stresses in diesen schwerkranken Patienten kann womöglich den Krankheitsverlauf widerspiegeln und wegweisend für die Einleitung bestimmter Therapien und unterstützender Maßnahmen wie der Zuführung von Antioxidantien sein.

Eine weitere, schwer handhabbare und wirtschaftlich wie medizinisch relevante Patientengruppe stellen Patienten mit sogenannten unspezifischen Symptomen dar. Diese auf Notaufnahmen verbreitete, jedoch schlecht untersuchte Patientengruppe beklagt Beschwerden wie „Unwohlsein“, „Erschöpfung“ oder „Verschlechterung des Allgemeinbefindens“, ist in der Regel sehr alt und weist eine weite Spanne medizinischer Probleme auf (Chew et al. 1999; Gordon 1986; Nickel et al. 2009; Vanpee et al. 2001), welche behandelnde Ärzte vor die Schwierigkeit einer korrekten Diagnose und Risikoeinstufung stellt. Tatsächlich liegt bei einem nennenswerten Teil dieser Patienten eine ernstzunehmende Erkrankung vor (Nemec et al. 2010; Rutschmann et al. 2005), die – falsch eingeschätzt – zu ineffizienten Maßnahmen führt und einen tödlichen Verlauf nehmen kann. Auf der anderen Seite werden womöglich unnötig viele zeit- und kostenaufwändige Untersuchungen in Patienten

mit einer minderschweren Erkrankung auf der ohnehin häufig überfüllten Notaufnahmestation veranlasst. Unter der Annahme, dass oxidativer Stress in nahezu alle pathologische Prozesse involviert ist und umso stärker ausgeprägt ist, je schwerwiegender die Erkrankung ist, kann ein Biomarker wie Prx4 – ohne die Diagnose zu erleichtern – unter Umständen prognostischen Nutzen in dieser Patientengruppe aufweisen und damit die Ressourcenallokation verbessern.

### 3 Zielstellung

Zu Beginn der Arbeit bestand Grund zu der Annahme, dass Prx4 in Abhängigkeit von oxidativem Stress in die Blutzirkulation gelangt. Ziel der aktuellen Arbeit war es daher, eine einfache Nachweismethode für Prx4 zu entwickeln und zu validieren, um das Enzym in der Zirkulation sensitiv und spezifisch zu quantifizieren. Unter Verwendung dieses Testsystems sollte in klinischen Studien der Vermutung nachgegangen werden, Prx4-Serumwerte reflektierten oxidativen Stress und seien mit dem Schweregrad und der Prognose verschiedener, derzeit unvollständig durch nicht-invasive Biomarker abgebildeter Erkrankungen assoziiert. Diese Zusammenhänge aufgreifend wurde beabsichtigt, die intrazelluläre Lokalisation und Regulation der Sekretion von Prx4 im Zellmodell zu untersuchen.

### 4 Material und Methoden

#### 4.1 Messung von Peroxiredoxin 4 im Immunoassay

Als immunogene Peptide des humanen Prx4 wurden PEC13 (Sequenz ETEERPRTREEEC, Aminosäureposition 39–51) und PCS15 (Sequenz CHFYAGGQVYPGEAS, Aminosäureposition 51–65) synthetisiert. Unter Nutzung dieser Peptide wurden die monoklonalen Antikörper 340/4F2 und 340/3F1 (beide gegen PEC13 gerichtet) sowie 357/3B6 (gegen PCS15 gerichtet) gewonnen, welche wie in **Publikation I** beschrieben an die Festphase gekoppelt bzw. mit dem Chemilumineszenz-Label MACN-Akridiniumester als Tracer markiert wurden. Als Standard wurde Proteinlysate aus Schweineleber in Standardmatrix, bestehend aus einem Pool affinitätsgereinigter humaner Blutspenderseren, verdünnt und Arbeitseinheiten (arb. U/L) festgelegt. Die Vermessung der Proben im Immunoassay erfolgte in einem Zwei-Schritt-Verfahren. Die Zusammensetzung der Puffer ist in **Publikation I** beschrieben.

#### 4.2 Weitere Labormessungen

Für die Messung von Copeptin, Procalcitonin (PCT), C-reaktivem Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6) und Albumin wurden kommerzielle Assays, für die Bestimmung von totalem Bilirubin ein Laborautomatensystem verwendet (siehe **Publikationen I-III**).

### 4.3 Protein-biochemische und molekularbiologische Methoden

Die Gelfiltrationschromatographie filtrierter und in Laufmittel verdünnter Proben erfolgte an einer Bio-Sil<sup>®</sup> SEC-250-5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Säule mit PBS als Laufmittel und unter Einsatz eines Größenstandards zwischen 1,35 und 670 kDa (**Publikation I**).

Für die Gewinnung der Totalproteinfraktion wurden Zellen in kaltem PBS bei 1.000xg geerntet, in kaltem Homogenisationspuffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA) einer Ultraschallbehandlung unterzogen und für 10 min bei 16.000xg und 4 °C zentrifugiert.

Zur Durchführung der quantitativen RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) wurden die Zellen lysiert, die mRNA durch Phenol/ Chloroform-Extraktion isoliert, in cDNA umgeschrieben und durch PCR vervielfältigt (Fw-Primer CTGGGAGACAGAGGAGAGG, Rev-Primer CCTTAAATTCTCCATCGATCAC).

Für die Detektion von Prx4 im Western-Blot wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 12,5-prozentigen Trenngel nach Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970) und die Proteine im semidry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Ein einheitlicher Probenauftrag wurde durch Ponceaufärbung geprüft. Als Primärantikörper kam Maus-anti-PEC13 340/4F2, als Sekundärantikörper Meerrettichperoxidase-Kaninchen-anti-Maus zum Einsatz.

Der Nachweis von Prx4 und Kompartiment-spezifischen Proteinen erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz entsprechend publizierter Beschreibungen (Tedelind et al. 2010). Als Primärantikörper bzw. Färbereagenz kamen zum Einsatz: Maus-anti-PEC13 340/4F2, Kaninchen-anti-Ratten-Proteindisulfidomerase, Schaf-anti-Nager-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, Kaninchen-anti-Mensch-Cathepsin B, Kaninchen-anti-Mensch-Cathepsin D und DraQ5<sup>™</sup>. Als Sekundärantikörper dienten Alexa Fluor<sup>®</sup>488 Ziege F(ab')<sub>2</sub>-anti-Maus, Alexa Fluor<sup>®</sup>546 Ziege F(ab')<sub>2</sub>-anti-Maus, Alexa Fluor<sup>®</sup>546 Ziege F(ab')<sub>2</sub>-anti-Kaninchen und Alexa Fluor<sup>®</sup>546 Esel-anti-Schaf.

Die Oberflächenbiotinylierung von Membran-ständigen Proteinen erfolgte mit einem kommerziellen Kit. Für die subzelluläre Fraktionierung von Proteinen wurde nach früheren Beschreibungen gearbeitet (Tedelind et al. 2010).

### 4.4 Zellkultur

Epitheliale Zelllinien wie MDCK1-, HEK293- und HepG2-Zellen wurden nach Standardvorschriften kultiviert. Für die Kultivierung von HEK293-Zellen auf Deckgläschen wurden diese zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet. Für Stimulationsversuche wurde Wasserstoffperoxid in serumfreiem Medium verwendet. Zur Prüfung der Zellviabilität erfolgte der MTT-Test (Lindl 2002).

Die Nierenzelllinie MDCK1 wurde mit humanem Prx4, myc- und enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)-fusionierten Prx4-Varianten transfiziert, um die intrazelluläre Lokalisation und Sekretion von Prx4 zu untersuchen (**Abstract IV**). Hierzu wurde der offene Leserahmen von humanem Prx4 in den pcDNA3.1(-)-Expressionsvektor einkloniert und mithilfe des Transfektionsreagenz PolyFect in die Zellen geschleust. Unter mehrwöchiger Kultivierung aus Kolonien isolierter Einzelklone in G418-enthaltendem Selektionsmedium wurden stabile Klone erhalten. Die weitere Arbeit erfolgte mit im Immunoassay und Western-Blot positiv auf Prx4-Expression getesteten Klonen. Unter Verzicht auf Selektionsmedium wurde eine transiente Transfektion in HEK293-Zellen durchgeführt.

#### 4.5 Probanden und Studiendesign

Seren bzw. EDTA-Plasmen von gesunden Blutspendern und Patienten der Intensivstation (45 Patienten, siehe **Publikation I**; 79 von 101 konsekutiv eingeschlossenen Patienten, siehe **Publikation II**) sowie der Notaufnahme (438 von 686 konsekutiv eingeschlossenen Patienten, siehe **Publikation III**) des Universitätsklinikums Basel, Schweiz wurden zur Biomarkermessung nach schriftlicher Einwilligung gewonnen und bei -20 bzw. -70 bis -80 °C gelagert. Die vorliegenden Studien wurden durch Ethikkommissionen freigegeben. Ethische Richtlinien wurden für alle weiteren in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben beachtet.

Eine Klassifizierung der 79 Patienten aus **Publikation II** erfolgte nach Aufnahme auf die Intensivstation zwischen September 1996 und Juni 1997 in SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock gemäß Standardkriterien (Bone et al. 1992). Die Patienten wiesen mehrere Erkrankungen auf und wurden bis zum Versterben oder bis zu ihrer Entlassung aus dem Krankenhaus verfolgt. Als Endpunkt diente die 28 Tage-Mortalität im Krankenhaus. Infektionen wurden nach Standardkriterien bzw. durch einen Spezialisten auf Basis der erhobenen Labordaten nachgewiesen. Der Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II-Score, welcher durch Betrachtung von 12 physiologischen Variablen wie Blutdruck und Körpertemperatur zur Beurteilung des Krankheitsschweregrades und der Prognose auf Intensivstationen herangezogen wird (Castella et al. 1995), und der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score, welcher die Organfunktion (Lunge, Gerinnungssystem, Leber, kardiovaskuläres System, zentrales Nervensystem, Niere) von Intensivstation-Patienten widerspiegelt (Vincent et al. 2000; Vincent et al. 1996), wurden zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation berechnet. Demographische Daten, Vitalparameter, Blutbilder und Diagnosen der Patienten wurden aufgezeichnet.

In der Basel Non-Specific Complaints (BANC)-Studie (siehe **Publikation III**) wurden hämodynamisch stabile Notaufnahme-Patienten zwischen Mai 2007 und Mai 2009

mit einem Emergency Severity Index (ESI) von 2 oder 3 (Grossmann et al. 2011) und mit unspezifischen Symptomen wie „Erschöpfung“ oder „Unwohlsein“ (Nemec et al. 2010) anstelle von spezifischen Leitsymptomen oder lebensbedrohenden Zuständen eingeschlossen und bezüglich des Endpunktes 30 Tage-Mortalität verfolgt. Bei dem Krankenhaus handelt es sich um ein städtisches 700-Betten-Spital mit 42000 Notaufnahme-Patienten pro Jahr. Demographische Daten und Vitalparameter wurden gewonnen. Begleiterkrankungen wurden aus Patientenakten bestimmt und durch den Charlson Comorbidity Index (CCI) ausgedrückt (Charlson et al. 1987). Der funktionelle Gesundheitsstatus wurde mithilfe des Katz-Index der Activities of Daily Living (ADL) angegeben (Katz et al. 1970).

## 4.6 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen erfolgten mit GraphPad Prism und dem Statistikprogramm R. Kontinuierliche Variablen wurden als Median mit Interquartil-Spanne (IQR), kategoriale Variablen als Anzahl (n) mit Prozent angegeben. Nicht-detektierbare Marker-Konzentrationen wurde ein Wert entsprechend der unteren Nachweisgrenze zugeordnet. In **Publikation III** wurden Markerwerte vor der Analyse log<sub>10</sub>-transformiert. Patienten wurden in Tertile (**Publikation III**) oder Quartile (**Publikation II**) stratifiziert. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte durch den Kolmogorov-Smirnov-Test (**Publikation II**). Unterschiede zwischen nicht-normalverteilten Gruppen wurden durch den Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon-Rangsummentest) oder den Kruskal-Wallis-Test bestimmt. Die Prüfung von Einflüssen mehrerer Parameter wurde durch two way-ANOVA mit Bonferroni-Nachtest durchgeführt (**Publikation II, Abstract IV**). Die Genauigkeit eines Markers in der Unterscheidung verschiedener Gruppen wurde in Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven illustriert. Die Überlebensanalyse in **Publikation III** erfolgte durch uni- und bivariable Cox-Regression mit Angabe von Likelihood-Ratio (LR) und Bootstrap-korrigiertem Concordance-Index (C-Index) und wurde durch Kaplan-Meier- sowie zeitabhängige ROC-Kurven dargestellt. Modelle wurden durch den LR- $\chi^2$ -Test verglichen. Zusammenhänge zwischen Variablen wurden durch Spearman-Korrelation untersucht (**Publikation II**). P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant eingeschätzt.

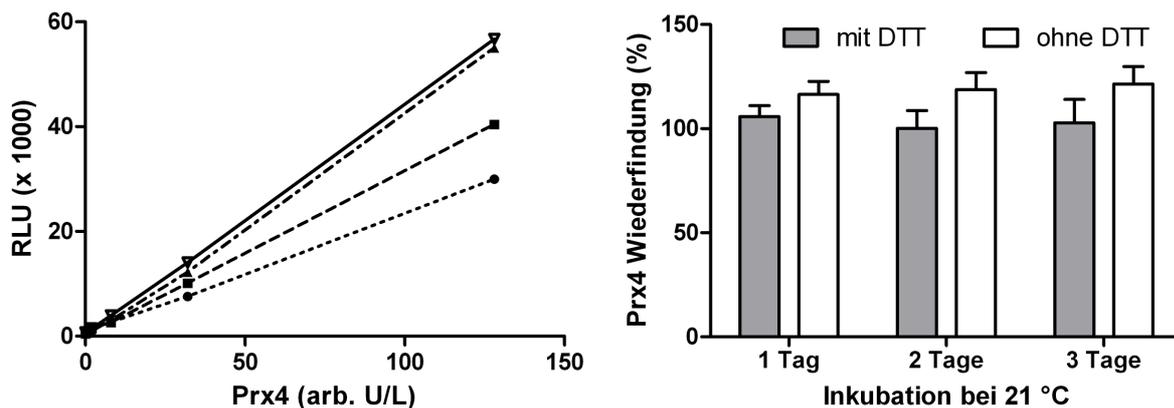
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Entwicklung eines Immunoassays zum Nachweis von Peroxiredoxin 4

Um bei der Entwicklung eines für Prx4 spezifischen Immunoassays eine Kreuzreaktivität mit den etwa 70 Prozent homologen Isoformen Prx1-3 der Gruppe 2-Cys-Prx zu vermeiden, wurden immunogene Sequenzen ausgewählt, welche im einzigartigen N-terminalen Bereich (Aminosäure 1-80), jenseits der vermuteten



Raumtemperatur und 37 °C erreicht werden (siehe suppl. Fig. 2 in **Publikation I**). Mindestens vier Einfrier-/ Auftauzyklen waren ohne Stabilitätsverlust möglich. Ohne Zusatz des Reduktionsmittels während der Probeninkubation stieg die Prx4-Immunreaktivität mit längerer Inkubationszeit bei höheren Temperaturen an (siehe Fig. 3 in **Publikation I** bzw. Abb. 3). Darüber hinaus erhöhte DTT das spezifische Signal des Immunoassays (siehe Fig. 2 in **Publikation I** bzw. Abb. 3), so dass die Sensitivität des Assays verbessert wurde.



**Abb. 3** Effekt von Dithiothreitol auf die *ex vivo*-Stabilität und Immunreaktivität von Peroxiredoxin 4 (entsprechend Fig. 2 und Fig. 3 in **Publikation I**)

Peroxiredoxin 4 (Prx4)-Standardkurven des Immunoassays 1 in Abhängigkeit von 0 mM (●), 1 mM (■), 2 mM (▲) und 5 mM (▼) Dithiothreitol (DTT) im Assaypuffer sind links abgebildet. Das Signal der Prx4-Arbeitseinheiten (arb. U/L) ist als relative Lumineszenzeinheiten (RLU) wiedergegeben. Die mittlere Wiederfindung von Prx4 in fünf Seren nach Lagerung bei 21 °C und Vermessung in Immunoassay 1 mit und ohne 3 mM DTT im Assaypuffer ist rechts dargestellt.

Im Vergleich verschiedener Matrices zeigte sich, dass EDTA-Plasma bei unzureichender Zentrifugation (Referenz 3000xg für 15 min) falsch-positive Prx4-Werte aufwies (siehe Fig. 4 in **Publikation I**). Da dies auf Serum nicht zutraf, keine einheitliche Praxis bezüglich der Zentrifugation von Blut besteht und aus logistischen Gründen häufig kürzer zentrifugiert wird, ist einzig Serum für den Assay zulässig. Tatsächlich konnte für parallele Abnahmen von 150 Blutspendern gezeigt werden, dass EDTA-Plasma einen signifikant höheren Prx4-Median als Serum aufweist (0,99 arb. U/L vs. 0,60 arb. U/L,  $P < 0,0001$ ) und keine perfekte Korrelation zwischen EDTA-Plasma und Serum besteht ( $r = 0,662$ ,  $P < 0,0001$ ), was zu einem gewissen Teil jedoch auf das Sensitivitätslimit des Assays zurückgeführt werden kann. Zusätzlich wurden für EDTA-Plasma höhere Variationskoeffizienten festgestellt als für Serum. Hämolyse hatte erst bei sehr starker Rotfärbung eine Erhöhung des Prx4-Signals zur Folge, die nicht auf freigesetztes Hämoglobin (bis 10 mg/ml kein Einfluss auf Prx4-Messung), vermutlich jedoch auf aus Blutzellen stammendes Prx4 zurückzuführen ist.

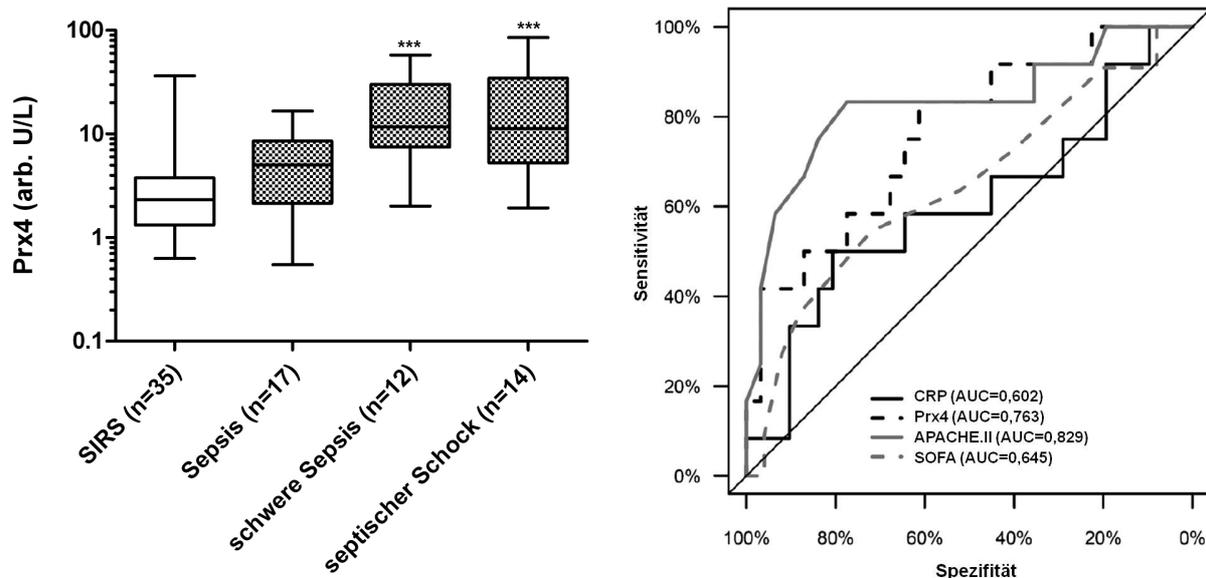
## 5.2 Peroxiredoxin 4 in gesunden und erkrankten Individuen

Mit dem entwickelten Sandwich-Immunoassay konnte Prx4 in einer geringen Median-Konzentration von 0,71 arb. U/L (IQR 0,48-1,02 arb. U/L) im Serum gesunder Blutspender (n=272, 44 Prozent männlich) nachgewiesen werden (siehe Fig. 6A in **Publikation I**). Prx4-Serumwerte waren in Frauen leicht höher als in Männern (0,75 arb. U/L vs. 0,69 arb. U/L,  $P < 0,05$ ), wiesen jedoch keine Altersabhängigkeit auf. Patienten mit Sepsis zeigten gegenüber Gesunden signifikant erhöhte Prx4-Serumwerte von zum Teil über 100 arb. U/L (Median 7,7 arb. U/L vs. 0,71 arb. U/L,  $P < 0,0001$ ; siehe Fig. 6A in **Publikation I**).

Die in **Publikation II** betrachteten 79 Patienten der Intensivstation (40 Männer, 39 Frauen) wiesen bei ihrer Aufnahme folgende demographischen Daten auf: Alter (Median 60 Jahre, IQR 46-70 Jahre), APACHE II-Score (Median 22 Punkte, IQR 17-28 Punkte), SOFA-Score (Median 9 Punkte, IQR 7-11 Punkte) und Aufenthalt auf der Intensivstation (Median 4 Tage, IQR 2-9,6 Tage). Die Mortalitätsrate aller Patienten betrug 24 Prozent. Die Klassifizierung in SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock mit der entsprechenden Unterteilung in Überlebende und Verstorbene ist Tab. 1 in **Publikation II** zu entnehmen. Mit einer Ausnahme wurde bei allen Patienten eine SIRS diagnostiziert. Bei den meisten Patienten war eine Erkrankung und Infektion des Atmungssystems vorhanden (siehe Tab. 2 in **Publikation II**). Der infektiöse Mikroorganismus wurde in nur 27 der 43 infizierten Patienten identifiziert, in 14 Patienten wurden zeitweilig Bakterien im Blut nachgewiesen (Bakterämie) und 51 Patienten wurden einer Antibiotikabehandlung unterzogen.

Im Serum von kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation lagen gegenüber Gesunden signifikant erhöhte Prx4-Konzentrationen vor (n=79, Median 4,5 arb. U/L,  $P < 0,0001$ ), die in Abhängigkeit des Schweregrades der Erkrankung anstiegen: SIRS (Median 2,23 arb. U/L, IQR 1,32-3,77 arb. U/L), Sepsis (Median 5,02 arb. U/L, IQR 2,15-8,55 arb. U/L), schwere Sepsis (Median 11,7 arb. U/L, IQR 7,46-30,1 arb. U/L) und septischer Schock (Median 11,4 arb. U/L, IQR 5,26-34,5 arb. U/L) (siehe Fig. 1 in **Publikation II** bzw. Abb. 4). Signifikante Unterschiede lagen im Multigruppen-Vergleich zwischen SIRS und schwerer Sepsis bzw. SIRS und septischem Schock vor. In der ROC-Analyse zeigte sich, dass Prx4 für die Unterscheidung von nicht-infektiöser und infektiöser SIRS (Area Under the Curve [AUC] von 0,82, 95 %-Konfidenzintervall [CI] 0,73-0,92; 2,32 arb. U/L vs. 8,43 arb. U/L,  $P < 0,0001$ ; siehe Fig. 2 in **Publikation II**) und für die Vorhersage des Versterbens von Patienten mit Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock im Krankenhaus (AUC von 0,76, 95 %-CI 0,60-0,92; 7,29 arb. U/L in Überlebenden vs. 14,6 arb. U/L in Verstorbenen,  $P < 0,01$ ; siehe Fig. 3 und 4 in **Publikation II** bzw. Abb. 4) geeignet ist. Dabei war der diagnostische Nutzen von Prx4 ähnlich dem von CRP, jedoch PCT unterlegen, und

der prognostische Nutzen vergleichbar mit dem APACHE II-Score. Eine Kombination von Prx4 mit den jeweils besten Markern PCT bzw. APACHE II-Score brachte keine signifikante diagnostische bzw. prognostische Verbesserung. Es zeigte sich, dass Prx4-Serumwerte über 4,5 arb. U/L für eine Infektion und Werte unter 8,43 arb. U/L für eine höhere Überlebenschance sprechen (siehe Tab. 3 und 4 in **Publikation II**). In der Gruppe der SIRS-Patienten ohne Infektion wiesen Überlebende und Verstorbene vergleichbare Prx4-Serumspiegel auf.

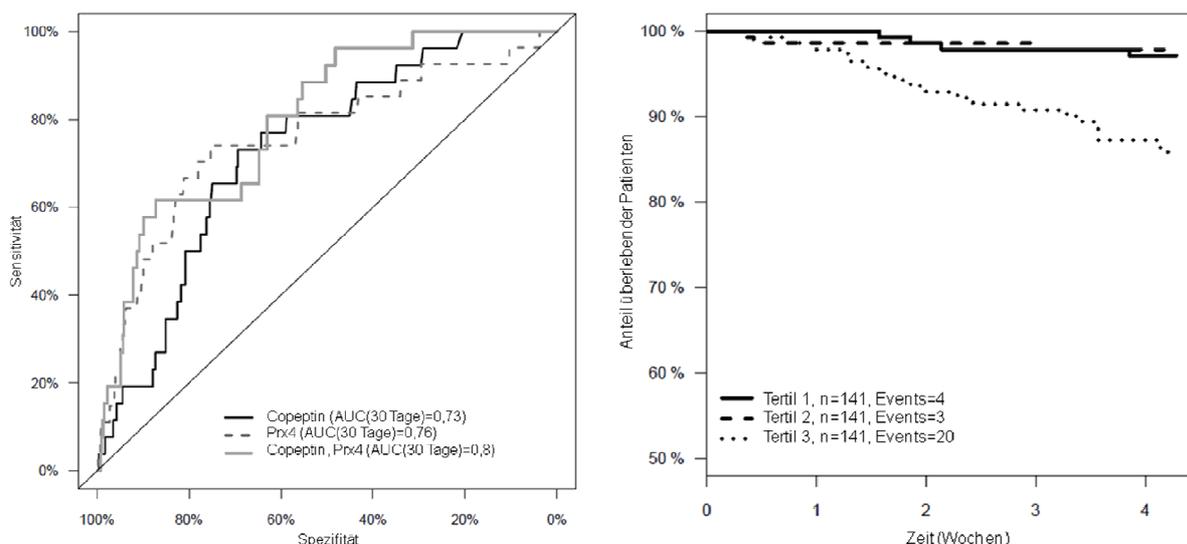


**Abb. 4 Peroxiredoxin 4-Serumwerte in Abhängigkeit des Krankheitsschweregrades und in der Prognose der Sterblichkeit von Sepsis-Patienten auf der Intensivstation (entsprechend Fig. 1 und Fig. 4 in Publikation II)**

Links dargestellt sind der Median (horizontale Linie), das untere und obere Quartil (Box) sowie das Maximum und Minimum (Whisker) der Peroxiredoxin 4 (Prx4)-Serumspiegel in Arbeitseinheiten (arb. U/L) aller untersuchten Intensivstation-Patienten mit mindestens zwei Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-Kriterien (n=78) zum Zeitpunkt der Aufnahme. Die Anzahl (n) der Patienten ist in Klammern angegeben. Im Multigruppenvergleich wurden signifikante Unterschiede ( $P < 0,0001$ ) im Vergleich zur SIRS-Patientengruppe festgestellt und sind als Sterne (\*\*\*) gekennzeichnet. Die Güte der Vorhersage der Krankenhaus-Sterblichkeit der Sepsis-Patienten (n=31 Überlebende; n=12 Verstorbene) durch Prx4- oder C-reaktives Protein (CRP)-Serumwerte, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II- oder Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score ist rechts mit der Area Under The Curve (AUC) gezeigt.

Die Patientengruppe mit unspezifischen Symptomen auf der Notaufnahme setzte sich inhomogen, aus überwiegend älteren Patienten zusammen: Alter (Median 80 Jahre, IQR 72-87 Jahre), etwa zwei Drittel der Patienten waren Frauen, die Mehrheit wies einen ESI von 3 auf, CCI (Median 2, IQR 1-4) und Katz ADL (Median 6, IQR 4-6). Im Median lagen 5 Begleiterkrankungen (IQR 3-6) und 5 Medikamenteneinnahmen (IQR 3-8) vor (siehe Tab. 1 in **Publikation III**). Mehr als 80 Prozent der Patienten wurden in das Krankenhaus aufgenommen. Unter den

entlassenen Patienten gab es keine Todesfälle innerhalb von 30 Tagen, allerdings kamen 25 Patienten in diesem Zeitraum erneut auf die Notaufnahme, zumeist mit einer anderen Diagnose. Von den 438 betrachteten Patienten verstarben 28 Patienten (27 Patienten älter als 65 Jahre) innerhalb von 30 Tagen nach Präsentation auf der Notaufnahme (Diagnosen siehe Tab. 2 in **Publikation III**). Die Prx4-Konzentration im Serum aller Patienten mit unspezifischen Symptomen war gegenüber gesunden Blutspendern erhöht (Median 4,5 arb. U/L, IQR 2,8-7,3 arb. U/L). Prx4-Serumwerte (bestimmt in 423 Patienten), wie auch der weitere betrachtete Biomarker Copeptin (bestimmt in 421 Patienten), waren in Verstorbenen signifikant höher als in Überlebenden (Prx4-Median 9,9 arb. U/L vs. 4,4 arb. U/L,  $P < 0,0001$ ; Copeptin-Median 52,6 pmol/L vs. 13,5 pmol/L,  $P = 0,0001$ ) (siehe Fig. 1 in **Publikation III**). Beide Marker zeigten einen von Alter, Geschlecht, Katz ADL, CCI und Krankenhausentlassung unabhängigen und diesen Parametern überlegenen prognostischen Nutzen in der Einschätzung der 30 Tage-Mortalität: Prx4 (LR- $\chi^2$  22,2,  $P < 0,00001$ , C-Index 0,749) und Copeptin (LR- $\chi^2$  17,0,  $P < 0,0001$ , C-Index 0,724) (siehe Tab. 3, Fig. 2 und 3 in **Publikation III**). Das kombinierte Modell aus Prx4 und Copeptin hatte zudem eine signifikant höhere prognostische Fähigkeit (LR  $\chi^2$  28,2,  $P < 0,00001$ , C-Index 0,783). Patienten mit Prx4- oder Copeptin-Konzentrationen im obersten Tertil (Prx4: 6,01 bis 51,30 arb. U/L; Copeptin: 31,0 bis 446,7 pmol/L) wiesen höhere Mortalitätsraten auf als Patienten in den unteren Tertilen (siehe Fig. 2 in **Publikation III** bzw. Abb. 6). Die zeitabhängige AUC der ROC-Analysen betrug 0,73 (95 %-CI 0,64-0,82) für Copeptin, 0,76 (95 %-CI 0,65-0,86) für Prx4 und 0,80 (95 %-CI 0,72-0,88) für das kombinierte Modell (siehe Fig. 3 in **Publikation III** bzw. Abb. 6).



**Abb. 5** Peroxiredoxin 4- und Copeptin-Serumspiegel in der Prognose der Sterblichkeit von Notaufnahme-Patienten mit unspezifischen Symptomen (entsprechend Fig. 2 und 3 in **Publikation III**)

Die Güte einzelner oder kombinierter Peroxiredoxin 4 (Prx4)- und Copeptin-Serumspiegel zur Vorhersage der 30 Tage-Sterblichkeit nach Präsentation von Patienten mit unspezifischen

Symptomen auf der Notaufnahme ist links durch zeitabhängige Area Under The Curve (AUC) dargestellt. Durch Einteilung der Prx4-Serumwerte in Tertile (Cut-off 6,1 arb. U/L) erfolgt rechts eine Darstellung der 30 Tage-Überlebenswahrscheinlichkeiten mit Angabe der Summe der Patienten (n) und der Verstorbenen (Events) pro Tertil.

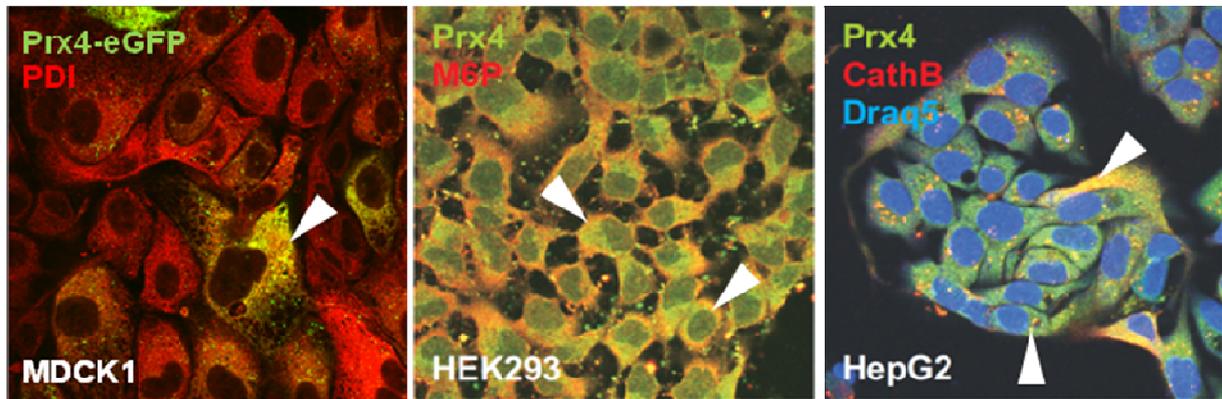
Korrelationsbetrachtungen mit bekannten Biomarkern und Punktesystemen ermöglichten einen ersten Einblick in mechanistische Zusammenhänge der Prx4-Sekretion. In verschiedenen Sepsis-Patientenkollektiven konnte eine vergleichsweise starke Korrelation von  $r=0,63$  bzw.  $r=0,61$  ( $P<0,0001$ ) zwischen Prx4 und dem Sepsis-Marker PCT nachgewiesen werden (siehe **Publikationen I und II**). Desweiteren bestanden im Patientenkollektiv der **Publikation II** positive Korrelationen zwischen Prx4 und dem APACHE II-Score ( $r=0,27$ ,  $P<0,05$  für alle Patienten;  $r=0,54$ ,  $P<0,05$  für verstorbene Patienten), dem SOFA-Score ( $r=0,55$ ,  $P<0,0001$ ), CRP ( $r=0,65$ ,  $P<0,0001$ ) und IL-6 ( $r=0,62$ ,  $P<0,0001$ ). Da die Studien zum Zeitpunkt der Prx4-Messung bereits abgeschlossen waren, konnten keine bekannten Marker für oxidativen Stress betrachtet werden. Allerdings wurde festgestellt, dass Prx4 in der Gruppe der Intensivstation-Patienten mit den antioxidativen Substanzen totales Bilirubin ( $r=0,37$ ,  $P<0,001$ ) und Albumin ( $r=-0,54$ ,  $P<0,0001$ ) korrelierte.

### 5.3 Struktur, Lokalisation und Regulation von Peroxiredoxin 4

Die Gelfiltrationsuntersuchung von Prx4 in einem Serumpool von Patienten mit Sepsis sowie in Schweineleberextrakt ergab, dass das Enzym in hochmolekularer Form von etwa 330 kDa vorliegt (siehe Fig. 5 in **Publikation I**). Es wurden weder im homologen noch im heterologen Assay weitere Peaks, nicht einmal auf Höhe der dimeren Prx4-Form nachgewiesen. Die Proben erschienen in denaturierender, nicht-reduzierender SDS-PAGE im hochmolekularen Bereich über 250 kDa, in denaturierender und reduzierender SDS-PAGE als Monomer und teilweise als Dimer (Schweineleberextrakt).

Unter Anwendung des neu entwickelten Prx4-Immunoassays sowie quantitativer RT-PCR wurde zunächst festgestellt, dass Prx4 von epithelialen Zelllinien (HEK293, HepG2, Huh7, Cos7, Capan1) exprimiert und sezerniert wird (**Abstract IV**). In HEK293-, HepG2- und Prx4-transfizierten MDCK1-Zellen, in denen die stärksten Prx4-Signale bestimmt wurden und deren intrazelluläres Prx4 auch im Western-Blot nachgewiesen werden konnte, war ein granuläres, perinukleäres Muster für Prx4 erkennbar; es lag keine Lokalisation von Prx4 im Zellkern oder im Zytoplasma vor (**Abstract IV**). Das Enzym war mit dem ER-Marker Proteindisulfidisomerase kolokalisiert. Darüber hinaus wurde eine partielle Kolokalisation von Prx4 und dem *trans*-Golginetzwerk/ späte Endosomen-Marker Mannose-6-Phosphat-Rezeptor sowie den Endo-/Lysosomen-Markern Cathepsin B und D festgestellt (**Abstract IV**; siehe exemplarisch in Abb. 6). Zwar deuteten Färbungen in der Peripherie an, dass

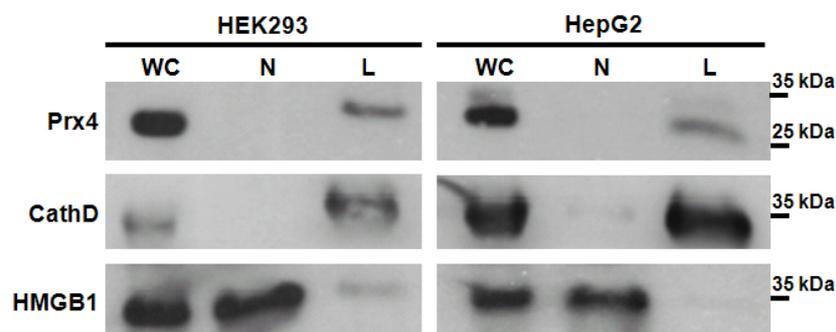
Prx4 sezerniert und mit der Zelloberfläche reassoziert werden könnte, jedoch ergab Oberflächenbiotinylierung Membran-ständiger Proteine, dass Prx4 in stabil transfizierten MDCK1-Zellen sowie in HepG2-Zellen nicht in die Membran integriert ist. In stabil transfizierten MDCK1-Zellen korrelierten die Mengen an exprimiertem und sezerniertem Prx4 ( $r=0,92$ ,  $P<0,01$ ).



**Abb. 6 Indirekte Immunofluoreszenz-Färbung von humanem Peroxiredoxin 4 bzw. Peroxiredoxin 4-enhanced Green Fluorescent Protein und Kompartiment-spezifischen Proteinen in MDCK1-, HEK293- und HepG2-Zellen**

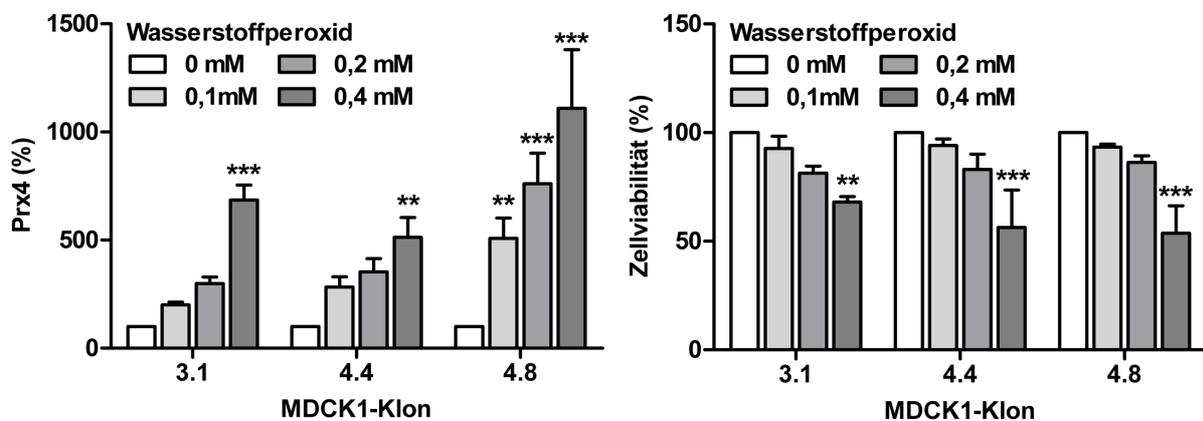
Humanes Peroxiredoxin 4 (Prx4) bzw. Prx4-enhanced Green Fluorescent Protein (Prx4-eGFP; grünes Signal) ist mit Proteindisulfidisomerase (PDI; rotes Signal) im endoplasmatischen Retikulum kolokalisiert und erscheint in *trans*-Golgi- (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, M6P; rotes Signal) und vesikulären Strukturen (Cathepsin B, CathB; rotes Signal). Die Kernfärbung erfolgte mit Draq5 (blaues Signal). Pfeilspitzen weisen auf Zellen mit Kolokalisation der Proteine hin (gelbes Signal). Die Vergrößerung der MDCK1-Zellen ist 63x, die der HEK293- und HepG2-Zellen 40x.

In einer subzellulären Fraktionierung mit Auftrennung des Zellproteins in Totalproteinfraktion, nukleäre und lysosomale Fraktion konnte ergänzend gezeigt werden, dass Prx4 nicht im Nukleus, wohl aber in der lysosomalen Fraktion lokalisiert ist (**Abstract IV**; siehe Abb. 7).



**Abb. 7 Proteinverteilung nach fraktionierter Zentrifugation von HEK293- und HepG2-Zellprotein** Peroxiredoxin 4 (Prx4) liegt in der Totalprotein-Fraktion (WC) und zum Teil in der lysosomalen Fraktion (L) vor. Cathepsin D (CathD) kennzeichnet die lysosomale, High-Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) markiert die nukleäre Fraktion (N).

Transient transfizierte HEK293-Zellen sezernierten Prx4 zeitabhängig mit bis 72 h verfolgten, kontinuierlich ansteigenden Prx4-Mengen im Medium (**Abstract IV**). Stabil transfizierte MDCK1-Zellen wiesen zwar geringere extrazelluläre Prx4-Mengen auf, zeigten allerdings in Abhängigkeit der externen Zugabe von 0,1 bis 0,4 mM Wasserstoffperoxid eine signifikant um bis zu 11-fach erhöhte Prx4-Sekretion. Dabei konnte insgesamt ein Trend, jedoch kein signifikanter Zusammenhang mit der Zelltoxizität von Wasserstoffperoxid festgestellt werden (**Abstract IV**; siehe Abb. 8). Im Gegensatz dazu, erhöhte sich die Prx4-Sekretion in HEK293- und HepG2-Zellen durch Wasserstoffperoxid von bis zu 2,4 mM nicht, sondern war trotz ansteigender Zytotoxizität tendenziell verringert (nicht gezeigt).



**Abb. 8 Peroxiredoxin 4-Sekretion und Zellviabilität in stabil transfizierten MDCK1-Zellen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid**

Die Sekretion von humanem Peroxiredoxin 4 (Prx4) in stabil transfizierten MDCK1-Zellen (humanes Prx4: 3.1; Prx4-myc-Fusionsprotein: 4.4, 4.8) wurde nach 24-stündiger Behandlung mit Wasserstoffperoxid in serumfreiem Medium durch Vermessung der Kulturüberstände im Prx4-Immunoassay bestimmt (links). Der MTT-Assay wurde zur Berechnung der Zellviabilität im Vergleich zum Referenzansatz (0 mM Wasserstoffperoxid) genutzt (rechts). Signifikante Unterschiede zur Referenz wurden durch ANOVA-Analyse bestimmt und sind durch Sterne angedeutet (\*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ). Die Experimente wurden in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

## 6 Diskussion

### 6.1 Immunoassay zum Nachweis von Peroxiredoxin 4

Im Rahmen der aktuellen Arbeit konnte ein einfacher Sandwichimmunoassay zur Quantifizierung von Prx4 in Serum entwickelt und hinsichtlich der Aspekte Richtigkeit, Präzision und Analytstabilität analytisch validiert werden (**Publikation I**). Es wird davon ausgegangen, dass trotz der Verwendung zweier monoklonaler Antikörper, welche das gleiche Prx4-Epitop (Aminosäuren 39-51) erkennen, spezifisch Prx4 detektiert wird. Zum einen weist das gewählte Peptidepitop keine nennenswerte Homologie zu anderen Proteinen oder anderen Prx-Isoformen auf. Zum anderen wurde der native Analyt im Assay sowohl für das Standardmaterial

Schweineleberextrakt als auch für humane Serumproben als hochmolekulare, dem in der Literatur beschriebenen Prx4-Dekamer (Tavender et al. 2008) entsprechende Form bestimmt, während mit den Assay-Antikörpern im Western-Blot unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen eine Bande vergleichbar der Monomergröße von Prx4 detektiert wurde. Darüber hinaus unterstützt die hohe Korrelation zwischen dem validierten Immunoassay und einer weniger sensitiven, verschiedene Epitope des Prx4-Moleküls erkennenden Assayvariante obige Annahme.

## 6.2 Sekretion von Peroxiredoxin 4

Unter Verwendung des neu entwickelten Assays konnte erstmals gesichert nachgewiesen werden, dass Prx4, welches eine N-terminale Signalsequenz aufweist (Haridas et al. 1998; Jin et al. 1997), sowohl bei Gesunden als auch bei Kranken in die Zirkulation gelangt und oxidativer Stress offenbar mit erhöhten Prx4-Serumwerten einhergeht. Die Ergebnisse eines früheren Berichtes diesbezüglich beschränken sich auf rheumatoide Arthritis und müssen aus methodischer Sicht in Frage gestellt werden (Chang et al. 2009): In dem genutzten Immunoassay erfolgte eine direkte Beschichtung der Festphase mit verdünntem Patientenplasma, die aufgrund des geringen Anteils von Prx4 am Gesamtplasmaprotein keine sensitive und spezifische Reaktion mit Prx4-Antikörpern erwarten lässt.

Im Versuch mit stabil Prx4-transfizierten MDCK1-Zellen und endogen Prx4-exprimierenden HEK293- und HepG2-Zellen konnte gezeigt werden, dass Prx4 in Kompartimenten des klassischen Sekretionsweges lokalisiert ist. Die vormalig beschriebene Membranassoziation (Okado-Matsumoto et al. 2000) konnte durch Oberflächenbiotinylierung für die untersuchten Zelllinien nicht bestätigt werden. Auch in transfizierten Cos-1-Zellen war Prx4 nicht in der Plasmamembran lokalisiert (Matsumoto et al. 1999). Letzte Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Prx4 beschrieben das Enzym als ER-gebunden (Tavender et al. 2010; Tavender et al. 2008; Tavender et al. 2010). Tatsächlich konnte eine deutliche Kolo-kalisation von intrazellulärem Prx4 und ER-lokalisierter Proteindisulfidisomerase gezeigt werden (**Abstract IV**). Darüber hinaus lag aktuell, frühere Aussagen bestätigend (Oberley et al. 2001; Okado-Matsumoto et al. 2000; Sasagawa et al. 2001), ein Teil des Prx4 in vesikulären (Kolo-kalisation mit endo-/ lysosomalem Cathepsin B und D) und *trans*-Golgi-ähnlichen Strukturen (Kolo-kalisation mit Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) vor. Eine Kernlokalisation konnte gemäß früheren Berichten ausgeschlossen werden. Auch Prx6 wurde in lysosomalen Strukturen von A549-Lungenzellen lokalisiert (Sorokina et al. 2009) und im Serum von Lungenkrebspatienten nachgewiesen (Zhang et al. 2009). Insgesamt wird geschlussfolgert, dass frühere Aussagen zur Prx4-Lokalisation abhängig von der angewandten Methode (subzelluläre Fraktionierung, Immunfärbung mit/ohne Kolo-kalisation) und Interpretation der

Autoren sind und insbesondere Zytoplasma/Zytosol-Lokalisation infrage gestellt werden kann.

In Übereinstimmung mit einer auf in vitro-Experimenten beruhenden Theorie (Fujii et al. 2002; Okado-Matsumoto et al. 2000) wird angenommen, dass die Menge des in die Zirkulation gelangten Prx4 mit der Höhe des oxidativen Stresses zusammenhängt. Der genaue Mechanismus der Freisetzung bleibt unbekannt. Tatsächlich wurden starke Korrelationen zwischen Prx4-Serumwerten und den antioxidativen Substanzen Bilirubin und Albumin in SIRS- und Sepsis-Patienten nachgewiesen (**Publikation II**). Darüber hinaus wurde eine signifikante Korrelation zwischen Prx4-Expression und Nitrotyrosin, einem Marker für nitrosativen Stress, nicht jedoch dem oxidativen Stress-Marker 8-Hydroxydeoxyguanosin in Eierstockkrebs (Karihtala et al. 2009; Pylväs et al. 2010) und Blasenkrebs berichtet (Soini et al. 2011). Die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen Prx4-Sekretion und oxidativem Stress wird dadurch unterstützt, dass aktuell Zelltyp-spezifisch eine erhöhte Prx4-Sekretion in Abhängigkeit ansteigender Wasserstoffperoxidkonzentrationen beobachtet wurde, welche jedoch nicht in vollem Umfang mit der zelltoxischen Wirkung, d.h. mit dem Absterben von Zellen und der unspezifischen Freisetzung von Zellinhalten, zusammenhing (**Abstract IV**). Die Zellspezifität dieses Effektes wird durch Berichte anderer Autoren bestätigt, welche einen Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Prx4-Expression in HT1080-Zellen (Tavender et al. 2010), nicht jedoch in PC3-Prostatakrebs-Zellen (Shiota et al. 2008) oder MCF7-Brustkrebs-Zellen (Bae et al. 2007) beschreiben. Es ist bekannt, dass ROS in apoptotischen Prozessen und diese wiederum für Organversagen eine Rolle spielen (Power et al. 2002). Prx4 korrelierte aktuell mit dem die Organfunktion widerspiegelnden SOFA-Score in Sepsis-Patienten (**Publikation II**). Daher besteht durchaus die Möglichkeit, dass Prx4 aus apoptotischen Zellen freigesetzt wird und zirkulierendes Prx4 indirekt oxidativen Stress durch Apoptose widerspiegelt. Generell werden Anschlussstudien, welche Prx4-Serumspiegel im direkten Vergleich zu anderen oxidativen Stress-Parametern bestimmen, zur Prüfung dieser Hypothese empfohlen. Dabei wird angenommen, dass im zeitlichen Verlauf freie Radikale und oxidierte Produkte früher erhöht sind als gegensteuernde und durch den oxidativen Stress induzierte Antioxidantien.

Es wird zunehmend deutlich, dass es nicht genügt, einzig eine Veränderung der Prx4-Expression zu betrachten, sondern dessen Oxidationsstatus und/ oder Sekretion zu untersuchen. Tatsächlich wurde aktuell weder eine veränderte Prx4-Expression bei Inkubation mit Wasserstoffperoxid noch eine Prx4-abhängige Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid festgestellt. Nach viraler Infektion von A549-Lungenepithelzellen (Jamaluddin et al. 2010) und Stimulation humaner Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) mit Hydroperoxiden (Mitsumoto et al. 2001) sowie bei Plaquebildung in der Halsschlagader (Full et al. 2010) erfolgte eine

Oxidation und Verschiebung des isoelektrischen Punktes von Prx4. Eine Verringerung der unprozessierten, nicht jedoch der sezernierbaren Prx4-Form in gestörter Spermatogenese (Huo et al. 2007; Matsuki et al. 2002) sowie unterschiedliche Expression der beiden Prx4-Formen in Lungenkarzinomen (Lehtonen et al. 2004) stellen möglicherweise einen weiteren posttranslationalen Mechanismus dar. Allerdings wurde kürzlich eingeräumt, dass es sich bei der größeren Prx4-Form neben dem unprozessierten Prx4-Vorläuferprotein ebenso um eine neu entdeckte Splicevariante des Enzyms handeln kann (Yim et al. 2011). Tatsächlich wird oxidativer Stress von manchen Autoren auch als Thiol-Redox-Imbalance beschrieben (Jones 2008), die gut durch die oxidativen Veränderungen der Prx widerspiegelt werden kann (Cordray et al. 2007; Diet et al. 2007; Mitsumoto et al. 2001; Rabilloud et al. 2002). Es wurde gezeigt, dass durch erhöhte Peroxidkonzentrationen hyperoxidierte Prx in der dekameren Form gefangen sind und nur durch Sulfiredoxin in die aktive, dimere Form reduziert werden können (Rhee et al. 2011; Woo et al. 2005). Kürzlich wurde in verschiedenen in vitro-Experimenten eine Hyperoxidation und Oligomerisierung von Prx4 bestätigt (Ikeda et al. 2010; Jamaluddin et al. 2010; O'Flaherty et al. 2011; Tavender et al. 2010). Somit könnte die hocholigomere Form des aktuell detektierten Prx4 (**Publikation I**) ein weiteres Indiz für die eingangs genannte Theorie der redox-abhängigen Freisetzung Endothelgebundener Prx4-Moleküle darstellen. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass das hohe Molekulargewicht des im Assay detektierten Prx4 ein Artefakt oxidativer *ex vivo*-Einflüsse während der Probenaufbereitung ist. Zusätzlich kann nicht gesichert bestätigt werden, ob hohe Signale im Assay mit einer größeren molaren Prx4-Menge oder mit stärkerer Oligomerisierung und damit verbundener besserer Detektion im derzeitigen Assaysystem einhergehen. Eine teilweise Reduktion erwies sich aktuell als notwendig, um die infolge präanalytischer Einflüsse wie Temperatur, Proteasen etc. veränderliche Immunreaktivität zu stabilisieren. Dies bestätigt redox-abhängige strukturelle Veränderungen. Zusätzlich wurde festgestellt, dass EDTA-Plasma, welches bei unzureichender Zentrifugation unvollständig abgetrennte zelluläre Bestandteile enthält, anfällig für falsch-positive Signale im Prx4-Immunoassay ist (**Publikation I**). Tatsächlich wurde Prx4 in roten Blutkörperchen nachgewiesen (O'Neill et al. 2011; Oberley et al. 2001) und EST-Datenbanken kann entnommen werden, dass Prx4 zu einem gewissen Teil von Immunzellen exprimiert wird, während keine oder nur geringe Prx4-mRNA-Mengen in peripheren Blutleukozyten gefunden wurden (Haridas et al. 1998; Jin et al. 1997).

### 6.3 Peroxiredoxin 4 als Biomarker

Es bestätigte sich in verschiedenen, sehr unterschiedlichen Patientengruppen, für welche oxidativer Stress beschrieben wurde (Dalle-Donne et al. 2006; Giustarini et al. 2009; Valko et al. 2007; Victor et al. 2005), dass Prx4 ein geeigneter prognostischer und Schweregrad-assoziiertes Biomarker ist, welcher in Zukunft

richtungsweisend für Risikostratifizierung, rechtzeitige Therapieentscheidungen und Ressourcenallokation sein kann. In Patienten mit Sepsis bestand ein Zusammenhang mit der Schwere (SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock; APACHE II- und SOFA-Score) und dem Ausgang (28 Tage-Mortalität im Krankenhaus) der Erkrankung (**Publikation II**). In Patienten mit unspezifischen Symptomen auf der Notaufnahme waren erhöhte Prx4-Werte mit der Kurzzeitprognose (30 Tage-Mortalität) assoziiert (**Publikation III**).

Die Schweregradassoziation von Prx4 in Patienten mit Sepsis war im Vergleich zu dem bekannten Infektionsparameter PCT nicht perfekt und beschränkte sich auf die Unterscheidung von SIRS und schwerer Sepsis sowie septischem Schock (**Publikation II**). Ähnliche Einschränkungen ergaben sich auch für die totale antioxidative Kapazität und Superoxiddismutase (Doise et al. 2008; Mishra et al. 2005). Zusätzlich dazu wies Prx4 jedoch prognostische Fähigkeiten auf, welche mit denen des APACHE II-Scores vergleichbar waren. Zum Teil lagen positive (Thioredoxin, antioxidative Eisen- und Reduktionsstärke, Harnsäure) (Andresen et al. 2008; Leaver et al. 2010; Mitaka 2005) oder aber negative Korrelationen (antioxidative Kapazität des Blutes) (Alonso de Vega et al. 2000; Chuang et al. 2006) zwischen Antioxidantien und dem Schweregrad-Score APACHE II in Sepsis vor. Erhöhte antioxidative Kapazität, Thioredoxin-, Superoxiddismutase- und Katalase-werte wurde in verstorbenen SIRS- und Sepsis-Patienten gefunden (Chuang et al. 2006; Hofer et al. 2009; Warner et al. 1995), während in anderen Studien Thioredoxin und Nitrit/Nitrat-Werte diesbezüglich unverändert waren (Leaver et al. 2010; Mitaka 2005). Sehr wahrscheinlich repräsentiert Prx4 nicht jede Form von oxidativem Stress. Bis heute wurde kein Parameter gefunden, der dies tut. Zwangsläufig verhalten sich bekannte Größen für oxidativen Stress durchaus variabel. So war im Gegensatz zu den aktuellen Ergebnissen für Prx4 (**Publikation I und II**), zwischen Thioredoxin und PCT oder proinflammatorischen Zytokinen in einer anderen Studie keine Korrelation feststellbar (Leaver et al. 2010). Andere Autoren mögen mit der Annahme, oxidative Parameter seien geeignetere Marker als antioxidative Parameter (Mishra et al. 2005) insofern Recht haben, als dass es sinnvoll erscheint, diese Aspekte kombiniert zu betrachten.

In Patienten mit unspezifischen, jedoch nach erster Einschätzung nicht lebensbedrohlichen Symptomen auf der Notaufnahme konnte Prx4 unabhängig von Alter und Geschlecht eine Kurzzeitprognose abgeben und bietet damit erstmals die Möglichkeit eines Warnsystems in diesen Patienten (**Publikation III**). Besonders ältere Patienten weisen oftmals keine spezifischen Leitsymptome wie Husten oder Fieber im Fall einer Pneumonie auf (Harper et al. 1989; Norman et al. 1996; Peters 2010; Rutschmann et al. 2005) und stellen den behandelnden Arzt vor ein Rätsel, die Krankengeschichte richtig zu deuten, den Patienten mit seinen Beschwerden ernst zu nehmen und tatsächlich medizinisch notwendige Untersuchungen zu veranlassen.

Es existiert zurzeit kein Goldstandard, welcher die Krankheitsschwere in dieser Patientengruppe frühzeitig sicher wiedergibt. Dabei ist dieses Wissen von großer Bedeutung für den Notaufnahmearzt, um im Zuge überfüllter Notaufnahmestationen korrekte Entscheidungen für eine Entlassung oder Krankenhausaufnahme des Patienten zu treffen und damit eine effiziente Patientenbehandlung mit dem besten Ausgang für den Patienten in die Wege zu leiten.

Bislang beschränkte sich die Betrachtung eines Zusammenhangs zwischen Prx4 und klinischen Endpunkten (Tumorgröße und -differenzierungsgrad, Schweregrad der Gewebsschädigung, Metastasierung, Prognose) auf Studien mit Krebs- und Zöliakiepatienten und beinhaltete zudem eine invasive Untersuchung der Expressionsstärke des Enzyms (Basu et al. 2010; Chang et al. 2011; Chen et al. 2002; Karihtala et al. 2011; Karihtala et al. 2003; Karihtala et al. 2009; Li et al. 2004; Simula et al. 2010; Soini et al. 2011). In anderen Studien wurde kein Zusammenhang zwischen der Prx4-Expression und klinischen Parametern festgestellt bzw. nicht untersucht (Chung et al. 2008; Kim et al. 2009; Woolston et al. 2011). Einschränkungen hinsichtlich Spezifität und Sensitivität von zirkulierendem Prx4 in der akuten und prognostischen Bewertung der aktuell untersuchten Patientenkollektive sind angesichts des hohen Grades an Begleiterkrankungen und medikamentöser Behandlungen nicht ungewöhnlich. In der Tat wurde für verschiedene Substanzen, wie beispielsweise Paracetamol, im Mausexperiment eine veränderte Prx4-Expression in der Leber festgestellt (Young et al. 2010). Vielmehr ist die gute Performance in den heterogenen Patientengruppen positiv zu bewerten und Prx4 offenbar auf schwerkranke wie auch Patienten mit unspezifischen Symptomen anwendbar. Dies bestätigt die Grundannahme, dass das komplexe Erscheinungsbild von oxidativem Stress und daraus resultierenden Regulationsmechanismen weniger von diagnostischem Nutzen ist, jedoch eine Verschlechterung des Krankheitszustandes reflektiert bzw. ankündigt. Es ist zudem möglich, dass eine veränderte Prx4-Sekretion erst dann relevant wird, wenn auch andere Antioxidantien aufgebraucht sind. So konnten in einem A549-Zellkulturmodell viraler Infektion erst dann veränderte Zytokinwerte festgestellt werden, wenn Prx4 und Prx1 gemeinsam ausgeschaltet waren, jedoch nicht bei Prx4 alleine (Jamaluddin et al. 2010). Andere, als zytosolisch beschriebene Prx-Isoformen wurden sporadisch und zumeist durch aufwändige Untersuchungen im Plasma oder Serum von Patienten mit Lungenkrebs (Prx1) (Chang et al. 2005), unbehandelten Patienten mit humanem Immundefizienz-Virus (Prx1, Prx2) (Geiben-Lynn et al. 2003), schwerem akuten Atemwegssyndrom, Magenkarzinom, Fieber oder Pneumonie (Prx2) (Chen et al. 2004) gefunden und stützen die Überlegung einer Dysregulation bzw. Freisetzung der antioxidativen Prx aus zerstörten Zellen unter pathologischen, oxidativen Bedingungen.

## 6.4 Funktion von Peroxiredoxin 4

Die Frage nach der Funktion von zirkulierendem Prx4 kann noch nicht gesichert beantwortet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass Prx4 vermehrt sezerniert wird, um extrazelluläre ROS in Kompensation aufgebrauchter antioxidativer Systeme (Berger et al. 2007) zu bekämpfen – die spezifische Aktivitätsmessung ist derzeit allerdings nicht möglich, ein Prx-Inhibitor befindet sich noch in der Erprobung (Liu et al. 2010). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass hochmolekulares Prx4, wie aktuell in Serum von Sepsis-Patienten gefunden (**Publikation I**), vielmehr als Chaperon denn als Peroxidase fungiert (Barranco-Medina et al. 2009; Tavender et al. 2008). Eine in **Publikation II** erkannte Korrelation von Prx4 mit anderen Parametern, welche Infektion (PCT), Inflammation (CRP, IL-6) oder Organfunktion (SOFA-Score) in Sepsis-Patienten widerspiegeln, deutet funktionelle Zusammenhänge an, welche in weiterer Grundlagenforschung untersucht werden sollten. Tatsächlich ist bekannt, dass Prx4 den redox-sensitiven und in Inflamationsprozesse involvierten Transkriptionsfaktor NF-kappaB (Li et al. 2002; Tak et al. 2001) reguliert (Haridas et al. 1998; Jin et al. 1997; Weichart et al. 2006; Yu et al. 2010) – wenn auch nicht eindeutig belegt ist, ob in aktivierender oder inhibierender Weise. Auch für Prx1 wurde eine aktivierende Wirkung auf NF-kappaB beschrieben (Riddell et al. 2010). In Tier- und Zellkulturmodellen zeigten sowohl Prx4 (Okado-Matsumoto et al. 2000; Yu et al. 2010) als auch Prx2 (Yang et al. 2007), Prx3 (Li et al. 2009; Li et al. 2007), Prx5 (Sun et al. 2010) und Prx6 (Yang et al. 2011) schützende, antiinflammatorische Effekte, während verschiedenen Prx an anderer Stelle eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben wurde (Riddell et al. 2010; Robinson et al. 2010). Versuche, in welchen Zellkulturen mit Viren infiziert (Jamaluddin et al. 2010; Mota et al. 2009; Wang et al. 2011) oder oxidativ stimuliert wurden (Hazane-Puch et al. 2010; Tavender et al. 2010; Tavender et al. 2008), ergaben eine veränderte Prx4-Expression, -Oxidation und/ oder andere Anzeichen von oxidativem Stress. Im Einklang mit einer antioxidativen und in Signaltransduktion involvierten Funktion von Prx4 wurden bei erhöhter Expression des Enzyms in unterschiedlichen Zellmodellen geringere ROS-Bildung (Wong et al. 2000) oder verminderte Apoptose (Crowley-Weber et al. 2002; Park et al. 2009; Wang et al. 2009) festgestellt. Darüber hinaus wurde die antioxidative Wirkung verschiedener pflanzlicher Polyphenole mit veränderter Prx4-Expression in Verbindung gebracht (Abdelwahed et al. 2007; Hayder et al. 2008).

Da in den aktuellen klinischen Studien allerdings gerade diejenigen Patienten mit sehr hohen Prx4-Serumwerten einen schlechteren Krankheitsverlauf aufwiesen (**Publikation II und III**), ist die Schutzfunktion des Prx4 fraglich – entweder genügt sie nicht, sezerniertes Prx4 führt zu einem Verlust intrazellulär bedeutsamer Prx4-Wirkung oder Prx4 hat einen krankheitsfördernden Effekt. Dabei steht letztere Vermutung einer möglichen antiinflammatorischen Wirkung von Prx4 nicht entgegen,

da vor allem das inflammatorische Gleichgewicht wiederherzustellen ist und in Sepsis-Patienten beispielsweise ein Zustand von Immunsuppression vorliegen kann (Berger et al. 2007; Cepinskas et al. 2008; Pinsky 2004; Riedemann et al. 2003). Im Zellkulturversuch konnte aktuell kein Zusammenhang zwischen der Prx4-Expressions- oder Sekretionsstärke und dem zytotoxischen Effekt von Wasserstoffperoxid erkannt werden, alle Zellklone waren ähnlich sensitiv. Somit wird angenommen, dass der Schutz von Zellen vor Apoptose und anderen schädlichen ROS-Einflüssen von weiteren Faktoren abhängt. Tatsächlich wurde auch eine zum Teil Stimulus-abhängige, kompensatorische Wirkung der verschiedenen Prx-Isoformen und anderer Antioxidantien (Jamaluddin et al. 2010; Shen et al. 2002) sowie Korrelationen zwischen den einzelnen Prx-Isoformen berichtet (Karihtala et al. 2003; Lehtonen et al. 2004; Soini et al. 2011).

Sollte Prx4 durch das Absterben von Zellen freigesetzt werden – wie für andere Antioxidantien beschrieben (Giustarini et al. 2009; Warner et al. 1995) –, erscheinen Gewebe mit hoher Prx4-Expression (Leber, Pankreas, Herz und Hoden) als Quelle zirkulierenden Prx4 naheliegend (Matsumoto et al. 1999; Okado-Matsumoto et al. 2000), während Gewebe mit geringer Prx4-Expression (Dünndarm, Thymus, Milz und Gehirn) vermutlich weniger relevant sind. In der Tat wurde in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen der Menge von sezerniertem und intrazellulär exprimiertem Prx4 in transfizierten MDCK1-Zellen erkannt. Untersuchungen verschiedener *in vivo*-Infektionsmodelle stützen die Annahme einer stimulierbaren, funktionell relevanten Expression von Prx4 in Organen mit hoher Basalexpression (Knight et al. 2009; Qiu et al. 2010; Yu et al. 2010). In diesem Fall könnte eine vertiefte Studie der als phänotypisch weitgehend unauffällig beschriebenen Prx4-Knockout-Maus (Iuchi et al. 2009) oder die Etablierung Organ-spezifischer Prx4-Knockout-Mäuse Klarheit bringen.

## **7 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hat einen neuen, in einer Vielzahl von Settings relevanten prognostischen Biomarker vorgestellt und dazu beigetragen, einen Teil der widersprüchlichen Aussagen zur physiologischen und pathophysiologischen Regulation von Prx4 zu bestätigen bzw. zu widerlegen und in einem anderen Zusammenhang zu betrachten. Auf Basis der ersten Einblicke, welche durch die aktuelle Arbeit und Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen gewonnen wurden, wird angeregt, die Erforschung von Prx4 zu vertiefen, um folgende Fragen zu beantworten: Woher stammt zirkulierendes Prx4 (Gewebe, Blutgefäße, ubiquitär oder spezifisch)? Wie wird die Sekretion von Prx4 reguliert (NF-kappaB, ROS-Quellen wie NADPH-Oxidasen, reaktive nitrosative Spezies, spezifisch oder unspezifisch)? Übt sezerniertes Prx4 eine Funktion aus (antioxidativ, pro- oder antiinflammatorisch, Chaperon, inaktiv)? Spielt der oligomere Status für die Sekretion eine Rolle (dimere

oder dekamere Form, Regenerierung, Membranbindung)? Interagiert zirkulierendes Prx4 mit anderen Prx-Isoformen oder redox-abhängigen Kofaktoren? Gibt es Kompensationsmechanismen zwischen Prx4 und anderen Antioxidantien? Kann eine antioxidative Therapie Prx4-Serumwerte beeinflussen und spiegeln diese den Therapieverlauf wider?

## Literaturverzeichnis

- Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A. M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M. G., Chekir-Ghedira, L. (2007). "Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling." *Chem Biol Interact* **165**(1): 1-13.
- Alonso de Vega, J. M., Díaz, J., Serrano, E., Carbonell, L. F. (2000). "Plasma redox status relates to severity in critically ill patients." *Crit Care Med* **28**(6): 1812-4.
- Andresen, M., Regueira, T., Bruhn, A., Perez, D., Strobel, P., Dougnac, A., Marshall, G., Leighton, F. (2008). "Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock." *Mediators Inflamm* **2008**(168652).
- Bae, J. Y., Ahn, S. J., Han, W., Noh, D. Y. (2007). "Peroxiredoxin I and II inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in MCF-7 cell lines." *J Cell Biochem* **101**(4): 1038-45.
- Barranco-Medina, S., Lázaro, J. J., Dietz, K. J. (2009). "The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function." *FEBS Lett* **583** (12): 1809-16.
- Bast, A., Erttmann, S. F., Walther, R., Steinmetz, I. (2010). "Influence of iNOS and COX on peroxiredoxin gene expression in primary macrophages." *Free Radic Biol Med* **49**(12): 1881-91.
- Basu, A., Banerjee, H., Rojas, H., Martinez, S. R., Roy, S., Jia, Z., Lilly, M. B., De León, M., Casiano, C. A. (2010). "Differential expression of peroxiredoxins in prostate cancer: consistent upregulation of PRDX3 and PRDX4." *Prostate* [Epub ahead of print].
- Berger, M. M., Chioloro, R. L. (2007). "Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome." *Crit Care Med* **35**(9 Suppl): S584-S90.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., Sibbald, W. J. (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." *Chest* **101**(6): 1644-55.
- Brixius, K., Schwinger, R. H., Hoyer, F., Napp, A., Renner, R., Bolck, B., Kumin, A., Fischer, U., Mehlhorn, U., Werner, S., Bloch, W. (2007). "Isoform-specific downregulation of peroxiredoxin in human failing myocardium." *Life Sci* **81**(10): 823-31.
- Castella, X., Artigas, A., Bion, J., Kari, A. (1995). "A comparison of severity of illness scoring systems for intensive care unit patients: results of a multicenter, multinational study. The European/North American Severity Study Group." *Crit Care Med* **23**(8): 1327-35.
- Cepinskas, G., Wilson, J. X. (2008). "Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants." *J Clin Biochem Nutr* **42**(3): 175-84.
- Cha, M. K., Suh, K. H., Kim, I. H. (2009). "Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma." *J Exp Clin Cancer Res* **28**: 93.
- Cha, M. K., Yun, C. H., Kim, I. H. (2000). "Interaction of human thiol-specific antioxidant protein 1 with erythrocyte plasma membrane." *Biochemistry* **39**(23): 6944-50.

- Chang, J. W., Lee, S. H., Jeong, J. Y., Chae, H. Z., Kim, Y. C., Park, Z. Y., Yoo, Y. J. (2005). "Peroxiredoxin-I is an autoimmunogenic tumor antigen in non-small cell lung cancer." FEBS Lett **579**(13): 2873-7.
- Chang, J. W., Lee, S. H., Lu, Y., Yoo, Y. J. (2006). "Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces the non-classical secretion of Peroxiredoxin-I in A549 cells." Biochem Biophys Res Commun **345**: 118-23.
- Chang, K. P., Yu, J. S., Chien, K. Y., Lee, C. W., Liang, Y., Liao, C. T., Yen, T. C., Lee, L. Y., Huang, L. L., Liu, S. C., Chang, Y. S., Chi, L. M. (2011). "Identification of PRDX4 and P4HA2 as metastasis-associated proteins in oral cavity squamous cell carcinoma by comparative tissue proteomics of microdissected specimens using iTRAQ technology." J Proteome Res [**Epub ahead of print**].
- Chang, X., Cui, Y., Zong, M., Zhao, Y., Yan, X., Chen, Y., Han, J. (2009). "Identification of proteins with increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues." J Rheumatol **36**(5): 872-80.
- Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L., MacKenzie, C. R. (1987). "A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation." J Chronic Dis **40**(5): 373-83.
- Chen, G., Gharib, T. G., Huang, C. C., Thomas, D. G., Shedden, K. A., Taylor, J. M., Kardia, S. L., Misek, D. E., Giordano, T. J., Iannettoni, M. D., Orringer, M. B., Hanash, S. M., Beer, D. G. (2002). "Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors." Clin Cancer Res **8**(7): 2298-305.
- Chen, J. H., Chang, Y. W., Yao, C. W., Chiueh, T. S., Huang, S. C., Chien, K. Y., Chen, A., Chang, F. Y., Wong, C. H., Chen, Y. J. (2004). "Plasma proteome of severe acute respiratory syndrome analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17039-44.
- Chen, J. H., Ni, R. Z., Xiao, M. B., Guo, J. G., Zhou, J. W. (2009). "Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in human pancreatic cancer tissue." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **8**(2): 193-200.
- Chew, W. M., Birnbaumer, D. M. (1999). "Evaluation of the elderly patient with weakness: an evidence based approach." Emerg Med Clin North Am **17**(1): 265-78.
- Chuang, C. C., Shiesh, S. C., Chi, C. H., Tu, Y. F., Hor, L. I., Shieh, C. C., Chen, M. F. (2006). "Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis." Crit Care **10**(1): R36.
- Chung, J. C., Oh, M. J., Choi, S. H., Bae, C. D. (2008). "Proteomic analysis to identify biomarker proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma." ANZ J Surg **78**(4): 245-51.
- Cordray, P., Doyle, K., Edes, K., Moos, P. J., Fitzpatrick, F. A. (2007). "Oxidation of 2-Cys-peroxiredoxins by arachidonic acid peroxide metabolites of lipoxygenases and cyclooxygenase-2." J Biol Chem **282**(45): 32623-9.
- Crimi, E., Sica, V., Williams-Ignarro, S., Zhang, H., Slutsky, A. S., Ignarro, L. J., Napoli, C. (2006). "The role of oxidative stress in adult critical care." Free Radic Biol Med **40**(3): 398-406.
- Crowley-Weber, C. L., Payne, C. M., Gleason-Guzman, M., Watts, G. S., Futscher, B., Waltmire, C. N., Crowley, C., Dvorakova, K., Bernstein, C., Craven, M., Garewal, H., Bernstein, H. (2002). "Development and molecular characterization of HCT-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate." Carcinogenesis **23**(12): 2063-80.

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006). "Biomarkers of oxidative damage in human disease." Clin Chem **52**(4): 601-23.
- Dhar-Mascareno, M., Mascareno, E., Golde, D. W. (2009). "Early signaling by vascular endothelial growth factor and placental growth factor in human bone marrow-derived endothelial cells is mediated by superoxide." J Vasc Res **46**(6): 601-8.
- Diet, A., Abbas, K., Bouton, C., Guillon, B., Tomasello, F., Fourquet, S., Toledano, M. B., Drapier, J. C. (2007). "Regulation of peroxiredoxins by nitric oxide in immunostimulated macrophages." J Biol Chem **282**(50): 36199-205.
- Ding, Y., Yamada, S., Wang, K. Y., Shimajiri, S., Guo, X., Tanimoto, A., Murata, Y., Kitajima, S., Watanabe, T., Izumi, H., Kohno, K., Sasaguri, Y. (2010). "Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice." Antioxid Redox Signal **13**(10): 1477-90.
- Doise, J. M., Aho, L. S., Quenot, J. P., Guillard, J. C., Zeller, M., Vergely, C., Aube, H., Blettery, B., Rochette, L. (2008). "Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time." Fundam Clin Pharmacol **22**(2): 203-9.
- Dreja, T., Jovanovic, Z., Rasche, A., Kluge, R., Herwig, R., Tung, Y. C., Joost, H. G., Yeo, G. S., Al-Hasani, H. (2010). "Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model of the metabolic syndrome." Diabetologia **53**(2): 309-20.
- Fujii, J., Ikeda, Y. (2002). "Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein." Redox Rep **7**(3): 123-30.
- Full, L. E., Davies, A. H., Wait, R., Monaco, C. (2010). "BAS/BSCR12 Proteomic analysis of smooth muscle cells derived from carotid plaque shows differences between symptomatic and asymptomatic plaques." Heart **96**(17): e15-e6.
- Geiben-Lynn, R., Kursar, M., Brown, N. V., Addo, M. M., Shau, H., Lieberman, J., Luster, A. D., Walker, B. D. (2003). "HIV-1 antiviral activity of recombinant natural killer cell enhancing factors, NKEF-A and NKEF-B, members of the peroxiredoxin family." J Biol Chem **278**(3): 1569-74.
- Giguère, P., Turcotte, M. E., Hamelin, E., Parent, A., Brisson, J., Laroche, G., Labrecque, P., Dupuis, G., Parent, J. L. (2007). "Peroxiredoxin-4 interacts with and regulates the thromboxane A(2) receptor." FEBS Lett **581**(20): 3863-8.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., Rossi, R. (2009). "Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers." Crit Rev Clin Lab Sci **46**(5-6): 241-81.
- Gordon, M. (1986). "Differential diagnosis of weakness--a common geriatric symptom." Geriatrics **41**(4): 75-80.
- Grossmann, F. N. C., Christ, M., Schneider, K., Spirig, R., Bingisser, R. (2011). "Transporting clinical tools to new settings: cultural adaptation and validation of the Emergency Severity Index in German." Ann Emerg Med **57**(3): 257-64.
- Haridas, V., Ni, J., Meager, A., Su, J., Yu, G. L., Zhai, Y., Kyaw, H., Akama, K. T., Hu, J., Van Eldik, L. J., Aggarwal, B. B. (1998). "TRANK, a novel cytokine that activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase." J Immunol **161**(1): 1-6.
- Harper, C., Newton, P. (1989). "Clinical aspects of pneumonia in the elderly veteran." J Am Geriatr Soc **37**(9): 867-72.

- Hayder, N., Bouhlel, I., Skandrani, I., Kadri, M., Steiman, R., Guiraud, P., Mariotte, A. M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M. G., Chekir-Ghedira, L. (2008). "In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray." *Toxicol In Vitro* **22**(3): 567-81.
- Hazane-Puch, F., Benaraba, R., Valenti, K., Osman, M., Laporte, F., Favier, A., Anderson, R. A., Roussel, A. M., Hininger-Favier, I. (2010). "Chromium III histidinate exposure modulates gene expression in HaCaT human keratinocytes exposed to oxidative stress." *Biol Trace Elem Res* **137**(1): 23-39.
- Hofer, S., Rosenhagen, C., Nakamura, H., Yodoi, J., Bopp, C., Zimmermann, J. B., Goebel, M., Schemmer, P., Hoffmann, K., Schulze-Osthoff, K., Breikreutz, R., Weigand, M. A. (2009). "Thioredoxin in human and experimental sepsis." *Crit Care Med* **37**(7): 2155-9.
- Huo, R., He, Y., Zhao, C., Guo, X.-J., Lin, M., Sha, J.-H. (2007). "Identification of human spermatogenesis-related proteins by comparative proteomic analysis: a preliminary study." *Fertil Steril*.
- Iizuka, N., Okamoto, K., Matsushita, R., Kimura, M., Nagai, K., Arito, M., Kurokawa, M. S., Masuko, K., Suematsu, N., Hirohata, S., Kato, T. (2010). "Identification of autoantigens specific for systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement." *Lupus* **19**(6): 717-26.
- Ikeda, Y., Ito, R., Ihara, H., Okada, T., J., F. (2010). "Expression of N-terminally truncated forms of rat peroxiredoxin-4 in insect cells." *Protein Expr Purif* **72**(1): 1-7.
- Iuchi, Y., Okada, F., Tsunoda, S., Kibe, N., Shirasawa, N., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, Y., Fujii, J. (2009). "Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress." *Biochem J* **419**(1): 149-58.
- Jamaluddin, M., Wiktorowicz, J. E., Soman, K. V., Boldogh, I., Forbus, J. D., Spratt, H., Garofalo, R. P., Brasier, A. R. (2010). "Role of peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 4 in protection of respiratory syncytial virus-induced cysteinyl oxidation of nuclear cytoskeletal proteins." *J Virol* **84**(18): 9533-45.
- Jang, J. S., Cho, H. Y., Lee, Y. J., Ha, W. S., Kim, H. W. (2004). "The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates." *Oncol Res* **14**(10): 491-9.
- Jarvela, S. E., Rantala, I., Rodriguez, A., Kallio, H., Parkkila, S., Kinnula, V., Soini, Y., Haapasalo, H. (2010). "Specific expression profile and prognostic significance of peroxiredoxins in grade II-IV astrocytic brain tumors." *BMC Cancer* **10**(1): 104.
- Jiang, Y. L., Ning, Y., Ma, X. L., Liu, Y. Y., Wang, Y., Zhang, Z., Shan, C. X., Xu, Y. D., Yin, L. M., Yang, Y. Q. (2011). "Alteration of the proteome profile of the pancreas in diabetic rats induced by streptozotocin." *Int J Mol Med* **28**(2): 153-60.
- Jin, D.-Y., Chae, H. Z., Rhee, S. G., Jeang, K.-T. (1997). "Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF- $\kappa$ B activation." *J Biol Chem* **272**(49): 30952-61.
- Jones, D. P. (2008). "Radical-free biology of oxidative stress." *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(4): C849-C68.
- Karasawa, R., Ozaki, S., Nishioka, K., Kato, T. (2005). "Autoantibodies to peroxiredoxin I and IV in patients with systemic autoimmune diseases." *Microbiol Immunol* **49**(1): 57-65.
- Karihtala, P., Kauppila, S., Soini, Y., Jukkola-Vuorinen, A. (2011). "Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas." *BMC Cancer* **11**(1): [Epub ahead of print].

- Karihtala, P., Mantyniemi, A., Kang, S. W., Kinnula, V. L., Soini, Y. (2003). "Peroxiredoxins in breast carcinoma." Clin Cancer Res **9**(9): 3418-24.
- Karihtala, P., Soini, Y., Vaskivuo, L., Bloigu, R., Puistola, U. (2009). "DNA adduct 8-hydroxydeoxyguanosine, a novel putative marker of prognostic significance in ovarian carcinoma." Int J Gynecol Cancer **19**(6): 1047-51.
- Katz, S., Downs, T. D., Cash, H. R., Grotz, R. C. (1970). "Progress in development of the index of ADL." Gerontologist **10**(1): 20-30.
- Khalil, A. A., James, P. (2007). "Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling." Cancer Sci **98**(2): 201-13.
- Kim, K., Yu, M., Han, S., Oh, I., Choi, Y. J., Kim, S., Yoon, K., Jung, M., Choe, W. (2009). "Expression of human peroxiredoxin isoforms in response to cervical carcinogenesis." Oncol Rep **21**(6): 1391-6.
- Kinnula, V. L., Lehtonen, S., Sormunen, R., Kaarteenaho-Wiik, R., Kang, S. W., Rhee, S. G., Soini, Y. (2002). "Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma." J Pathol **196**(3): 316-23.
- Knight, M., Raghavan, N., Goodall, C., Cousin, C., Ittiprasert, W., Sayed, A., Miller, A., Williams, D. L., Bayne, C. J. (2009). "Biomphalaria glabrata peroxiredoxin: effect of schistosoma mansoni infection on differential gene regulation." Mol Biochem Parasitol **167**(1): 20-31.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Leaver, S. K., MacCallum, N. S., Pingle, V., Hacking, M. B., Quinlan, G. J., Evans, T. W., Burke-Gaffney, A. (2010). "Increased plasma thioredoxin levels in patients with sepsis: positive association with macrophage migration inhibitory factor." Intensive Care Med **36**(2): 336-41.
- Lee, S. Y., Patton, S. M., Henderson, R. J., Connor, J. R. (2007). "Consequences of expressing mutants of the hemochromatosis gene (HFE) into a human neuronal cell line lacking endogenous HFE." FASEB J **21**(2): 564-76.
- Lee, W., Choi, K. S., Riddell, J., Ip, C., Ghosh, D., Park, J. H., Park, Y. M. (2007). "Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2." J Biol Chem **282**(30): 22011-22.
- Lehtonen, S. T., Svensk, A. M., Soini, Y., Paakko, P., Hirvikoski, P., Kang, S. W., Saily, M., Kinnula, V. L. (2004). "Peroxiredoxins, a novel protein family in lung cancer." Int J Cancer **111**(4): 514-21.
- Li, L., Kaifu, T., Obinata, M., Takai, T. (2009). "Peroxiredoxin III-deficiency sensitizes macrophages to oxidative stress." J Biochem **145**(4): 425-7.
- Li, L., Shoji, W., Takano, H., Nishimura, N., Aoki, Y., Takahashi, R., Goto, S., Kaifu, T., Takai, T., Obinata, M. (2007). "Increased susceptibility of MER5 (peroxiredoxin III) knockout mice to LPS-induced oxidative stress." Biochem Biophys Res Commun **355**(3): 715-21.
- Li, M., Lin, Y. M., Hasegawa, S., Shimokawa, T., Murata, K., Kameyama, M., Ishikawa, O., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nakamura, Y., Furukawa, Y. (2004). "Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray." Int J Oncol **24**(2): 305-12.
- Li, Q., Verma, I. M. (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-34.

- Lin, J. F., Xu, J., Tian, H. Y., Gao, X., Chen, Q. X., Gu, Q., Xu, G. J., Song, J. D., Zhao, F. K. (2007). "Identification of candidate prostate cancer biomarkers in prostate needle biopsy specimens using proteomic analysis." Int J Cancer **121**(12): 2596-605.
- Lindl, T. (2002). "Zell- und Gewebekultur " Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Liu, G., Botting, C. H., Evans, K. M., Walton, J. A. G., Xu, G., Slawin, A. M. Z., Westwood, N. J. (2010). "Optimisation of conoidin A, a peroxiredoxin inhibitor." Chem Med Chem **5**: 41-5.
- Liu, X., Zeng, B., Ma, J., Wan, C. (2009). "Comparative proteomic analysis of osteosarcoma cell and human primary cultured osteoblastic cell." Cancer Invest **27**(3): 345-52.
- Matsuki, S., Sasagawa, I., Iuchi, Y., Fujii, J. (2002). "Impaired expression of peroxiredoxin 4 in damaged testes by artificial cryptorchidism." Redox Rep **7**(5): 276-8.
- Matsumoto, A., Okado, A., Fujii, T., Fujii, J., Egashira, M., Niikawa, N., Taniguchi, N. (1999). "Cloning of the peroxiredoxin gene family in rats and characterization of the fourth member." FEBS Lett **443**(3): 246-50.
- Matte, A., Low, P. S., Turrini, F., Bertoldi, M., Campanella, M. E., Spano, D., Pantaleo, A., Siciliano, A., De Franceschi, L. (2010). "Peroxiredoxin-2 expression is increased in beta-thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress." Free Radic Biol Med **49**(3): 457-66.
- Meneses-Lorente, G., Guest, P. C., Lawrence, J., Muniappa, N., Knowles, M. R., Skynner, H. A., Salim, K., Cristea, I., Mortishire-Smith, R., Gaskell, S. J., Watt, A. (2004). "A proteomic investigation of drug-induced steatosis in rat liver." Chem Res Toxicol **17**(5): 605-12.
- Mishra, V. (2007). "Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness." Clin Lab **53**(3-4): 199-209.
- Mishra, V., Baines, M., Wenstone, R., Shenkin, A. (2005). "Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients." Ann Clin Biochem **42**(Pt 4): 269-76.
- Mitaka, C. (2005). "Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome." Clin Chim Acta **351**(1-2): 17-29.
- Mitsumoto, A., Takanezawa, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nakagawa, Y. (2001). "Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress." Free Radic Biol Med **30**(6): 625-35.
- Mota, S., Mendes, M., Freitas, N., Penque, D., Coelho, A. V., Cunha, C. (2009). "Proteome analysis of a human liver carcinoma cell line stably expressing hepatitis delta virus ribonucleoproteins." J Proteomics **72**(4): 616-27.
- Nemec, M., Koller, M. T., Nickel, C. H., Maile, S., Winterhalder, C., Karrer, C., Laifer, G., Bingisser, R. (2010). "Patients presenting to the emergency department with non-specific complaints: the Basel Non-specific Complaints (BANC) study." Acad Emerg Med **17**(3): 284-92.
- Nickel, C. H., Nemec, M., Bingisser, R. (2009). "Weakness as presenting symptom in the emergency department." Swiss Med Wkly **139**(17-18): 271-2.
- Norman, D. C., Yoshikawa, T. T. (1996). "Fever in the elderly." Infect Dis Clin North Am **10**(1): 93-9.
- O'Flaherty, C., Rico de Souza, A. (2011). "Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner." Biol Reprod **84**(2): 238-47.
- O'Neill, J. S., Reddy, A. B. (2011). "Circadian clocks in human red blood cells." Nature **469**(7331): 498-503.

- Oberley, T., Verwiebe, E., Zhong, W., Kang, S. W., Rhee, S. G. (2001). "Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney." Free Radical Biol Med **30**(4): 412-24.
- Okado-Matsumoto, A., Matsumoto, A., Fujii, J., Taniguchi, N. (2000). "Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced conditions." J Biochem **127**(3): 493-501.
- Oldham, K. M., Bowen, P. E. (1998). "Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial?" J Am Diet Assoc **98**(9): 1001-8.
- Palande, K. K., Beekman, R., van der Meeren, L. E., Beverloo, H. B., Valk, P. J., Touw, I. P. (2011). "The antioxidant protein peroxiredoxin 4 is epigenetically down regulated in acute promyelocytic leukemia." PLoS One **6**(1): e16340.
- Park, H.-J., Kim, B.-G., Lee, S.-J., Heo, S.-H., Kim, J.-Y., Kwon, T.-H., Lee, E.-B., Ryoo, H.-M., Cho, J.-Y. (2008). "Proteomic profiling of endothelial cells in human lung cancer." J Proteome Res **7**(3): 1138-50.
- Park, J. J., Chang, H. W., Jeong, E. J., Roh, J. L., Choi, S. H., Jeon, S. Y., Ko, G. H., Kim, S. Y. (2009). "Peroxiredoxin IV protects cells from radiation-induced apoptosis in head-and-neck squamous cell carcinoma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **73**(4): 1196-202.
- Peters, M. L. (2010). "The older adult in the emergency department: aging and atypical illness presentation." J Emerg Nurs **36**(1): 29-34.
- Pinsky, M. R. (2004). "Dysregulation of the immune response in severe sepsis." Am J Med Sci **328**(4): 220-9.
- Power, C., Fanning, N., Redmond, H. P. (2002). "Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review." Shock **18**(3): 197-211.
- Pritchard, C., Mecham, B., Dumpit, R., Coleman, I., Bhattacharjee, M., Chen, Q., Sikes, R. A., Nelson, P. S. (2009). "Conserved gene expression programs integrate mammalian prostate development and tumorigenesis." Cancer Res **69**(5): 1739-47.
- Pylväs, M., Puistola, U., Kauppila, S., Soini, Y., Karihtala, P. (2010). "Oxidative stress-induced antioxidant enzyme expression is an early phenomenon in ovarian carcinogenesis." Eur J Cancer **46**(9): 1661-7.
- Qiu, L., Ma, Z., Jiang, S., Wang, W., Zhou, F., Huang, J., Li, J., Yang, Q. (2010). "Molecular cloning and mRNA expression of peroxiredoxin gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)." Mol Biol Rep **37**(6): 2821-7.
- Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebbersold, R., Benahmed, M., Louisot, P., Lunardi, J. (2002). "Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of Peroxiredoxins at their active site." J Biol Chem **277**(22): 19396-401.
- Rhee, S. G., Chae, H. Z., Kim, K. (2005). "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." Free Radic Biol Med **38**(12): 1543-52.
- Rhee, S. G., Woo, H. A. (2011). "Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and protein chaperones." Antioxid Redox Signal **15**(3): 781-94.
- Riddell, J. R., Wang, X. Y., Minderman, H., Gollnick, S. O. (2010). "Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4." J Immunol **184**(2): 1022-30.

- Riedemann, N. C., Guo, R. F., Ward, P. A. (2003). "Novel strategies for the treatment of sepsis." Nat Med **9**(5): 517-24.
- Robinson, M. W., Hutchinson, A. T., Dalton, J. P., Donnelly, S. (2010). "Peroxiredoxin: a central player in immune modulation." Parasite Immunol **32**(5): 305-13.
- Rocha, S., Costa, E., Coimbra, S., Nascimento, H., Catarino, C., Rocha-Pereira, P., Quintanilha, A., Belo, L., Santos-Silva, A. (2009). "Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress." Blood Cells Mol Dis **43**(1): 68-73.
- Rowe, D. D., Leonardo, C. C., Hall, A. A., Shahaduzzaman, M. D., Collier, L. A., Willing, A. E., Pennypacker, K. R. (2010). "Cord blood administration induces oligodendrocyte survival through alterations in gene expression." Brain Res **1366**: 172-88.
- Rutschmann, O. T., Chevalley, T., Zumwald, C., Luthy, C., Vermeulen, B., Sarasin, F. P. (2005). "Pitfalls in the emergency department triage of frail elderly patients without specific complaints." Swiss Med Wkly **135**(9-10): 145-50.
- Sasagawa, I., Matsuki, S., Suzuki, Y., Iuchi, Y., Tohya, K., Kimura, M., Nakada, T., Fujii, J. (2001). "Possible involvement of the membrane-bound form of peroxiredoxin 4 in acrosome formation during spermiogenesis of rats." Eur J Biochem **268**: 3053-61.
- Shen, C., Nathan, C. (2002). "Nonredundant antioxidant defense by multiple two-cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells." Mol Med **8**(2): 95-102.
- Shiota, M., Izumi, H., Miyamoto, N., Onitsuka, T., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Takahashi, M., Ono, M., Kuwano, M., Naito, S., Sasaguri, Y., Kohno, K. (2008). "Ets regulates peroxiredoxin1 and 5 expressions through their interaction with the high-mobility group protein B1." Cancer Sci **99**(10): 1950-9.
- Simula, M. P., Cannizzaro, R., Canzonieri, V., Pavan, A., Maiero, S., Toffoli, G., De Re, V. (2010). "PPAR signaling pathway and cancer-related proteins are involved in celiac disease-associated tissue damage." Mol Med **16**(5-6): 199-209.
- Soini, Y., Haapasaari, K. M., Vaarala, M. H., Turpeenniemi-Hujanen, T., Kärjä, V., Karihtala, P. (2011). "8-hydroxydeguanosine and nitrotyrosine are prognostic factors in urinary bladder carcinoma." Int J Clin Exp Pathol **4**(3): 267-75.
- Sorokina, E. M., Feinstein, S. I., Milovanova, T. N., Fisher, A. B. (2009). "Identification of the amino acid sequence that targets peroxiredoxin 6 to lysosomal-like structures of lung epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(5): L871-L80.
- Sun, H. N., U., K. S., M., H. S., Kim, J. M., Park, Y. H., Kim, S. H., Yang, H. Y., Chung, K. J., Lee, T. H., Choi, H. S., Min, J. S., Park, M. K., Kim, S. K., Lee, S. R., Chang, K. T., Lee, S. H., Yu, D. Y., Lee, D. S. (2010). "Microglial peroxiredoxin V acts as an inducible anti-inflammatory antioxidant through cooperation with redox signaling cascades." J Neurochem **114**(1): 39-50.
- Tak, P. P., Firestein, G. S. (2001). "NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases." J Clin Invest **107**(1): 7-11.
- Tavender, T. J., Bulleid, N. J. (2010). "Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced during disulphide formation." J Cell Sci **123**(Pt 15): 2672-9.
- Tavender, T. J., Sheppard, A. M., Bulleid, N. J. (2008). "Peroxiredoxin IV is an endoplasmic reticulum-localized enzyme forming oligomeric complexes in human cells." Biochem J **411**: 191-9.
- Tavender, T. J., Springate, J. J., Bulleid, N. J. (2010). "Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum." EMBO J **29**(24): 4185-97.

- Tedelind, S., Poliakova, K., Valeta, A., Hunegnaw, R., Yemanaberhan, E. L., Heldin, N. E., Kurebayashi, J., Weber, E., Kopitar-Jerala, N., Turk, B., Bogyo, M., Brix, K. (2010). "Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells." Biol Chem **391**(8): 923-35.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**: 44-84.
- Vanpee, D., Swine, C., Vandebossche, P., Gillet, J. B. (2001). "Epidemiological profile of geriatric patients admitted to the emergency department of a university hospital localized in a rural area." Eur J Emerg Med **8**(4): 301-4.
- Victor, V. M., Rocha, M., Esplugues, J. V., De la Fuente, M. (2005). "Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy." Curr Pharm Des **11**: 3141-58.
- Vincent, J. L., Ferreira, F., Moreno, R. (2000). "Scoring systems for assessing organ dysfunction and survival." Crit Care Clin **16**(2): 353-66.
- Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter, P. M., Thijs, L. G. (1996). "The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine." Intensive Care Med **22**(7): 707-10.
- Wang, H. Q., Du, Z. X., Liu, B. Q., Gao, Y. Y., Meng, X., Guan, Y., Zhang, H. Y. (2009). "TNF-related apoptosis-inducing ligand suppresses PRDX4 expression." FEBS Lett **583**(9): 1511-5.
- Wang, X., Zhang, S., Sun, C., Yuan, Z. G., Wu, X., Wang, D., Ding, Z., Hu, R. (2011). "Proteomic profiles of mouse neuro n2a cells infected with variant virulence of rabies viruses." J Microbiol Biotechnol **21**(4): 366-73.
- Warner, A., Bencosme, A., Healy, D., Verme, C. (1995). "Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment." Clin Chem **41**(6 Pt 1): 867-71.
- Weichart, D., Gobom, J., Klopffleisch, S., Häslner, R., Gustavsson, N., Billmann, S., Lehrach, H., Seegert, D., Schreiber, S., Rosenstiel, P. (2006). "Analysis of NOD2-mediated proteome response to muramyl dipeptide in HEK293 cells." J Biol Chem **281**(4): 2380-9.
- Wong, C. M., Chun, A. C., Kok, K. H., Zhou, Y., Fung, P. C., Kung, H. F., Jeang, K. T., Jin, D. Y. (2000). "Characterization of human and mouse peroxiredoxin IV: evidence for inhibition by Prx-IV of epidermal growth factor- and p53-induced reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **2**(3): 507-18.
- Woo, A. H., Jeong, W., Chang, T.-S., Park, K. J., Park, S. J., Yang, J. S., Rhee, S. G. (2005). "Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins." J Biol Chem **280**(5): 3125-8.
- Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., Karplus, P. A. (2002). "Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins." Biochemistry **41**(17): 5493-504.
- Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., Poole, L. B. (2003). "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins." Trends Biochem Sci **28**(1): 32-40.
- Woolston, C. M., Storr, S. J., Ellis, I. O., Morgan, D. A., Martin, S. G. (2011). "Expression of thioredoxin system and related peroxiredoxin proteins is associated with clinical outcome in radiotherapy treated early stage breast cancer." Radiother Oncol [**Epub ahead of print**].
- Xie, X., Li, S., Liu, S., Lu, Y., Shen, P., Ji, J. (2008). "Proteomic analysis of mouse islets after multiple low-dose streptozotocin injection." Biochim Biophys Acta **1784**(2): 276-84.

- Yang, C. S., Lee, D. S., Song, C. H., An, S. J., Li, S., Kim, J. M., Kim, C. S., Yoo, D. G., Jeon, B. H., Yang, H. Y., Lee, T. H., Lee, Z. W., El-Benna, J., Yu, D. Y., Jo, E. K. (2007). "Roles of peroxiredoxin II in the regulation of proinflammatory responses to LPS and protection against endotoxin-induced lethal shock." J Exp Med **204**(3): 583-94.
- Yang, D., Song, Y., Wang, X., Sun, J., Ben, Y., An, X., Tong, L., Bi, J., Wang, X., Bai, C. (2011). "Deletion of peroxiredoxin 6 potentiates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice." Crit Care Med **39**(4): 756-64.
- Yim, S. H., Kim, Y. J., Oh, S. Y., Fujii, J., Zhang, Y., Gladyshev, V. N., Rhee, S. G. (2011). "Identification and characterization of an alternatively transcribed form of peroxiredoxin IV that is specifically expressed in spermatids of the postpubertal mouse testis." J Biol Chem [**Epub ahead of print**].
- Young, R., Hayes, J. D., Brown, K., Wolf, C. R., Whitelaw, C. B. (2010). "Peroxiredoxin gene expression signatures in liver reflect toxic insult." Assay Drug Dev Technol **8**(4): 512-7.
- Yu, S., Mu, Y., Ao, J., Chen, X. (2010). "Peroxiredoxin IV regulates pro-inflammatory responses in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and protects against bacterial challenge." J Proteome Res **9**(3): 1424-36.
- Zhang, X. Z., Xiao, Z. F., Li, C., Xiao, Z. Q., Yang, F., Li, D. J., Li, M. Y., Li, F., Chen, Z. C. (2009). "Triosephosphate isomerase and peroxiredoxin 6, two novel serum markers for human lung squamous cell carcinoma." Cancer Sci **100**(12): 2396-401.

## Anteilserklärung

Frau Janin Schulte hatte folgenden Anteil an den drei vorgelegten Publikationen und dem Abstract der von ihr experimentell erstellten kumulativen Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung von Peroxiredoxin 4 als Biomarker für oxidativen Stress“:

[I] **Schulte, J.**, Struck, J., Bergmann, A., Köhrle, J. (2010). “Immunoluminometric assay for quantification of peroxiredoxin 4 in human serum.” Clin Chim Acta **411**(17-18): 1258-63. (Impact Factor 2.535)

Der Anteil von Frau Schulte an dieser Publikation liegt bei mindestens 80 Prozent. Das Manuskript wurde vornehmlich von Frau Schulte verfasst. Die zugrunde liegenden Daten wurden gänzlich von Frau Schulte erhoben, ausgewertet und in Abbildungen bzw. Tabellen dargestellt.

[II] **Schulte, J.**, Struck, J., Köhrle, J., Müller, B. (2011). “Circulating levels of peroxiredoxin 4 as a novel biomarker of oxidative stress in patients with sepsis.” Shock **35**(5): 460-5. (Impact Factor 2.871)

Das Manuskript wurde zum überwiegenden Teil von Frau Schulte verfasst. Ihr Anteil an der Publikation ist mit über 50 Prozent einzustufen. Die experimentelle Datenerhebung zu Prx4 und die Berechnung des SOFA-Scores erfolgten durch Frau Schulte. Sie erstellte die Abbildungen 1 und 2 und hat zu den übrigen Abbildungen anteilig beigetragen. Die Erstellung der Tabellen wurde gänzlich von Frau Schulte vorgenommen. Die statistischen Auswertungen wurden von Frau Schulte anteilig durchgeführt.

[III] Nickel, C. H., Ruedinger, J., Misch, F., Blume, K., Maile, S., **Schulte, J.**, Köhrle, J., Hartmann, O., Giersdorf, S., Bingisser, R. (2011). “Copeptin and peroxiredoxin-4 independently predict mortality in patients with non-specific complaints presenting to the emergency department.” Acad Emerg Med **18**(8): 851-9. (Impact Factor 2.478)

Frau Schulte wirkte anteilig an der Formulierung und Gestaltung des Manuskriptes mit. Die experimentellen Daten für Prx4 wurden von Frau Schulte erhoben. Insgesamt beträgt der Anteil von Frau Schulte an dieser Publikation 20 Prozent.

[IV] **Schulte, J.**, Struck, J., Kinne, A., Tedelind, S., Brix, K., Köhrle, J. (2010). “Secretion of peroxiredoxin 4 in response to oxidative stress.” 17th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine. Free Radic Biol Med **49**(suppl 1): S197. (Impact Factor 6.081)

Die dem Abstract zugrunde liegenden Daten wurden zum überwiegenden Teil von Frau Schulte generiert. Für die subzelluläre Lokalisation wirkte Frau Schulte an der Planung, experimentellen Vorbereitung und an der Interpretation mit. Die Gestaltung

des Abstracts und Posterbeitrages oblag in erster Linie Frau Schulte. Ihr Anteil an dem Abstract ist mit mindestens 70 Prozent einzuschätzen.

---

Datum, Janin Schulte

---

Datum, Prof. Dr. Josef Köhrle

## Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

- [I] **Schulte, J.**, Struck, J., Bergmann, A., Köhrle, J. (2010). "Immunoluminometric assay for quantification of peroxiredoxin 4 in human serum." Clin Chim Acta **411**(17-18): 1258-63.
- [II] **Schulte, J.**, Struck, J., Köhrle, J., Müller, B. (2011). "Circulating levels of peroxiredoxin 4 as a novel biomarker of oxidative stress in patients with sepsis." Shock **35**(5): 460-5.
- [III] Nickel, C. H., Ruedinger, J., Misch, F., Blume, K., Maile, S., **Schulte, J.**, Köhrle, J., Hartmann, O., Giersdorf, S., Bingisser, R. (2011). "Copeptin and peroxiredoxin-4 independently predict mortality in patients with non-specific complaints presenting to the emergency department." Acad Emerg Med **18**(8): 851-9.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Komplette Publikationsliste

### Originalarbeiten

Nickel, C. H., Ruedinger, J., Misch, F., Blume, K., Maile, S., **Schulte, J.**, Köhrle, J., Hartmann, O., Giersdorf, S., Bingisser, R. (2011). "Copeptin and peroxiredoxin-4 independently predict mortality in patients with non-specific complaints presenting to the emergency department." Acad Emerg Med **18**(8): 851-9.

**Schulte, J.**, Struck, J., Köhrle, J., Müller, B. (2011). "Circulating levels of peroxiredoxin 4 as a novel biomarker of oxidative stress in patients with sepsis." Shock **35**(5): 460-5.

**Schulte, J.**, Struck, J., Bergmann, A., Köhrle, J. (2010). "Immunoluminometric assay for quantification of peroxiredoxin 4 in human serum." Clin Chim Acta **411**(17-18): 1258-63.

### Abstracts

Abbasi, A., Corpeleijn, E., Postmus, D., Gansevoort, R. T., de Jong, P. E., Gans, R. O. B., de Jong-van den Berg, L. T. W., Struck, J., **Schulte, J.**, Hillege, H. L., van der Harst, P., Stolk, R. P., Navis, G., Bakker, S. J. L. (2011). "Serum peroxiredoxin 4 and cardiometabolic outcomes in the general population." 47th EASD Annual Meeting, 13-16 September 2011, Lisbon, Portugal.

Alkhalaf, A., Gerrits, E. G., Landman, G. W., van Hateren, K. J. J., Groenier, K. H., Struck, J., **Schulte, J.**, Gans, R. O. B., Bakker, S. J. L., Kleefstra, N., Bilo, H. J. G. (2011). "Serum peroxiredoxin-4 and mortality in patients with type 2 diabetes (ZODIAC-28)." 47th EASD Annual Meeting, 13-16 September 2011, Lisbon, Portugal.

**Schulte, J.**, Struck, J., Kinne, A., Tedelind, S., Brix, K., Köhrle, J. (2010). "Secretion of peroxiredoxin 4 in response to oxidative stress." 17th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine. Free Radical Biol Med **49**(suppl 1): S197.

Weiss, F. U., Günther, A., Aghdassi, A., Nitsche, C., **Schulte, J.**, Struck, J., Lerch, M. M. (2010). „Evaluation of peroxiredoxin-4 as a severity marker for acute pancreatitis." PancreasFest, 29-31 July 2010, Pittsburgh, Pennsylvania.

Guenther, A., Aghdassi, A. A., Nitsche, C. J., **Schulte, J.**, Struck, J., Lerch, M. M., Weiss, F. U. (2010). "Comparison of peroxiredoxin-4 with CRP as a severity marker for acute pancreatitis." 42nd Meeting of the European Pancreatic Club, 14-19 June 2010, Stockholm, Sweden.

## Patente

Anmeldenummer: EP09162874.3, Titel: "Diagnostical use of Peroxiredoxin 4"

Dieses Patent schützt den Chemilumineszenz-Immunoassay zur Quantifizierung von Peroxiredoxin 4 in einem weiten Anwendungsgebiet.

## **Selbstständigkeitserklärung**

„Ich, Janin Schulte, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung von Peroxiredoxin 4 als Biomarker für oxidativen Stress“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

---

Datum, Unterschrift des Antragsstellers

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie haben mich während der fachlich wie persönlich prägenden Zeit begleitet und damit entscheidend dazu beigetragen, dass aus einer ersten Idee ein patentgeschütztes Produkt von klinischem Nutzen geworden ist.

Mein wesentlicher Dank gilt den Betreuern meiner Doktorarbeit am Institut für experimentelle Endokrinologie, Prof. Dr. Josef Köhrle, und der BRAHMS GmbH, Dr. Andreas Bergmann und Dr. Joachim Struck. Mit viel Kreativität, gegenseitig bereicherndem Wissen und stetem Vertrauen haben sie dieses Projekt gemeinsam ins Leben gerufen, mir den idealen Rahmen zur selbstständigen Arbeit und Interpretation geboten und laborübergreifende Kooperationen ermöglicht.

In diesem Sinne möchte ich allen Ärzten, insbesondere Dr. Beat Müller und Dr. Christian Nickel, sowie dem Klinikpersonal und ganz besonders den Patienten der Studien PEDCRIP und BANC danken, die der Biomarkerforschung mit der erforderlichen Offenheit begegnet sind und damit die Grundlagen für einen wichtigen Teil der vorliegenden Arbeit geschaffen haben. Die Zusammenarbeit war mir eine große Freude und ist unzweifelhaft meinem persönlichen Anspruch, ein vertieftes Verständnis der medizinischen Zusammenhänge zu erlangen, gerecht geworden.

Den Mitarbeitern der Jacobs University Bremen, Dr. Klaudia Brix und Dr. Sofia Tedelind, danke ich besonders für ihr herausragendes Engagement, ihre Gastfreundschaft und dafür, dass sie ihr bemerkenswertes Fachwissen der Zellbiologie und Proteinbiochemie während unserer Kooperation mit mir geteilt haben.

Ein herzliches Dankeschön für die freundliche Unterstützung geht an meine Kollegen der BRAHMS GmbH, namentlich Dr. Sven Giersdorf sowie die Statistiker Dr. Oliver Hartmann und Dr. Almuth Marx von Global Medical Affairs, Dajana Tandler, Kerstin Gürnth, Christina Fischer-Schulz, Tao Chen, Marco Talke und Andrea Ernst aus der Forschung und Entwicklung, die Mitarbeiter der Fertigung und Produktion sowie Claudia Kohlbrenner und Andrea Schulz von administrativer Seite. Ich danke den Mentoren, Studenten und der Administration im Graduiertenkolleg 1208 dafür, dass mir die Teilnahme an lehrreichen Veranstaltungen in angenehmer Atmosphäre ermöglicht wurde, insbesondere Anita Kinne, Mette Stoedter, Kostja Renko und Doreen Braun für ihre große Hilfsbereitschaft und den offenen Erfahrungsaustausch.

Zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und Freunden, vor allem Tino Otto für das erhellende Interesse, die Zuversicht und Geduld sowie den verlässlichen Rückhalt während der letzten Jahre.