

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und dem

Zentrum für Innovationskompetenz
Septomics
des Universitätsklinikums Jena

**Die Pathogenese der *Escherichia coli*-induzierten
Sepsis in einem Immunoproteasom
defizienten Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Carolin von Lachner
Tierärztin aus Rüdersdorf

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3931

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und dem

Zentrum für Innovationskompetenz
Septomics
des Universitätsklinikums Jena

**Die Pathogenese der *Escherichia coli*-induzierten Sepsis in einem
Immunoproteasom defizienten Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Carolin von Lachner

Tierärztin

aus Rüdersdorf

Berlin 2017

Journal-Nr. 3931

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hortense Slevogt
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Achim Gruber

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice; animal models; Escherichia coli; sepsis; inflammation; immunology;
peritonitis; proteasome endopeptidase complex (MeSH); protein degradation;
pathology; endopeptidases; polymerase chain reaction; immunoblotting; ELISA;
immunoassay

Tag der Promotion: 05.12.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im
Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-876-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des
Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche
Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung
elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk
berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen
im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären
und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior
written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für Guntram

„Besides love and sympathy, animals exhibit other qualities connected with the social instincts which in us would be called moral.“

- Charles Darwin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VI
Abbildungen.....	XII
Tabellen	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Ziel der Studie	1
1.2 Fragestellung	2
1.3 Sepsis.....	3
1.3.1 Sepsisdefinition und Epidemiologie	3
1.3.2 Allgemeine Pathophysiologie der Sepsis	4
1.3.3 Immunantwort in der Sepsis	5
1.3.3.1 Die Pathogenerkennung und Initiierung der Immunantwort.....	5
1.3.3.2 Proinflammatorische Prozesse.....	7
1.3.3.3 Antiinflammatorische Prozesse	8
1.3.3.4 Entwicklung eines Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom	9
1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System	10
1.4.1 Proteasom-Subtypen	11
1.4.1.1 Aufbau des 20S und 26S Proteasoms.....	11
1.4.1.2 I-Proteasom und gemischtes Proteasom.....	11
1.4.1.3 Proteasom-Aktivator 28 und das Hybridproteasom	12
1.4.2 Funktionen des I-Proteasoms	15
1.4.3 Die Rolle des I-Proteasoms in Infektionen und autoimmunen Reaktionen	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Bakterien	18
2.1.1.1 Escherichia coli	18
2.1.1.2 Bakterienkultur	18
2.1.2 Zellen	19
2.1.2.1 Murine Peritonealmakrophagen	19
2.1.2.2 Zellkultur	19
2.1.3 Tierexperimente	19
2.1.3.1 Versuchstiere	19
2.1.3.2 Verbrauchsmaterialien in der Tierhaltung.....	20

2.1.3.3 Narkosemittel und Antikoagulantien.....	20
2.1.4 Histologie und Zytologie	21
2.1.4.1 Herstellung vom HE gefärbten Paraffinschnitten.....	21
2.1.4.2 Zytologische Färbungen	22
2.1.5 Mikrobielle Methoden.....	22
2.1.5.1 Phagozytose und intrazelluläres Abtöten von Bakterien.....	22
2.1.6 Molekularbiologische Methoden	23
2.1.6.1 Durchflusszytometrie	23
2.1.6.2 RNA-Extraktion	25
2.1.6.3 DNA-Isolation	26
2.1.6.4 Polymerase-Kettenreaktion	27
2.1.6.5 Next-Generation-Sequencing	29
2.1.6.6 Immunblot	30
2.1.6.7 Multiplex-Immunoassay.....	32
2.1.6.8 Nitratbestimmung.....	33
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	34
2.1.8 Geräte	35
2.2 Methoden	38
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	38
2.2.1.1 Anlegen eines <i>E. coli</i> A247-Glyzerolstocks.....	38
2.2.1.2 Anzucht von <i>E. coli</i> A247	38
2.2.2 Ex-vivo Experimente	39
2.2.2.1 Kultivierung muriner Peritonealmakrophagen	39
2.2.2.2 Phagozytose-Assay mit <i>E. coli</i> -Partikeln	39
2.2.2.3 Phagozytose und intrazelluläres Abtöten von <i>E. coli</i> A247	41
2.2.3 Tierexperimentelle Untersuchungen	42
2.2.3.1 Versuchstiere	42
2.2.3.2 Haltung	42
2.2.3.3 Zucht.....	43
2.2.3.4 Mausmodell der <i>E. coli</i> -induzierten Peritonitis.....	43
2.2.3.5 Präparation und Probenentnahme.....	46
2.2.3.6 Histologie	48
2.2.3.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	50
2.2.3.8 Bestimmung der bakteriellen Last.....	51

2.2.3.9	Blutanalyse	52
2.2.3.10	Durchflusszytometrische Untersuchungen	53
2.2.3.11	RNA-Extraktion	54
2.2.3.12	DNA-Isolation.....	55
2.2.3.13	Polymerase-Kettenreaktion.....	56
2.2.3.14	Next-Generation-Sequencing.....	58
2.2.3.15	Immunblot.....	60
2.2.3.16	Multiplex-ELISA	62
2.2.3.17	Nitritbestimmung	63
2.2.3.18	Statistik	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Regulation der I-Proteasom-Untereinheiten während der <i>E. coli</i>-Infektion	64
3.1.1	Expressionsanstieg der Immununtereinheiten und PA28 β durch <i>E. coli</i>	64
3.1.2	LMP2 wird exprimiert, aber nicht in das gemischte Proteasom eingebaut	66
3.1.3	Ein kompensatorischer Expressionsanstieg der konstitutiven β -Untereinheiten findet nicht statt.....	67
3.2	Symptomatik und Letalität während der <i>E. coli</i>-Sepsis in I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen	67
3.2.1	Verstärkte Letalität und verschärfter Krankheitsverlauf in Knock-Out-Mäusen..	67
3.2.2	I-Proteasom-Knock-Out-Tiere weisen eine ausgeprägtere Leukopenie auf.....	68
3.2.3	Klinische Befunde und blutchemische Werte zeigen stärkere Schädigungen in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren	69
3.2.4	Vermehrte Organschädigung in I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen	71
3.2.4.1	Histopathologie der Leber	71
3.2.4.2	Histopathologie der Lunge	73
3.2.4.3	Histopathologie der Niere.....	74
3.2.4.4	Histopathologie der Milz.....	75
3.2.4.5	Histopathologie des Thymus	76
3.2.4.6	Histopathologie mediastinaler Lymphknoten.....	77
3.3	Analyse von Entzündungsparametern in Knock-Out- und Wildtyp-Tieren	78
3.3.1	Zirkulierende Zytokine im Blut der I-Proteasom-Knock-Out-Tiere zeigen kein stärkeres proinflammatorisches Muster als in den Wildtyp-Tieren	78
3.3.2	Die Expression ausgewählter Zytokine in Blutleukozyten unterscheidet sich kaum.....	80
3.3.3	Nur leichte Unterschiede im Zytokin-Expressionsmuster der Organe	82

3.4	Die Ausbreitung der Bakterien im Organismus	84
3.4.1	Nachweis einer erhöhten Bakterienlast in Peritonealflüssigkeit, Blut und Organen der I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse	84
3.4.2	Bakterien dringen in das Organparenchym infizierter Mäuse ein, bilden aber keine biofilmähnlichen Gruppierungen	85
3.5	Quantifizierung der Leukozyten und Charakterisierung von Effektoreigenschaften	87
3.5.1	Kein signifikanter Unterschied der Leukozyten-Anzahl im Peritonealraum	87
3.5.2	Vergleichbare Vitalität peritonealer Zellen in beiden Tiergruppen	89
3.5.3	Gleiche Verteilung der Leukozytenpopulationen in beiden Versuchsgruppen.....	90
3.5.4	Makrophagen zeigen reduzierte PD-L1 und MHC-I Expressions-Level.....	93
3.5.5	Residente Makrophagen der I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse zeigen keine Einschränkung in Phagozytose und intrazellulären Abtöten von <i>E. coli</i>	95
3.5.6	Die peritoneale Stickstoffmonoxid- und Zytokinproduktion ist in beiden Versuchsgruppen vergleichbar	97
3.6	Verminderte MHC-Expression auf B- und T-Zellen und reduzierte Anzahl zytotoxischer T-Zellen als Zeichen einer gestörten lymphozytären Abwehr	99
3.6.1	Verringerte Vitalität aus der Milz isolierter Immunzellen	99
3.6.2	Quantifizierung ausgewählter Lymphozytenpopulationen und deren MHC-Expression	100
3.6.2.1	I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse weisen reduzierten Anteil CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen mit verringerter MHC-I-Expression auf	100
3.6.2.2	Höherer Anteil B-Zellen mit verminderter MHC-I- und MHC-II-Expression in Knock-Out-Tieren	102
3.7	Einfluss des I-Proteasoms auf die gewebsspezifische Genregulation.....	103
3.7.1	Verzögerter Abbau von IκBα im Lebergewebe gibt Hinweis auf Unterschiede in der NFκB-Aktivierung	103
3.7.2	Abweichende Genregulation in Lebergewebe von Wildtyp- und Knock-Out-Mäusen	105
3.8	MECL-1 als wichtigste I-Proteasom-Untereinheit in der <i>E. coli</i>-Infektion	109
4	Diskussion.....	110
4.1	Durch die <i>E. coli</i>-Infektion werden I-Proteasom-Untereinheiten reguliert	112
4.2	Der Schweregrad der Sepsis überwiegt in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren, ist aber nicht in einer Hyperinflammation begründet	113
4.2.1	Analysierte Sepsisparameter sind mit Befunden der humanen Sepsis vergleichbar	113

4.2.2	Besonders in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren induziert die <i>E. coli</i> -Sepsis Zellstress und steigert sich in ein Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom	115
4.2.3	Sepsis-relevante Zytokine der Pro- und Antiinflammation können den vermehrten Gewebsschaden in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren nicht erklären.	117
4.2.4	IFN γ und IL-17A sind an der verstärkten Gewebsdestruktion der Knock-Out-Tiere nicht ursächlich beteiligt.....	118
4.3	Die erhöhte Bakterienlast als möglicher Grund für die stärkere Gewebsdestruktion in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren	120
4.4	Verminderte bakterielle Eradikation trotz uneingeschränkter angeborener Immunabwehr am Infektionsort	122
4.4.1	Vergleichbare Anzahl und Aktivität neutrophiler Granulozyten am Infektionsort	122
4.4.2	Peritoneale Makrophagen weisen reduzierte PD-L1 und MHC-I Expressions-Level, aber uneingeschränkte Effektorfunktionen auf.....	124
4.5	Begünstigung der Infektion durch eine systemisch eingeschränkte lymphozytäre Immunantwort.....	126
4.6	Mögliche zell- und pathogenspezifische Funktionalität des I-Proteasoms	130
4.7	Beeinflussung der Transkription durch das I-Proteasom	131
4.8	MECL-1 als protektive I-Proteasom-Untereinheit in der <i>E. coli</i>-Peritonitis..	134
4.9	Medizinische Relevanz des Projektes.....	135
5	Zusammenfassung	137
6	Summary	138
7	Referenzen	139
8	Anhang.....	159
8.1	Publikationen	159
8.2	Danksagung	160
8.3	Selbständigkeitserklärung	161

Abkürzungen

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i> , Ammonium-Chlorid-Kalium
AKI	<i>Acute kidney injury</i> , akute Nierenschädigung
ALI	<i>Acute lung injury</i> , akute Lungenschädigung
ALIS	<i>Aggresome-like structures</i> , Aggresome-ähnliche Strukturen
APC	Allophycocyanin
APCs	<i>Antigen presenting cells</i> , Antigen präsentierende Zellen
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i> , akutes Atemnotsyndrom
ATP	Adenosintriphosphat
Axl	<i>Receptor tyrosine kinase</i> , Rezeptortyrosinkinase
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
Bmf	<i>BCL2 modifying factor</i> , BCL2 modifizierender Faktor
BSA	Bovines Serumalbumin
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i> , Blut-Harnstoff-Stickstoff
C1qa	<i>Complement component 1</i> , Komplementbestandteil 1
CAMs	<i>cell adhesion molecules</i> , Zelladhäsionsmoleküle
CARS	<i>Compensatory Anti-Inflammatory-Response</i> , Kompensatorische antiinflammatorische Antwort
CCL2, MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i> , Monozytenchemotaktisches Protein 1
CCL4, MIP-1 β	<i>Macrophage inflammatory protein 1β</i> , Makrophagen-inflammatorisches Protein 1 β
CCL5, RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted</i> , CC-Chemokin Ligand 5
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Chil1	<i>Chitinase-like 1</i> , Chitinase-ähnliches Protein 1
CLP	<i>Cecal Ligation and Puncture</i> , Caecumligation und Punktion
CO ₂	Kohlendioxid
Crp	<i>C reactive protein</i> , C-reaktives Protein
Ct	<i>Cycle threshold</i> , Zyklusschwellenwert

Cu	Kupfer
CXCL1, GRO α , KC	<i>Growth-regulated alpha protein, Keratinocyte chemoattractant, CXC-Chemokin Ligand 1</i>
CXCL10, IP-10	<i>Interferon γ induced protein 10, Interferon γ induzierendes Protein 10</i>
Cy	Cyanin
DAD	<i>Diffuse alveolar damage, diffuse alveolare Schädigung</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern, Gefahr-assoziierte molekulare Muster</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>Dendritic cell, dendritische Zelle</i>
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid, Desoxyribonukleinsäure</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRiPs	<i>Defective ribosomal products, fehlerhafte ribosomale Produkte</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacid, Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung</i>
Fcna	Ficolin A
FCS	<i>Fetal calf serum, fetales Kälberserum</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FZB	Forschungszentrum Beutenberg
FZL	Forschungszentrum Lobeda
gDNA	Genomische DNA

G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GO	Gene Ontology Datenbank
GOT, AST	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Aspartat-Aminotransferase
Gpam	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferase</i> , Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase
HBSM	<i>HEPES-buffered saline magnesium</i> , gepufferte HEPES-Salzlösung mit Magnesium
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HlyA	Haemolysin A
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i> , High-Mobility-Group-Protein B1
Hspa1b	<i>Heat shock protein 1B</i> , Hitzeschockprotein 1B
HSPs	Hitzeschock-Proteine
IBCs	<i>Intracellular bacterial communities</i> , Intrazelluläre bakterielle Gemeinschaften
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i> , Chronisch entzündliche Darmerkrankung
I.E.	Internationale Einheit
IFN γ	Interferon gamma
IKK	I κ B-Kinasen
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i> , angeborene lymphoide Zelle
IL-RA	Interleukin-1-Rezeptoragonist
iNOS	<i>Inducible Nitric oxide synthase</i> , induzierbare Stickoxid-Synthase
i.p.	Intraperitoneal
I κ B	Inhibitor von NF κ B
KBE	Koloniebildende Einheit
Kegg	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KGW	Körpergewicht

K.O.	Knock-Out
Krea	Kreatinin
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LMP2	<i>Low-molecular-mass polypeptide 2</i>
LMP7	<i>Low-molecular-mass polypeptide 7</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeats</i> , Leucin-reiche Wiederholungssequenzen
Ly6	<i>Lymphocyte Antigen 6</i> , Lymphozytenantigen 6
Mbl2	<i>Mannose binding lectin 2</i> , Mannose bindendes Lektin 2
MECL-1	<i>Multicatalytic endopeptidase complex subunit</i>
MFI	<i>Median Fluorescence Intensities</i> , mediane Fluoreszenzintensitäten
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
mHPRT	Murine Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
MODS	Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NKs	Natürliche Killerzellen
NMEC	Neonatal-Meningitis-auslösender <i>E. coli</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> , Stickoxid-Synthase
OAc ⁺	O-acetylierte K1- Kapsel
OD	Optische Dichte
PA28	Proteasome Aktivator 28

PAF	<i>Platelet activating factor</i> , Plättchenaktivierungsfaktor
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	<i>Peritoneal contamination and infection</i> , Peritoneale Kontamination und Infektion
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell-death protein 1</i> , programmierter Zelltod Protein 1
PD-L1	<i>Programmed cell-death ligand 1</i> , programmierter Zelltod Ligand 1
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin-Chlorophyll
PF	Peritonealflüssigkeit
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
PMN	Polymorphnukleäre Neutrophile
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMP	<i>Proteasome maturation protein</i> , Proteasom-Maturierungsprotein
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
Ptx3	Pentraxin 3
qRT-PCR	Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RPL13a	<i>Ribosomal Protein L 13a</i> , ribosomales Protein L 13a
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktion
sat	<i>secreted autotransporter toxin</i>
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat

SEK	Serviceeinheit Kleinnager
SEM	<i>Standard error of mean</i> , Standardfehler
SEPEC	Sepsis-assoziiertes <i>E. coli</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> , kleine eingreifende RNA
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
SOPF	<i>Specific and opportunistic pathogen-free</i>
TAE	TRIS-Azetat-EDTA
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i> , Antigentransporter
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , trisgepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zell Rezeptor
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i> , transformierender Wachstumsfaktor- β
Th	T-Helfer-Zelle
TIR	Toll-Interleukin-1 Rezeptordomäne
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> , Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Salzsäure
TX-100	Triton X-100
UPEC	Uropathogener <i>E. coli</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
wt	Wildtyp

Abbildungen

Abbildung 1: Konstitutives 20S Proteasom und 20S I-Proteasom mit PA28-Komplex.....	14
Abbildung 2: Regulation von LMP7, MECL-1, PA28 α und PA28 β in der Leber.....	65
Abbildung 3: Regulation von LMP2 in Leber und Lunge	66
Abbildung 4: Regulation des konstitutiven Proteasoms in Knock-Out-Mäusen	67
Abbildung 5: <i>E. coli</i> -Infektion von Wildtyp- und LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -/- Mäusen	68
Abbildung 6: Leukozyten im peripheren Blut.....	69
Abbildung 7: Blutchemie	71
Abbildung 8: Histopathologie der Leber.....	72
Abbildung 9: Histopathologie der Lunge.....	73
Abbildung 10: Histopathologie der Niere	74
Abbildung 11: Histopathologie der Milz	75
Abbildung 12: Histopathologie des Thymus.....	76
Abbildung 13: Histopathologie mediastinaler Lymphknoten	77
Abbildung 14: Plasmalevel ausgewählter Zytokine und Chemokine	79
Abbildung 15: Zytokin- und Chemokin-Expression in Blutleukozyten	81
Abbildung 16: Zytokin- und Chemokin-Expression in Leber und Milz.....	83
Abbildung 17: Bakterienlast in Peritonealflüssigkeit, Blut und Leber	84
Abbildung 18: <i>E. coli</i> im Leber- und Lungenparenchym	86
Abbildung 19: Gesamtzahl peritonealer Leukozyten.....	88
Abbildung 20: Anteil toter Zellen in peritonealer Spülflüssigkeit.....	89
Abbildung 21: Anteil der Monozyten und Neutrophilen in peritonealer Spülflüssigkeit	91
Abbildung 22: Anteil der Makrophagen und Eosinophilen in peritonealer Spülflüssigkeit	92
Abbildung 23: Expression von PD-L1, CD86 und MHC-I auf peritonealen Makrophagen....	94
Abbildung 24: Phagozytose und intrazelluläres Abtöten muriner Peritonealmakrophagen	96
Abbildung 25: Ausgewählte Zytokine und Chemokine in der peritonealen Spülflüssigkeit...	98

Abbildung 26: NO in Peritonealflüssigkeit.....	99
Abbildung 27: Anteil toter, aus der Milz isolierter Zellen.....	100
Abbildung 28: Anteil der CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen und deren MHC-I-Expression.....	101
Abbildung 29: Anteil der B-Zellen und deren MHC-I- und -II Expression.....	103
Abbildung 30: IκBα in Lebergewebe.....	104
Abbildung 31: Genexpression im Lebergewebe	106
Abbildung 32: Expression ausgewählter Gene in der Leber.....	107
Abbildung 33: Letalität Einzel-K.– O.	109

Tabellen

Tabelle 2-1: Kultur von <i>Escherichia coli</i>	18
Tabelle 2-2: Kultivierung und Stimulation peritonealer Makrophagen	19
Tabelle 2-3: Haltung der Versuchstiere	20
Tabelle 2-4: Narkose und Blutentnahme.....	20
Tabelle 2-5: Paraffinschnittherstellung und HE-Färbung	21
Tabelle 2-6: Färbung zytologischer Präparate	22
Tabelle 2-7: Phagozytoseassay.....	22
Tabelle 2-8: Verbrauchssubstanzen der FACS-Messung.....	23
Tabelle 2-9: FACS-Antikörper.....	23
Tabelle 2-10: FACS-Antikörper-Isotypen	24
Tabelle 2-11: RNA-Extraktion aus Zelllysaten und Organhomogenaten	25
Tabelle 2-12: RNA-Extraktion aus schwer aufschließbaren Geweben.....	25
Tabelle 2-13: RNA-Extraktion aus Mausvollblut	26
Tabelle 2-14: Gewinnung muriner DNA	26
Tabelle 2-15: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	27
Tabelle 2-16: Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	27
Tabelle 2-17: Murine PCR-Primer	28
Tabelle 2-18: Semiquantitative-Polymerase-Kettenreaktion	28
Tabelle 2-19: Primer für die Genotypisierung	29
Tabelle 2-20: Next-Generation-Sequencing-Kits.....	29
Tabelle 2-21: Proteinbestimmung	30
Tabelle 2-22: Western Blot	30
Tabelle 2-23: Western Blot-Antikörper	31
Tabelle 2-24: Multiplex-Immunoassay – 14-Plex Kit.....	32
Tabelle 2-25: Griess Reaktion.....	33

Tabelle 2-26: Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 2-27: Geräte	36
Tabelle 2-28: Monitoringprotokoll	46
Tabelle 2-29: HE-Färbeprotokoll	50
Tabelle 2-30: FISH-Sonden	51
Tabelle 2-31: PCR-Programme der Genotypisierung	58
Tabelle 2-32: Probenmengen der Organhomogenate	60
Tabelle 3-1: Proteinfunktion ausgewählter differenziell exprimierter Gene	108

1 Einleitung

1.1 Ziel der Studie

Die Sepsis und der septische Schock stellen die weltweit häufigste Komplikation auf Intensivstationen dar und sind mit einer Mortalitätsrate von bis zu 40 % und steigender Inzidenz ein in der öffentlichen Meinung weit unterschätztes Krankheitsbild. Nach Jahrzehnten intensiver Forschung zur Pathogenese und exakter molekularer Grundlage der Sepsis konnte bisher kein vielversprechender klinisch relevanter Therapieansatz, neben einer allgemeinen Behandlung mit Flüssigkeit- und Sauerstoffsubstitution, sowie einer antibiotischen Therapie, gefunden werden. Aktualität erhält die Sepsisforschung durch die 2016 formulierte Neufassung der Sepsisdefinition, sowie neue Empfehlungen für klinische Richtlinien durch eine internationale *Sepsis task force*. Diese nach 2001 novellierte Charakterisierung der Sepsis zeigt das Problem, das komplexe Syndrom für gezielte Forschungsansätze zu konkretisieren. Studien, welche molekulare Mechanismen der immunologischen Dysregulation während einer Sepsis offenlegen, sind demnach in der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung von hohem Interesse. Hierbei wird vielfach auf murine Infektionsmodelle zurückgegriffen, welche im Gegensatz zu *in vitro*-Zellmodellen ein weitaus komplexeres, wenn auch nicht direkt in das humane System überführbares Bild der immunologischen Reaktion während einer Sepsis darstellen. Die dabei verwendeten Pathogene sind in ihrer Diversität ein Abbild der Vielfalt natürlicher Sepsiserreger, wobei Endotoxinmodelle und Gram-negative Erreger in der Forschung dominieren. Der extraintestinal pathogene *Escherichia coli* (*E. coli*) mit dem Serotyp O18:K1:H7 stellt den Modellerreger dieser Arbeit dar. Zahlreiche Studien weisen *E. coli*, neben Gram-positiven *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* als häufigsten Sepsiserreger aus. Um tiefere Einblicke in die Rolle immunmodulatorischer Prozesse während dieses systemischen Krankheitsbildes zu gewinnen, fokussiert sich die Studie auf die Rolle des Immunoproteasoms (I-Proteasom) während der Gram-negativen *E. coli*-Sepsis in einem Mausmodell. Das in allen eukaryotischen Zellen exprimierte Proteasom ist der wichtigste proteolytische Enzymkomplex des nicht lysosomalen Proteinabbaus. Dieser für die Erhaltung der Proteinhomöostase und somit für das Überleben der Zelle essentielle Komplex erfährt, durch Interferon- γ und Lipopolysaccharid induziert, während der de novo-Synthese eine Kompositionsänderung durch den Einbau verstärkt proteolytisch aktiver Untereinheiten. Dieser neue Proteasomaufbau, die Immununtereinheiten *Low molecular mass protein 2* (LMP2), *Multicatalytic Endopeptidase Complex-1* MECL-1 und *Low Molecular Mass protein 7* (LMP7) umfassend, wird als Immunoproteasom bezeichnet. Neben einer verbesserten Antigenpräsentation und dem Abbau oxidiertes und fehlgefalteter, sowie regulatorischer Proteine soll diese Studie der Darstellung weiterer immunmodulatorischer Eigenschaften des Immunoproteasoms im Verlauf der Gram-negativen Sepsis offenlegen.

1.2 Fragestellung

In der hier zusammengefassten Studie sollen folgende Fragen adressiert werden:

1. Sind I-Proteasom-defiziente Mäuse empfänglicher für die Entwicklung einer Sepsis aus einer *Escherichia coli* induzierten Peritonitis?
2. Bestehen im Verlauf der *Escherichia coli*-Sepsis zwischen I-Proteasom-Knock-Out- und Wildtyp-Tieren Unterschiede in der Pathologie und dem Schweregrad der Erkrankung?
3. Welche immunologischen Modulationen, die Pathogenese der Sepsis mitbestimmend, werden von dem I-Proteasom beeinflusst?
4. Wäre die selektive Blockade des I-Proteasoms oder einer spezifischen Immununtereinheit ein mögliches pharmakologisches Ziel während der Behandlung der Gram-negativen *Escherichia coli*-Sepsis?

1.3 Sepsis

1.3.1 Sepsisdefinition und Epidemiologie

In einer aktuellen Veröffentlichung der *Sepsis task force*, bestehend aus 19 Mitgliedern entsprechender Expertise, wurde mit Hilfe epidemiologischer und pathophysiologischer Erkenntnisse eine neue Definition und klinische Kriterien einer Sepsis auf den Weg gebracht (Singer et al. 2016). Eine Empfehlung dieser Ausarbeitung ist die Redundanz des Begriffes der schweren Sepsis. Nunmehr sollte die Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion, verursacht durch eine dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion, definiert werden. Weiterhin postulieren die Autoren, dass der septische Schock ein der Sepsis unterliegendes Ereignis ist, welches besonders schweren zirkulatorischen, zellulären und metabolischen Abnormalitäten unterliegt und eine bis zu 40%ige In-Hospital-Mortalität aufweist (Singer et al. 2016). Von einer klassischen Infektion wird die Sepsis durch eine ungewöhnliche oder dysregulierte Immunantwort mit Beteiligung von Organschädigungen unterschieden. Der klinischen Beurteilung und Graduierung der Organdysfunktion während einer Sepsis dient der *SOFA-score* (*SOFA = Sequential Organ Failure Assessment*) (Singer et al. 2016). Je höher der *SOFA-score*, welcher ausgewählte Parameter wie unter anderem Blutdruck, Sauerstoffpartialdruck, Kreatinin- und Bilirubinlevel und Thrombozytenzahl eines Patienten beschreibt, desto höher die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung zu erliegen (Vincent et al. 1998). Verkompliziert wird die Charakterisierung der Sepsis durch ihr mannigfaltiges Erscheinungsbild und deren Ausprägung. Bestimmt wird dies durch Faktoren des beteiligten Erregers und dessen Infektionsortes, Faktoren des Wirtes wie Alter und Geschlecht, aber auch Vorerkrankungen, das Muster der Organdysfunktion und genetische Faktoren des Patienten spielen eine Rolle (Angus & van der Poll 2013, Singer et al. 2016). Die Autoren der *Sepsis task force* beschreiben die Inzidenz dieser Erkrankung zwar durch methodische Abweichungen als unbekannte Größe (Singer et al. 2016), doch durch eine akkuratere Diagnostik, das steigende Alter der Patienten und einer erhöhten Komorbidität wird die Inzidenz der Sepsis insgesamt als steigend betrachtet (Gaieski et al. 2013). Die Sepsis gilt weltweit als der Hauptverursacher von Komplikationen auf Intensivstationen, welche zu erhöhter Mortalität und lebensbedrohlicher Erkrankung führen (Fleischmann et al. 2016, Vincent et al. 2014). In Deutschland ergab die Studie von Engel *et al.* eine Prävalenz von 12,4 % für Sepsis und 11,0 % für die hier noch unterschiedene schwere Sepsis bei intensivstationär-pflichtigen Patienten (Engel et al. 2007). 2009 wurde die Sepsis an dritter Stelle der tödlich verlaufenden Erkrankungen, neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen und malignen Neoplasien, in den Vereinigten Staaten eingeordnet (Kochanek et al. 2011). Obgleich die einst divers publizierte In-Hospital-Mortalität von 25 % bis 80 % als sinkend bezeichnet werden kann (Angus & Wax 2001) und von der *Sepsis task force* mit 10 % angegeben wird (Singer et al. 2016), manifestiert sich die Erkrankung auch in Sepsis-Überlebenden als gesundheitliches Problem, da diese zumeist mit kognitiven und funktionellen Einschränkungen leben müssen (Iwashyna et al. 2010). In einer aktuellen epidemiologischen Studie mit Werten aus sechs europäischen Ländern wurde eine übergeordnete Mortalität von 29 % beschrieben, wobei vorwiegend Gram-negative *Escherichia coli* (*E. coli*) und an zweiter Stelle der Gram-positive *Staphylococcus aureus* als verursachende Erreger mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Blutkultur detektiert wurden (Vincent et al. 2015). Neben diesen Erregern beschreibt Opal *et al.* außerdem

Klebsiella Spezies, *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pneumoniae* als Hauptverursacher einer Sepsis (Opal et al. 2003). Durch eine frühe Diagnosestellung und die Ermittlung des ursächlichen Erregers können Patienten mit einer adäquaten antibiotischen Therapie und Unterstützung des Flüssigkeitshaushaltes zwar behandelt werden, jedoch spielen Komorbiditäten, das Muster der Organdysfunktion sowie die wirtseigene Immunreaktion eine wichtige Rolle in der Pathogenität und Individualität der Sepsis (Angus & van der Poll 2013, D. G. Remick 2007). Die genaue Klärung der Pathophysiologie der Sepsis und der ihr zugrunde liegenden Immunantwort sind somit unerlässlich für die erfolgreiche und spezifische Behandlung (Deutschman & Tracey 2014) dieser weltweit mit hoher Mortalität assoziierten und im öffentlichen Bewusstsein oft unterschätzten Erkrankung (Rubulotta et al. 2009).

1.3.2 Allgemeine Pathophysiologie der Sepsis

Da sich die Sepsis aufgrund der bereits beschriebenen Vielfältigkeit als ein sehr komplexes und schwer zu definierendes Krankheitsbild darstellt, kann sie vielmehr als ein Syndrom betrachtet werden (Vincent et al. 2013). Schlüssel für eine stark ausgeprägte Pathologie, welche durch beteiligte Organschädigungen in einem Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom (MODS) gipfeln kann, ist in der Sepsis die Immunreaktion auf ein eindringendes Pathogen (Semeraro et al. 2012). Durch die hämatogene Streuung des Erregers kommt es zu einer schnell fortschreitenden generalisierten Immunantwort, welche der Grund für die vielfältige Beteiligung diverser Organsysteme ist. Angus *et al.* stellt in einer umfangreichen Studie die statistische Verteilung der betroffenen Organsysteme während der Sepsis dar. So sind in 45,8 % der Fälle das respiratorische und in 24,4 % das kardiovaskuläre System betroffen. Bei 20,6 % der Sepsispatienten wurde eine Beteiligung der Niere und bei 9,3 % eine Beeinflussung des zentralnervösen Systems ermittelt. Auch der Diversität des Infektionsortes, wenn auch oft unbekannt, wird in dieser Studie Beachtung geschenkt. Eine respiratorische Infektion macht in den untersuchten Fällen 44 % aus und die abdominale Infektion ist in 8,6 % der Fälle als Sepsisauslöser klassifiziert (Angus et al. 2001). Neben der Streuung des Erregers in verschiedene Organsysteme und die dortige Immunreaktion spielt die generalisierte Immunantwort in der Pathologie der Sepsis die größte Rolle (Seeley et al. 2012). Eine komplexe und noch nicht voll entschlüsselte immunologische Dysorchestration proinflammatorischer wie auch antiinflammatorischer Immunreaktionen ist entscheidend für die Entwicklung einer Sepsis. Hierbei führen die Aktivierung des Komplementsystems und der zellulären Abwehr sowie Veränderungen im endothelialen und vaskulären System und eine Koagulopathie zu Gewebsschädigungen, die durch ein Organversagen letztlich zum Tod führen können (D. G. Remick 2007).

1.3.3 Immunantwort in der Sepsis

1.3.3.1 Die Pathogenerkennung und Initiierung der Immunantwort

Auslöser der Immunreaktion in der Sepsis ist die Erkennung körperfremder mikrobieller Strukturen wie LPS als Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, bakterielles Flagellin, Lipoteichonsäure Gram-positiver Bakterien aber auch Nukleinsäuren von Viren. Weiterhin stimulieren „Warnsignale“ (*Danger Signals*), auch als *Alarmine* bezeichnete Verbindungen einer Zell- oder Gewebsschädigung wie unter anderem *High mobility group box 1* (HMGB1), Hitzeschock-Proteine (HSPs = *Heat shock proteins*) und Interleukin-1 α eine Immunreaktion. Generell werden sogenannte extrazelluläre Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs = *Pathogen-associated molecular patterns*) und endogene *Alarmine* zu *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) zusammengefasst (Bianchi 2007). Deren Bindung an Mustererkennungsrezeptoren (PRRs = *pattern recognition receptors*) induziert Signalkaskaden, welche letztendlich zu der Induktion einer Immunantwort auf die erkannten DAMPs führt. Klassische Folgen einer PRR-Aktivierung neben der Induktion proinflammatorischer Signaltransduktionswege sind die Opsonisierung des Pathogens und das Aktivieren des Komplementsystems, der Gerinnungskaskade sowie der Phagozytose (Medzhitov 2001). Zu den bekanntesten PRRs zählen, neben den NOD-Rezeptor ähnlichen Proteinen (Fritz et al. 2006) und den C-Typ Lektinen (Robinson et al. 2006), die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), welche auf die Erkennung und Bindung exogener PAMPs spezialisiert sind (Bianchi 2007). Durch leucinreiche Wiederholungssequenzen (LRR) im extrazytoplasmatischen Anteil der TLRs erhalten die unterschiedlichen TLR-Typen ihre Rezeptorspezifität (F. L. Rock et al. 1998). Nach Bindung des Agonisten wird über die zytoplasmatisch lokalisierte TIR-Domäne (Toll-Interleukin-1-Rezeptordomäne) mittels Bindung eines Adapterproteins der Signaltransduktionsweg in der Zelle aktiviert, welcher eine Effektorreaktion zur Folge hat (O'Neill & Bowie 2007). Diese besteht zumeist in der Beeinflussung der Transkription und letztlich in der Ausschüttung immunmodulatorischer Mediatoren und der Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunantwort, wie Makrophagen und Granulozyten, was zu einer schnellen Eradikation des Pathogens oder der Zerstörung der infizierten Zelle führen soll (Kuipers et al. 2011). Für diese Arbeit stellt sich TLR4 als besonders relevant dar da er, mit dem CD14-Molekül assoziiert Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien bindet (Haziot et al. 1996). Die Erkennung von PAMPs durch patrouillierende antigenpräsentierende Zellen (APCs = *Antigen presenting cells*) hat eine Aktivierung dieser sekretorisch potenten Zellen zur Folge, welche eine lokale wie auch systemische Immunreaktion hervorrufen. Weiterhin sind APCs nach der Erkennung der DAMPs befähigt, intrazelluläre und auch exogene Verbindungen zu Peptiden zu spalten und diese mit Hilfe der MHC-I und -II Moleküle auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Dieser Vorgang verbindet die angeborene Immunantwort mit der erworbenen, adaptiven Immunreaktion. Durch die Antigenpräsentation und die Expressionssteigerung kostimulierender Moleküle wird über die Bindung an T-Zell-Rezeptoren eine lymphozytäre Immunreaktion initiiert (Gordon 2002).

Antigenpräsentation

Kernhaltige Zellen höherer Organismen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche sogenannte Hauptgewebeverträglichkeitskomplexe (MHC = *major histocompatibility complex*) der Klasse I (Pamer & Cresswell 1998). Durch die MHC-I Moleküle erfolgt eine kontinuierliche Präsentation intrazellulärer Proteinfragmente, welche hauptsächlich aus degradierten Proteinen und sogenannten DRiPs (*defective ribosomal products*) bestehen und vom Ubiquitin-Proteasom-System prozessiert werden (Goldberg et al. 2002). Mit Hilfe der TAP-Transporter (Abele & Tampe 2004) werden die produzierten Peptide zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) überführt, dort an MHC-I-Heterodimere gebunden und an die Zelloberfläche transportiert (Pamer & Cresswell 1998). Die Präsentation intrazellulärer Peptide ermöglicht im Folgenden eine Erkennung abnormaler und zellfremder Peptide wie bei einer intrazellulär infizierten Zelle durch zytotoxische T-Lymphozyten (CD8⁺T-Zellen) und ermöglicht somit die selektive Zerstörung der betroffenen Zellen (N. Zhang & Bevan 2011). Neben der Präsentation intrazellulärer Peptide sind professionelle Antigen präsentierende Zellen, allen voran dendritische Zellen (DCs), aber auch Monozyten, aktivierte Makrophagen und B-Lymphozyten befähigt, exogene Antigene durch MHC-II-Moleküle auf der Zelloberfläche zu präsentieren (Kaufmann & Schaible 2005). Die Produktion dieser Antigene erfolgt über den endo-/lysosomalen Abbau der von der Zelle aufgenommenen exogenen Bestandteile (Bryant & Ploegh 2004). Die synthetisierten MHC-II-Moleküle sind im ER durch die invariante Kette für die Bindung mit Peptiden des zytosolischen Proteinabbaus blockiert. Erst nach Freiwerden der Bindungsstelle und dem Transport der MHC-II-Moleküle zu endo-/lysosomalen Zellkompartimenten werden sie mit den entsprechenden exogenen Peptiden beladen (Amigorena et al. 1995). Durch die Fähigkeit exogene Antigene zu präsentieren wird die MHC-II-Antigenpräsentation mit der Immunreaktion auf extrazelluläre Infektionen, meist durch Bakterien verursacht, in Verbindung gebracht. Über eine T-Zell-Rezeptor-vermittelte Bindung an MHC-II-Epitope sowie kostimulatorische Oberflächenmoleküle der APCs werden T-Helferzellen (CD4⁺T-Zellen) aktiviert (Rudolph et al. 2006). Diese differenzieren in unterschiedliche T-Helferzell-Unterformen, wie IFN γ produzierende Th1-, IL-4- und IL-10-sezernierende Th2-, IL-17-produzierende Th17- und regulatorische T-Zellen. Je nach T-Helferzell-Typ stimulieren aktivierte CD4⁺T-Zellen dendritische Zellen und B-Zellen und beeinflussen somit die zelluläre wie auch die humorale Immunantwort (L. Zhou et al. 2009). Eine zusätzliche Präsentation bakterieller, exogener Bestandteile über den MHC-I-Weg und dessen Aktivierung der zytotoxischen T-Zell-Antwort wird als *Cross presentation* bezeichnet. Der genaue Mechanismus hinter diesem Prozess konnte indes noch nicht ausreichend geklärt werden (Groothuis & Neefjes 2005). Neben Thesen wie dem MHC-I-Recycling (Gromme et al. 1999) und dem Transport der Proteine von einer infizierten Zelle in eine uninfizierte über gap-junctions (Neijssen et al. 2005) wird angenommen, dass das ER als Quelle der Phagosommembran dienen kann (Desjardins 2003, Gagnon et al. 2002) und somit die MHC-I-Prozessierungs-Maschinerie in Verbindung mit phagozytierten Partikeln bringt (Guermontprez et al. 2003, Houde et al. 2003).

1.3.3.2 Proinflammatorische Prozesse

Als Hauptverursacher der Pathogenität in der Sepsis wurde über viele Jahre die Entwicklung einer exzessiven proinflammatorischen Immunantwort gesehen. Heute ist jedoch bekannt, dass ein komplexes Zusammenspiel zwischen Pro- und Antiinflammation, das aktivierte Komplementsystem, metabolische Dysregulationen und eine Koagulopathie, inklusive endothelialer und vaskulärer Störungen der Pathogenese einer Sepsis zu Grunde liegen (D. G. Remick 2007). Dennoch wird der rapiden proinflammatorischen Reaktion auf eine enorme Menge zirkulierender DAMPs, bestehend aus Strukturen des Pathogens sowie Alarminen, welche massiv aus einer Zellschädigung hervorgehen, eine große Rolle zugeschrieben (Kuipers et al. 2011). Neben der raschen Aktivierung der Gerinnungskaskade und des Komplementsystems bewirkt die Bindung der DAMPs an PRRs die Aktivierung von Signalwegen hin zu proinflammatorischen Effektorreaktionen, bei denen die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 α und β (IL-1 α , IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) im Mittelpunkt stehen (Chaudhry et al. 2013, Xiao et al. 2015). Neben einer zytokin- und pathogenerkennung vermittelten Differenzierung und Aktivierung der Immunzellen durch Zytokine werden diese durch ausgeschüttete Mediatoren in hohem Maße an den Ort der Entzündung rekrutiert. In der Liste der chemotaktisch wirkenden Mediatoren sind CXCL1 (GRO α = *Growth-regulated alpha protein*; KC = *Keratinocyte chemoattractant*), ein an den Interleukin-8-Rezeptor bindendes Chemokin (Jin et al. 2014), CCL5 (RANTES = *Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted*) und das Monozyten-chemotaktische Protein (MCP-1) (Conti & DiGiacchino 2001) sowie Interleukin-17 (IL-17), vorwiegend von Th-17-Lymphozyten produziert (Reynolds et al. 2010), neben einer Vielzahl weiterer Mediatoren hervorzuheben. Bei einer systemischen Immunantwort auf zirkulierende DAMPs kommt es durch Zytokine und Chemokine zu einem massiven chemotaktischen Rekrutieren von vorwiegend neutrophilen Granulozyten (Bhatia et al. 2005). Diese für die Pathogeneradikation während einer adäquaten Immunantwort verantwortlichen angeborenen Immunzellen sind ebenso als Vermittler einer massiven Gewebsdestruktion in der Sepsis bekannt (Brown et al. 2006).

NF- κ B-Signalweg

Einer der wichtigsten Signalwege von der Pathogenerkennung durch TLRs bis zu der Aktivierung eines entzündlichen proinflammatorischen Status der Zellen ist der *nuclear factor- κ B-pathway* (NF- κ B-Signalweg) (Bianchi 2007). Nicht nur PAMPs, sondern eine Vielzahl unterschiedlicher exogener, endogener, aber auch physikalischer und chemischer Stressoren können die NF- κ B-Signalkaskade aktivieren (Pahl 1999), wobei der klassische (kanonische) Weg durch eine Vielzahl von aktivierten Rezeptoren und der alternative (nicht-kanonische) Weg vorwiegend durch Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie (TNFR) in Gang gesetzt wird (Hoffmann et al. 2006). Durch ein Set an negativen und positiven regulatorischen Elementen beeinflusst der NF- κ B-Weg nicht nur immunologische Vorgänge sondern durch das breite Feld an Zielgenen ebenfalls die Zelldifferenzierung, Proliferation und das Überleben der Zelle (Hayden & Ghosh 2008). Durch Aktivieren der I κ B-Kinasen (IKK) wird eine Phosphorylierung mit anschließender Ubiquitinierung und Degradierung der inhibierenden Proteine durch das UPS in Gang gesetzt. I κ B-Proteine, allen voran I κ B α , binden die NF- κ B-Heterodimere, zu denen die NF- κ B-Mitglieder p50, p52, p65 (RelA), c-Rel und RelB gehören,

und halten die als Transkriptionsfaktoren aktiven NF- κ B-Mitglieder im Zytoplasma (Z. Chen et al. 1995, Gilmore 2006). Der klassische Signalweg beruht vorrangig auf einer Abspaltung von I κ B α von NF- κ B (Hayden & Ghosh 2008, Scheidereit 2006), wobei im alternativen Signalweg mehrheitlich das Prozessieren des NF- κ B-Vorläuferproteins p100 zum aktiven p52 zu einer Freisetzung und Translokation der NF- κ B-Heterodimere in den Nukleus führt (Senftleben et al. 2001). Im Zellkern angekommen binden NF- κ B-Heterodimere an κ B-Seiten der spezifischen DNA-Sequenzen von Zielgenen und regulieren deren Transkription zusätzlich mit aktivierenden oder repressiven Komplexen (Hayden & Ghosh 2008, Hoffmann et al. 2006). Die Abschaltung des proinflammatorischen Signaltransduktionsweges ist bisher noch nicht im Detail geklärt. Klar ist jedoch, dass eine gesteuerte Abschaltung des Weges vor einer inadäquaten und übersteuerten Immunantwort schützen soll. Vermutet werden Ereignisse im Verlauf des Signalweges, welche durch externe Trigger und Moleküle, wie das A20 Protein, den Weg drosseln (E. G. Lee et al. 2000). Eine parallel vermehrte Expression inhibierender Moleküle wie den I κ Bs sorgt zusätzlich für ein potentes negatives *feedback* (Hoffmann et al. 2002). Bringt man einen verlängert aktiven NF- κ B-Weg mit der Pathogenese der Sepsis in Verbindung, lässt sich die Ausschüttung von Mediatoren (H. Wang & Ma 2008) und ein verlängertes Überleben von Neutrophilen (Taneja et al. 2004) sowie das massive Rekrutieren von gewebsschädigenden Entzündungszellen als Zeichen einer exzessiven Proinflammation, die vormals als wichtigste immunologische Dysfunktion in der Sepsis gehandelt wurde (D. G. Remick 2007), erklären.

1.3.3.3 Antiinflammatorische Prozesse

Entsprechend der Tatsache, dass die Inhibition der exzessiven Proinflammation in klinischen Studien des Menschen keine Therapieerfolge erzielte, rückte die These, dass weitreichendere immunologische Mechanismen in der Pathogenität der Sepsis eine Rolle spielen, in den Vordergrund. Durch die von Freeman und Natanson publizierte Zusammenfassung wird deutlich, dass eine Behandlung mit niedrig dosierten Glukokortikoiden wie auch Mittel gegen Endotoxine, Inhibitoren der *Nitric oxide synthase* (NOS) und der Prostaglandinsynthese, sowie Antikörper gegen TNF- α keine förderliche Wirkung im Kampf gegen die Sepsis haben (B. D. Freeman & Natanson 2000). Der vor zwei Jahrzehnten eingeführte Begriff der *Compensatory Anti-Inflammatory-Response* (CARS) beschreibt eine Immunmodulation parallel zu der Proinflammation in akuten und post-akuten Phasen der Sepsis. Diese ist durch den apoptotischen Verlust von Immunzellen, einem anti-inflammatorisch geprägten Zytokinprofil, einer Einschränkung von Effektoreigenschaften wichtiger Immunzellen und einer verminderten Antigenpräsentation geprägt (Bone 1996). Als Hauptmerkmal der Antiinflammation gilt bis heute ein massiver Verlust von Immunzellen. Bisweilen stellen sich besonders T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NKs) (Hotchkiss et al. 2005) und dendritische Zellen (DCs) anfällig für einen rapiden apoptotischen Zelltod im Zuge der Sepsis dar, was eine Vielzahl von Immunfunktionen des angeborenen wie auch des adaptiven Immunsystems negativ beeinflusst (Hotchkiss et al. 2002). Weiterhin wurden Einschränkungen in Effektoreigenschaften von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten detektiert, welche sich auf die Eradikation von Pathogenen und die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (Kovach & Standiford 2012) sowie auf eine adäquate Migration

auswirken (Cummings et al. 1999). Auch das sekretierte und prozessierte Mediatorenprofil unterliegt einer Veränderung im Zuge der CARS, wobei dies in Makrophagen hauptsächlich auf die vielfach vermehrte Phagozytose apoptotischer Körper, welche sonst als Alarmine zirkulieren würden, zurückzuführen ist. Das Zytokinprofil wechselt in den betroffenen Makrophagen von den proinflammatorischen *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), IL-8, IL-1 und TNF- α zu Mediatoren wie *Transforming growth factor- β* (TGF- β), Prostaglandin E2 und dem *Platelet activating factor* (PAF) (Fadok et al. 1998). Insgesamt konnten erhöhte antiinflammatorisch aktive Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-1-Rezeptoragonist (IL-1RA) sowie der lösliche TNF-Rezeptor (sTNFR), neben erhöhten proinflammatorischen Zytokinen während der akuten Phase in Sepsispatienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert werden (Gogos et al. 2000). Ebenso wirkt sich ein antiinflammatorischer Status in der post-akuten Phase der Sepsis als bedrohlich aus, da Patienten nunmehr äußerst empfänglich für sekundäre, meist während des Klinikaufenthaltes erworbene, nosokomiale Infektionen sind (Otto et al. 2011). Durch die Pathogenität der Antiinflammation in der Sepsis parallel zu einer exzessiven Proinflammation (Ward et al. 2008) wird deutlich, dass die Charakteristika des CARS in der Sepsis nicht einer gesteuerten Kompensation auf die überbordende Immunreaktion auf DAMPs entsprechen, sondern vielmehr Zeichen einer komplexen Störung in der Orchestration immunologischer Prozesse sind.

1.3.3.4 Entwicklung eines Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom

Die Summe der immunologischen, metabolischen, vaskulären und endothelialen Störungen führt während einer Sepsis zu einer massiven Gewebsschädigung und macht schließlich die zu Grunde liegende Pathogenität einer Sepsis aus (D. G. Remick 2007). Das vielfältige Erscheinungsbild einer Sepsis, abhängig vom Erreger, dem Infektionsort und Vorerkrankungen des Patienten, führt zu einem differierenden Muster der beteiligten Organschädigungen (Angus et al. 2001). Dessen ungeachtet manifestiert sich der schwere Krankheitszustand während einer Sepsis in einem Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom (MODS), welches massive Störungen und Einschränkungen in mehreren Organsystemen beschreibt. Das Schlüsselereignis der systemischen Reaktion ist wie beschrieben, die unkontrollierte übermäßige Immunreaktion auf ein infektiöses Geschehen (Semeraro et al. 2012). Hierbei sorgen die proinflammatorischen Proteine, welche nach der Erkennung des Pathogens ausgeschüttet werden für eine Komplementaktivierung. Dieses interagiert mit den Mikroorganismen oder deren Produkten und schürt zusätzlich eine systemische Koagulationsreaktion (Levi et al. 2010). Eine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation in den betroffenen Organen entsteht, wenn es zu einer Dysregulation der Gerinnung kommt, verursacht durch einen starken Anstieg der Prokoagulation, einer Reduktion der Antikoagulation und der Suppression der Fibrinolyse. So entwickelt sich eine disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) mit Fibrinablagerungen, welche in eine Thrombosierung der Gefäße verursacht (Levi 2008, Semeraro et al. 2010). Neben der mikrovaskulären Thrombose führt die Hypotension und reduzierte Verformbarkeit der Erythrozyten zu einer mangelhaften Oxygenierung des Gewebes. Desweiteren sorgen rekrutierte polymorphnukleäre Entzündungszellen durch Ausschüttung von lytischen Enzymen und der Produktion von reaktiven Sauerstoff- und nitrosativen Verbindungen zu direkter

Zellschädigung (Brown et al. 2006). Durch die Störung der Gewebsintegrität werden außerdem nukleare Proteine wie zum Beispiel Histone (Xu et al. 2009) oder HMGB-1 aus den geschädigten Zellen entlassen, welche wiederum als *Alarmine* fungierend zu einer Steigerung der lokalen Entzündungsreaktion (Rouhiainen et al. 2007) führen oder direkt toxisch auf umgebende Zellen wirken (Cinel & Opal 2009). Eine inadäquate Nutzung von Sauerstoff durch mitochondriale Schäden verstärkt die Destruktion des Gewebes weiterhin (Q. Zhang et al. 2010). All diese Faktoren begünstigen eine Schädigung von Zellen und Geweben und schränken somit die metabolischen, zirkulatorischen und immunologischen Funktionen der Organsysteme ein oder führen gar zu einem irreparablen Gewebsschaden, der in einem Organversagen gipfelt und den Tod des Sepsispatienten verursacht.

1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Proteasom, ein Proteinkomplex eukaryotischer Zellen, ist für den nicht lysosomalen Abbau zellulärer Proteine verantwortlich und besitzt die proteolytische Enzymaktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) (K. L. Rock et al. 1994). Nicht nur oxidativ geschädigte oder fehlgefaltete Proteine sind das Substrat des Proteasomkomplexes (Heinemeyer et al. 1991), auch kurzlebige regulatorische Proteine (Feikova et al. 2000, Inoue & Imamura 2008, Palombella et al. 1994) und einige Enzyme (Gross-Mesilaty et al. 1997) werden zu Peptiden gespalten. Die Substraterkennung erfolgt über die Markierung der Proteine mit Ubiquitin durch die Aktivität dreier Enzyme (Komander 2009). Diese induzieren eine Kettenreaktion, in der das Ubiquitin ATP-abhängig von dem Ubiquitin-Aktivierungs-Enzym (E1) angeregt wird und an E2, das Ubiquitin-konjugierende Enzym, transferiert wird (Markson et al. 2009), bis es letztlich durch die substratspezifische E3-Ligase kovalent an das Zielprotein gebunden wird (Ozkan et al. 2005). Über eine Lysin-Bindung an Position 48 (K48-Bindung) des bereits gebundenen Ubiquitins entsteht eine Poly-Ubiquitin-Kette, welche das Substrat für den Abbau im Proteasom markiert (Chau et al. 1989). Auch die Bindung mehrerer einzelner Ubiquitinglieder an ein Zielprotein über verschiedene Lysinreste kann laut Lu *et al.* als Degradierungssignal dienen (Lu et al. 2015). Neben der prominenten K48-Ubiquitinierung wurden auch Mono-Ubiquitinierungen und Bindungen an Cystein-, Threonin- und Serinresten als Abbausignal identifiziert (Kravtsova-Ivantsiv et al. 2013). Das Ubiquitin-Proteasom-System ist in der Zelle für den Erhalt der Proteinhomöostase verantwortlich und kann durch die Spaltung regulatorischer Proteine mannigfaltige Zellprozesse beeinflussen und steuern (Ebstein et al. 2012). Somit ist es an Prozessen wie der Zellzyklusprogression (Hershko et al. 1991), der Genregulation (Collins & Tansey 2006, Rubin et al. 1996), Apoptose (Shirley et al. 2005), Wachstum und der Zelldifferenzierung (Feikova et al. 2000) beteiligt. Zusätzlich werden dem Proteasom immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben, da die prozessierten Peptide zur Antigenpräsentation mittels MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche maßgeblich die T-Zell-Antwort beeinflussen (Niedermann et al. 1995, K. L. Rock et al. 1994).

1.4.1 Proteasom-Subtypen

1.4.1.1 Aufbau des 20S und 26S Proteasoms

Der 20S Kern-Komplex des Proteasoms besteht aus einer zylindrischen Anordnung von vier heptamerischen Ringen (Lowe et al. 1995). Die äußeren Ringe werden durch α -Untereinheiten geformt (siehe Abbildung 1). Während der Synthese des Proteasoms fungieren sie als Gerüst und unterstützen zusammen mit dem *Proteasome maturation protein* (POMP) den koordinierten Aufbau des Proteasomzentrums aus Pro- β -Untereinheiten (Seifert & Kruger 2008, Witt et al. 2000). Später bilden die α -Ringe das Tor in die katalytische Kammer und die Bindungsstelle für regulatorische oder aktivierende Komplexe (M. Groll et al. 2000). Die zwei inneren Ringe, aus β -Untereinheiten bestehend, bilden das katalytische Zentrum des konstitutiven 20S Proteasoms (Unno et al. 2002). Die Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 sind für die charakteristischen Haupt-Enzymaktivitäten des Proteasoms verantwortlich. Hierbei handelt es sich um Caspase-ähnliche (Post-Glutamyl-hydrolysierende Aktivität), Trypsin-ähnliche und Chymotrypsin-ähnliche Enzymaktivitäten (DeMartino & Slaughter 1999), welche die Spaltung der Proteine nach sauren, basischen oder hydrophoben Aminosäureresten katalysieren (Orlowski & Wilk 2000). Der Abbau der Proteine im konstitutiven 20S Proteasom ist gering und wird einem passiven, ATP unabhängigen Mechanismus zugeschrieben (Osmulski et al. 2009). Ungeachtet dessen scheint die Spezifität des 20S Proteasoms vermeintlich in der Degradierung von mehrheitlich oxidierten oder geschädigten Proteinen zu liegen (Pickering et al. 2010). Der Hauptanteil zellulärer Proteine wird jedoch von dem 26S Proteasomkomplex Energie-abhängig abgebaut. Hier binden an die äußeren α -Ringe regulatorische 19S Komplexe, welche aus einer Basis und einem Deckel bestehen (Gallastegui & Groll 2010), wobei die Basis sich mit den α -Ringern verbindet und der Deckel die Poly-Ubiquitin-Proteinsubstrate erkennt und dem katalytischen Zentrum zuführt (Coux et al. 1996, Ebstein et al. 2012, Navon & Goldberg 2001). In einem 26S Proteasom können 19S Komplexe entweder an beiden α -Ringern gebunden sein oder sogenannte asymmetrische 26S Proteasome bilden, welche nur einen 19S Regulator beinhalten (Coux et al. 1996). Da die Bindung an die α -Untereinheiten gekoppelt ist, spielt die Zusammensetzung der β -Untereinheiten keine Rolle für die Bildung des 26S Proteasoms. So können von der Zelle eine Vielzahl unterschiedlicher 26S-Kompositionen zusammengesetzt werden (McCarthy & Weinberg 2015).

1.4.1.2 I-Proteasom und gemischtes Proteasom

Variationen des katalytischen Zentrums des 20S Proteasoms können von den Zellen als Antwort auf Stressoren vorgenommen werden. Während der *de novo* Synthese dieser Proteasome werden einzelne konstitutive β -Untereinheiten durch Untereinheiten des Immunoproteasoms, im Weiteren als I-Proteasom bezeichnet, ersetzt (Aki et al. 1994, Tanaka 1994). Abbildung 1 veranschaulicht den Aufbau des konstitutiven Proteasoms und des 20S I-Proteasoms mit seinen typischen Immununtereinheiten. Das *Low molecular mass protein 2* (LMP2, β 1i) wird im Austausch mit β 1 eingebaut, das Protein *Multicatalytic endopeptidase complex like 1* (MECL-1, β 2i) ersetzt die konstitutive β 2-Untereinheit und das *Low molecular*

mass protein 7 (LMP7, $\beta 5i$) wechselt an die Stelle von $\beta 5$. Diese drei Untereinheiten, welche vorwiegend durch $\text{IFN}\gamma$ induziert werden, bilden das katalytische Zentrum des klassischen 20S I-Proteasoms, welches sich wie zuvor beschrieben ebenfalls mit dem regulatorischen 19S Komplex verbinden kann, um proteolytisch hochaktive 26S I-Proteasome zu bilden (Groettrup et al. 1996, Hisamatsu et al. 1996). Funktionell hat der Einbau dieser Immununtereinheiten eine effektivere proteolytische Spaltung nach hydrophoben und basischen Aminosäureresten zur Folge, kaum verändert stellt sich hingegen die Spaltung nach sauren Aminosäuren dar (Aki et al. 1994, Driscoll et al. 1993, Raule, Cerruti, & Cascio 2014). Die konzentrierte genetische Kodierung von LMP2 und LMP7 zusammen mit den Genen der Antigen-Transporter 1 und 2 (TAP-1 und TAP-2) in der MHC-Region des murinen Chromosoms 17 (Kincaid et al. 2012) gibt Hinweis auf die immunmodulatorische Funktion des I-Proteasoms (Cho et al. 1991). Durch die veränderte Komposition des katalytischen Zentrums und dessen proteolytischen Spaltpräferenzen sind I-Proteasome befähigt, ein modifiziertes Peptidrepertoire für die Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle zu generieren (Gaczynska et al. 1994, Kincaid et al. 2012, Vigneron & Van den Eynde 2012). Eine adäquate Antigenpräsentation kontrolliert die zytotoxische T-Zell-Antwort (Toes et al. 2001) und spielt vor allem in Virusinfektionen eine maßgebliche Rolle bei der Detektion und Zerstörung infizierter Zellen (Ferrington & Gregerson 2012). Neben dem induzierbaren Austausch der konstitutiven Untereinheiten mit Immununtereinheiten wurden vorrangig in Immunzellen und sekundär lymphatischen Organen eine erhöhte Menge I-Proteasome bereits im unstimulierten Zustand detektiert (Ferrington & Gregerson 2012, Frisan et al. 2000, Noda et al. 2000). In Zellen, welche Immununtereinheiten und konstitutive Untereinheiten exprimieren, erfolgt der Einbau einzelner I-Proteasomuntereinheiten, welcher gemischte oder *intermediate* Proteasome charakterisiert, nach gewebs- bzw. zellspezifischen Präferenzen (Hensley et al. 2010) und konnte ohne Stimulation vermehrt in Lebergewebe, dem Dünndarm, Kolon und Niere nachgewiesen werden (Guillaume et al. 2010). Der Einbau einzelner Immununtereinheiten geschieht jedoch nicht willkürlich. So wurde deutlich, dass die Inkorporation von MECL-1 abhängig von LMP2 ist (De et al. 2003, Groettrup et al. 1997). Desweiteren sorgt LMP7 für die funktionelle Ausreifung von LMP2 und MECL-1, durch die Beseitigung der Propeptide, welche die katalytische Aktivität blockieren (Griffin et al. 1998). LMP7 kann somit als einzige Immununtereinheit allein in gemischte Proteasome eingebaut werden (McCarthy & Weinberg 2015) und verdrängt Pro- $\beta 5$ durch die erhöhte Affinität zu POMP (Heink et al. 2005). Bedingt durch die vielfältige Komposition der gemischten Proteasome lassen sich auch Unterschiede in deren proteolytischer Aktivität finden (Dahlmann et al. 2000, Klare et al. 2007).

1.4.1.3 Proteasom-Aktivator 28 und das Hybridproteasom

Neben den induzierbaren Immununtereinheiten LMP2, MECL-1 und LMP7 folgt die Expression des Aktivators PA28 α/β (*IIS regulator*) ebenfalls einer $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation (Jiang & Monaco 1997, Rechsteiner et al. 2000). Die konischen Komplexe des PA28-Regulators können, unabhängig von ATP (C. P. Ma et al. 1992) an beide α -Ringe des konstitutiven 20S Proteasoms oder des 20S I-Proteasoms binden (siehe Abbildung 1) und die Degradierung kurzer Peptid-Substrate verbessern (Dubiel et al. 1992). Die Assoziation von PA28 an ein asymmetrisches 26S Proteasom oder 26S I-Proteasom wird als Hybridproteasom bezeichnet

(Cascio et al. 2002). Strukturell konnten drei in ihrer Primärstruktur nah verwandte Untereinheiten des PA28-Komplexes identifiziert werden. Die α - und β -Untereinheiten lagern sich zu einem heteroheptamerischen Komplex zusammen und sind im Zytoplasma der Zellen zu finden (Tanahashi et al. 1997). Anders verhält sich die strukturell ähnliche Untereinheit γ , welche sich nicht durch $\text{IFN}\gamma$ induzieren lässt und homopolymerische Komplexe im Nukleozytoplasma bildet (Wojcik et al. 1998). Proteasomkomplexen mit assoziiertem PA28 γ konnten bislang keine Immunfunktionen zugesprochen werden, jedoch spielen sie eine Rolle in der Zellproliferation und der Tumorgenese (J. He et al. 2012, L. Li et al. 2013, Murata et al. 1999). Immunologisch relevant scheinen hingegen Hybridproteasome oder 20S-PA28 α/β -Komplexe zu sein, wobei von der These einer beschleunigten und vermehrten Peptidbereitstellung (Schwarz et al. 2000) für die Antigenpräsentation über MHC-I bisweilen abgerückt wird. Zwar hat die Assoziation mit PA28 α/β eine Beeinflussung der Synthese einzelner bestimmter Antigene zur Folge, die generelle Antigenproduktion wird jedoch nicht verbessert (Murata et al. 2001, Yang & Schmidt 2014). Vielmehr produzieren Hybridproteasome anteilig vermehrte Mengen kurzer Peptide (Cascio et al. 2002), kleiner als sechs Aminosäuren (Raule, Cerruti, Benaroudj, et al. 2014), welche sich nicht für die MHC-I-gekoppelte Präsentation eignen (McCarthy & Weinberg 2015). Eine mögliche Schlussfolgerung aus dieser Fähigkeit ist die Rolle des PA28-Regulators in der Vermeidung einer überbordenden zytotoxischen Immunantwort auf Selbst-Antigene (McCarthy & Weinberg 2015). Außerdem kann durch die Fähigkeit, vermehrt oxidativ geschädigte Proteine zu spalten (Pickering & Davies 2012), mit einer deutlichen Aktivitätssteigerung in Kombination mit dem 20S I-Proteasom in ATP-Mangel-Situationen (Freudenburg et al. 2013), von weiteren wichtigen Funktionen des PA28 α/β -Regulators, neben der Beeinflussung der Antigenprozessierung, ausgegangen werden, was Ansätze für zukünftige Untersuchungen bietet.

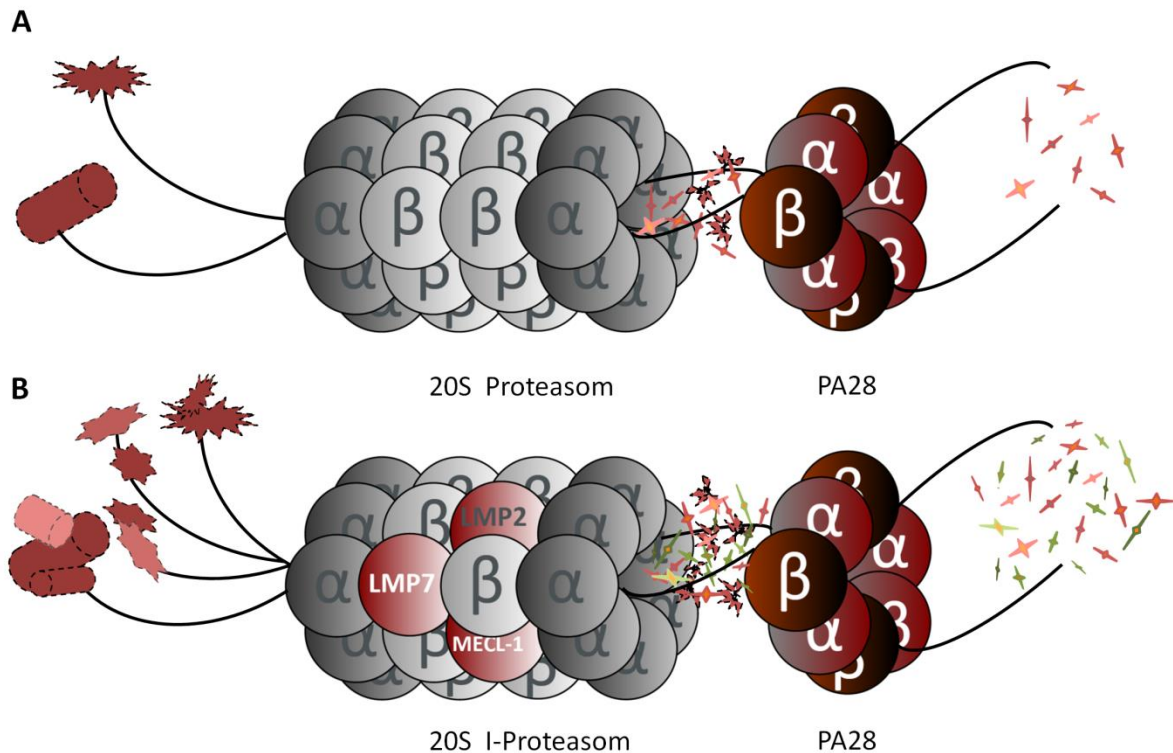


Abbildung 1: Konstitutives 20S Proteasom und 20S I-Proteasom mit PA28-Komplex

Dargestellt wird das zentrale 20S Proteasom mit einseitig assoziiertem PA28-Ring, welcher an die äußeren α -Untereinheiten des 20S Kernkomplexes binden kann. Der 19S Regulator, welcher das 26S Proteasom bildet, findet in dieser Darstellung keine Beachtung. A zeigt das konstitutive, aus heptamerischen Ringen aufgebaute 20S Proteasom. Die β -Untereinheiten formen das katalytische Zentrum, wohingegen die α -Untereinheiten die Tore für die Proteinsubstrate und Bindungsstellen für Regulatoren, wie hier mit dem durch $\text{IFN}\gamma$ induzierbaren PA28 α/β -Ring, bilden. B kennzeichnet die Komposition des I-Proteasoms, in welcher die katalytischen β -Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms mit proteolytisch stärker aktiven Immununtereinheiten LMP2, MECL-1 und LMP-7 ersetzt wurden. Der Einbau der Immununtereinheiten hat eine gesteigerte Degradierung der Proteinsubstrate und die Produktion eines modifizierten Peptidrepertoires zur Folge. Besonders die Verbindung mit PA28 α/β sorgt für eine verstärkte Degradierung kurzer Peptidsubstrate und der anteilig vermehrten Synthese von Peptiden, kleiner als sechs Aminosäuren.

1.4.2 Funktionen des I-Proteasoms

Neben dem bereits beschriebenen Einfluss des I-Proteasoms auf die Modifizierung des Peptidrepertoires (Vigneron & Van den Eynde 2012) für eine adäquate Antigenpräsentation durch MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche obliegt dem Proteasom und somit dem I-Proteasom in gesteigertem Maße die Aufgabe, die Proteinhomöostase in der Zelle zu erhalten (Goldberg 2003, Seifert et al. 2010). Vor allem in Zellstresssituationen wie einer entzündlichen Reaktion auf eine Infektion, charakterisiert durch stimulierende Zytokine, einer vermehrten Transkription, aber auch Schädigungen durch oxidative und nitrosative Verbindungen, kommt es in der Zelle zu einer Häufung fehlgefalteter und geschädigter Proteine (Berlett & Stadtman 1997, Goldberg 2003) oder gar zytotoxisch wirkender stark basischer Histone (Raule, Cerruti, & Cascio 2014). Um ein Akkumulieren oder die direkte Wirkung dieser Verbindungen zu vermeiden (Y. S. Chen & Qiu 2012), ist das vorwiegend unter Einfluss von $\text{IFN}\gamma$, aber auch durch LPS bei Gram-negativer bakterieller Infektion (Reis, Guan, et al. 2011) neu synthetisierte I-Proteasom befähigt, vermehrt geschädigte Proteine zu degradieren und zu Peptiden abzubauen (Pickering & Davies 2012, Raule, Cerruti, & Cascio 2014). Kann das I-Proteasom in der Zelle nicht gebildet werden, kommt es laut Seifert *et. al.* nach erschöpfter Proteinabbaukapazität des konstitutiven Proteasoms zu einem Akkumulieren geschädigter ribosomaler Produkte (DRiPs). Diese können sogenannte *aggresome-like structures* (ALIS) bilden, welche letztlich zu einer Apoptose der betroffenen Zellen führen können (Seifert et al. 2010). Nicht nur durch den Abbau potenziell zellschädigender Protein- und Peptidsubstrate erhält das I-Proteasom die Vitalität der Zelle (Raule, Cerruti, & Cascio 2014, Seifert et al. 2010), auch durch den Abbau kurzlebiger regulatorischer Proteine kann das Proteasom und das I-Proteasom in eine Vielzahl von Zellfunktionen eingreifen (Feikova et al. 2000, Hayashi & Faustman 1999, Hoppe et al. 2000). Die am häufigsten diskutierte Einflussnahme auf einen Signaltransduktionsweg, welcher in der Freisetzung eines immunologisch relevanten Transkriptionsfaktors mündet, ist die Ubiquitinierung und Abspaltung der inhibierenden κB -Proteine, welche darauf den *Nuclear factor- κB* freigeben (Palombella et al. 1994). Bekannt ist bisher, dass neben dem konstitutiven Proteasom (Palombella et al. 1994) auch das I-Proteasom die κB -Proteine und Vorläuferproteine von NF- κB spaltet (Hayashi & Faustman 2000, Hensley et al. 2010). Diskutiert wird jedoch, ob das I-Proteasom einen besonderen Einfluss auf das Freisetzen von NF- κB durch die Aktivierung des alternativen oder klassischen Weges (Maldonado et al. 2013, Opitz et al. 2011, Schmidt et al. 2010) oder gar beider Aktivierungsvarianten hat (Jang et al. 2012). Analysen des Transkriptionsprofils untersuchter Zellen und Gewebe, defizient für eine oder mehrere Immununtereinheiten, unterschieden sich in bisherigen Studien von jenem der Wildtypiere. Somit kann von einer ubiquitären und weitreichenden Beeinflussung der Transkription durch das I-Proteasom ausgegangen werden (de Verteuil et al. 2014, Schmidt et al. 2010).

1.4.3 Die Rolle des I-Proteasoms in Infektionen und autoimmunen Reaktionen

Medizinische Relevanz erhält das I-Proteasom in Hinblick auf seine Rolle in der Abwehr von intrazellulären Infektionen. Besonders in der Erkennung und Abtötung von virusinfizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen ist die verstärkte Peptidproduktion, welche zu einer optimierten MHC-I gekoppelten Antigenpräsentation führt, von maßgeblicher Relevanz (Ferrington & Gregerson 2012, Toes et al. 2001). Die Rolle des I-Proteasoms in intrazellulären Infektionen wurde in einer Vielzahl muriner Infektionsmodelle mit Tieren, welche der genetischen Deletion einer oder mehrerer Immununtereinheiten unterlagen, untersucht. Intrazelluläre Infektionen mit Viren (Opitz et al. 2011, Sijts et al. 2000), aber auch *Toxoplasma gondii* (Tu et al. 2009) und *Listeria monocytogenes* (Strehl et al. 2006) wiesen eine Beteiligung des I-Proteasoms in diesen Deletionsmodellen auf. Hierbei zeigten sich verminderte CD8⁺T-Zell-Zahlen (zytotoxische T-Zellen) (Van Kaer et al. 1994, Zaiss et al. 2008), eine reduzierte CD8⁺T-Zell-Antwort auf den Erreger (Basler et al. 2006, Pang et al. 2006) und eine Minderexpression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche (Fehling et al. 1994), sowie die inadäquate Produktion und Präsentation spezieller Antigene (Kincaid et al. 2012, Sibille et al. 1995, Sijts et al. 2000). Weiterhin konnte eine eingeschränkte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN γ und IL-17 (Muchamuel et al. 2009) und assoziierte quantitativ verminderte Zellpopulationen wie Th17- und Th1-Lymphozyten detektiert werden (Kalim et al. 2012). All diese Befunde belegen den essenziellen Einfluss des I-Proteasoms auf eine adäquate Bekämpfung intrazellulärer Pathogene. Neueste Publikationen beschreiben erstmals die Rolle des I-Proteasoms in dem Krankheitsverlauf infizierter Mäuse mit dem Gram-positiven Erreger *Streptococcus pneumoniae* (Kirschner et al. 2016) und der Hefe *Candida albicans* (Mundt et al. 2016) und machen deutlich, dass auch die Abwehr extrazellulärer Erreger von I-Proteasomen beeinflusst wird. Ob sich diese Funktionalität auch auf generalisierte Infektionen mit Gram-negativen Erregern übertragen lässt, wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt, ist jedoch zu vermuten, da bakterielles LPS laut Reis *et al.* ein potenter Stimulator für die Expression der Immununtereinheiten darstellt (Reis, Guan, et al. 2011, Reis, Hassan, et al. 2011). Neben infektiösen Geschehen steht das I-Proteasom im Fokus mannigfaltiger autoimmuner Reaktionen. Wie auch im Bereich neurologischer Erkrankungen wurde mittels Deletion von Immununtereinheiten durch genetische Manipulation oder pharmakologische Hemmung in Zell- oder Mausmodellen die Rolle des I-Proteasoms in Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Muchamuel et al. 2009), systemischen Lupus erythematosus (SLE) (Ichikawa et al. 2012), Hashimotos Thyroiditis (Nagayama et al. 2012), Sjögren-Syndrom (Egerer et al. 2006) und ulzerativer Kolitis (Schmidt et al. 2010, Visekruna et al. 2006) studiert. Allgemein scheint das I-Proteasom ein potenter Modulator dieser autoimmunen Reaktionen zu sein, wurden doch in den Deletionsmodellen verminderte Entzündungszellzahlen und proinflammatorische Zytokine sowie eine reduzierte Gewebsdestruktion dokumentiert (Muchamuel et al. 2009, Schmidt et al. 2010). Neben dem zur Therapie des multiplen Myeloms zugelassenen Proteasominhibitors Bortezomib (Kane et al. 2003) und einigen, sich zumeist in der Zulassungsprüfung befindlichen Epoxyketonen, welche sich ebenfalls kritisch auf das Überleben hoch proliferativer Tumorzellen auswirken (Fostier et al. 2012, Potts et al. 2011, H. J. Zhou et al. 2009), zeigten Studien mit dem selektiven LMP7-Blocker ONX 0914 einen positiven Einfluss auf die Behandlung von autoimmunen Reaktion in murinen Modellen (Muchamuel et al. 2009, Nagayama et al. 2012).

Das ausgesprochen vielseitige Auftreten des I-Proteasoms, in Zusammenhang mit dessen Vorkommen bzw. Induzierbarkeit in allen eukaryotischen Zellen, macht diesen wichtigen proteolytischen Komplex zu einer relevanten Größe in intrazellulären (Beilstein et al. 2015, Strehl et al. 2006) und extrazellulären Infektionen (Kirschner et al. 2016), in autoimmunen Reaktionen (Basler et al. 2014) sowie neurodegenerativen Erkrankungen (Mishto et al. 2006) und Krebs (Cerruti et al. 2007). Die Beeinflussung des I-Proteasoms von intrazellulären Infektionen, besonders von Virusinfektionen, stellt sich zunehmend klarer dar (McCarthy & Weinberg 2015). Hingegen lassen die lückenhaften Erkenntnisse des Einflusses des I-Proteasoms auf spezifische Zellfunktionen in Bereichen wie der Proliferation, des Zellmetabolismus und immunologischer Eigenschaften, neben der Antigenpräsentation, Raum für zukünftige Studien.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Bei den in diesem Kapitel aufgelisteten Chemikalien handelt es sich um in Laboratorien standardmäßig eingesetzte Substanzen. Die einzelnen Substanzen kommerziell erhältlicher Kits, die für einige Methoden verwendet wurden, sind hier nicht detailliert beschrieben. Die experimentelle Anwendung dieser Kits erfolgte gemäß den Herstellervorschriften.

2.1.1 Bakterien

2.1.1.1 Escherichia coli

Escherichia coli (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 des Serotyps O18:H7 wurde von der *Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* bezogen (DSM Nr.: 10724, weitere Nr.: A302a). Es handelt sich bei dem Stamm A247 um ein humanes Isolat aus einem Appendizitis Patienten (Achtman et al. 1983). Dieser Serotyp, mit der Fähigkeit eine K1-Kapsel auszubilden, ist ein extraintestinal pathogener *E. coli* (Johnson et al. 2001), genauer Sepsis assoziierten *E. coli* (SEPEC) zugeordnet und ist in die Risikogruppe 2 gemäß § 3 der Biostoffverordnung eingestuft.

2.1.1.2 Bakterienkultur

Tabelle 2-1: Kultur von *Escherichia coli*

LB- Medium*	Menge	Hersteller
Hefeextrakt	10,0 g	Roth
Trypton	5,0 g	Roth
Natriumchlorid	10,0 g	Roth
Aqua dest. ad	1000 ml	
LB- Agar*		
Hefeextrakt	10,0 g	Roth
Trypton	5,0 g	Roth
Natriumchlorid	10,0 g	Roth
Agar-Agar	15,0 g	Sigma
Aqua dest. ad	1000 ml	

*Das LB-Medium und der Agar wurden bis zur vollständigen Auflösung der Inhaltsstoffe auf einer Wärmeplatte erhitzt und anschließend im Autoklav bei 121 °C 20 Minuten sterilisiert.

2.1.2 Zellen

2.1.2.1 Murine Peritonealmakrophagen

Die für die ex-vivo Experimente verwendeten murinen Makrophagen wurden aus peritonealer Spülflüssigkeit von nicht infizierten Mäusen, wie im folgenden Kapitel 2.2.3.5 beschrieben, gewonnen. Es handelt sich um residente, große Peritonealmakrophagen (Ghosh et al. 2010), die nach 12-24 stündiger Kultivierung für weitere Untersuchungen genutzt wurden.

2.1.2.2 Zellkultur

Tabelle 2-2: Kultivierung und Stimulation peritonealer Makrophagen

Zellkulturmedien und Zusätze	Menge	Hersteller
RPMI	500 ml	Gibco
Fetales Kälberserum	50 ml	Biochrom, Merck
Penicillin/Streptomycin	10 ml	Invitrogen
Stimulanzen		
Rekombinantes murines Interferon γ	100 U/ml	Peprotech
<i>E. coli</i> LPS	1 μ g/ml	InvivoGen
Verbrauchssubstanzen		
Dulbeccos PBS 1x	500 ml	Gibco
Trypan Blau 0,4 %	10 μ l	Invitrogen
ACK-Lysing Buffer	3 ml	Invitrogen

2.1.3 Tierexperimente

2.1.3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche, 9-11 Wochen alte Mäuse verwendet, mit einem Körpergewicht von 19-23 g. Diese stammen aus der eigenen SOPF-Zucht der *Serviceeinheit Kleinnager* (SEK) des *Forschungszentrums Beutenberg* (FZB) beziehungsweise aus dem *Forschungszentrum Lobeda* (FZL) in Jena. Verwendet wurden LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out Mäuse mit C75BL/6J Hintergrund, die ursprünglich von der Universität Utrecht (*Dept. Of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht*) zur Verfügung gestellt worden waren (de Graaf et al. 2011). Trotz der Deletion von zwei I-Proteasom-Untereinheiten und dem Proteasom-Aktivator 28 zeigen die Tiere keine Abnormalitäten in Fruchtbarkeit und Wachstum oder andere phänotypische Charakteristika. Für weitere Versuche wurden im FZB, *Service-Einheit Kleinnager*, die Dreifach-Knock-Out-Mäuse (LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -/-) mit Hilfe eingekreuzter Wildtypen

zu LMP7-Knock-Out-, MECL-1-Knock-Out- und PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out-Mäusen zurückgezüchtet. Verglichen wurden diese genetisch veränderten Tiere jeweils mit C75BL/6J-Wildtyp-Mäusen. Insgesamt wurden 582 Tiere für die im Folgenden beschriebenen Versuche verwendet.

2.1.3.2 Verbrauchsmaterialien in der Tierhaltung

Tabelle 2-3: Haltung der Versuchstiere

Produktname*	Verwendungszweck	Hersteller
Rod 16, 10 mm, autoklavierbares Nagerfutter, sojafrei	Futter	LASvendi
Leitungswasser, angesäuert mit HCl, pH-Wert: 2,5-3,0	Tränkwasser	
Anibedding [®] , Espeneinstreu	Einstreu	AsBe-wood
Sizzlenset [®]	Nestbaumaterial	ssniff

* Alle Materialien und Flüssigkeiten werden bei 121°C 20 Minuten autoklaviert bevor sie in der Tierhaltung verwendet werden. Einstreu und Nestbaumaterial wurde direkt im Käfig autoklaviert.

2.1.3.3 Narkosemittel und Antikoagulantien

Tabelle 2-4: Narkose und Blutentnahme

	Menge	Hersteller
Finale Narkose (<i>Ulmer Mix</i>)		
Natriumchlorid 0,9 %	9 ml	Fresenius Kabi
Rompun 2 %	1 ml	Bayer
Ketavet [®] (100 mg/ml)	2 ml	Zoetis
Antikoagulantien		
EDTA-Lösung	25,6 mg/1 ml	SERVA
Heparin	5000 I. E./10 ml	Ratiopharm
Prä Präparation: Hautdesinfektion		
Softasept [®] N		Braun

2.1.4 Histologie und Zytologie

2.1.4.1 Herstellung vom HE gefärbten Paraffinschnitten

Tabelle 2-5: Paraffinschnittherstellung und HE-Färbung

	Hersteller
Fixierung	
Formalin 4 %	Roth
Entwässerung	
Ethanol, vergällt 50 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 70 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 96 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 100 %	Nordbrand
Methylbenzoat	Merck
Toluol	Roth
Einbettung	
Paraffin (Schmelzpunkt: 56-57 °C)	Thermo
Entparaffinierung	
Xylol	Merck
Roticlear ®	Roth
Ethanol, vergällt 100 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 96 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 70 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 50 %	Nordbrand
Aqua dest.	
Hämatoxylin-Eosin Färbung	
Hämatoxylin	Merck
Eosin	Merck
Aqua dest.	
Ethanol, vergällt 50 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 70 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 96 %	Nordbrand
Ethanol, vergällt 100 %	Nordbrand
Xylol	Merck

Eindeckeln	
Shandon Hypermount (E-Z Mount)	Thermo

2.1.4.2 Zytologische Färbungen

Tabelle 2-6: Färbung zytologischer Präparate

	Hersteller
Diff-Quik-Färbung	
Diff-Quik I	Medion Diagnostiks
Diff-Quik II	Medion Diagnostiks
Diff-Quik Fix	Medion Diagnostiks
Pappenheim-Färbung	
Methanol	Sigma
May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung	Merck
PBS	Gibco
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck
Puffertabletten pH 6,8 (Puffer nach WEISE)	Merck
Aqua dest.	

2.1.5 Mikrobielle Methoden

2.1.5.1 Phagozytose und intrazelluläres Abtöten von Bakterien

Tabelle 2-7: Phagozytoseassay

Phagozytose mit <i>E. coli</i> -Partikeln	Hersteller
Escherichia coli BioParticles® fluorescein conjugate Alexa Fluor® 488	life technologies™
Escherichia coli BioParticles® Opsonizing Reagent	life technologies™
Waschpuffer (PBS + 2 % FCS)	Gibco, Biochrom
Paraformaldehyd 4 %	Roth
Dapi-Fluoromount-G	Biozol
Trypan Blau 0,4 %	Invitrogen

Phagozytose mit <i>E. coli</i> A247	
Dulbeccos PBS 1x	Gibco
Rekombinantes murines Interferon γ , 100 U/ml	Peprotech
Intrazelluläres Abtöten von <i>E. coli</i> A247	
Dulbeccos PBS 1x	Gibco
Gentamicin 100 $\mu\text{g/ml}$	life technologies™

2.1.6 Molekularbiologische Methoden

2.1.6.1 Durchflusszytometrie

Tabelle 2-8: Verbrauchssubstanzen der FACS-Messung

FACS-Lösungen und Puffer	Hersteller
Waschpuffer (1 % PBS + 2 % FCS)	Gibco, Biochrom
Propidiumiodid (50 $\mu\text{g/ml}$)	life technologies™
Fixable Viability Dye eFluor® 780 (1:10 000)	eBioscience
FC-Block (Rat Anti-Mouse CD16/CD32) (0,1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)	eBioscience
Formalin 2 %	Roth
Attune Focusing Fluid	life technologies™
FACS Clean: 12 % Natriumhypochloritlösung	Roth

Tabelle 2-9: FACS-Antikörper

FACS-Antikörper	Spezies	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Anti-Human/Maus CD45R (B220) PE	Ratte	0,25 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	eBioscience
Anti-Maus B220 PerCp Cy5.5	Ratte	0,25 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	eBioscience
Anti-Maus CD11b FITC	Ratte	0,125 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	eBioscience
FITC gekoppelter anti-Maus CD11b	Ratte	0,25 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	Immuno Tools
Anti-Maus CD11b PE	Ratte	0,1 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	BD
Anti-Maus CD152 APC	Ratte	0,06 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	eBioscience
Anti-Maus CD3 PerCp Cy5.5	Ratte	0,5 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	eBioscience
Anti-Maus CD4 APC	Ratte	0,125 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	eBioscience
Anti-Maus CD4 FITC	Ratte	0,05 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen	eBioscience

FACS-Antikörper	Spezies	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Anti-Maus CD8a PE-Cyanine7	Ratte	0,06 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus CD86 PE	Ratte	0,06 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus F4/80 eFluor 660	Ratte	0,25 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus F4/80 PeCy7	Ratte	0,25 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus Ly6C PeCy7	Ratte	0,06 µg/10 ⁶ Zellen	BD
Anti-Maus Ly6G (1A8) PE	Ratte	0,06 µg/10 ⁶ Zellen	BD
Anti-Maus MHC I (2Db) APC	Maus	0,25 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus MHC I (2Kb) PE	Maus	0,12 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus MHC I (2Kb) PECy7	Maus	0,12 µg /10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus MHC II (I-A/I-E) APC	Ratte	0,002 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus MHCII PerCp Cy5.5	Ratte	0,06 µg/10 ⁶ Zellen	BD
Anti-Maus PD-1 APC	Ratte	0,5 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
Anti-Maus PD-L1 PE	Ratte	0,02 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience

Tabelle 2-10: FACS-Antikörper-Isotypen

Isotypen	Spezies	eingesetzte Konzentration	Hersteller
IgG APC	Hamster	0,5 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG PerCp Cy5.5	Hamster	0,5 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2a, kappa APC	Ratte	0,25 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2a, kappa APC	Maus	0,25 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2a, kappa PE	Ratte	0,25 µg, 0,06 µg und 0,02 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2a, kappa PE	Maus	0,12 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2a, kappa PeCy7	Ratte	0,06 µg und 0,25 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2a, kappa PeCy7	Maus	0,12 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2a, kappa PerCp Cy5.5	Ratte	0,25 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2b, kappa APC	Ratte	0,002 µg und 0,5 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2b, kappa FITC	Ratte	0,05 µg und 0,125 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgG2b, kappa PE	Ratte	0,2 µg/10 ⁶ Zellen	BD

Isotypen	Spezies	eingesetzte Konzentration	Hersteller
IgG2b, kappa PerCp Cy5.5	Ratte	0,06 µg/10 ⁶ Zellen	eBioscience
IgM, kappa PeCy7	Ratte	0,06 µg/10 ⁶ Zellen	BD

2.1.6.2 RNA-Extraktion

Tabelle 2-11: RNA-Extraktion aus Zelllysaten und Organhomogenaten

	Menge je Probe	Hersteller
RNeasy Mini Kit		Qiagen
RNase AWAY®		Roth
DTT	2 M	Sigma
RLT Buffer	700 µl	Qiagen
RPE Buffer	1 ml	Qiagen
RW1 Buffer	700 µl	Qiagen
RNase free water	40 µl	Qiagen
Ethanol 70 %	700 µl	Nordbrand
DTT 2 M	40 µl	Sigma
RNase-Free DNase Set (50)		Qiagen
Buffer RDD	70 µl	Qiagen
DNase	10µl	Qiagen

Tabelle 2-12: RNA-Extraktion aus schwer aufschließbaren Geweben

	Menge je Probe	Hersteller
RNeasy Plus Universal Kit		Qiagen
QIAzol® Lysis Reagent	900 µl	Qiagen
Chloroform	180 µl	Roth
RPE Buffer	1 ml	Qiagen
RWT Buffer	700 µl	Qiagen
RNase free water	40 µl	Qiagen
Ethanol 70 %	900 µl	Nordbrand
gDNA Eliminator Solution	100 µl	Qiagen

Tabelle 2-13: RNA-Extraktion aus Mausvollblut

	Menge je Probe	Hersteller
PAXgene Blood RNA Kit		Qiagen
Additiv	100 - 1500	Qiagen
RNase free water	4 ml	Thermo
BR1 Buffer	350 µl	Qiagen
BR2 Buffer	300 µl	Qiagen
Proteinase K	40 µl	Qiagen
Ethanol 100 %	350 µl	Nordbrand
BR3 Buffer	350 µl	Qiagen
BR4 Buffer	500 µl	Qiagen
BR5 Elution Buffer	40 µl	Qiagen
RNase-Free DNase Set (50)		
Buffer RDD	70 µl	Qiagen
DNase	10 µl	Qiagen
GLOBINclear-Kit		Invitrogen
Streptavidin Magnet Beads	30 µl	Invitrogen
Streptavidin Bead Buffer	30 µl	Invitrogen
RNA Binding Beads	10 µl	Invitrogen
RNA Bead Buffer	4 µl	Invitrogen
100 % Isopropanol	6 µl	Roth
2x Hybridization Buffer	15 µl	Invitrogen
Capture Oligo Mix	1 µl	Invitrogen
RNA Binding Buffer	100 µl	Invitrogen
RNA Wash Solution	200 µl	Invitrogen
Elution Buffer	30 µl	Invitrogen

2.1.6.3 DNA-Isolation

Tabelle 2-14: Gewinnung muriner DNA

Puffer	Menge	Hersteller
Tailpuffer, aus Stocklösungen	320 µl/Probe	
Tris HCl 100 mM pH 8,5	20 ml	Sigma

Puffer	Menge	Hersteller
EDTA 5 mM pH 8,0	2 ml	SERVA
NaCl 200 mM	8 ml	Roth
SDS 0,2 %	4 ml	Sigma
Sonstiges		
Proteinase K (600 U/ml)	30 µl/Probe	Merck
Isopropanol	300 µl/Probe	Roth
Ethanol 70 %	500 µl/Probe	Nordbrand

2.1.6.4 Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 2-15: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit Mastermix:	Menge je Probe	Hersteller
Nuclease freies Wasser	3,4 µl	Ambion
Buffer 10x	2 µl	Applied Biosystems
Random Primer 10x	2 µl	Applied Biosystems
MultiScribe Reverse Transkriptase 50 U/µl	1 µl	Applied Biosystems
dNTP-Mix 100 mM	0,8 µl	Applied Biosystems
RNase Inhibitor 20 U/µl	1 µl	Applied Biosystems
Verdünnen der cDNA		
0,5 x Tris-EDTA-Puffer	150 µl	FLUKA

Tabelle 2-16: Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

RT-qPCR Mastermix	Menge je Probe	Hersteller
Nuclease freies Wasser	5,2 µl	Ambion
2x SensiMix™ SYBR® No-ROX Kit	10 µl	Bioline
Primer vorwärts	0,4 µl	Eurofins
Primer rückwärts	0,4 µl	Eurofins

Tabelle 2-17: Murine PCR-Primer

Murine q-PCR Primer*	Vorwärts Sequenz 5'→3'	Rückwärts Sequenz 3'→5'
Beta 1	CGGTTTTTCGCCTTATGCCTT	TGGCCTTGTTATTGGAATGCT
Beta 2	GCTATGGTGCCTTCCTGACT	CTCCAGCCTCTCCAACACAT
Beta 5	AGCTTCGCAATAAGGAACGC	TAGCCTCGATCCATAACGCC
CCL-5	CTTGCCTACCTCTCCCTCG	CGAGTGACAAACACGACTGC
HPRT	TTCTTTGCTGACCTGCTGGA	TATGTCCCCCGTTGACTGAT
IFN- γ	GAGGAAGTGGCAAAGGATGG	TGGACCTGTGGGTGTTGAC
IL1_m	ACCTGAGAAACAACCAGCTCAT	AGGTCAATAGGCACCATGTCT
IL-10	TGGGTGAGAAGCTGAAGACC	GCTCCACTGCCTTGCTCTTA
IL-1 α	CGCTTGAGTCGGCAAAGAAA	GATACTGTCACCCGGCTCTC
IL-1 β	TGGCAGCTACCTGTGTCTTT	CAGCTCATATGGGTCCGACA
IL-6	ACCACTTCACAAGTCGGAGG	TCTGCAAGTGCATCATCGTT
iNOS	GGTGAAGGGACTGAGCTGTT	CTGAGAACAGCACAAGGGGT
KC	ACCTCAAGAACATCCAGAGCTT	CGACCATTCTTGAGTGTGGC
LMP2	TTCTGTGCCCTCTCAGGTTC	TTCTTCACCACGTTTGCAGC
LMP7	TTCCTGAGGTCCTTTGGTGG	TACAACCTGCACTCCTTGGC
MECL-1	CGGGGTTGATTTGAACGGAC	GTGATGGCTTCCACCAACAG
PA28 α	AGGTTTCGAGCTGTGCTTTC	CCCAAGCAGGTTCTCTGTCT
PA28 β	CAGCACCTGATCCCCAAGAT	CTGCTTCATCTCGCTCATGC
RPL13a	TACGCTGTGAAGGCATCAAC	CTCGGGAGGGGTTGGTATTC
TNF α	GGCCTCCCTCTCATCAGTTC	TTTGCTACGACGTGGGCTAC

* alle Primer stammen von Eurofins MWG Synthesis GmbH

Tabelle 2-18: Semiquantitative-Polymerase-Kettenreaktion

Semiquantitative PCR Mastermix	Menge je Probe	Hersteller
Nuclease freies Wasser	15,8 μ l	Ambion
dNTP Mix 10 mM	0,5 μ l	Jena Bioscience
Taq Polymerase 5 U/ μ l	0,2 μ l	Jena Bioscience
Taq Reaction Buffer 10x	2,5 μ l	Jena Bioscience
Primer vorwärts	0,5 μ l	Eurofins
Primer rückwärts	0,5 μ l	Eurofins

TAE Puffer pH 8,0		
Tris Base	4,84 g	Roth
Eisessig 100 %	1,14 ml	Sigma
EDTA 0,5 M	2 ml	Serva
Aqua dest. ad	1000 ml	
Agarosegel 2 %		
Agarose	7 g	Biozym
TAE-Puffer (1x)	350 ml	
GelRed Nucleic Acid Stain	10 µl	BioTium
Marker		
100 bp DNA-Ladder (50 µg/ml)	10 µl	NEB
6 x DNA Loading Dye	2,5 µl	Thermo

Tabelle 2-19: Primer für die Genotypisierung

Murine PCR Primer	Vorwärts Sequenz 5' → 3'	Rückwärts Sequenz 3' → 5'	Vorwärts Sequenz Neomycin-Kassette
PA-Neo	CCGACGGCGAGGATCT CGTCGTGA	AGCGAGCACGTACTCG GATG	
PA28a	CAGGCAGTGTCTCAAT GGT	CTCAGGCTGGTTGCACA GTA	
PA28b	TCAGAGATGCAGGTCTT CAA	TCACAGAAAGCTGTGA GCGT	
LMP7	GGACCAGGACTTTACTA CGTAGATG	CTTGTACAGCAGGTCAC TGACATCG	CCGACGGCGAGGATCT CGTCGTGA
MECL-1	CAGAGAGAAACACGTG ACAGACTGG	CAGGACAGGTGTGGTT CCAGGAGC	CCGACGGCGAGGATCT CGTCGTGA

2.1.6.5 Next-Generation-Sequencing

Tabelle 2-20: Next-Generation-Sequencing-Kits

Verwendete Kits	Hersteller
Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit	Ambion by life technologies™
Ion Total RNA-Seq Kit v2	IonTorrent by life technologies™

2.1.6.6 Immunblot

Tabelle 2-21: Proteinbestimmung

Proteinbestimmung Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Menge (pro 96 Well Platte)	Hersteller
Reagent A	19,6 ml	Thermo
Reagent B	0,4 ml	Thermo
Albumin Standard	100 µl	Thermo

Tabelle 2-22: Western Blot

Puffer und Lösungen	Menge	Hersteller
HBSM (HEPES-buffered saline magnesium) pH 7,2		
Natriumchlorid	4,38 g (= 150 mM)	Roth
Magnesiumchlorid	0,51 g (= 5 mM)	Sigma
HEPES	2,38 g (= 20 mM)	Sigma
Aqua dest. ad	500 ml	
HBSM Lysepuffer		
Protease inhibitor cocktail	1:200	Merck
PMSF	1 mM	Sigma
TX-100	1 %	Sigma
HBSM ad.		
Probenpuffer	1:4 einsetzen	
DTT 1 M	40 µl	Sigma
NuPAGE® LDS Puffer (4x)	1 ml	life technologies™
Verbrauchssubstanzen		
Prestained Page Ruler	2 µl - 5 µl	Thermo
SuperSignal®West Pico Chemieluminescent substrate		Thermo
Luminol / Enhancer solution	350 µl	Thermo
Stable peroxide solution	350 µl	Thermo
Laufpuffer 10x		
Tris	30,3 g (= 0,25 M)	Roth

Puffer und Lösungen	Menge	Hersteller
Glycin	144,1 g (= 1,92 M)	SERVA
SDS	10 g	Sigma
Aqua dest. ad	1000 ml	
Transfer Puffer 10 M pH 8,3		
Glycin	112,6 g (= 1,5 M)	SERVA
Tris	24,2 g (= 0,2 M)	Roth
Aqua dest. ad	1000 ml	
Transfer Puffer 1 M		
10x Transfer Puffer	100 ml	
Ethanol 96 %	100 ml	Nordbrand
Aqua dest. ad	1000 ml	
Ponceaufärbung		
Ponceau-S	0,1 %	Sigma
Essigsäure	5 %	Merck
Entfärbelösung: Essigsäure	1 %	Merck
Eisessig	200 ml	Sigma
Tris Buffered Saline (TBS) 10x		
Natriumchlorid	87,7 g (= 1,5 M)	Roth
Tris	15,8 g (= 0,1 M)	Roth
Aqua dest. ad	1000 ml	
Waschpuffer (TBS-T) 1x		
TBS 10x	100 ml	
Tween20	1 ml	Sigma
Aqua dest. ad	1000 ml	
Blockpuffer		
TBS 1x	10 ml	
Milchpulver	1 g	Roth

Tabelle 2-23: Western Blot-Antikörper

Western Blot Antikörper	Produktgröße [kDa]	Spezies	eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-PA28 α	28	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling

Western Blot Antikörper	Produktgröße [kDa]	Spezies	eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-PA28 α	28	Kaninchen	1:100	Acris
Anti-Maus-PA28 β	28	Kaninchen	1:500	Cell Signaling
Anti-Maus-PSMB10	29	Kaninchen	1:500	Proteintech
Anti-Maus-LMP2	22	Kaninchen	1:500	Abcam
Anti-Maus-LMP7	20-22	Kaninchen	1:5000	Labor: Prof. U. Seifert
Anti-Maus-MECL-1	20	Kaninchen	1:5000	Labor: Prof. U. Seifert
Anti-14-3-3	28-30	Maus	1:2000	Santa Cruz
Anti-GAPDH	36	Maus	1:500	Santa Cruz
Anti- β -actin	45	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Anti-Vinculin	124	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Anti-I κ B α	37	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Anti-I κ B α	37	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
Anti-cleaved Caspase 1	20	Ziege	1:500	Santa Cruz
Anti-Caspase 1	42	Ratte	1:1000	ebioscience
Anti-Caspase 3 (pro- und cleaved- Form)	30, 19, 17	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling

2.1.6.7 Multiplex-Immunoassay

Tabelle 2-24: Multiplex-Immunoassay – 14-Plex Kit

14-Plex Kit - Komponenten	Analyt	Analyt
ProcartaPlex[®] (eBioscience)	Gro-alpha/KC	MCP-1
Standard Mix A	IFN-gamma	MIP-1beta
Standard Mix B	TNF-alpha	RANTES
14-plex Beads	IL-10	G-CSF
14-plex Detection Antibody	IL-12p70	
Streptavidin-PE	IL-17A	
Universal Assay Buffer	IL-1beta	
10x Wash Buffer	IL-6	
Reading Buffer	IP-10	

2.1.6.8 Nitratbestimmung

Tabelle 2-25: Griess Reaktion

Griess Reaktion	Menge	Hersteller
Lösung A		
N-(1-naphtyl)ethylenendiamin	300 mg	Sigma
Aqua dest. ad	300 ml	
Lösung B		
Sulfanilamid	3 g	Sigma
Phosphorsäure 85 %	18 ml	Roth
Aqua dest. ad	300 ml	
Standard 1M (10 mM einsetzen)		
Nitrit	6,9 g	Sigma
Aqua dest. ad	100 ml	

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Gängig verwendete Verbrauchsmaterialien werden in dieser Übersicht nicht aufgeführt. Sie entsprechen den allgemein verwendeten Standards. Zu ihnen gehören Pipettenspitzen, Einmalpipetten, Röhrchen, Schraubbecher sowie Reaktionsgefäße.

Tabelle 2-26: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
96well Platten, V-förmiger Boden	FACS-Messungen	VWR
Corbett qPCR-tubes (0,1 ml)	Real-Time-qPCR	Qiagen
Costar® 12well, 6well-Platten	Zellkultur Makrophagen	Corning
DNALoBind Tubes 1,5 ml	RNA-Extraktion	Eppendorf
Einbettkassetten	Gewebe in Paraffin einbetten	KABE Labortechnik
Einmalimpfösen	Nährmedium mit Bakterien animpfen	VWR
Filterkarten, Shandon	Präparation von Cytozentrifugaten	Thermo Fisher
Filterpapier, Whatman	Western Blot	VWR
Flachboden-Platte, schwarz, 96well	Multiplex-ELISA	eBioscience
Free Style Lite Teststreifen	Blutglukosemessung	Abbott
Fuji Slides: Albumin (Alb-PIII)	Blutchemie	SCIL
Fuji Slides: Cre-PIII	Blutchemie	SCIL
Fuji Slides: GOT/AST-PII	Blutchemie	SCIL
Fuji Slides: Harnstoff (Bun-PIII)	Blutchemie	SCIL
Fuji Slides: LDH-PIII	Blutchemie	SCIL
Kammerobjekträger (4 und 8 Kammern)	Phagozytose Assay	VWR
Küvetten, Kunststoff	Messung optische Dichte	Sarstedt
Li-Heparin Monovette 1,2 ml	Blutentnahme	Sarstedt
Lysing Matrix Tube 2 ml	Gewebe homogenisieren	MP Biomedicals
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, heparinisiert	Retrobulbare Blutentnahme	Brand
Mikrotom Klingen MX35 ULTRA	Schneiden der Paraffinblöcke	Thermo Scientific
Mini-Protean TGX Gels 4-15 %, 15; 10well	Western Blot	BioRad

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
Objektträger Superfrost Ultra Plus	Mikroskopieren von Zellen und histologischen Schnitten	Thermo Fisher
PCR-Reaktionsgefäße mit Deckel, 0,2 ml, in 8x-Streifen-Format	PCR, c-DNA-Synthese	life technologies™
Petrischalen	Agarherstellung	VWR
Pipettenspitzen für FDC 3500i	Blutchemie	SCIL
ProteinLoBind Tubes 1,5 ml	Western Blot	Eppendorf
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Präparation von Milzzellen	Falcon
Safe Lock Tubes 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Reaktionsgefäße	Eppendorf
Spritzen 1 ml; 5 ml	Blutentnahme	Braun
Spritzen 10 ml	Gewinnung Makrophagen	BD
Sterican® Kanülen G20, G21, G25, G27	Blutentnahme, i.p.-Injektion	Braun
Transfermembran Nitrozellulose	Western Blot	Thermo Fisher
Zellschaber 25 cm	Ablösen von Zellen	VWR
Zellsieb 40 µm	Präparation von Milzzellen	Corning

2.1.8 Geräte

Tabelle 2-27: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absauggerät Vacusave	Integra
Agilent 2200 TapeStation System (G2964AA)	Agilent Technologies
Attune Acoustic Focusing Cytometer	life technologies™
Auto Hematology Analyzer BC-5300 Vet	mindray
Biophotometer 6132 plus	Eppendorf
BioPlex 200 System, powered by Luminex xMAP Technology	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator Galaxy 170S	Eppendorf
CO ₂ -Inkubator HERA cell 150	Thermo Fisher
Corbett Rotor-Gene	Qiagen
Elektrophoresekammer MiniPROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad
Free Style Freedom Lite Blutglukosemessgerät	Abbott
Fuji DRI-CHEM 3500i	Fujifilm Europe
Fusion Fx7	PeQlab
Gelhalterungssystem Sub-Cell® GT	BioRad
Gewebehomogenisator FastPrep-24	MP Biomedicals
Haereus Multifuge X3R	Thermo Fisher
Infinite® M200	Tecan Group
Inkubationsschüttler I26	New Brunswick- Eppendorf
Ion Proton™ System for Next-Generation Sequencing	life technologies™
Labormikroskop	Leica
Magnetrührer VS-C7 und VMS-C7	VWR
Mikroskop Axio Vert. A1	Zeiss
MiniVent mit Trachealkanüle	Hugo Sachs Elektronik
Multipette (100 µl, 300 µl)	Eppendorf
Multistepper	Eppendorf
NanoDrop D-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher

Ohaus Waage CS 200	Ohaus
Paraffineinbettstation Leica EG1150H	Leica
pH-Meter SevenCompact™ S220	Mettler Toledo
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Polymax 2040	Heidolf Instruments
Powerpac™ HC Power Supply	Bio-Rad
Präzisionswaage EWB 620-2M	Sartorius
Roboter CAS-1200	Qiagen
Rotationsmikrotom HM 355S	Thermo Fisher
S1000™ Thermal Cycler	BioRad
Shandon Citadel 1000	Thermo Fisher
Shandon Cytospin 4	Thermo Fisher
Sicherheitswerkbank HERA safe	Thermo Fisher
Sicherheitswerkbank Maxisafe 2020	Thermo Fisher
SpeedVac Concentrator SPD1010	Thermo Scientific
Stereomikroskop primovert	Zeiss
Thermal Cycler MJ Mini	Bio-Rad
Thermometer mit Rektalsonde für Mäuse BAT-12	physitemp
Thermomixer COMPACT_5350	Eppendorf
Thermomixer MTP	Eppendorf
VortexGenie 2	Scientific Industries
Wasserbad TW20	Julabo
Zentrifuge 5418 R	Eppendorf
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen bakteriologischen Arbeiten fanden an einem Arbeitsplatz der Schutzstufe 2 nach § 3 Biostoffverordnung statt. Die Durchführung erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank. Die Werkbank wie auch alle weiteren Materialien und Gefäße wurden vor Beginn und nach Beendigung der Arbeiten mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Oberflächen wurden zusätzlich mit 1%igem Kohrsolin behandelt. Bakterienhaltige oder eventuell kontaminierte Flüssigkeiten wurden vor der Entsorgung autoklaviert. Die Kultivierung der Bakterien auf Agar-Platten erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Für die Kultivierung in flüssigem Medium wurde das Medium unter gleichen Kulturbedingungen in einem Inkubationsschüttler bei 200 U/min geschwenkt.

2.2.1.1 Anlegen eines *E. coli* A247-Glyzerolstocks

Der *E. coli* A247 wurde nach den Angaben der DSMZ geöffnet und in flüssiges LB-Medium überführt. Anschließend wurde die Keimsuspension auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und unter oben aufgeführten Kulturbedingungen etwa 16 h inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden nun mit einer Impföse in 5 ml LB-Medium mit 25 % Glycerol überführt und gut gemischt. Diese Suspension wurde in Kryoröhrchen zu 1 ml aufgeteilt und als Gebrauchsstocks bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Anzucht von *E. coli* A247

Für die Anzucht von *E. coli* A247 wurde mit einer Impföse eine geringe Menge der kryokonservierten Bakteriensuspension in 20 ml LB-Medium überführt. In einem Schüttelinkubator wurden die Bakterien bei 37 °C und 5 % CO₂ unter beständigem Schwenken von 200 U/min mindestens 12 h inkubiert. Aus dieser dichten Bakteriensuspension wurde eine entsprechende Menge in 15 ml steriles LB-Medium überführt, um die optische Dichte bei 600 nm von 0,03 zu erzielen. Nach 90 min erneuter Schüttelinkubation erreichen die Bakterien ihre logarithmische Wachstumsphase, in der sie die optimalen Infektionseigenschaften besitzen. Eine mit dem Spektralphotometer gemessene OD_{600nm} von 0,33 entspricht etwa $1,37 \times 10^8$ KBE/ml. Aus der Bakteriensuspension wurde nun das Volumen mit der gewünschten Keimmenge entnommen und bei Raumtemperatur mit 4500 U/min 7 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Bakterienpellet mit 0,9%iger Natriumchloridlösung auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die finale Bakterienkonzentration wurde mittels Ausplattieren in der entsprechenden Verdünnung auf LB-Agar-Platten überprüft.

2.2.2 Ex-vivo Experimente

2.2.2.1 Kultivierung muriner Peritonealmakrophagen

Mittels peritonealer Lavage, wie unter 2.2.3.5 beschrieben, wurden aus nicht infizierten Mäusen Zellen gewonnen. Die Lavageflüssigkeit wird bei 4 °C mit 300 g 10 min lang zentrifugiert. Bei makroskopisch sichtbaren Blutbeimengungen wurde nach Absaugen des Überstandes dem Zellpellet 3 ml *ACK-Lyse* Puffer (Invitrogen) beigelegt. Das vorsichtige Mischen und 5 minütige Inkubieren bei Raumtemperatur bewirkte die Lyse der Erythrozyten. Die Reaktion wurde mit 10 ml eiskaltem PBS abgestoppt und die Suspension erneut bei 4 °C und 300 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet mit etwa 5 ml kaltem PBS zweimal gewaschen (Zentrifugation wie zuvor beschrieben). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 2 ml 4 °C kaltem RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % *Penicillin-Streptomycin* aufgenommen. Um die Zellzahl unter Ausschluss toter Zellen zu ermitteln, wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl 0,4%igem Trypan-Blau (Invitrogen) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die lebenden Zellen in 4 Großquadraten mikroskopisch ausgezählt. Die Anzahl der Zellen in einem Großquadrat wurde gemittelt und der Wert mit der Kammerkonstanten (10^4) und dem Verdünnungsfaktor (2) multipliziert. Die Anzahl der Zellen pro ml wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{Zellzahl aus 4 Großquadraten}}{4} \right) \times 20\,000$$

Für optimale Kulturbedingungen wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in die für den jeweiligen Verwendungszweck benötigten Zellkulturgefäße ausgesät. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungs-Brutschrank unterscheiden sich die Makrophagen durch ihre Adhärenz auf der Kulturgefäßoberfläche von anderen Zellen. Durch das Absaugen des Zellkulturmediums wurden die nicht adhären Zellen entfernt. Frisches, zuvor in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmtes RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % *Penicillin-Streptomycin* wurde nun auf die adhären Zellen gegeben. Die Makrophagen konnten so 12-20 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für weitere Untersuchungen in Kultur gehalten werden.

2.2.2.2 Phagozytose-Assay mit *E. coli*-Partikeln

Einsäen der Zellen:

Die Phagozytoseaktivität der murinen Peritonealmakrophagen wurde mittels der Aufnahme nicht infektiöser fluoreszenzgekoppelter *E. coli*-Partikel (*Escherichia coli BioParticles[®] fluorescein conjugate Alexa Fluor[®] 488*, Life Technologies) gemessen. 1×10^6 aus peritonealer Lavage gewonnene Zellen wurden mit 0,5 ml Zellkulturmedium (RPMI-Medium mit 10 % FCS) pro Kammer in 4-Kammer-Objektträger (VWR) eingesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde mittels Neubauer-

Zählkammer und Trypan-Blau-Färbung die genaue Anzahl lebender Makrophagen in einer dafür bestimmten zusätzlichen Kammer bestimmt.

Vorbereitung der E. coli-Partikel:

Die Anzahl der *E. coli*-Partikel in der Stammsuspension wurde ebenfalls mit der Neubauer-Zählkammer per Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Um eine optimale Auswertung der Phagozytose zu erreichen, sollten die Zellen mit der 20fachen Menge (MOI = 20) *E. coli*-Partikeln stimuliert werden. Nach Entnahme des Volumens mit der gewünschten Partikelmenge aus der Stammsuspension, wurde ein gleiches Volumen der Opsonierungslösung (*Escherichia coli BioParticles® Opsonizing Reagent*, Life Technologies) zu den Partikeln gegeben. Für die Opsonisierung der Partikel wurden diese nun 1 h bei 37 °C, vor Licht geschützt, in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Opsonierungslösung durch dreimaliges Waschen mit kaltem PBS aus der Partikelsuspension entfernt (Zentrifugation: 1250 x g, 15 min bei 4 °C). Um die Zellen mit der richtigen Partikelmenge zu stimulieren, wurden diese nochmals ausgezählt bevor aus der konzentrierten Suspension ein Stimulationsmedium hergestellt wurde. Dabei wurde die Partikelmenge (MOI = 20) in 0,5 ml 37 °C warmen Zellkulturmedium (RPMI-Medium mit 10 % FCS) aufgenommen.

60-minütige Zellstimulation:

Nach Absaugen des ursprünglichen Mediums aus den Kammern wurde das Stimulationsmedium zu den nun adhärennten Makrophagen gegeben. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde das Stimulationsmedium abgesaugt und die Reaktion mittel Zugabe von eiskaltem Waschpuffer (PBS mit 2 % FCS) gestoppt. Zu den 500 µl PBS wurden 30 µl 0,4 % Trypan-Blau hinzugegeben. Diese Trypan-Blau-Lösung mit einer Konzentration von etwa 0,25 mg/ml löscht das Fluoreszenzsignal von Partikeln, die sich außerhalb der Zellen befinden, sodass nur komplett phagozytierte Partikel im FITC-Kanal ein Signal abgeben können. Nach kurzem Schwenken der Kammerobjektträger wurde die Trypan-Blau-Lösung abgesaugt und die Zellen nochmals mit kaltem Waschpuffer gespült.

Fixieren und Färben der Zellen:

Nach dem Entfernen der Waschlösung und der aufgeklebten Kammern wurden die Objektträger getrocknet und die Zellen 20 min mit 100 µl 4 % Formalin je Kammer fixiert. Dies geschah vor Licht geschützt in einem für die Immunhistochemie geeigneten Färbekasten (Roth) für Objektträger. Nach der Fixierung der Zellen wurden die Objektträger nochmals mit PBS gespült und nach der vollständigen Trocknung mit einem DAPI-fluoreszierenden Medium (*Dapi-Fluoromount-G*, Biozol) und Deckgläschen eingedeckelt. Nach mehrstündiger Aushärtung des Eindeckmediums konnten die fluoreszierenden *Alexa Fluor® 488* gekoppelten Partikel pro Zelle mittels eines Fluoreszenzmikroskops *Axio Vert. A1* (Zeiss) ausgezählt werden. Für die Bestimmung der aufgenommenen Partikelmenge pro Zelle wurden in jeder Probe 200 Zellen ausgewertet.

2.2.2.3 Phagozytose und intrazelluläres Abtöten von *E. coli* A247

Phagozytose-Assay

Die Phagozytoseaktivität der murinen Peritonealmakrophagen wurde mittels der Reduktion lebender *E. coli* während einer 30 minütigen Koinkubation von INF γ vorstimulierten Zellen und Bakterien bestimmt. $1,5 \times 10^6$ aus peritonealer Lavage gewonnene Zellen wurden mit 1,5 ml Zellkulturmedium (RPMI-Medium mit 10 % FCS) und 100 U/ml murinem INF γ (Peptotech) pro Kammer in 12-Kammer-Platten eingesät. Diese wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach einem Mediumwechsel mittels Neubauer-Zählkammer und Trypan-Blau-Färbung die genaue Anzahl lebender Makrophagen in einer dafür bestimmten zusätzlichen Kammer ausgezählt. Die Zellen wurden nun mit der doppelten Menge (MOI = 2) vitaler *E. coli* infiziert. Die Anzucht von *E. coli* A247 und Herstellung der Infektionslösung erfolgte wie in 2.2.1.2 beschrieben. Eine zusätzliche Kammer welche nur Zellkulturmedium enthielt, wurde ebenfalls mit der entsprechenden Menge *E. coli* versetzt und fungiert nach der Phagozytosereaktion als Kontrolle, über die tatsächliche Anzahl lebender *E. coli*. Nach 30 minütiger Koinkubation der Makrophagen mit den Bakterien in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die adhären Zellen mittels steriler Zellschaber von der Oberfläche der Kulturplatten gelöst. Die Bakterien-Zell-Suspension wurde gleichmäßig vermischt und nach entsprechender Verdünnung in kaltem PBS unverzüglich auf LB-Agar-Platten übertragen, welche am folgenden Tag nach Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ ausgewertet werden konnten. Auch die Bakterien suspension ohne Zellen wurde in Verdünnungsstufen auf LB-Agar plattiert und zeigte am nächsten Tag die tatsächliche *E. coli*-Menge im Medium an. Durch Bilden der Differenz dieser Bakterienmenge und der *E. coli*-Menge aus der Makrophagen-Ko-Inkubation konnte die Menge phagozytierter Bakterien bestimmt werden.

Intrazelluläres Abtöten

Das intrazelluläre Abtöten wurde mittels Anzahl der in der Zelle überlebender *E. coli* nach der Phagozytosereaktion bestimmt. Die Koinkubation von INF γ vorstimulierten Zellen und Bakterien erfolgte wie im vorigen Absatz beschrieben. Nach der 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen mit sterilen Zellschabern von der Kulturplatte gelöst. Das bakterien- und zellhaltige Medium wurde anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 700 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet in 1 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden ein weiteres Mal zentrifugiert, der Überstand entfernt und nun in PBS mit 100 ng/ml Gentamicin aufgenommen. Unter beständigem Schwenken von 150 U/min wurden die Zellen in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C und 5 % CO₂ 2 h inkubiert. Da Gentamicin nicht in die Zellen eindringt, bewirkt die bakterizide Wirkung nur das Abtöten extrazellulärer Bakterien. Eine Probe mit Bakterien versetztem PBS, welche unter gleichen Bedingungen 2 h mit Genatmicin inkubiert wurde und nach unverdünntem Auftragen auf LB-Agar-Platten kein Bakterienwachstum zeigte, bestätigt die Wirkung des Gentamicins. Nach der Gentamicinbehandlung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 700 x g, 5 min) und in sterile Lyseröhrchen (*Lysing Matrix Tube 2 ml*, MP Biomedicals) überführt. In einem Gewebehomogenisator *FastPrep-24* (MP Biomedicals) wurden die Zellen nun mechanisch zerkleinert, so dass überlebende intrazelluläre Bakterien frei werden konnten. 100 μ l dieser Suspension wurden nun unverdünnt und 1:10 verdünnt auf LB-Agar plattiert und über

Nacht inkubiert. Am folgenden Tag konnten die Bakterienkolonien ausgezählt werden und somit die Anzahl intrazellulär überlebender *E. coli* bestimmt werden.

2.2.3 Tierexperimentelle Untersuchungen

Alle tierexperimentellen Vorhaben erfolgten gemäß den Auflagen des *Thüringer Landesamtes für Verbraucherschutz*. Sie erhielten im Rahmen des Tierversuchsantrages 02-049/12 mit dem Kurztitel: „*Das Ubiquitin-Proteasom-System in der Peritonitis und Pneumonie*“ am 08.03.2013 mit dem Aktenzeichen 22-2684-04-02-049/12 ihre Durchführungsgenehmigung. Somit unterliegen alle im Zuge dieses Antrags erfolgten Versuche den Vorgaben des Tierschutzgesetzes. Die Experimente erfolgten in speziell für die Tierversuche geeigneten Infektionseinheiten der Schutzstufe 2 im Gebäude der Serviceeinheit Kleinnager des FZB. Alle Maßnahmen an den SOPF-Tieren wurden unter einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Nur sterile Gegenstände und Verbrauchsmaterialien wurden im Zuge der Tierversuche in der Infektionseinheit verwendet. Die Infektionseinheit wurde nach der Passage von Schleusen nur mit adäquater, den Reinraumbedingungen angepasster Arbeitskleidung betreten. Diese erforderlichen Maßnahmen erhöhten den Schutz der SOPF Tiere und deren Umgebung vor Kontaminationen und sorgten für die Gewinnung hochwertigen Probenmaterials im Zuge der Tierversuche. Die durchgeführten Versuche entsprechen einem offenen Studiendesign. Da die Versuchsplanung und das Einsetzen der unterschiedlichen Tiere in die Schutzstufe 2 Infektionseinheit allein der Doktorandin als versuchsdurchführende Person oblag, konnten die Versuchsgruppen nicht geblindet werden.

2.2.3.1 Versuchstiere

Wie unter 2.1.3.1 dargelegt, stammen die LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out-Mäuse, die für die im Folgenden beschriebenen Versuche genutzt wurden, aus der eigenen Zucht am FZB. Auch die aus ihnen zurückgekreuzten Einzel-Knock-Out-Mäuse (LMP7-K.O., MECL-1-K.O., PA28 $\alpha\beta$ -K.O.) wurden im FZB gezüchtet.

2.2.3.2 Haltung

Die Unterbringung der Mäuse während der Zucht, der Haltung und der tierexperimentellen Untersuchungen erfolgte in der Tierhaltung der Serviceeinheit Kleinnager des FZB unter fachgerechter Aufsicht von Tierpflegern. Die Haltung der Tiere entspricht einer SOPF-Tierhaltung. Das Gebäude ist in eine Infektionsseite für die Durchführung der Versuche und eine Seite für die SOPF-Haltung und Zucht untergliedert. Die strikte Trennung dieser Bereiche minimierte die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination der Tierhaltung mit unerwünschten Keimen. Die Mäuse wurden in Kleingruppen mit nicht mehr als fünf Tieren in Typ-2L Käfigen mit einer Bodenfläche von 530 cm² gehalten. Die Käfige waren mit Einstreu und Enrichment ausgestattet, welches ein Höhlenbau der Tiere zuließ. Es erfolgte eine *ad libitum* Fütterung von autoklaviertem Pelletfutter und Tränkwasser. Die Haltung unterlag einem 12-stündigen

Hell/Dunkel-Rhythmus und erfolgte unter gleichbleibenden Temperaturen von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von $55 \% \pm 10 \%$.

2.2.3.3 Zucht

Die Zucht der 3-fach-Knock-Out-Mäuse (LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -/-) beschränkte sich auf eine Erhaltungszucht, deren Umfang an den Bedarf weiblicher 9-11 Wochen alter Tiere für die geplanten Versuche orientiert war. Alle für die Experimente ausgewählten Tiere und Elterntiere für die Zucht wurden hinsichtlich des Knock-Outs der vier Gene (LMP7, MECL-1, PA28 α , PA28 β) durch Genotypisierung überprüft. Hierbei wurde aus Schwanzbiopsien DNA isoliert, in der durch Primer für die Knock-Out-Gene mittels PCR die Abwesenheit der Ziel-Sequenzen bestätigt wurde. Das genaue Vorgehen wird in Kapitel 2.2.3.12 und 2.2.3.13 detailliert beschrieben. Um die Einzel-Knock-Out-Mäuse aus den 3-fach-Knock-Out-Tieren heraus zu züchten, wurden die LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -/- mit C75BL/6J Wildtypen neu verpaart. Auch hier wurde eine umfangreiche Genotypisierung durchgeführt, um den genetischen Hintergrund jedes der Nachkommen aus dieser Zucht zu untersuchen. Nach intensiver Rückkreuzung konnten letztendlich heterozygote Einfach-Knock-Out-Mäuse verpaart werden, um eine stabile homozygote Zucht für die drei Mauslinien (LMP7-K.O., MECL-1-K.O., PA28 $\alpha\beta$ -K.O.) aufzubauen.

2.2.3.4 Mausmodell der *E. coli*-induzierten Peritonitis

Die Zielsetzung dieses Projekts war den Effekt des I-Proteasomes während der Gram-negativen *E. coli*-Sepsis zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde bei den Tieren per intraperitonealer Injektion mit extraintestinal pathogenen *E. coli* A247 des Serotyps O18:H7 eine Peritonitis induziert. Vorversuche mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen ergaben eine optimale Infektionsdosis von 8×10^5 KBE. Hierbei erkrankten die Tiere innerhalb weniger Stunden. Da dieses Modell einen äußerst schweren, perakuten Krankheitsverlauf abbildet und die Tiere zumeist schon nach 12 h die tierschutzrelevanten Endpunkte erreichten, war die Überwachung der Tiere in sehr kurzen Abständen und ein genaues, an das Modell angepasstes Monitoring unerlässlich. Während der Experimente wurden Knock-Out-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen verglichen und diese jeweils zu ihren gesunden Kontrollen. Die gesunden Kontrollen sind je nach Versuchsaufbau uninfizierte oder scheininfizierte Tiere. Uninfizierte Mäuse bilden den Zustand vor der Infektion ab, was bei der Untersuchung des Krankheitsverlaufes unerlässlich war. Mit 0,9%iger steriler Natriumchloridlösung scheininfizierte (*sham*-Kontrollen) Tiere wurden verwendet, um einen eventuellen Effekt der Trägersubstanz während der *E. coli*-Infektion auszuschließen. Diese zuletzt genannten Scheininfektionen wurden jedoch auf ein minimales Maß reduziert, da eine intraperitoneale Verabreichung von isotoner Natriumchloridlösung keinen erkennbaren Nebeneffekt hervorrief. Aus diesem Grund wurde auf diese zusätzliche Injektion und das damit verbundene Handling der Versuchstiere verzichtet.

Intraperitoneale Infektion mit E. coli A247

Die Anzucht der Bakterien erfolgte wie in 2.2.1.2 beschrieben. Abhängig von der Anzahl zu infizierender Mäuse wurde die Menge der einzusetzenden Bakterien errechnet. Die finale Infektionslösung wurde mit 0,9%iger Natriumchloridlösung auf eine Konzentration von 8×10^5 KBE/200 μ l eingestellt. Vor der Infektion wurde ein Teil der Lösung verdünnt und auf LB-Agar plattiert und inkubiert, um am folgenden Tag Aufschluss über die genaue Keimmenge zu geben. *Prä infectionem* wurde jedes Tier einer äußeren Untersuchung unterzogen, gewogen und die Rektaltemperatur gemessen. Wenn noch nicht in der Tierhaltung geschehen, wurden die Tiere individuell mittels Ohrstanze markiert. Die bei Raumtemperatur aufbewahrte isotone Infektionslösung wurde vor jeder Infektion gut gemischt, um die gleichmäßige Verteilung der Bakterien zu gewährleisten. 200 μ l der Infektionslösung wurden mit einer 27 G Kanüle in den kaudalen rechten Quadranten des Peritoneums der Mäuse injiziert. Die Tiere wurden nach der Injektion für 2-5 min in kleinen Boxen separiert und vor dem Transfer in den Käfig nochmals einer äußeren Untersuchung unterzogen. Werte und Befunde der Untersuchungen sowie die genaue Infektionszeit wurden dokumentiert. Im Anschluss wurde die verbliebene Infektionslösung, in entsprechender Verdünnung, auf LB-Agar plattiert und am nächsten Tag zur Überprüfung der Keimmenge ausgewertet.

Endpunkte

Als einheitliche Analysezeitpunkte während der tierexperimentellen Untersuchungen wurden die Zeiten 2 h, 6 h, 12 h und 52 h nach der Infektion (*p. i. = post infectionem*) gewählt. Außerdem wurden uninfizierte Kontrolltiere analysiert (0 h). Unabhängig von den für das Modell spezifisch ausgewählten Endpunkten, die für die meisten Versuche relevant waren, ergeben sich hinsichtlich des Krankheitsverlaufes tierschutzrelevante Endpunkte. Diese wurden erreicht, wenn das Leiden des Tieres ein ethisch vertretbares Maß überschritt. Während längerer Versuche (über 12 h), wie in den Letalitätsversuchen, mussten Tiere vor dem avisierten Ende des Versuches aus Gründen der Leidensbegrenzung tierschutzgerecht getötet werden. Durch ein engmaschiges Monitoring und ein auf das Modell angepasstes Benoten (Scoring) des Allgemeinzustandes der Tiere konnten diese tierschutzrelevanten Endpunkte zweifelsfrei erkannt und dokumentiert werden. Wenn ein Tier einen Endpunkt erreicht hatte, wurde es tierschutzgerecht getötet. In den meisten Fällen wurde dem Tier eine hohe Dosis Narkotikum i.p. injiziert (Ulmer Mix: 150 mg/kg KGW Ketamin und 15 mg/kg KGW Xylazin in einer Mischspritze, verdünnt mit 0,9%iger Natriumchloridlösung) und es anschließend durch Blutentzug getötet. Eine weitere Methode der tierschutzgerechten Tötung stellte die zervikale Dislokation dar. Diese wurde wegen einer erschwerten Gewinnung von Probenmaterial jedoch nur in bestimmten Fällen angewandt.

Klinischer Zustand und Allgemeinbefinden der Tiere

Mit Hilfe eines Bewertungssystems war es möglich die allgemeine Untersuchung der Tiere im Verlauf der Erkrankung zu standardisieren und zu dokumentieren. Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes Benotungssystem nach „Empfehlungen des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“. Aus dieser Benotungsmethode ergaben sich, bei spezifisch erreichten Punktzahlen, Handlungsanweisungen für den Untersucher. So zum Beispiel auch die Information wann ein Tier aus Gründen der Leidensbegrenzung aus dem Versuch genommen werden muss. In dem

Monitoringprotokoll (Tabelle 2-27) wurden die zu beurteilenden Parameter übersichtlich dargestellt. In jeder der sechs Kategorien konnte eine Punktzahl 0 bis 3 vergeben werden. Die Addition dieser Punkte reflektierte den Allgemeinzustand des Tieres. Ab der Punktzahl 10 war ein tierschutzrelevanter Endpunkt erreicht und das Tier musste unverzüglich getötet werden, um ihm weitere Leiden zu ersparen. Wenn ein Tier die Punktzahl 10 nicht erreichte, in einer der Kategorien jedoch mit einer 3 benotet wurde, musste es ebenfalls aus tierschutzrechtlichen Gründen aus dem Versuch ausgeschlossen und euthanasiert werden. Die Abstände des Monitorings gestalteten sich in diesem Modell variabel und wurden an den Versuchsvorhaben orientiert. Bei Versuchen, deren einziges Ziel die Erfassung des Krankheitsverlaufes über 52 h war, wurden die Tiere alle 4 h benotet. Für alle weiteren Versuche war der 12 h Zeitpunkt der wichtigste Monitoring-Punkt, da einige Tiere, vor allem die Knock-Out-Mäuse, den tierschutzrelevanten Endpunkt nach 12 h erreicht hatten. Ab 12 h mussten kürzere Monitoringintervalle von nicht mehr als 4 h eingehalten werden.

Untersuchung des Krankheitsverlaufes

Um den Krankheitsverlauf dieses Modells ausreichend zu charakterisieren, wurden zu Beginn der Untersuchungen sogenannte Letalitätsversuche vorgenommen. Hierbei wurden die Tiere wie beschrieben infiziert und anschließend alle 4 h nach dem oben angeführten Protokoll (Tabelle 2-28) benotet. Relevant war die genaue Dokumentation der Symptome im Krankheitsverlauf, einschließlich des Zeitpunktes an denen die Mäuse den tierschutzrelevanten Endpunkt erreicht hatten und aus dem weiteren Versuchsablauf ausgeschlossen wurden. Tiere die nicht erkrankten und somit überlebten, wurden zum Ende des Versuches (52 h) euthanasiert. Das Überleben der Tiere wurde anschließend mit einer Kaplan-Meier-Kurve grafisch dargestellt und mittel Log-rank-Test statistisch ausgewertet.

Tabelle 2-28: Monitoringprotokoll

Tiernummer: Versuchsbeginn: Ausgangsgewicht: Ausgangstemperatur:		Monitoring-Zeitpunkt: Datum <i>Zeit post infectionem</i>
Symptome	Punkte	
Keine Symptome	0	
Provozierte Reaktion		
Fluchtverhalten beim Öffnen des Käfigs	0	
Flucht erst bei sich nähernder Hand	1	
Flucht erst beim Anfassen	2	
Keinerlei Fluchtreaktion	3	
Äußere Erscheinung		
Normales, glattes Fell	0	
Struppiges Fell	1	
Nasses Fell	2	
Blässe (Augen, Ohren), bleibende Hautfalten, Leib hart oder gespannt	2	
Schleimige Augen, Leib hart und aufgetrieben	3	
Atmung		
Normal	0	
Schnell	1	
Langsam	2	
Atemnot (schwerfällig, unregelmäßig, stark pumpend)	3	
Verhalten		
Normal agil, neugierig	0	
Langsam, vorwiegend sitzende Position, Tier isoliert sich	1	
Matt, gekrümmt (Schmerzen), Gang schwankend	2	
Seitenlage	3	
Gewicht		
-5 %	0	
-10 %, ungewöhnliche Zunahme	1	
-15 %	2	
-20 %	3	
Rektaltemperatur		
- 1,0 °C	0	
- 1,5 - 2,5 °C	1	
- 2,5 – 4 °C	2	
- > 4 °C	3	
Körpermasse / - Rektaltemperatur-Bestimmung	[g] / [°C]	
Unterschrift		

2.2.3.5 Präparation und Probenentnahme

Die Präparation und Probengewinnung wurde im Zuge der für die einzelnen tierexperimentellen Untersuchungen festgelegten Endpunkte durchgeführt. Wie in 2.2.3.4 beschrieben, wurden die

Tiere mit einer tiefen *Ketamin/Xylazin*-Narkose betäubt und anschließend durch Blutentzug getötet. Alle Präparationen fanden in einer Reinraumwerkbank in der Schutzstufe 2-Infektionseinheit der Serviceeinheit Kleinnager statt.

Präparation der Versuchstiere

Wurde ein Endpunkt während eines Versuchs erreicht, wurde das Tier einer allgemeinen klinischen Untersuchung unterzogen. Die Befunde, wie auch das Körpergewicht und die Rektaltemperatur, wurden dokumentiert und das Tier mit Hilfe der Scoresheets (Tabelle 2-28) final benotet. Nun erfolgte die i. p. Injektion der *Ketamin/Xylazin*-Narkose und die darauf folgende Narkoseüberwachung. Erst nach Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe, überprüft mittels Zwischenzehenreflex, wurde das Operationsfeld desinfiziert (*Softasept[®]N*, Braun). Die Maus wurde dazu in Rückenlage auf einer sterilen Styroporunterlage fixiert. Durch einen medianen Hautschnitt wurde nun großzügig die Haut samt Fell entfernt. Dies geschah vor Öffnung des Peritoneums, um Kontaminationen der sterilen Bauchhöhle zu vermeiden. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde das Darmkonvolut nach rechts verlagert, um die *Vena cava caudales* freizulegen. Die zur Blutentnahme verwendete 27 G Kanüle und 1 ml Spritze wurde zuvor mit Antikoagulantien gespült (2500 I.E./ml Heparin oder 25,6 mg/ml EDTA, steril filtriert), um die Blutgerinnung zu verhindern. Mit der 90° gebogenen 27 G Kanüle wurde nun Blut aus der *Vena cava caudalis* entnommen. Durch den massiven Blutverlust erliegt das Tier sofort einem Herz- und Kreislauf-Stillstand. Im Anschluss wurde das Diaphragma inzidiert und von der Thoraxwand gelöst. Mit einem Längsschnitt wurde der Thorax eröffnet und über den linken Ventrikel des Herzens mit 4 °C kaltem, sterilem PBS der große Kreislauf gespült. Über den rechten Ventrikel erfolgte die Spülung der Lunge. Die Organe wurden nun entsprechend ihrer weiteren Bestimmung entnommen und gelagert. Bei der Entnahme der Nieren wurde vor deren Lagerung die Nierenkapsel entfernt. Für Analysen der Leber wurden jeweils Gewebestücke der *Lobi lateralis sinister* und *medialis dexter* entnommen. Um den Herzmuskel in weiteren Untersuchungen zu analysieren, wurde die *Apex cordis* entnommen. Die Lunge wurde in ihren zwei Hälften separiert entnommen, frei von mediastinalen Lymphknoten und Thymusgewebe. Auch bei der Gewinnung der Milz wurde auf die Entfernung von umliegendem Viszeralfett geachtet. Einzig die Entnahme der Organe für die histologische Aufarbeitung erfolgte nach einem anderen Protokoll (siehe 2.2.3.5 *Organentnahme für die histologische Untersuchung*).

Peritoneale Lavage und Zellquantifizierung

Nach Erreichen der adäquaten Narkosetiefe und Desinfektion des Operationsbereiches wurde die Haut und Muskulatur caudal des *Processus Xyphoideus* inzidiert. Durch das intakte Peritoneum wurde mit einer 25 G Kanüle 3 ml kaltes, steriles PBS injiziert. Nach 20 Sekunden leichter Massage des Abdomens wurde die Abdominalwand mit einer Pinzette angehoben und mit einer 25 G Kanüle die Flüssigkeit abgesaugt. Verbliebene Flüssigkeit wurde nach der medianen Eröffnung des Peritoneums mit einer sterilen Transferpipette entnommen. Nach der Lavage wurde die Maus durch finalen Blutentzug aus der *Vena cava caudalis* getötet. Die Lavageflüssigkeit wurde auf Eis gelagert und die gesamte Anzahl der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer und Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Die Gesamtzahl der Leukozyten in der Peritonealflüssigkeit (PF) wurde zusätzlich mit dem *Auto Hematology Analyzer BC-5300 Vet* (mindray) während der Blutanalyse verifiziert. Für die mikroskopische Quantifizierung der Zellpopulationen wurden nun Zytozentrifugate hergestellt. Um die Zellen per

Zytozentrifugation auf Objektträger zu pressen, wurde auf dem Objektträger eine Filterkarte mit einer runden Aussparung befestigt, über der ein Trichter eingespannt wurde. Der Filter wurde anschließend mit 100 µl PBS über den Trichter angefeuchtet. Nach kurzer Einwirkzeit wurden nun 100 µl, der auf 1×10^6 Zellen/ml konzentrierten Lavageflüssigkeit, in den Trichter gegeben. Die Objektträger mit den festgespannten Filtern und Trichtern, wurden anschließend bei Raumtemperatur 5 min und bei 1300 U/min mit der *Shandon Cytospin 4* (Thermo Fisher) zentrifugiert. Nach Trocknung der Objektträger von mindestens 20 min wurden die Zellen mit dem *Diff-Quick-Färbekit* (Medion Diagnostiks) (5 sec in Fixierlösung, 5 sec in Färbelösung I, 5 sec in Färbelösung II, Spülen unter Leitungswasser) angefärbt. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, konnten die Zellen mikroskopisch analysiert werden.

Organentnahme für die histologische Untersuchung

Abweichend von dem in 2.2.3.5 *Präparation der Versuchstiere* beschriebenen Protokoll wurde bei der Entnahme der Organe für die Histologie bei den Tieren eine Tracheotomie durchgeführt. In die Inzision der Trachea, caudal des Larynx, wurde eine Trachealkanüle eingeführt und mit einer Ligatur um die Trachea fixiert. Das Tier wurde nun mit einem Beatmungsgerät für Kleinnager *MiniVent* (Hugo Sachs Elektronik) beatmet (Atemzugvolumen: 200 µl, Atemfrequenz 150 Atemzüge/min). Nach medianer Laparotomie wurden durch das Diaphragma 50 µl Heparin (2500 I.E./ml) in die rechte Herzkammer injiziert. Anschließend wurde das Tier durch Blutentzug über die Vena cava caudalis getötet. Nach medianer Thorakotomie wurden die Milz, Nieren und die Leber über die linke Herzkammer mit PBS gespült und anschließend entnommen. Die Organe wurden in verschlossenen Einbettkassetten in 4%igem Formalin bei 4 °C lichtgeschützt, mindestens 24 h fixiert. Die Lunge wurde ohne Spülung inklusive des Thymusgewebes, den mediastinalen Lymphknoten und der Trachea vorsichtig aus dem Thorax präpariert. Mit Hilfe der Trachealkanüle konnte die Lunge nun 20 min mit 4%igem Formalin gefüllt werden. Die Aufhängung der Lunge erfolgte unter einer 20 ml Flüssigkeitssäule. Anschließend wurde auch die Lunge in einer Einbettkassette bei 4 °C lichtgeschützt in 4%igem Formalin fixiert.

2.2.3.6 Histologie

Entwässern und Einbetten

Die in beschrifteten Einbettkassetten gelagerten Organe wurden 2 h unter laufendem Leitungswasser gespült. Anschließend durchliefen die Proben, in einen Korb gestapelt, in dem *Shandon Citadel 1000* (Thermo Fisher) die aufsteigende Alkoholreihe. Dazu wurden die Proben automatisch in einen Behälter mit 50%igem Ethanol, dann in 70%igem Ethanol, 2 x in 96%igem Ethanol und 2 x in 100%igem Ethanol getaucht. Anschließend wurden sie 2 x in Methylbenzoat und 2 x in Toluol getaucht, um final in einen Behälter mit flüssigem Paraffin bis zur Einbettung zu verweilen. Dieses automatisierte Verfahren benötigte insgesamt 17,5 h und fand unter einem Chemikalienabzug statt. Nach der Entwässerung der Proben wurden diese mit der *Paraffineinbettstation Leica EG1150H* eingebettet. Hierbei wurden die Organe in mit flüssigem Paraffin (Schmelzpunkt 56 °C) gefüllten Formen in die richtige Position gebracht und in den beschrifteten Einbettkassetten fixiert. Das flüssige Wachs in den Formen wurde auf

einer Kühlplatte zum Aushärten gebracht. Anschließend konnten die Formen entfernt werden und die Paraffinblöckchen mit den Organen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Anfertigen von Paraffinschnitten

Mit dem *Rotationsmikrotom HM 355S* (Thermo Fisher) wurden 3 µm dünne Paraffinschnitte gefertigt. Die Paraffinblöckchen wurden zuvor auf Eis gelagert, um das Schneiden zu erleichtern. Die Schnitte wurden anschließend aus dem warmen Streckbad auf beschriftete Objektträger (*Superfrost Ultra Plus*, Thermo Fisher) überführt und konnten nach der Trocknung in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur gelagert werden. Mit Ausnahme der Lungenproben wurden die histologischen Proben der Leber, Milz und Nieren von der Doktorandin angefertigt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung einiger Proben wurde nach dem beigefügten (Tabelle 2-29) Färbeprotokoll durchgeführt. Dazu wurde ein Trägereinsatz mit den Objektträgern bestückt und in die mit Chemikalien gefüllten Färbeküvetten getaucht. Alle Arbeiten wurden unter einem Chemikalienabzug vorgenommen. Die histologische Auswertung dieser gefärbten Schnitte erfolgte mit dem Mikroskop *Axio Vert. AI* (Zeiss). Weitere Paraffinschnitte und HE-Färbungen sowie die histologisch-pathologische Befundung von Niere-, Leber- und Milz-Proben wurden von PD Dr. med. Nicolas Schröder am *Institut für Pathologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald* vorgenommen. Die Paraffinschnitte und HE-Färbungen, sowie Giemsa- und Ladewig-Färbungen und die histologisch-pathologische Auswertung der Lungenproben, des Thymus und mediastinaler Lymphknoten wurden im *Institut für Tierpathologie an der Freien Universität Berlin* von der Veterinärmedizinerin Kristina Dietert, PhD durchgeführt.

Beurteilung der histologischen Befunde

Die Gesamtbetrachtung der histologischen Befunde der Lunge, des Thymus und der mediastinalen Lymphknoten für die verschiedenen Tiergruppen wurde im *Institut für Tierpathologie an der Freien Universität Berlin* von der Veterinärmedizinerin Kristina Dietert, PhD vorgenommen. Nach Betrachtung aller Einzelproben wurden die Befunde als minimal, geringgradig, mittelgradig und hochgradig eingestuft (Gradierung 1-4). Dabei wurde der Zustand der Pneumonie mit diesen vier Abstufungen gesondert betrachtet. Besonderes Augenmerk bekam hier die Verteilung, der Schweregrad sowie Purulenz und Nekrosen der Pneumonie. Weiterhin wurde der Grad der bakteriellen Besiedlung des Thymus, der Schweregrad von Thymitis und Lymphknotennekrosen sowie eine Benotung der Menge an Gefäßthromben vorgenommen. Die unabhängige Beurteilung der Niere, Leber und Milz wurde vom Humanpathologen PD Dr. med. Nicolas Schröder am *Institut für Pathologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald* vorgenommen. Ohne exakte Graduierung wurde hier eine abschließende Gesamtbeurteilung der Organe von verschiedenen Mausgruppen vorgenommen, welche eine klare Schlussfolgerung über den Schweregrad der Erkrankung in den einzelnen Organen der Tiergruppen zulässt. Für die Beurteilung der Leber wurden Befunde wie zentrolobuläre entzündliche Foki, septische Herde, Parenchymnekrosen und Mikrothromben bewertet. Der Schweregrad der pathologischen Befunde der Milz wurde über das Auffinden von Mikrothromben in Milzsinusoiden und entzündlichen Foki im Parenchym gestellt. Die Niere wurde auf tubuläre Nekrosen, septische Streuherde und Zirkulationsstörungen hin untersucht und beurteilt.

Tabelle 1-29: HE-Färbeprotokoll

Chemikalien	Dauer
Xylol	5 min
Xylol	5 min
100 % Ethanol	3 min
100 % Ethanol	3 min
96 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min
50 % Ethanol	3 min
Aqua dest.	3 min
Aqua dest.	3 min
Hämalaun	20 min
Leitungswasser	2 min spülen
Leitungswasser	7 min
Eosin	1,30 min
Aqua dest.	schwenken
50 % Ethanol	schwenken
70 % Ethanol	schwenken
96 % Ethanol	schwenken
100 % Ethanol	3 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min
Xylol	Ohne Zeitangabe
Shandon Hypermount (E-Z Mount)	eindeckeln

2.2.3.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, der nach dem Histologieprotokoll (2.2.3.5) entnommenen Organe wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Annette Moter vorgenommen (*Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Biofilmzentrum des Deutschen Herzzentrums*). Das Prinzip der Methode ist die Koppelung von spezifischen Sonden an rRNA der Mikroorganismen in den Gewebeschnitten. Die Sonden wurden mit einem Fluorophor verbunden und können so mit einem Epifluoreszenzmikroskop mit Bandpass-Filtersätzen detektiert werden (Moter et al. 1998). Die Fixierung der Proben erfolgte in einem formaldehydhaltigen Puffer. Anschließend wurden die Organe in *Technovit 8100* (Heraeus Kulzer), einem Kunstharz, nach dem Protokoll des Herstellers eingebettet. Mit einem Rotationsmikrotom wurden nun 2 µm dünne Schnitte hergestellt und auf Objektträger verbracht. Während der anschließenden Hybridisierung wurde die formamidhaltige (40 %) Hybridisierungslösung, welche auch die Sonden und den Fluoreszenzfarbstoff DAPI enthält, auf die Schnitte gegeben und 2 h inkubiert. In Tabelle 2-30 sind die verwendeten Sonden und Fluorophore aufgelistet. Sobald die Proben getrocknet sind, werden sie mit *Vectashield*[®] Eindeckmedium (Biozol) eingedeckelt. Als separate Positivkontrolle diente ein Objektträger mit Ethanol fixierten *E. coli*, welche ebenfalls hybridisiert wurden. Die interne Negativkontrolle

jeder Probe wurde über die Verwendung der NON338-Sonde generiert. Diese gibt ein rotes Signal (Cy5), wenn eine unspezifische Bindung an degradierte Nukleinsäuren oder anderes organisches Material vorliegt. Somit konnten falsch-positive Signale ausgeschlossen werden. Die Bindung von Cy3 (oranges Signal) an *E. coli* wurde über die EUB338-Sonde hergestellt. Hierbei handelt es sich um eine panbakterielle Sonde, welche an die 16S rRNA der meisten Eubakterien bindet. Zur Orientierung im Gewebe wurden die Schnitte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt, welcher an die DNA der Bakterien und Zellen bindet und ein blaues Signal generiert. Für die Auswertung der Proben wurde ein Epifluoreszenzmikroskop *Axioplan 2* (Zeiss) mit der Ausstattung einer Digitalkamera *AxioCamMRm* (Zeiss) und Bandpassfiltern (AHF Analysetechnik AG Tübingen) verwendet. Die Proben wurden in den Kanälen FITC, DAPI, Cy5, Cy3 mit 100-facher und 1000-facher Vergrößerung bewertet und aufgenommen, um sie zu einem Gesamtbild zusammenzufügen. Mit Hilfe dieser Bilder konnte keine Quantifizierung der *E. coli* in den Geweben vorgenommen, jedoch die Lage der Bakterien in den Organen bestimmt werden.

Tabelle 2-30: FISH-Sonden

Sonde / Fluorophor	Funktion
EUB338-Sonde / Cy3 (orange)	Panbakterielle Sonde, erkennt fast alle Eubakterien (Amann et al. 1990)
NON338-Sonde / Cy5 (rot)	Antisense-Sequenz zu EUB338, erkennt unspezifische Sondenbindung (Wallner et al. 1993)
Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau)	Interkaliert in DNA-Helix der Bakterien und Zellkerne

2.2.3.8 Bestimmung der bakteriellen Last

Bakterienlast in Blut und peritonealer Lavageflüssigkeit

6 h und 12 h nach der *E. coli*-Infektion wurde an den Mäusen, wie in 2.2.3.5 beschrieben, eine peritoneale Spülung mit 5 ml sterilem PBS durchgeführt. Die Lavageflüssigkeit wurde in entsprechenden, von der Infektionszeit und dem Krankheitsgrad abhängigen Verdünnungsstufen auf LB-Agar plattiert und inkubiert. Am Folgetag wurde die Menge der KBE pro ml Lavageflüssigkeit unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen und der eingesetzten Probemenge errechnet. Nach der Peritonealspülung wurde die Maus durch finalen Blutentzug mit einer heparinisierten Kanüle getötet. Wie die Peritonealflüssigkeit wurde auch das Vollblut in Verdünnungsstufen ausplattiert, inkubiert und am folgenden Tag ausgewertet. Letztendlich wurde auch hier die Menge der KBE in 1 ml Blut bestimmt.

Bakterienlast in den Organen

Nach der peritonealen Spülung und dem Blutentzug wurden aus den Versuchstieren Milz, Niere, Leber, Herz und Lunge in toto entnommen. Alle Organe wurden vor der Entnahme mit sterilem PBS gespült, um Rückstände von Blut, welches eine hohe Bakterienlast aufwies, zu entfernen. Alle Organe wurden äußerlich in steriler, kalter PBS-Lösung gewaschen, um auch von außen anhaftendes Blut zu entfernen. Anschließend wurden die Organe in, mit 1ml PBS gefüllte Lysing-Matrix-Röhrchen überführt. Die Leber und Milz wurden wegen ihrer hohen

Bakterienlast exakt geteilt und nur zur Hälfte in die Lysing-Matrix-Röhrchen gegeben, mit denen sie in einem Gewebehomogenisator lysiert wurden. Anschließend wurden Verdünnungsstufen dieser Homogenate auf LB-Agar plattiert und inkubiert. Die Menge der KBE wurde am Folgetag bestimmt und unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenmenge und Verdünnungsstufe auf das gesamte Organ hochgerechnet.

2.2.3.9 Blutanalyse

Leukozytendifferenzierung und Quantifizierung im peripheren Blut

Für die Bestimmung der Menge verschiedener Leukozytenpopulationen im peripheren Blut wurde bei den narkotisierten Mäusen mit einer heparinisierten Mikro-Hämatokrit-Kapillare retrobulbär 50 µl Vollblut gewonnen, welches mit dem *Auto Hematology Analyzer BC-5300 Vet*, mindray (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ilse Jacobsen, *Mikrobielle Immunologie, Hans-Knöll-Institut, Jena*) untersucht und die Blutzellpopulationen quantifiziert wurden. Von jeder Blutprobe wurde ein zusätzlicher Blutausstrich angefertigt, um die Ergebnisse des *Hematology Analyzers* zu verifizieren. Die luftgetrockneten Ausstriche wurden nach Pappenheim (Tabelle 2-6) gefärbt. Dafür wurden die Schnitte 10 min mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit May-Grünwald-Färbelösung 7 min gefärbt. Nachdem die erste Färbelösung einige Sekunden abtropfte, wurden die Ausstriche 20 min mit Giemsa-Färbelösung gefärbt. Schließlich wurden die Objektträger kurz in der Pufferlösung gewaschen und anschließend 2 x 4 min in Pufferlösung getaucht. Die Ausstriche konnten nun mikroskopisch (*Axio Vert. A1*, Zeiss) ausgewertet werden, wobei 200 Zellen pro Probe ausgezählt und den Populationen zugeordnet wurden. Die Färbung nach Pappenheim ermöglichte ein Differenzieren der Zellen, durch die Färbung basophiler, eosinophiler und neutrophiler Strukturen.

Blutchemische Analyse

Es wurden folgende Parameter untersucht: Laktatdehydrogenase (LDH), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT oder auch AST), Albumin, Harnstoff (BUN=blood urea nitrogen) und Kreatinin (Krea). Wie in 2.2.3.5 beschrieben, wurde das Blut aus der *Vena cava caudalis* gewonnen. Für eine optimale Analyse des Plasmas wurde das Blut mit 1,2 ml Lithium-Heparin-Monovetten (Sarstedt) und einer 27 G Kanüle entnommen. Nun wurde das Vollblut bei 1000 x g 10 min zentrifugiert, um anschließend das Plasma zu separieren. Bis zur endgültigen Messung wurde das Plasma bei -80 °C gelagert. Mit dem *Fuji DRI-CHEM 3500i*, Fujifilm Europe (zur Verfügung gestellt von PD Dr. R. Claus, *Experimentelle Anästhesie, Universitätsklinikum Jena*) wurden die Parameter mittels Trockenchemie analysiert. Die Blutglukoselevel wurden direkt während der Präparation der Tiere mit einem Tropfen Vollblut auf einem *Free Style Lite* Teststreifen (Abbott) mittels zugehörigem *Free Style Lite* Glukosemessgeräte (Abbott) in mg/dl bestimmt. Da es sich um ein humanes Monitoring-Testsystem mit geringer Sensitivität handelt, konnten die Ergebnisse nur als Anhaltspunkt dienen.

2.2.3.10 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen (FACS-Analysen) wurden an dem *Attune acoustic focusing cytometer* (Life technologies) durchgeführt. Sämtliche Antikörperverdünnungen und Waschschriffe wurden mit gekühltem FACS-Puffer (PBS mit 2 % FCS) vorgenommen. Für die Färbung einer Probe mit bis zu sechs Antikörpern sind Einzelfärbungen dieser Antikörper mit den gleichen Zellen unerlässlich. Sie dienen der Kompensation, falls sich verschiedene Fluorophore in der Wellenlänge des von ihnen emittierten Signals überlagern. Die Versuchsplanung welche Fluorophore kompensiert werden müssen, erfolgte mit dem *BD Fluorescence Spectrum Viewer, A Multicolor Tool*. Das gemessene Signal jedes verwendeten Antikörpers wurde auf seine Isotyp-Kontrolle berechnet, um unspezifische Reaktionen des Antikörpers auszuschließen. Die Datenanalyse der generierten *fcs*-Dokumente erfolgte mit der *FlowJo* Software (TreeStar Inc.).

Analyse aus peritonealer Flüssigkeit isolierter Leukozyten

Wie unter 2.2.3.5 dargestellt wurde aus scheininfizierten und infizierten Mäusen nach 12 h Peritonealflüssigkeit gewonnen. Für die Kultivierung der Peritonealmakrophagen bereits beschrieben (2.2.2.1), wurden nun mit ACK-Lyse-Puffer die Erythrozyten lysiert und anschließend alle lebenden Zellen pro Probe ausgezählt. Die Färbungen für die Durchflusszytometrie wurden in 96-Kammer-Spitzbodenplatten vorgenommen. In jedes *Well* wurden 250 000 Zellen in 250 µl FACS-Puffer (PBS mit 2 % FCS) eingesät. Nun wurden die Zellen mit dem *Fixable Viability Dye eFluor® 780* (eBioscience), 1:10 000 eingesetzt, gefärbt. Dieser Farbstoff wurde nach 15 minütiger Inkubation auf Eis und unter Lichtschutz durch die 5 minütige Zentrifugation der Platte bei 4 °C und 250 x g entfernt. Dazu wurde der Überstand nach der Zentrifugation abgeschlagen und die Zellen in frischem FACS-Puffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Puffers wurden 100 µl PFA (2%ig) für eine 30 minütige Fixierung zu den Zellen gegeben. Das PFA wurde anschließend von den Zellen gewaschen, welche nun mit 50 µl *Fc-Block*, eBioscience (Rat Anti-Mouse CD16/CD32) in der Konzentration 0,1 µg/100 µl behandelt wurden. Nach 5-10 minütiger Vorinkubation mit *Fc-Block* wurden die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (siehe Tabelle 2-9) in der entsprechenden Verdünnung zu den Zellen gegeben, welche 30 min auf Eis inkubierten. Der Antikörper Mastermix wurde durch anschließendes Waschen von den Zellen entfernt, welche final in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen wurden.

Analyse aus der Milz isolierter Lymphozyten

Während des Probenzuges wurde den Versuchstieren die Milz entnommen, gewogen und exakt geteilt. Eine Hälfte wurde für die Lymphozytengewinnung genutzt. Dafür wurde die Milz in einem Zellsieb (40 µm) auf einem 50 ml-Röhrchen mit dem Stempel einer 10 ml Spritze zerkleinert. Mit kaltem FACS-Puffer wurden die vereinzelter Zellen durch das Sieb in das 50 ml-Röhrchen gespült. Anschließend wurden die Röhrchen zentrifugiert (200 x g 5 min bei 4 °C), der Überstand abgesaugt und eine zweimalige ACK-Erythrozyten-Lyse durchgeführt (5 ml ACK-Lyse Puffer, 5 min, mit 20 ml kaltem PBS Reaktion abstoppen). Nun wurde die Anzahl lebender Zellen in jeder Probe bestimmt und 250 000 Zellen in 250 µl FACS-Puffer, je Kammer einer 96-Kammer-Spitzbodenplatte eingesät. Anschließend folgte nun die Fixierung und Färbung der Zellen.

2.2.3.11 RNA-Extraktion

Alle Reaktionsgefäße, die für die Extraktion von mRNA oder deren Lagerung genutzt wurden, sind RNase-frei (Eppendorf). Auch die verwendeten Pipettenspitzen und steriles Wasser für Verdünnungen, gelten als frei von RNasen. Vor Beginn der Extraktion und der Arbeit mit RNA wurde der Arbeitsplatz gründlich mit RNase AWAY® (Roth) gereinigt.

mRNA-Extraktion aus Leber, Milz, Niere und Lunge

Die mRNA aus Leber, Milz, Niere und Lunge wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) extrahiert. Dies erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die bei -80 °C stabil gelagerten Gewebe wurden in entsprechender Menge (halbe Niere, halbe Lunge, halbe Milz; 0,05 g Lebergewebe) in $700\ \mu\text{l}$ *RLT-Buffer* (Qiagen) und $2\ \text{M}$ DTT homogenisiert (Gewebehomogenisator). Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Organhomogenat aus den RNase-freien *Lysing-Matrix*-Röhrchen in $1,5\ \text{ml}$ Reaktionsgefäße gegeben und bei höchster Umdrehung 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Dieser Schritt stellte sicher, dass sich in dem gewonnenen Überstand keine größeren Gewebestücke befanden, die das spätere Filtrieren der Lösung behindern könnten. Das Organhomogenat wurde anschließend mit 1 Volumen Ethanol (70 %) gründlich gemischt. Die Vernetzung der RNA mit dem Ethanol garantiert die Bindung dieser an die Filter der *RNeasy Mini Spin Columns* (Qiagen), in welche das Probengemisch überführt wurde. Nach der Zentrifugation des Alkohol-Proben-Gemisches befand sich die RNA auf dem Filter der *Spin Columns* und der zu verwerfende Durchfluss unterhalb des Filters. Die RNA wurde nun mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) aufgereinigt und mittels DNase-Verdau von genomischer DNA befreit (*RNase-Free DNase Set*, Qiagen). Letztendlich wurde die RNA mit $40\ \mu\text{l}$ Wasser durch Zentrifugation aus den Filtern eluiert und in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

mRNA-Extraktion aus Herzmuskel

Da es sich bei Herzmuskelgewebe um ein schwer aufschließbares Gewebe handelt, wurde die mRNA in diesem Fall mit einem spezifischen Kit extrahiert und aufgereinigt (*RNeasy Plus Universal Kit*, Qiagen). Die *Lysing-Matrix*-Röhrchen wurden hier mit $900\ \mu\text{l}$ *QIAzol® Lysis Reagent* (Qiagen) befüllt und die Herzspitzen darin homogenisiert. Nach dem Überführen des Homogenats in neue Reaktionsgefäße wurde nach genauen Angaben des zu dem Kit gehörigen Protokolls die Aufreinigung der RNA und Elimination der genomischen DNA vorgenommen.

mRNA-Extaktion aus Mausblut

Bei der Extraktion der RNA aus Vollblut ist in erster Linie die Stabilisierung und Erythrozytenlyse des gewonnenen Blutes zu beachten. Dies erfolgte durch die Blutentnahme mit *Additiv* (Pax Gene, Qiagen), einem Stabilisierungs- und Lysepuffer, der im Verhältnis 4:1 dem gewonnenen Blut beigemischt wurde. Das so stabilisierte Blut konnte über einen Zeitraum von mehreren Wochen bei -80 °C gelagert werden. Vor der Weiterbearbeitung des gefrorenen Blutes taute es 2-3 h bei Raumtemperatur auf. Anschließend wurde das Blut 10 min bei $4000\ \text{x g}$ in einer Zentrifuge mit Ausschwenkrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit $4\ \text{ml}$ Wasser gelöst. Nun wurden für alle weiteren Aufreinigungsschritte die Instruktionen des *PAXgene Blood RNA Kit-Protocols* (Qiagen) befolgt. Die Elimination der genomischen DNA erfolgte auch hier, wie in 2.2.3.11 bereits erwähnt, mit dem *RNase-Free*

DNase Set (Qiagen). Nach Gewinnung der RNA wurde diese mit dem *GLOBINclear-Kit* (Invitrogen) weiter aufgereinigt und das Globin, welches etwa die Hälfte der Probe darstellte, entfernt. Die Globinaufreinigung wurde ebenfalls nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Bei der Gewinnung von im Mittel 500 µl Vollblut aus den Mäusen konnte nach allen Aufreinigungsschritten eine Menge von 2 – 10 µg reine RNA gewonnen werden.

Bestimmung der mRNA-Konzentration

Letztendlich wurden alle RNA-Proben mit dem *NanoDrop D-1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher) auf ihre Reinheit und Konzentration geprüft. Nach der Bestimmung des Leerwertes im Gerät mit dem entsprechenden Eluenten der Proben, wurde mittels spektrophotometrischer Analyse von 1,5 µl Probe die Reinheit und die Konzentration der gemessenen Probe angegeben. Das Gerät misst für die Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren die Probenabsorbanz bei 230 nm, 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm. Das Verhältnis von 260/280 nm sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Wurde ein niedrigerer Wert gemessen liegt eine Verunreinigung mit Proteinen, Phenolen oder anderen, nah bei 280 nm absorbierenden Stoffen vor. Das Verhältnis von 260/230 nm sollte auch bestenfalls zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Ist der Wert niedriger befinden sich mit aufgereinigte Kontaminanten in der Probe. Die Konzentration wurde über die Probenabsorbanz bei 260 nm berechnet und in ng/µl angegeben.

2.2.3.12 DNA-Isolation

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Der Verdau der Biopsie wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 320 µl *Tail-Puffer* und 30 µl *ProteinaseK* (Merck) angesetzt. Die Proben wurden zur Inkubation 2 bis maximal 4 h auf einem 57 °C warmen Heizblock mit 600 rpm geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation der Proben (höchste Umdrehung, 10 min bei Raumtemperatur) wurde der Überstand und 300 µl Isopropanol in neue Reaktionsgefäße gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl 70 % Ethanol aufgenommen. Durch eine weitere Zentrifugation und das Verwerfen des Überstandes blieb nun ein Pellet im Reaktionsgefäß zurück. Das Pellet wurde nach erfolgter Trocknung in 100 µl Tris-HCl-Puffer (10 mM) gelöst und für 30 min bis maximal 3 h auf dem Heizblock (54 °C) mit 600 U/min geschüttelt. Die isolierte gDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3.13 Polymerase-Kettenreaktion

Reverse Transkriptase Reaktion

Um mittels quantitativer PCR die Genexpression in den gewonnenen Proben zu ermitteln, wurde die, wie in 2.2.3.11 beschrieben, extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben. Dieses Vorgehen erfolgte mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* (Applied Biosystems®) und wurde nach Herstellerangabe durchgeführt. Während der Reaktion wandelt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase), mittels RNA-Polymerase-Aktivität die RNA in einen RNA-DNA-Hybridstrang, von dem durch die zusätzliche Exoribonuklease-Aktivität der Polymerase, der RNA-Anteil abgebaut wurde. Durch die DNA-Polymerase-Aktivität des Enzyms wurde aus dem verbliebenen DNA-Einzelstrang ein DNA-Doppelstrang synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurden 1,5 µg RNA/19,8 µl DNase-freies Wasser in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen (life technologies) eingesetzt. Für die Reaktion wurden 10,2 µl des Mastermixes (siehe Tabelle 2-15) hinzugegeben. Das totale Volumen, der für die Reaktion eingesetzten Mischung, betrug letztendlich 30 µl. Als Negativkontrolle (RT-negativ-Probe) wurde die Reaktion mit 10,2 µl DNase-freiem Wasser, anstatt des Mastermixes, durchgeführt. Dies gab in der PCR Aufschluss über eine eventuelle Kontamination der Proben mit genomischer DNA. Die eigentliche cDNA-Synthese lief nun in einem *Thermal Cycler MJ Mini* (Bio-Rad) bei folgendem Programm ab: 10 min bei 25 °C: Primerhybridisierung, 120 min bei 37 °C: Transkriptasereaktion und 5 sec bei 85 °C: Hitzeinaktivierung des Enzyms, unbestimmte Zeit bei 4°C: Abkühlung. Das cDNA-Produkt wurde mit 0,5 x Tris-EDTA-Puffer auf ein totales Volumen von 180 µl gebracht und bei -20 °C gelagert.

quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR, welche der Erfassung relativer Genexpression der zu untersuchenden Gene diene, wurde mit der *Corbett Rotor Gene 6000* (Qiagen) durchgeführt. Hierbei wurde jede Probe als Duplikat mit einem totalen Reaktionsvolumen von 20 µl gemessen. Die zu messende Probe setzte sich aus 4 µl cDNA und 16 µl Mastermix (siehe Tabelle 2-16) zusammen. Bestandteil des Mastermixes ist das jeweilige Primerpaar, des zu analysierenden Genes und das *SensiMix™ SYBR® No-ROX Kit* (Bioline). Der *SensiMix™* beinhaltet alle weiteren für die Reaktion essentiellen Bestandteile, wie unter anderem den *SYBR® Green I* Farbstoff und dNTPs. Das Pipettieren des Mastermixes und der zu analysierenden Probenmischungen in *Corbett qPCR-tubes* (Qiagen) wurde mit einem *Roboter CAS-1200* (Qiagen) durchgeführt. Dieses Verfahren zeichnete sich durch ein sehr hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Genauigkeit aus. Zusätzlich wurde die Messung der Proben durch das rotierende, zentrifugierende Verfahren der *Corbett Rotor Gene 6000* präzisiert. Ein RT-qPCR Lauf begann mit der Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95 °C für 15 sec. Anschließend folgten 40 Zyklen mit der Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden, dem Primer-Annealing bei 60 °C für 20 Sekunden und der Elongation bei 72 °C für 20 Sekunden. Für die Zuverlässigkeit der Analysenresultate war es unumgänglich die Primerspezifität durch Beurteilung der Schmelzkurvenanalyse und Verifikation der Produktgröße durch eine Gelelektrophorese zu bestätigen. Auch die Ermittlung der PCR-Effizienz (E) (Pfaffl 2001) mit dem verwendeten Primerpaar sowie die Kontrolle auf eventuell vorhandene Primer-Dimer während der Reaktion (Kubista et al. 2006) sind nötig, um die Ergebnisse auszuwerten. Rohdaten für die spätere Auswertung der Reaktion stellen die Ct-Werte (cycle threshold-Werte)

dar. Dieser Wert beschreibt den Zyklus in dem die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes *SYBR[®] Green I* erstmals signifikant oberhalb des Hintergrundlevels bestimmbar war und wurde in der exponentiellen Phase der Reaktion gemessen. Mit Hilfe der *Rotor Gene 6000 Software* (Qiagen) wurden die Ct-Werte gegen die Fluoreszenz in einem Diagramm ausgegeben. Die relative Quantifizierung (R) des Zielgenes wurde über folgende nach Pfaffl 2001 modifizierte Formel errechnet:

$$R = \frac{(E \text{ target})^{\Delta CT \text{ target (uninfiziert-infiziert)}}}{(E \text{ ref})^{\Delta CT \text{ ref (uninfiziert-infiziert)}}$$

Der ΔCT -Wert stellt hier die Differenz der Ct-Werte von uninfizierter Kontrollprobe und der infizierten Probe dar. Mittels geometrischem Mittel zweier Referenzgene (Housekeeping genes) wurden diese Werte normalisiert, um interne PCR-Variationen zwischen verschiedenen Läufen auszuschließen. Bei den Referenzgenen (mHPRT, mRPL13a) handelt es sich um ubiquitär synthetisierte und konstant exprimierte Gene. Die Ct-Werte der Referenzgene der uninfizierten Kontrolle und der infizierten Probe durften nicht voneinander abweichen. Auch die PCR-Effizienz des Zielgenes (target gene) und der Referenzgene sollten gleich sein. Wenn sich außerdem eine Effizienz von 2 (100 % PCR-Effizienz = Verdopplung der Amplikons pro Zyklus), wie bei den hier verwendeten Primern ergibt, lässt sich die Gleichung zu der Formel der $\Delta\Delta CT$ -Methode einkürzen (Pfaffl 2001):

$$R = 2^{-(\Delta CT \text{ infiziert} - \Delta CT \text{ uninfiziert})}$$

Die errechneten Werte wurden anschließend zur Basis 2 logarithmiert und mit der *GraphPad Prism 5.0*- Software statistisch ausgewertet.

semiquantitative PCR – Genotypisierung

Mit dieser PCR-Methode wurde die Präsenz von Zielgenen durch nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese ermittelt. Eine präzise Quantifizierung der Genexpression ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich und wurde deshalb mittels qRT-PCR vorgenommen. Mittel der Wahl war diese Methode bei der Genotypisierung der Versuchstiere. Bei den, in diesem Projekt verwendeten Knock-Out-Mäusen wurde mit der semiquantitativen PCR die Absenz der Zielgene überprüft. Nach der Gewinnung der gDNA aus Mausschwanzbiopsien wie in 2.2.3.12 beschrieben, wurden 5 μ l der DNA zu 20 μ l Mastermix (siehe Tabelle 2-18) in PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) pipettiert. Die Polymerase-Kettenreaktion lief dann in einem *S1000TM Thermal Cycler* (Biorad) mit in Tabelle 2-31 aufgeführten Programmen ab. Für die Genotypisierung war zu beachten, dass mittels anschließender Gelelektrophorese nicht nur die Zielgene, sondern auch die sogenannte Neomycin-Kassette dargestellt werden konnte. Bei der Neomycin-Kassette handelt es sich um einen DNA-Vektor, der in die Zielsequenz des Knock-out-Genes eingebaut wurde und somit das Gen unterbricht. Außerdem können während der Synthese von Knock-out-Zellen die für die Mutation positiven Zellen mittels Antibiotikaresistenz für Neomycin von Wildtyp-Zellen unterschieden werden. Wenn nach erfolgreicher PCR der gDNA mehrere Genprodukte amplifiziert wurden (Neo-Kassette und Zielgen), handelte es sich um eine heterozygote Maus. Hierbei trägt ein Chromosom die Mutation und das andere nicht. Ein homozygotes Knock-Out liegt vor, wenn nur die Neomycin-Kassette amplifiziert werden konnte und ein Wildtyp, wenn nur das Zielgen dargestellt wurde.

Um die Neo-Kassette und das Zielgen in einer Reaktion zu amplifizieren, befanden sich in den Proben für MECL-1 und LMP7 drei Primer (siehe Tabelle 2-19) während die PA-Neo-Kassette in einer separierten Reaktion amplifiziert wurde.

Tabelle 2-31: PCR-Programme der Genotypisierung

Gen	Aktivierung Taq- Polymerase	35 Zyklen:			Finale Elongation
		Denaturierung	Primer- hybridisierung	Elongation	
LMP7	96°C 3 min	95°C 30 sec	58°C 30 sec	72°C 45 sec	72°C 10 min
MECL1	96°C 3 min	95°C 30 sec	65°C 30 sec	72°C 35 sec	72°C 10 min
PA28a	96°C 3 min	95°C 30 sec	63°C 30 sec	72°C 20 sec	72°C 10 min
PA28b	96°C 3 min	95°C 30 sec	63°C 30 sec	72°C 35 sec	72°C 10 min
PA-Neo	96°C 3 min	95°C 30 sec	63°C 30 sec	72°C 50 sec	72°C 10 min

Um die Produkte der PCR zu visualisieren und zu überprüfen, wurde eine 2%ige Agarosegelmatrix vorbereitet. Dieses Gel enthielt den Farbstoff *GelRed Nucleic Acid Stain* (BioTium), welches das stark interkalierende Ethidiumbromid ersetzt und die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar macht. Das in TAE-Puffer gelagerte Gel wurde anschließend mit 15 µl der amplifizierten Probe beladen. Zuvor wurde die Probe mit 2,5 µl *DNA Loading Dye* (Thermo) angefärbt, um das Beladen zu vereinfachen. Eine Größenreferenz *100bp DNA-Ladder* (NEB) wurde ebenfalls in eine der Geltaschen gegeben. Das Anlegen einer Spannung von 120 V ließ die negativ geladenen Oligonukleotide der PCR-Produkte die Gelmatrix durchlaufen. Durch den Molekularsiebeffekt wurden die PCR-Produkte hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt und mittels Referenz identifiziert.

2.2.3.14 Next-Generation-Sequencing

Anfertigung der cDNA-Bibliotheken und Sequenzierung

Mittels *RNA-Seq* wurde die Sequenzierung von Lebergewebe vorgenommen. Die Probengewinnung und RNA-Extraktion wurde wie in 2.2.3.11 beschrieben durchgeführt. Die nachfolgende Qualitätskontrolle der RNA erfolgte mit dem *Agilent 2200 TapeStation System* (Agilent Technologies). Aus der gewonnenen RNA wurde nun mit Hilfe des *Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit* (Ambion by Life Technologies™) die mRNA isoliert. Dies erfolgte über die spezifische Bindung der mRNA an magnetische *Beads* und wurde nach den Herstellervorschriften durchgeführt. Die weiteren Schritte der mRNA-Fragmentierung mittels RNase-Verdau und die Aufreinigung der mRNA-Fragmente erfolgten mit dem *Ion Total RNA-Seq Kit v2* (Ion Torrent by Life Technologies™). Der RNase-Verdau wurde erneut mit dem *Agilent 2200 TapeStation System* überprüft, bevor in weiteren Schritten nach Angaben des *Ion*

Total RNA-Seq Kits v2 die mRNA-Fragmente hybridisiert und ligiert wurden. Nun fand die Reverse-Transkriptase-Reaktion, in der die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde, statt. Mittels *Magnetic Bead Cleanup Modules*, des oben erwähnten Kits, wurde die cDNA aufgereinigt. Anschließend wurde die cDNA amplifiziert, nochmals gereinigt und sogenannte *libraries* erstellt. *Libraries* sind die entstandenen Sammlungen gleich langer DNA-Fragmente mit bekannten Adaptersequenzen. Die Markierung der einzelnen Proben mit sogenannten *Barcodes* ermöglichte ein Multiplexing mehrerer Proben auf einem Sequenzier-Chip. Vor dem Sequenzieren wurden die *libraries* auf ihre Fragmentgröße und Konzentration mit dem *Agilent 2200 TapeStation System* untersucht. Die Sequenzierung erfolgte mit der IonTorrent-Proton-Sequenzier-Technologie (Ion Proton™ System, Life Technologies™). Hierbei wurden die Sequenzier-Chips, auf denen sich die an *beads* gebundenen cDNA-Fragmente befanden, mit jeweils einem Nukleotid geflutet. Die Bindung des Nukleotids an seine Base verursachte die Freisetzung eines Wasserstoff-Ions, welches in dem spezifischen *Well* eine pH-Wert-Änderung hervorrief. Letztendlich wurden diese chemischen Signale in elektronische umgewandelt und die Daten des sequenzierten cDNA-Fragments (nachfolgend *Reads* genannt) konnten in *fastq*-Dateien gespeichert werden. Bei den untersuchten Leberproben (n = 3) wurden insgesamt drei Sequenzierläufe mit jeweils einem Replikat pro Probe durchgeführt.

Datenanalyse

Zu Beginn der Datenanalyse wurden die *fastq*-Dateien einer Qualitätskontrolle mittels *fastqc* (Version 0.11.1) unterzogen. Als Ergebnis dieser Kontrolle konnten noch vorhandene Sequenzieradapter und *Read*-Regionen, deren Qualität schlechter als *phred-Score* 20 waren, erkannt und mittels *cutadapt* (Version 1.2.1) getrimmt werden. Somit konnte die Analyse mit getrimmten *Reads*, angeglichen auf eine Größe von maximal 250 Basen, fortgesetzt werden. Alle *Reads* kleiner als 30 Basen wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die getrimmten *Reads* einer jeden Probe wurden nun auf das Mausgenom mm10, mit Hilfe des *TMAP Aligners* (Version 2.9.2) mit den default-Einstellungen und der Option “no pairing of reads” gemappt [PMID:xy *]. Mit den nun entstandenen *bam*-Dateien konnte die Gesamtanzahl aller *Reads* pro Gen und pro Probe ermittelt werden. Dazu wurde *featureCounts* (mit Exons auf “feature level”) verwendet, welches zum *subread-1.4.5*-Paket gehört (Liao et al. 2014). Für die benötigten Geninformationen wurde die *mm10-gtf*-Datei *Mus_musculus.GRCm38.79.gtf* (heruntergeladen von *ensembl.org* am 21. Mai 2015) und als Annotationsdatei verwendet (Zhao & Zhang 2015). Die Gesamtzahl der *Reads* pro Gen jeder Probe wurde nun in *R* (Version 3.2.2) eingelesen. Um differenziell exprimierte Gene zwischen den untersuchten Gruppen ausfindig zu machen, wurde das Bioconductor-Paket *DESeq2* (DESeq2 Release 1.10.1 (Love et al. 2014), Bioconductor Version 3.2 (Anders et al. 2013)) zur Analyse genutzt. Hierbei wurden folgende Parameter gesetzt: *contrast*-Option sowie *cooksCutoff-filtering = FALSE*, *independent-filtering = TRUE* und eine p-Wert Grenze bei 0,05. Anschließend wurden die differenziell exprimierten Gene ausgewählt, deren *log2FoldChange* größer als 1 bzw. kleiner als -1 waren. Die Gene von Interesse wurden mit Hilfe von *Gene Ontology* (GO)-Kategorien annotiert. Bezüglich der GO-Kategorien wurde *BioMart* (Version 2.26.1) appliziert. Den folgenden GO-Kategorien konnten die meisten der differenziell exprimierten Gene zugeordnet werden: *immune system process* (GO:0002376), *innate immune response* (GO:0045087), *inflammatory response* (GO:0006954), *cell death* (GO:0008219), *cell proliferation* (GO:0008283), *apoptotic process* (GO:0006915), *cell adhesion* (GO:0007155), *angiogenesis* (GO:0001525) und *metabolic*

process (GO:0008152). Um einen noch tieferen Einblick in die Daten zu bekommen, wurde in R das Paket *pathview* (Version 1.10.1) genutzt, welches die Gene, die während der Infektion differentiell transkribiert wurden, in ausgewählten *Kegg*-Kategorien anzeigte. Hierbei waren vor allem die *Kegg*-Kategorien *NF-kappa B signaling pathway*, *cell adhesion molecules* (CAMs) und *PI3K-Akt signaling pathway* von Interesse.

2.2.3.15 Immunblot

Proteinextraktion

Für die Western Blot-Analysen wurden Organhomogenate der Versuchstiere untersucht. Nach Entnahme der Organe wurde eine Gewebemenge, wie in Tabelle 2-32 dargestellt, abgewogen und für die weitere Aufarbeitung genutzt. Die Probe wurde in *Lysing-Matrix*-Röhrchen mit 1 ml HBSM-Lysepuffer, wie in 2.1.6.4.2 aufgeführt, homogenisiert und mindestens 1 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde das Gewebehomogenat in 1,5 ml *ProteinLoBind Tubes* (Eppendorf) überführt und bei Höchstgeschwindigkeit und 4 °C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße gegeben und nochmals zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich kein Zelldebris in der Probe befindet. Der nun gewonnene Überstand wurde in mehrere *ProteinLoBind Tubes* aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2-32: Probemengen der Organhomogenate

Organ:	Leber	Lunge	Milz	Niere	Herz
Menge:	0,025 g	0,06 g	0,03 g	0,06 g	0,05 g

BCA-Test:

Die Proteinbestimmung wurde mittels *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo) durchgeführt. Das Prinzip des BCA-Tests basiert auf der Biuret-Reaktion während der das Protein in alkalischem Milieu mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex bildet. Durch die Reduktion der Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen und deren Bildung eines violetten Farbkomplexes durch die Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA) kann die Proteinmenge mittels Extinktionsmessung bestimmt werden. Die Proben wurden in eine 96-Kammer-Platte in 3 Verdünnungsstufen aufgetragen und gegen einen BSA-Standard gemessen. Sie wurden als Triplikate aufgetragen, da es bei der Bestimmung der Proteinkonzentration aus Gewebelysaten oft zu Artefakten während der Messung kommen kann. Das Vorgehen und die Auswertung der Proben in Bezug auf eine Standardkurve erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Extinktion (OD) der Proben wurde mit dem Photometer *Infinite® M200* (Tecan group) gemessen.

Probenaufarbeitung:

Die Proben wurden aufgetaut und während des Verfahrens auf Eis gelagert. Da die Proteinkonzentrationen nun bekannt waren, wurden die zu vergleichenden Proben mittels HBSM-Puffer auf die gleiche Konzentration (je nach Gewebe 80-100 µg/ 50 µl) gebracht. Die Proben wurden mit einem Mix aus 1 M DTT und *NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)* (Life technologies) (1:4 eingesetzt) gemischt und bei 95 °C, 10 min aufgeköcht. Hierbei denaturierten die Proteine und es bildeten sich negativ-geladene SDS-Protein-Komplexe mit vergleichbaren

hydrodynamischen Eigenschaften. Somit unterschieden sich die Proteine nur in ihrer Größe und konnten mittels SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt werden.

SDS-Gel-Elektrophorese:

Bei der SDS-Gel-Elektrophorese werden die negativ-geladenen Protein-Komplexe hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt, während sie im elektrischen Feld der Polyacrylamidmatrix zum positiv geladenen Pol laufen. Die zuvor aufgearbeiteten Proben wurden in Gradientengele, *Mini-Protean TGX Gels 4-15%* (Bio-Rad) gegeben. Die 10-Kammer-Gele wurden mit 20-50 µl Probenvolumen pro Tasche und die 15-Kammer-Gele mit 15 µl Probe je Tasche gefüllt. In eine separate Tasche wurden 5 µl oder 2 µl bei den 15-Kammer-Gele *Prestained Page Ruler* (Thermo) als Größenreferenz aufgetragen. Die Gele wurden vor dem Befüllen mit den Proben, aufrecht in mit Laufpuffer gefüllte *Elektrophoresekammer MiniPROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad) platziert. Um den Lauf zu Starten wurde das Elektrophoresebad an eine Stromquelle, *Powerpac™ HC Power Supply* (Bio-Rad) mit 160 V angeschlossen. Nach etwa 30 min war der Lauf beendet und das Gel konnte aus seiner Schaltung genommen werden und in Transferpuffer überführt werden.

Blotten:

Als Blotten wird der Vorgang bezeichnet bei dem die Proteine des zuvor durchlaufenen Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen werden. Hierbei wurde eine Transfermembran aus Nitrozellulose (Thermo) verwendet, auf der die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden wurden. Das Gel und die Membran wurden von je zwei *Whatman*-Filtern (VWR) und einem Schwamm, unter Vermeidung von Luftblasen, umschlossen und in einer Kassette in den Blottank eingespannt. Der Transferpuffer wurde in den Blottank gefüllt und aktiviert durch den Anteil an 96%igem Ethanol die Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran. Der Blottank wurde nun für 90-120 min an die Stromquelle mit einer Stromstärke von 0,28 A angeschlossen. Während des Blottens wird die gesamte Apparatur in ein Eisbad platziert, um ein Überhitzen zu vermeiden.

Ponceau-Rot-Färbung:

Zusätzlich zu der Färbung der Proteine auf der Membran fixiert die Ponceau-Färbung durch die enthaltene Trichloressigsäure (TCA) die Proteine. Die Färbung ist außerdem reversibel und verträgt sich mit späteren Immunfärbungen einzelner Proteine. Das 30-sekündige Schwenken der geblotteten Membran in der fertigen TCA-haltigen Ponceau-Lösung färbte die Proteine an. Durch das Waschen mit Entfärbelösung oder TBS konnte die Färbung wieder aufgehoben werden. Letzte Färberückstände wurden während des nun folgenden Blockierens abgewaschen.

Immunfärbung:

Nachdem die Proteinbindungsstellen über mindestens 2 h mit 10 % Milchpulver in 1 % TBS-T abgesättigt wurden, konnte der erste Antikörper, der spezifisch gegen das zu analysierende Zielantigen gerichtet ist, hinzugegeben werden. Alle verwendeten Antikörper und deren eingesetzten Verdünnungen können in Tabelle 2-23 nachgelesen werden. Die erste Antikörperfärbung wurde 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht unter fortlaufendem Schwenken inkubiert. Dieser Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen der Membran mit TBS-T entfernt und durch einen zweiten Antikörper, verdünnt in TBS-T ersetzt. Dieser ist gegen den Erstantikörper gerichtet und mit einer Peroxidase markiert. Dieser Antikörper inkubierte 1 h bei Raumtemperatur und wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-

T und anschließend gründlichen Spülen mit TBS entfernt. Auf die Membran wurde nun die Chemilumineszenzlösung *SuperSignal®West Pico Chemiluminescent substrate* (Thermo) gegeben. Die Peroxidase des zweiten Antikörpers oxidierte das in dem Substrat enthaltene Luminol. Die dadurch entstandene Chemilumineszenz wurde von dem *Fusion Fx7* (PeQlab) gemessen und als Bild wiedergegeben. Nach gründlichem Waschen der Membran konnte diese nun ein weiteres Mal einer Immunfärbung unterzogen werden. Bei dieser zweiten Färbung war der Erstantikörper gegen ein Protein gerichtet, welches als Referenz dient, da es ubiquitär und gleichbleibend in jeder Probe exprimiert wurde. Dieses Referenzprotein dient als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels. Dies ist unerlässlich, wenn die Banden unterschiedlicher Proben quantitativ verglichen werden sollen.

2.2.3.16 Multiplex-ELISA

Der 14-Plex-ELISA wurde mit dem *ProcartaPlex™ Immunoassay Kit* (eBioscience) durchgeführt. Die beinhalteten Chemikalien, Antikörper und magnetischen Kügelchen (Beads), sowie die zu untersuchenden Analyten sind in Tabelle 2-24 aufgelistet. Das Ziel dieses ELISAs ist es, mehrere Zielproteine in einer Probe zu quantifizieren. Dabei wurden in eine schwarze 96-Kammer-Flachboden-Platte (eBioscience) *Magnetic Capture Beads* gegeben und anschließend *Antibody Magnetic Beads*, welche spezifisch für jeden Analyten sind hinzugefügt. Nun wurde 50 µl Probenvolumen dazu gegeben und die Mischung über Nacht bei 4 °C auf einem *Thermomixer MTP* (Eppendorf) inkubiert. Bei Raumtemperatur wurde nun der biotinylierte *Detection Antibody Mix* hinzugegeben. Die so entstandenen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit *Streptavidin-PE* markiert. Das Streptavidin bindet an den biotinylierten *Detection Antibody* und verstärkt das Signal, wogegen PE das gebundene Fluorophor darstellt. Mit dem *BioPlex 200™ System, powered by Luminex xMAP Technology* (Bio-Rad) wurde die Platte ausgelesen. Hier wurden die Beads aufgezogen und mit zwei Lasern analysiert. Ein Laser bestimmt den Zielanalyt der Beads, wogegen der andere das Ausmaß des Fluoreszenzsignals ermittelt und somit die Menge des Zielproteins bestimmt. Die exakte Quantifizierung erfolgte mittels integrierter Software. Hier wurden die Rohdaten auf eine Standardkurve des mitgeführten Standards bezogen, um die Konzentration der einzelnen Zielproteine in der Probe zu bestimmen. Mit diesem Verfahren wurden Zytokine und Chemokine in der Peritonealflüssigkeit und dem Plasma bestimmt. Da die Peritonealflüssigkeit während ihrer Gewinnung mit 3 ml PBS schon verdünnt worden war, wurde die Spülflüssigkeit für den Multiplex-ELISA unverdünnt eingesetzt. Für die Analyse der Blutzytokine wurde heparinisertes Plasma verwendet, da dieses reproduzierbarere Ergebnisse verspricht, als die Analyse von Serum (Rosenberg-Hasson et al. 2014). Da hier von einer höheren Konzentration der Zielproteine auszugehen war, wurden 25 µl der Proben vor der Analyse mit 25 µl des *Universal Assay Buffers* 1:2 verdünnt. Alle Proben, wie auch der Standard wurden als Duplikate aufgetragen. Die exakte Durchführung des Verfahrens richtete sich strikt nach dem Protokoll des *ProcartaPlex™ Immunoassay Kits*.

2.2.3.17 Nitritbestimmung

Der Zweck der Nitritbestimmung ist der indirekte Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) durch den Umsatz der Griess-Reagenz (Sulfanilsäure/N-(1-naphtyl)ethylendiamin) und dem in der Probe enthaltenem Nitrit zu einem Diazofarbstoff. Nitrit entsteht durch die spontane Oxidation von Stickstoffmonoxid unter physiologischen Bedingungen und ist somit ein Marker für die Produktion von NO in den Zellen. In eine 96-Kammer-Flachbodenplatte wurden 50 µl der Nitritlösung in absteigender Konzentration (160 µM – 0,16 µM) pipettiert. Aus den Mittelwerten der aufgetragenen Duplikate wurde für die spätere Auswertung die Standardkurve generiert. Den Null-Wert der Kurve markiert die Extinktion des Probenhintergrundes, welcher ebenfalls von den gemessenen Proben abzuziehen war. Um die Eigenabsorption der Proben zu ermitteln, wurden zwei Kammern mit je 50 µl PBS gefüllt, da steriles PBS für das Gewinnen der Proben genutzt worden war. Die Proben (hier peritoneale Spülflüssigkeit) wurden ebenfalls als Duplikate mit einem Volumen von 50 µl auf die Platte gebracht. Hinzugegeben wurden nun 50 µl der Arbeitslösung, welche sich 1:1 aus Lösung A und Lösung B, wie in Tabelle 2-25 angegeben, zusammensetzte. Nach Zugabe der Arbeitslösung kam es sofort zu einem Farbumschlag, so dass die photometrische Auswertung der Proben bei 450 nm, mit dem *Infinite*[®] M200 (Tecan Group) nach wenigen Minuten stattfinden konnte.

2.2.3.18 Statistik

Für die statistische Auswertung der gezeigten Versuche wurde die Grafik- und Statistik-Software *Prism 5.0* von *Graph Pad*[®] genutzt. Für die Auswertung der meisten Versuche wurde der Mann-Whitney U-Test, ein ungepaarter, parameterfreier zweiseitiger Test verwendet. Eine Ausnahme bildet die statistische Analyse der relativen RNA-Expression und der Zytokin-Level, welche mit einer Two-Way-ANOVA berechnet wurde. Die Auswertung der Kaplan-Meier-Kurven, die das Überleben der Tiere darstellen, erfolgte mittels Log-rank-Test. Die erreichten Signifikanzlevel wurden mit Sternchen dargestellt. Als signifikant gilt die Auswertung, wenn die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag (p-Wert < 0,05). Folgende Signifikanzlevel wurden angegeben: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001; n.s. = nicht signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der I-Proteasom-Untereinheiten während der *E. coli*-Infektion

3.1.1 Expressionsanstieg der Immununtereinheiten und PA28 β durch *E. coli*

Um die Relevanz des I-Proteasoms in der *E. coli*-induzierten Sepsis zu ermitteln, wurde die Expression der I-Proteasom-Untereinheiten LMP7 und MECL-1 sowie die α - und β -Untereinheiten des Proteasomaktivators 28 auf transkriptioneller Ebene und Proteinebene analysiert. Die Expression wurde in Leber, Milz, Lunge, Niere und Herz von Wildtyp-Mäusen nach erfolgreicher *E. coli*-Infektion bestimmt. Abbildung 2 veranschaulicht stellvertretend für weitere untersuchte Organe die Ergebnisse der Leberanalyse. Die Untersuchung der mRNA zeigt einen signifikanten Anstieg der Expression in Bezug auf LMP7, MECL-1 und PA28 β während der Infektion. Analysen der Proteinmengen verifizieren diese Ergebnisse. Eine Ausnahme bildet die PA28-Untereinheit α , welche keine Änderung in der Expression zeigte. PA28 α liegt in unstimulierten Zellen schon hoch exprimiert vor, im Gegensatz zu PA28 β , welches im Zuge der Infektion hoch reguliert wird. Zusätzlich zeigt Abbildung 2 die Abwesenheit der Proteine LMP7, MECL-1, PA28 α und β in den untersuchten I-Proteasom-Knock-Out-Tieren.

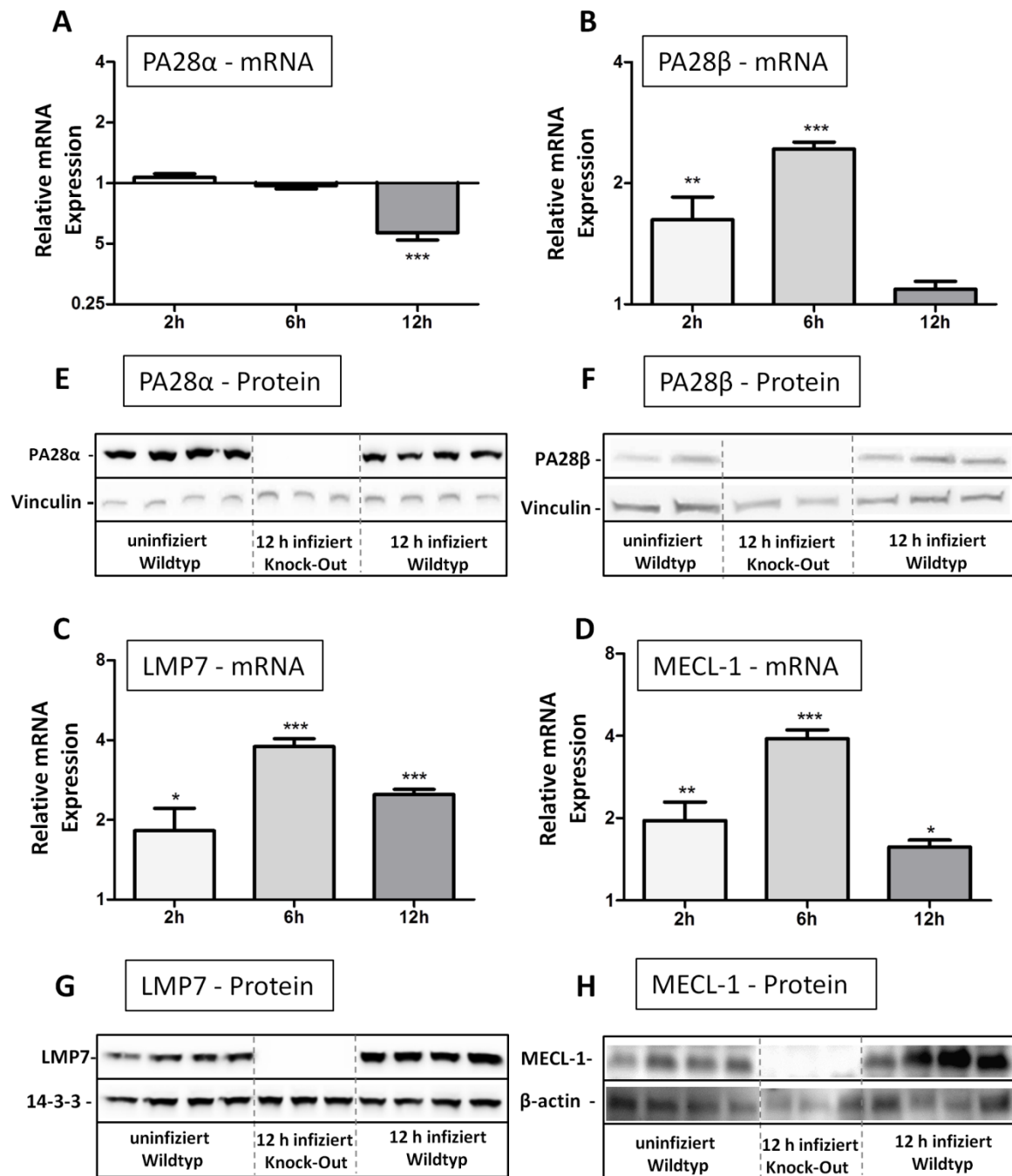


Abbildung 2: Regulation von LMP7, MECL-1, PA28 α und PA28 β in der Leber

Die mittels qRT-PCR gemessenen relativen mRNA Level von (A) PA28 α , (B) PA28 β , (C) LMP7 und (D) MECL-1 wurden in Leberhomogenaten von Wildtyp-Mäusen 2 h, 6 h und 12 h nach der Infektion bestimmt. Dargestellt wird die relative Genexpression, normalisiert zu den uninfizierten Kontrollen. Abgebildet werden die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) Die vergleichende Darstellung der Proteine (E) PA28 α (28 kDa), (F) PA28 β (27 kDa), (G) LMP7 (22 kDa) und (H) MECL-1 (20 kDa) erfolgte mittels Western Blot. Es wurden Leberhomogenate uninfizierter Wildtypen mit 12 h infizierten Wildtyp-Mäusen verglichen. Zusätzlich wird die Abwesenheit der Zielproteine in der Leber von 12 Stunden infizierten LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out-Mäusen dargestellt. Als Beladungskontrolle wurde das Protein 14-3-3 (30 kDa), β -Actin (45 kDa) oder Vinculin (124 kDa) genutzt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden ausschließlich Tiere mit einem ähnlichen Schweregrad der Erkrankung verglichen.

3.1.2 LMP2 wird exprimiert, aber nicht in das gemischte Proteasom eingebaut

Es folgte eine weiterführende Charakterisierung der LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out-Mäuse mit dem Ausschluss einer I-Proteasomfunktionalität durch die verbliebene I-Proteasom-Untereinheit LMP2. Wie einleitend erklärt, können einzelne I-Proteasom-Untereinheiten zusammen mit Untereinheiten konstitutiver Proteasome eingebaut werden und gemischte Proteasome, beziehungsweise sogenannte *intermediate proteasoms* bilden (Dahlmann 2016). In Abbildung 3 wird stellvertretend in Leber- und Lungengewebe gezeigt, dass eine Expression von LMP2 in den Knock-Out-Tieren stattfand. Auf RNA-Ebene wird zusätzlich deutlich, dass es zu einer scheinbar erhöhten, kompensatorischen Expression von LMP2 in Knock-Out-Mäusen kam (Abbildung 3 A und C). Die abgebildeten Western Blot-Analysen der jeweiligen Gewebe stellen jedoch eine verminderte Proteinexpression in den Knock-Out-Tieren dar (Abbildung 3 B und D). Dieser Effekt resultiert vermutlich aus der Unfähigkeit der Zellen, LMP2 in gemischte Proteasome einzubauen. Somit wurde LMP2 in den Knock-Out-Zellen zwar transkribiert und auch synthetisiert, dann anscheinend aber wieder degradiert, da das Protein keine Funktion erfüllen konnte.

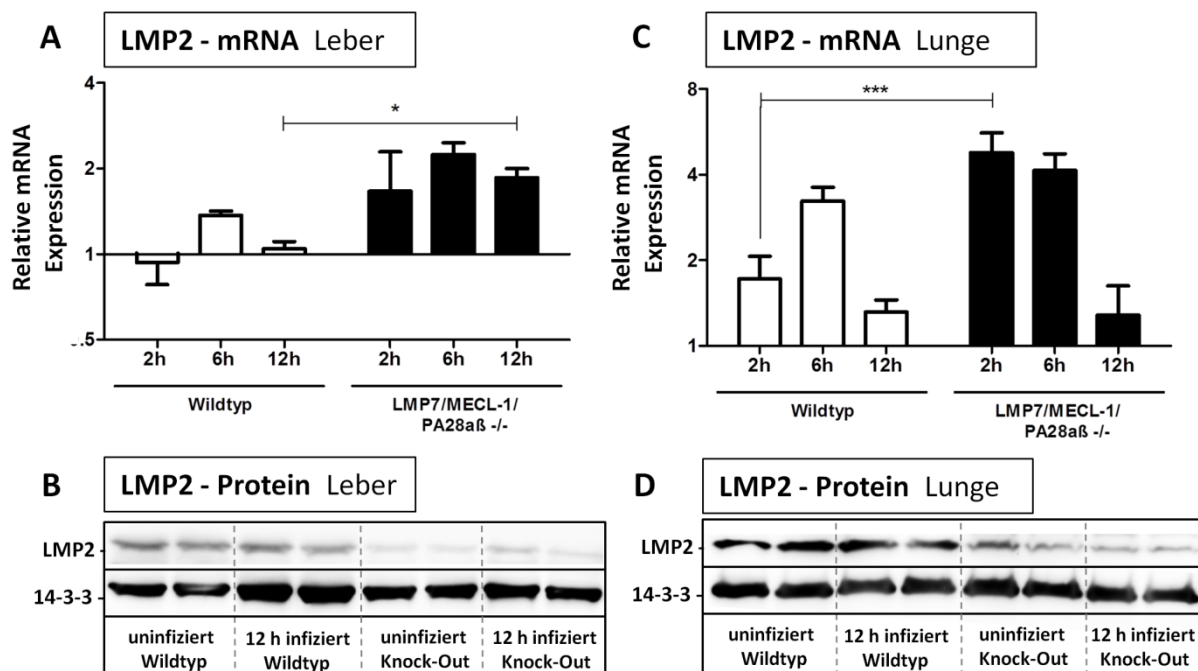


Abbildung 3: Regulation von LMP2 in Leber und Lunge

Die mittels qRT-PCR gemessenen relativen mRNA Level von (A) LMP2 in der Leber und (C) LMP2 in der Lunge wurden in Gewebehomogenaten von 2 h, 6 h und 12 h infizierten Mäusen bestimmt. Dargestellt wird die relative Expression, normalisiert zu den uninfizierten Kontrollen. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden ausschließlich Tiere mit einem ähnlichen Schweregrad der Erkrankung verglichen. Abgebildet werden die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Mittels Western Blot wurde LMP2 (22 kDa) (B) in der Leber und (D) in der Lunge auf Proteinebene dargestellt. Verglichen werden je zwei 12 h infizierte Wildtypen und LMP7/MECL1/PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out-Mäuse mit ihren uninfizierten Kontrollen. Als Beladungskontrolle wurde 14-3-3 (29 kDa) genutzt. Dargestellt werden repräsentative Blots aus der Analyse von fünf Individuen pro Gruppe.

3.1.3 Ein kompensatorischer Expressionsanstieg der konstitutiven β -Untereinheiten findet nicht statt

Durch den Verlust der Fähigkeit das I-Proteasom zu bilden, wird hier der Vermutung einer erhöhten Synthese des konstitutiven Proteasomes in LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out-Mäusen nachgegangen. Mittels qRT-PCR konnte dargestellt werden, dass die relative Expression der konstitutiven β -Untereinheiten in den Knock-Out-Mäusen nicht erhöht ist. Es kommt somit nicht zu einer kompensatorischen Proteasombildung um den Verlust des I-Proteasoms auszugleichen. Diese Ergebnisse werden hier für Leber- und Milzgewebe dargestellt (Abbildung 4) und repräsentieren die Aussagen, welche ebenfalls für die Niere, das Herz und die Lunge getroffen werden konnten.

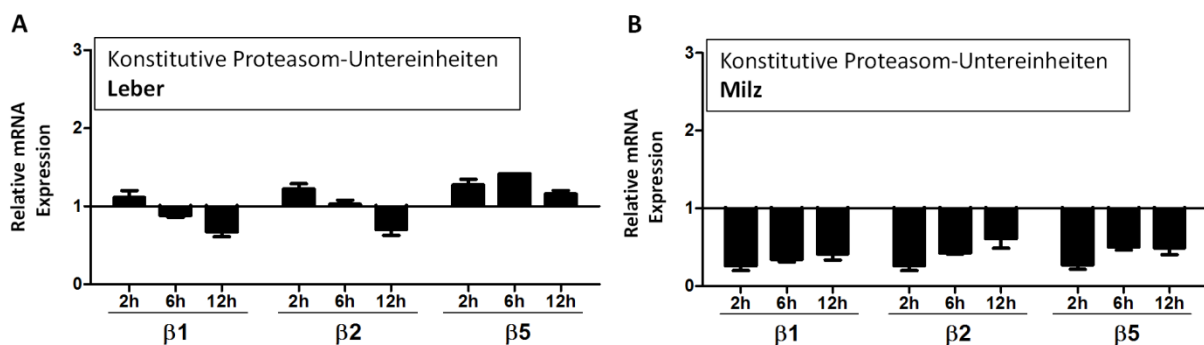


Abbildung 4: Regulation des konstitutiven Proteasoms in Knock-Out-Mäusen

Die mittels qRT-PCR gemessenen relativen mRNA Level von (A) $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ in der Leber und (B) $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ in der Milz wurden in Gewebehomogenaten von 2 h, 6 h und 12 h infizierten LMP7/MECL1/PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out-Mäusen bestimmt. Dargestellt wird die relative Expression, normalisiert zu den uninfizierten Kontrollen. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden ausschließlich Tiere mit einem ähnlichen Schweregrad der Erkrankung verglichen. Abgebildet werden die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.2 Symptomatik und Letalität während der *E. coli*-Sepsis in I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen

3.2.1 Verstärkte Letalität und verschärfter Krankheitsverlauf in Knock-Out-Mäusen

Nach der Ermittlung der optimalen Keimmenge von 8×10^5 KBE/Maus wurde das Überleben der Tiere und der Krankheitsverlauf über 52 h analysiert. Alle Tiere, bei denen nach 52 h die klinische Untersuchung keinen besonderen Befund ergab (Scorepunktzahl: 0), überlebten die Infektion. Tiere, die während der Infektion die tierschutzrelevanten Endpunkte erreichten, wurden euthanasiert und der Zeitpunkt wurde in einer Kurve nach Kaplan-Meier aufgetragen. So ergab sich mittels *Log-Rank*-Test ein signifikanter Unterschied in der Letalität der Tiere (Abbildung 5 A). Fast 40 % der LMP7/MECL-1/PA28 $\alpha\beta$ -Knock-Out-Mäuse erreichten nach 12 h *p. i.* den tierschutzrelevanten Endpunkt, wogegen nur 10 % der Wildtyp-Mäuse nach 12 h euthanasiert werden mussten. Letztendlich beträgt die Letalität der I-Proteasom-Knock-Out-Tiere über 90 % und die der Wildtypen nur etwa 50 %. Verifiziert wurden diese Ergebnisse durch mehrere unabhängige Infektionsversuche mit einer totalen Tierzahl von 26 Mäusen pro

Gruppe. Zusätzlich zu der Bestimmung der Letalität wurde der Krankheitsverlauf mittels Benotung des klinischen Zustandes, der Rektaltemperatur und des Körpergewichts nach einem Benotungsbogen (siehe Tabelle 2-29) dokumentiert (Abbildung 5 B). Wenn ein Tier die Punktzahl 10 oder eine höhere Benotung während eines Monitoringzeitpunktes erreichte wurde dieses unverzüglich tierschutzgerecht getötet. Die Kurve der Knock-Out-Tiere, welche den Mittelwert der Benotung dieser Tiergruppe zeigt, nimmt einen deutlich steileren Verlauf als die der Wildtyp-Tiere und stellt somit einen aggressiveren und rapideren Krankheitsverlauf dar. Dieses Ergebnis sollte die Basis für folgende Versuche des Projektes werden, in welchen die Ursache für das verschärfte Krankheitsbild in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren untersucht wurde.

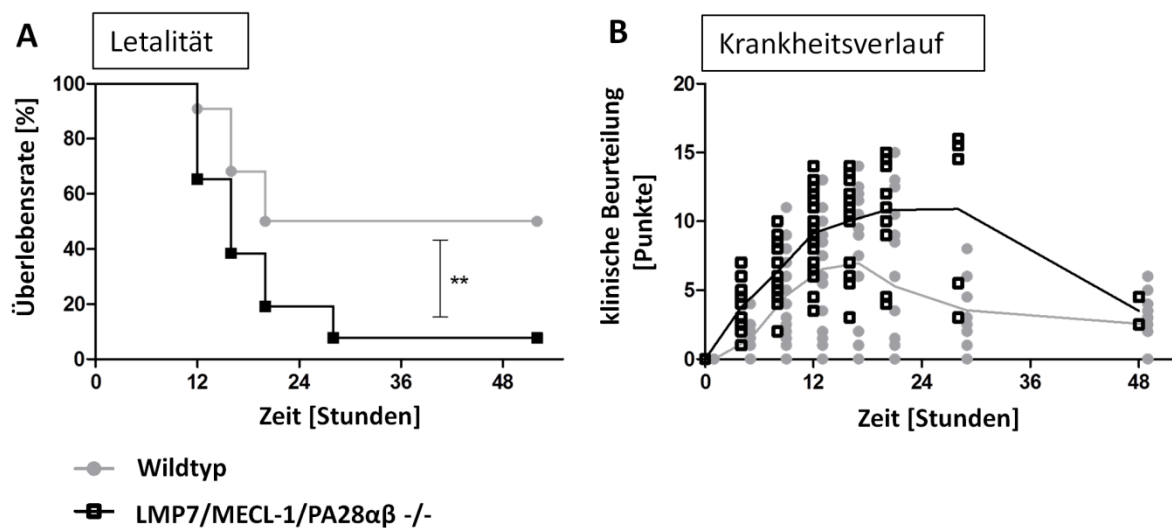


Abbildung 5: *E. coli*-Infektion von Wildtyp- und LMP7/MECL-1/PA28αβ -/- Mäusen

A zeigt die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier und **B** den Krankheitsverlauf nach intraperitonealer Infektion mit *E. coli*. Dabei umfassen die klinischen Beurteilungskriterien sechs verschiedene Fitness- und Verhaltensparameter, inklusive Körpergewicht und Rektaltemperatur. Die Addition der Punkte 0-3 der einzelnen Kriterien (Punktzahl 0 = ohne besonderen Befund, 3 = Abbruchkriterium) ergibt die in der Kurve dargestellte Punktzahl der Individuen. Die Tiere wurden über 52 Stunden klinisch beurteilt. Die Abbildung beschreibt fünf unabhängig voneinander durchgeführte Versuche mit einer Gesamtzahl von 26 Tieren pro Gruppe. In **B** kennzeichnen die Linien den Mittelwert der analysierten Tiere. In **A** wurden signifikante Unterschiede mit dem Log-Rank-Test ermittelt. (** $p < 0,01$)

3.2.2 I-Proteasom-Knock-Out-Tiere weisen eine ausgeprägtere Leukopenie auf

Als prägnantes Zeichen einer Sepsis gilt der Verlust von Immunzellen im peripheren Blut. In humanen Sepsispatienten (Hotchkiss et al. 2001), wie auch in experimentell ausgelöster Sepsis in Mäusen (Markwart et al. 2014), konnte vorwiegend eine Verminderung der Lymphozyten beobachtet werden. Um dies in dem *E. coli*-Modell zu verifizieren, wurden nach 2 h, 6 h und 12 h *p. i.* die Hauptpopulationen der Leukozyten im peripheren Blut quantifiziert (Abbildung 6). Beide erkrankten Mausgruppen zeigten hierbei eine Verminderung der Leukozyten, wobei eine Lymphopenie der ausschlaggebende Faktor war. In den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren war die beobachtete Lymphopenie jedoch nach 12 h *p. i.* signifikant stärker ausgeprägt als in

den Wildtyp-Tieren. Dies spricht, wie zu der Dokumentation des Krankheitsverlaufes passend, für ein verschärftes Krankheitsgeschehen in den Knock-Out-Tieren.

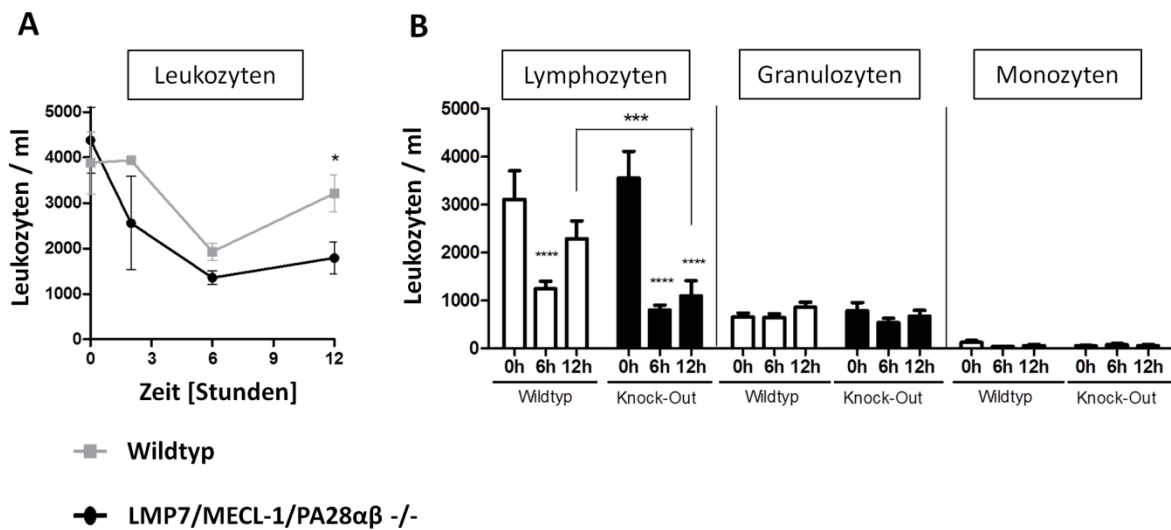


Abbildung 6: Leukozyten im peripheren Blut

A zeigt die Entwicklung der Gesamtzahl von Leukozyten im Blut bis 12 h nach der Infektion mit *E. coli*. B stellt die Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten vor der Infektion, 6 h und 12 h nach der Infektion dar. Die hier aufgeführten 0 h-Tiere sind uninfiziert und bilden den Zustand vor der Infektion ab. Kontrolltiere die anstatt mit *E. coli*, mit einer Natriumchloridlösung scheininfiziert wurden, weichen in der Zellmenge nicht signifikant von den uninfizierten Kontrolltieren ab (nicht abgebildet). Die Darstellung beschreibt drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche mit einer Gesamtzahl von bis zu zwölf Tieren pro Gruppe. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

3.2.3 Klinische Befunde und blutchemische Werte zeigen stärkere Schädigungen in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren

Die während der genauen Betrachtung des Krankheitsverlaufes gesammelten Befunde wurden nun zusammen mit Parametern der Blutchemie-Messung betrachtet und in ein klinisches Bild gefügt. Der Nachweis von Bakterien im Blut, wie in Kapitel 3.4.1 genauer beschrieben, und die ausgeprägte Lymphopenie (siehe 3.2.2) sprechen für ein septisches Geschehen. Dies eröffnet die Vermutung, dass die Tiere einem Multiorganversagen mit assoziierter Koagulopathie erliegen. Die makroskopische Betrachtung der gewonnenen Blutproben wies bei vielen 12 h infizierten Tieren und vor allem bei den Knock-Out-Tieren ein starke Rotverfärbung der Serumfraktion auf, was auf eine Sepsis-induzierte Hämolyse hindeutete (Haak et al. 2016). Diese Beobachtung konnte mit der Messung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Blut verifiziert werden. Das Enzym ist ein Parameter für generelle Gewebsschädigungen (Rotenberg et al. 1988), aber auch für die Hämolyse, da es in hohem Maße während der Erythrozytenlyse freigesetzt wird. Wie in Abbildung 7 A dargestellt, wiesen die I-Proteasom-Knock-Out-Tiere ein höheres Maß der LDH auf. Ein weiteres Phänomen der Sepsis ist die akute Nierenschädigung (AKI = *acute kidney injury*), welches als multifaktorielles Geschehen beschrieben wird und mittels erhöhten Serum-Kreatininwerten und einem verminderten Harnvolumen bestimmt werden kann (Umbro et al. 2016). Ursächlich für eine AKI während einer Sepsis ist die renale Vasodilatation und der vermehrte renale Blutfluss (Pettila & Bellomo

2014). Mit Hilfe der Messung von Kreatinin und Harnstoff (BUN = *Blood Urea Nitrogen*) im Plasma, wurde nachgewiesen, dass die Nierenschädigung in beiden Tiergruppen vernachlässigbar gering war. Gleichbleibende Kreatininwerte und nur minder erhöhte Harnstoffwerte bei den Knock-Out-Tieren ließen auf eine kaum beeinträchtigte Nierenfunktion schließen (nicht abgebildet). Bei der klinischen Untersuchung der Tiere fiel nach ungefähr 8 h *p. i.* eine deutlich erschwerte bis pumpende Atmung auf. Dieser Befund konnte ebenfalls vermehrt für die I-Proteasom-Knock-Out-Tiere gestellt werden und gibt Hinweis auf eine stärker ausgeprägte Pneumonie in diesen Tieren. Ein für die Immunmodulation wichtiges Organ stellt die Leber dar, da diese auf Entzündungen rapide mit der Synthese der Akute-Phase-Proteine reagiert und somit maßgeblich an der primären Bekämpfung der Erreger beteiligt ist. Durch PAMPs oder sekundäre Faktoren, wie einwandernde neutrophile Granulozyten, oxidativen Stress und Störungen der Mikrozirkulation durch Thromben, kann es zu einer Cholestase und direktem Untergang der Hepatozyten und somit zu einer exkretorischen Dysfunktion der Leber kommen (Bauer et al. 2013). Die Funktionalität und Integrität der Leber wurde mit der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und dem in der Leber synthetisierten Protein Albumin überprüft. Die GOT ist ebenfalls ein Parameter für Zellschädigung und kommt neben der Leber auch im Skelettmuskel und Herzmuskel vor (Wedemeyer et al. 2010). In Abbildung 7 B wird das signifikant höhere GOT-Level nach 12 h *p. i.* in den Knock-Out-Tieren dargestellt. Albumin hingegen wies bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Änderung auf (Abbildung 7 C). Eine finale Aussage über die Leberschädigung konnte jedoch nur in Zusammenhang mit der histopathologischen Auswertung der Leber getroffen werden. Die in Abbildung 7 D ebenfalls dargestellte Blutglukose sank bei beiden Tiergruppen im Zuge der Infektion rapide ab und ist ein Hinweis auf die verminderte oder gar eingestellte Nahrungsaufnahme während der Erkrankung. Diese spiegelte sich auch in dem Gewichtsverlust der Tiere wider, welcher durch die Exsikkose schwer kranker Tiere noch verstärkt wurde. Ist bei den Tieren eine Reduktion des Körpergewichts von 20 % festgestellt worden oder verstrich die Hautfalte nach dem Handling der Tiere nicht oder sehr langsam, war ein tierschutzrelevanter Endpunkt erreicht und das Tier wurde euthanasiert.

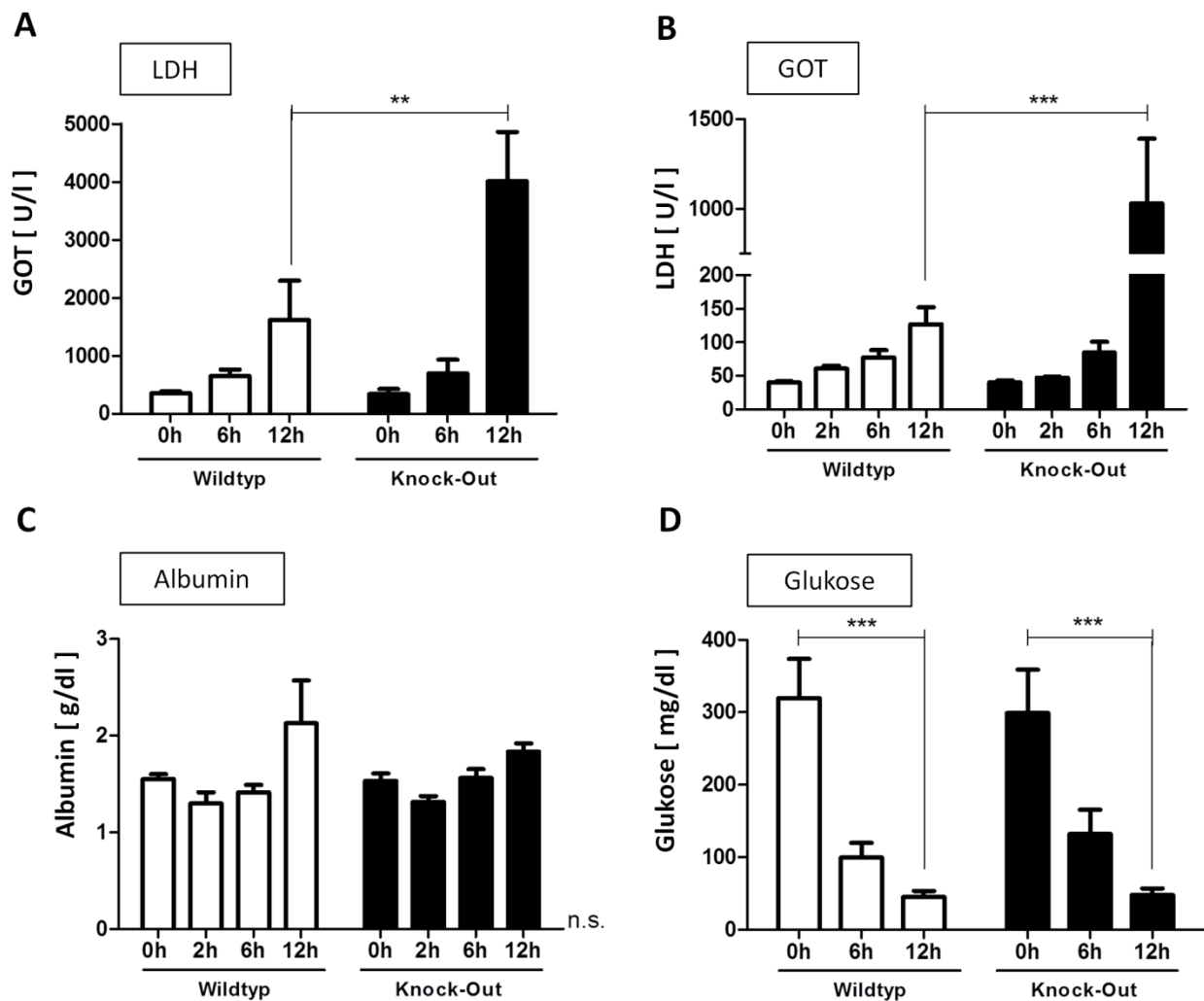


Abbildung 7: Blutchemie

Die hier gezeigten Parameter (A) Laktatdehydrogenase, (B) Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und (C) Albumin wurden in uninferzierten, 6 h und 12 h mit *E. coli* infizierten Tieren in Lithium-Heparin-Plasma mittels trockenchemischer Plättchen analysiert (*FDC 3500i*). Die in D abgebildete Glukosemessung erfolgte mit einem humanen Blutglukose-Monitoring-System *Free Style Lite* (Abbott). Die Darstellung zeigt die Werte \pm SD von jeweils acht Individuen pro Gruppe. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.2.4 Vermehrte Organschädigung in I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen

3.2.4.1 Histopathologie der Leber

Wie schon durch die Bestimmung der GOT und LDH deutlich gemacht, liegt die Annahme einer Gewebsschädigung, welche ebenfalls die Leber beeinträchtigt, nahe. Während einer Sepsis ist die Zerstörung von Gewebe lebenswichtiger Organe mit einem Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom (MODS) verbunden. Neben entzündlichen Schädigungen des Gewebes durch neutrophile Granulozyten und oxidativen Stress kommt es in den meisten Fällen zu der Entwicklung einer disseminierten intravasalen Koagulopathie. Diese hat Mikrozirkulationsstörungen durch massive Thrombenbildung zur Folge, welche in den Organen zu Ischämien und damit verbundenen Zelluntergängen führt (Semeraro et al. 2012). Diese beschriebene Gewebsschädigung war in den Hämatoxylin-Eosin gefärbten histologischen

Leberpräparationen zu finden (Abbildung 8). Dargestellt werden hier die 12 h infizierten Tiere im Vergleich zu ihren uninfizierten Kontrollen. Hauptbefunde der infizierten Tiere waren die zentrolobuläre Einwanderung polymorphnukleärer Entzündungszellen in das Lebergewebe, gestaute Gefäße und Mikrothromben, vor allem in venösen Gefäßen, jedoch ohne den Verlust der Läppchenstruktur der Leber. In den Knock-Out-Tieren wiesen die Thromben außerdem stärkere Ausmaße auf und führten zu ischämischen Nekrosen in den Zirkulationsgebieten der verlegten Gefäße. Die Nekrosen wurden durch Kernveränderungen der Hepatozyten (Kernpyknose und Karyorrhexis) sowie eine vermehrte Eosinophilie des Plasmas in den histologischen Präparationen deutlich. Diese teilweise massiven Zelluntergänge traten in Wildtyp-Tieren nicht auf.

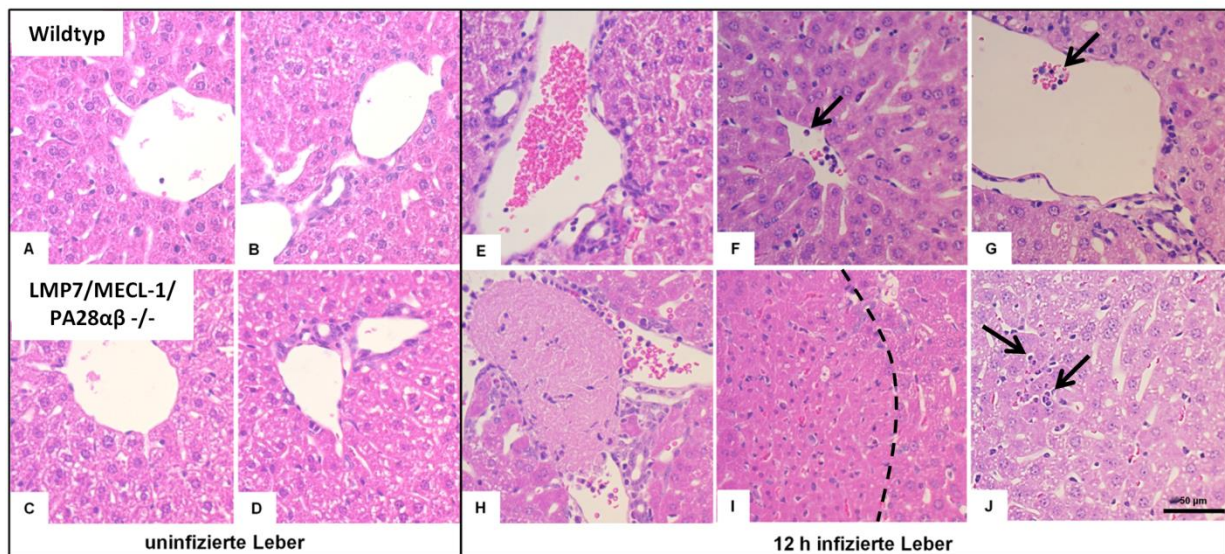


Abbildung 8: Histopathologie der Leber

Gezeigt werden repräsentative HE-gefärbte Paraffinschnitte von gesunden und 12 h infizierten Wildtyp-Mäusen (obere Reihe) im Vergleich zu gesunden und infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen (untere Reihe). **A** und **C** zeigen jeweils die unauffälligen zentrolobulären Bereiche und **B** und **D** die Portalfelder uninfizierter Individuen. Im Vergleich sind in den Schnitten der infizierten Wildtypen (**E**) venöse Stauungen und vereinzelte neutrophile Granulozyten (\rightarrow) (**F**) in den Zentralvenen und (**G**) den Portalfeldern sichtbar. Deutlich massivere Auswirkungen der Infektion sind in infizierten Knock-Out-Tieren zu finden. **H** zeigt die Verlegung eines Gefäßes durch einen Thrombus und **I** die daraus resultierende ischämische Nekrose (---). Außerdem lassen sich hier (**J**) Herden, in das Lebergewebe infiltrierter neutrophiler Granulozyten (\rightarrow) erkennen. Alle Abbildungen entsprechen einer 400-fachen Vergrößerung. Der in **J** dargestellte Balken misst 50 µm. Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen aus Untersuchungen von sechs Tieren pro Gruppe. (Abbildung: C. v. Lachner)

3.2.4.2 Histopathologie der Lunge

Eine erschwerte bis pumpende Atmung der erkrankten Tiere lies auf eine Beteiligung der Lunge im Zuge des Multi-Organ-Dysfunktions-Syndroms schließen. Die Beeinträchtigung der Atmung während einer Sepsis manifestiert sich zumeist in einem akuten Atemnotsyndrom (ARDS = *acute respiratory distress syndrome*) (Angus & van der Poll 2013), welches sich histopathologisch als diffuse Alveolarepithelschädigung darstellt (DAD = *diffuse alveolar damage*) (Butt et al. 2016). Die histopathologische Auswertung der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparationen ergab eine vermehrte Schädigung der Lunge in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren. In Summe wiesen die infizierten Tiere eine akute, eitrig, interstitielle Pneumonie auf, welche von einer starken Thrombosierung kapillärer Gefäße begleitet wurde. Im Mittel wies etwa die Hälfte des Lungengewebes von Knock-Out-Tieren nach 12-stündiger Infektion die entzündlichen Veränderungen auf. Im Gegensatz dazu konnten nur durchschnittlich für ein Viertel des gesamten Lungengewebes der Wildtypen diese Befunde gestellt werden. Auch die Hauptbefunde, zu denen die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Alveolarepten, Nekrosen des Alveolarepithels sowie eine Thrombosierung kapillärer Gefäße zählten, traten in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren häufiger auf, wurden jedoch nicht exakt quantifiziert (Abbildung 9).

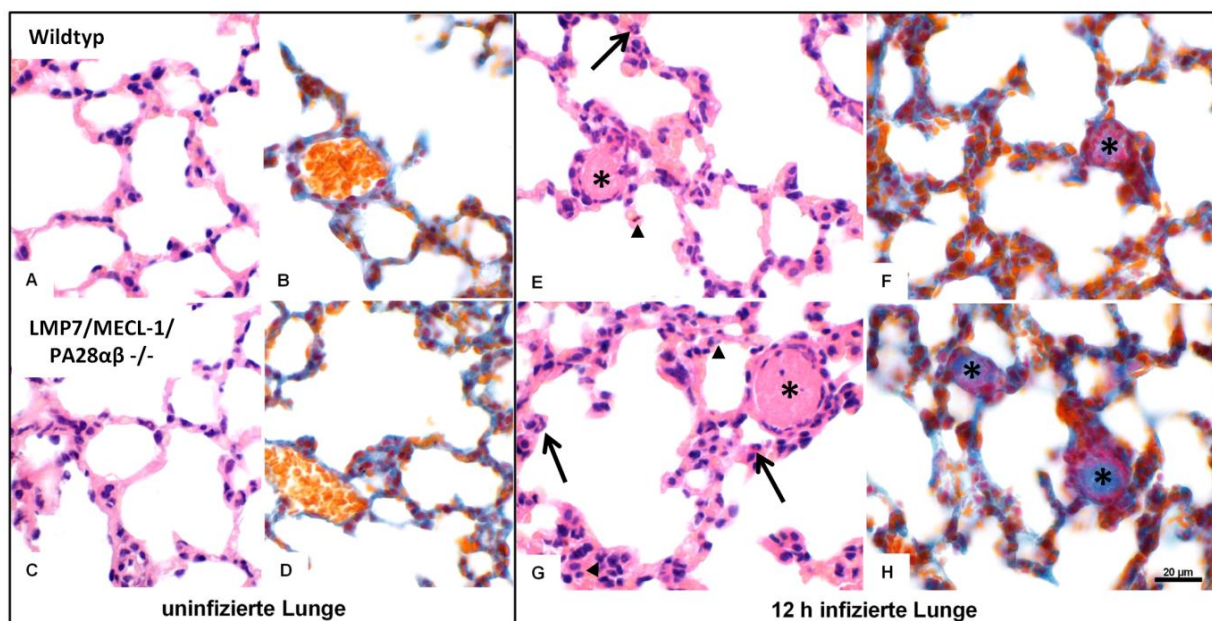


Abbildung 9: Histopathologie der Lunge

Gezeigt werden repräsentative HE und nach Ladewig gefärbte Paraffinschnitte von gesunden und 12 h infizierten Wildtyp-Mäusen (obere Reihe) im Vergleich zu gesunden und infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen (untere Reihe). **A** und **C** zeigen jeweils gesundes Alveolarepithel (HE gefärbt) und **B** und **D** venöse Gefäße und Alveolarepithel uninfizierter Individuen nach Ladewig gefärbt. Im Vergleich, sind in den HE-gefärbten Schnitten der infizierten Wildtypen (**E**) kapilläre Mikrothromben (*), vereinzelte neutrophile Granulozyten (→) und Nekrosen des Alveolarepithels (▶) zu sehen. **Abbildung F** verdeutlicht mittels Ladewigfärbung die Mikrothromben. (**G, H**) Gleiche Befunde jedoch mit erhöhtem Schweregrad wurden in den Schnitten der infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tiere deutlich. Alle Abbildungen entsprechen einer 600-fachen Vergrößerung. Der in **H** dargestellte Balken misst 20 µm. Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen aus Untersuchungen von bis zu neun Tieren pro Gruppe. (Abbildung: PhD K. Dietert)

3.2.4.3 Histopathologie der Niere

Eine häufige Begleiterscheinung der Sepsis ist das akute Nierenversagen, charakterisiert durch erhöhte Serum-Kreatininwerte und ein vermindertes Harnvolumen (Angus & van der Poll 2013). Der histopathologische Befund der Tubulusnekrose (Langenberg et al. 2008) konnte in den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Nierenpräparationen von 12 h infizierten Tieren (Abbildung 10) jedoch nicht nachgewiesen werden. Desweiteren waren auch keine Entzündungsfoci oder Mikrothromben sichtbar. Die Abwesenheit dieser Befunde bestärkt die zuvor durch die unveränderten Kreatininwerte gestützte These der nicht beeinträchtigten Nierenfunktion 12 h *p.i.* in diesem *E. coli*-Modell (siehe Kapitel 3.2.3).

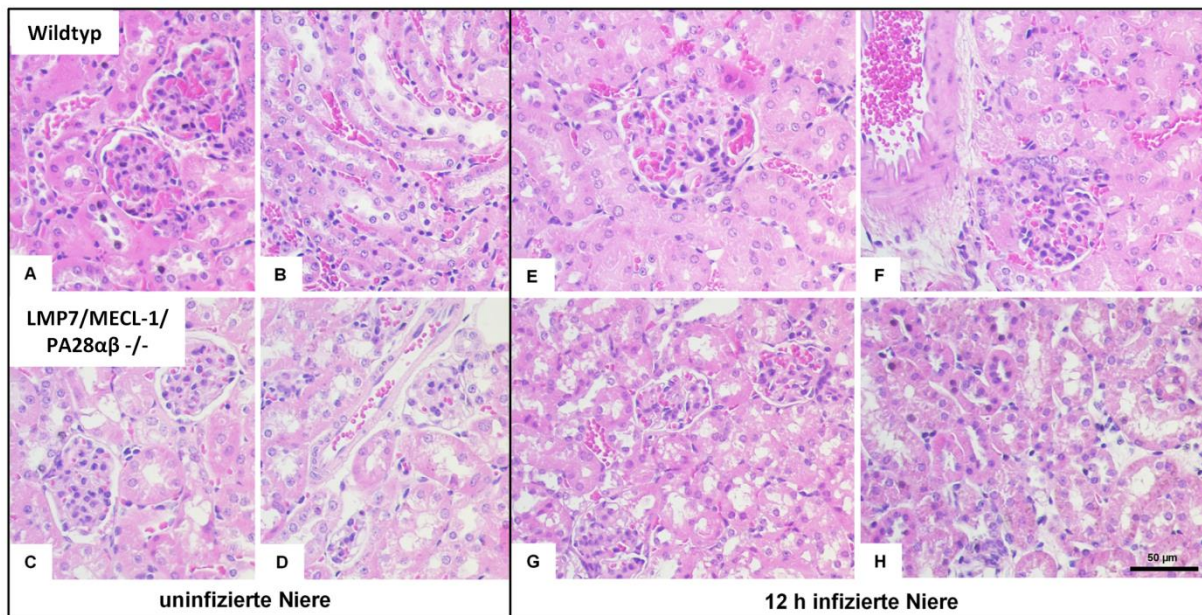


Abbildung 10: Histopathologie der Niere

Gezeigt werden repräsentative HE-gefärbte Paraffinschnitte von gesunden und 12 h infizierten Wildtyp-Mäusen (obere Reihe) im Vergleich zu gesunden und infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen (untere Reihe). **A** und **C** zeigen jeweils Ausschnitte des Nierenkortexes mit Glomeruli und **B** und **D** Tubuli uninfizierter Individuen. Die dargestellten Glomeruli- und Tubulusstrukturen in infizierten Wildtyp-Mäusen (**E**, **F**) und in den infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tieren (**G**, **H**) stellen sich ebenfalls frei von entzündlichen Foci und Nekrosen dar. Alle Abbildungen entsprechen einer 400-fachen Vergrößerung. Der in **H** dargestellte Balken misst 50 µm. Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen aus Untersuchungen von sechs Tieren pro Gruppe. (Abbildung: C. v. Lachner)

3.2.4.4 Histopathologie der Milz

Während der Sepsis kommt es zum Verlust von Lymphozyten im peripheren Blut (siehe Abbildung 6), wie auch zum Untergang von B- und T-Zellen in Thymus und Milz, was für die humane Sepsis (Hotchkiss et al. 1999) und ebenfalls in murinen Modellen dokumentiert wurde (Hotchkiss et al. 1997). Charakterisiert ist dieser Zellverlust durch den histopathologischen Befund der Kernpyknose und Karyorrhexis in der weißen Pulpa der Milz. In Zusammenhang mit diesem, verstärkter in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren auftretenden Befund, wurde eine vermehrte Einwanderung von mononukleären Entzündungszellen in das Milzparenchym (rote Pulpa) und Mikrothromben in den Knock-Out-Tieren deutlich. Die Hauptbefunde werden in Abbildung 11 in repräsentativen Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Milzpräparationen dargestellt.

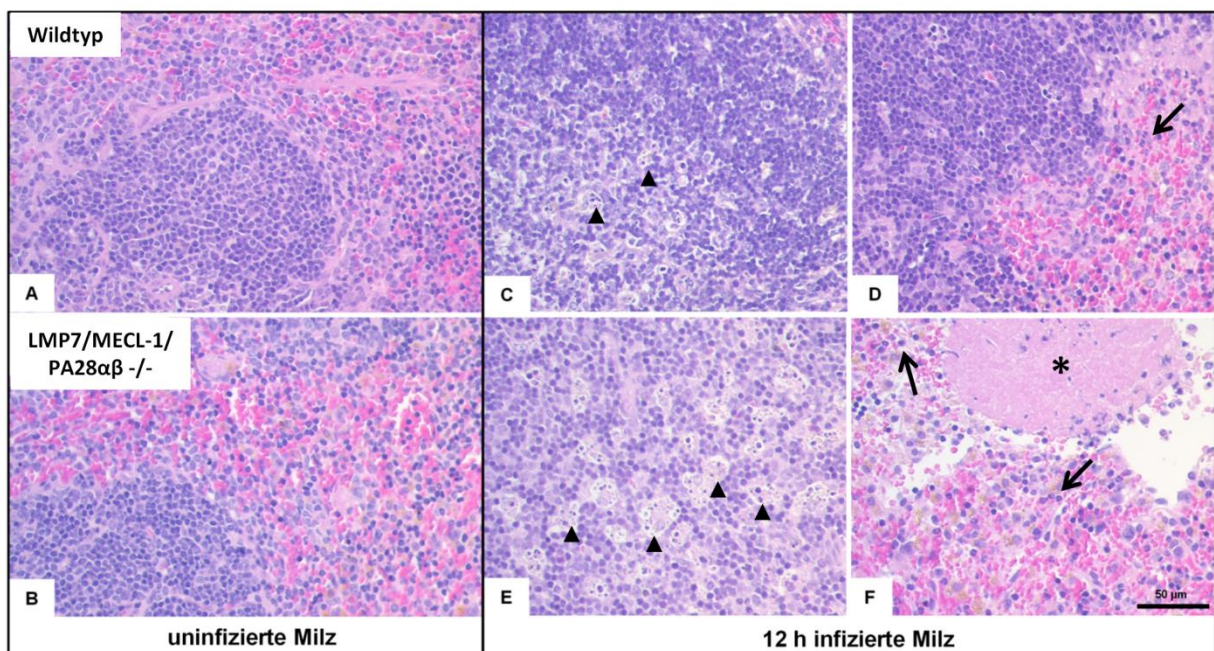


Abbildung 11: Histopathologie der Milz

Gezeigt werden repräsentative HE-gefärbte Paraffinschnitte von gesunden und 12 h infizierten Wildtyp-Mäusen (obere Reihe) im Vergleich zu gesunden und infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tieren (untere Reihe). **A** und **B** zeigen die weiße und rote Milzpulpa gesunden Milzparenchyms uninfizierter Individuen. Im Vergleich sind in den Schnitten der infizierten Wildtypen (**C**) vereinzelt Kernpyknosen und Karyorrhexis (▶) in der weißen Milzpulpa und (**D**) moderate Infiltrate neutrophiler Granulozyten (→) in der roten Pulpa sichtbar. In infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen treten die Befunde verstärkt auf. **E** zeigt den massiven Zelltod in der weißen Milzpulpa einer 12 h infizierten Knock-Out-Maus. Außerdem lassen sich in **F** entzündliche Foci mit neutrophilen Granulozyten und ein massiver hyaliner Thrombus (*) erkennen. Alle Abbildungen entsprechen einer 400-fachen Vergrößerung. Der in **F** dargestellte Balken misst 50 µm. Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen aus Untersuchungen von sechs Tieren pro Gruppe. (Abbildung: C. v. Lachner)

3.2.4.5 Histopathologie des Thymus

Neben dem Verlust von Lymphozyten in der Milz wird in Abbildung 12 der Untergang von T-Zellen im Thymus während der Infektion deutlich. Von diesem massiven Zelluntergang, begleitet von eingewanderten Bakterien, waren vor allem die I-Proteasom-Knock-Out-Tiere betroffen. Zusätzlich prägten die Knock-Out-Tiere eine hochgradige Thymitis aus, charakterisiert durch in den Randsinus infiltrierte neutrophile Granulozyten. Die Wildtyp-Tiere zeigten eine vergleichbar hochgradige Thymitis, jedoch ohne sichtbare Bakterien und nur mit vereinzelt Nekrosen.

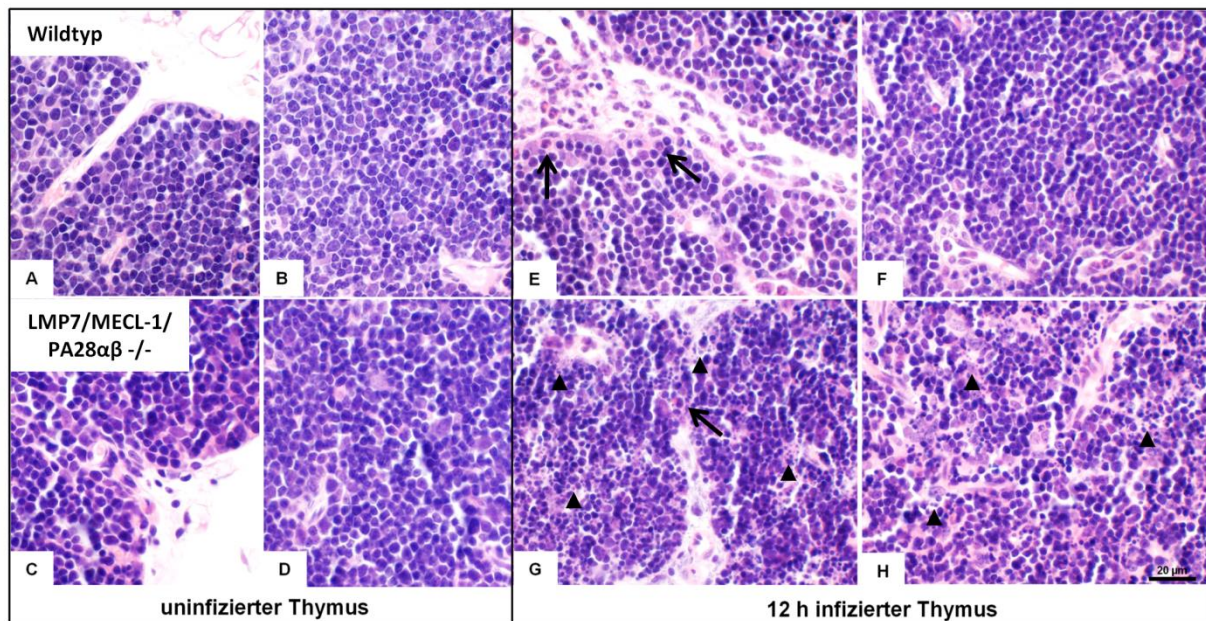


Abbildung 12: Histopathologie des Thymus

Gezeigt werden repräsentative HE-gefärbte Paraffinschnitte von gesunden und 12 h infizierten Wildtyp-Mäusen (obere Reihe) im Vergleich zu gesunden und infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tieren (untere Reihe). **A bis D** zeigen die Kortex-Areale des Thymus uninfizierter Individuen. Im Vergleich, sind in den Schnitten der infizierten Wildtypen (**E, F**) Infiltrate neutrophiler Granulozyten (→) vor allem im Randsinus des Thymus sichtbar. In infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen (**G, H**) ist neben entzündlichen Infiltraten ein massiver Zelluntergang (▶) zu erkennen. Außerdem fallen in **G** Kolonien eingewanderter *E. coli* auf. Alle Abbildungen entsprechen einer 600-fachen Vergrößerung. Der in **H** dargestellte Balken misst 20 µm. Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen aus Untersuchungen von acht Tieren pro Gruppe. (Abbildung: PhD K. Dietert)

3.2.4.6 Histopathologie mediastinaler Lymphknoten

Repräsentativ für die Betrachtung der Lymphknoten wurden die mediastinalen Lymphknoten histopathologisch untersucht (Abbildung 13). Hierbei wurde, ähnlich wie im Thymusgewebe, eine hochgradige Lymphadenitis durch eingewanderte neutrophile Granulozyten sichtbar. Besonders massive entzündliche Infiltrate wurden erneut für die I-Proteasom-Knock-Out-Tiere nach 12 h *p. i.* festgestellt. Zusätzlich konnte nur in den infizierten Knock-Out-Tieren die massenhafte Besiedlung mit *E. coli* dargestellt werden. Ungeachtet der Parallelen zu dem infizierten Thymusgewebe grenzen sich die Lymphknoten durch das Ausbleiben von Nekrosen, trotz hochgradiger Entzündung von den Befunden des infizierten Thymus ab.

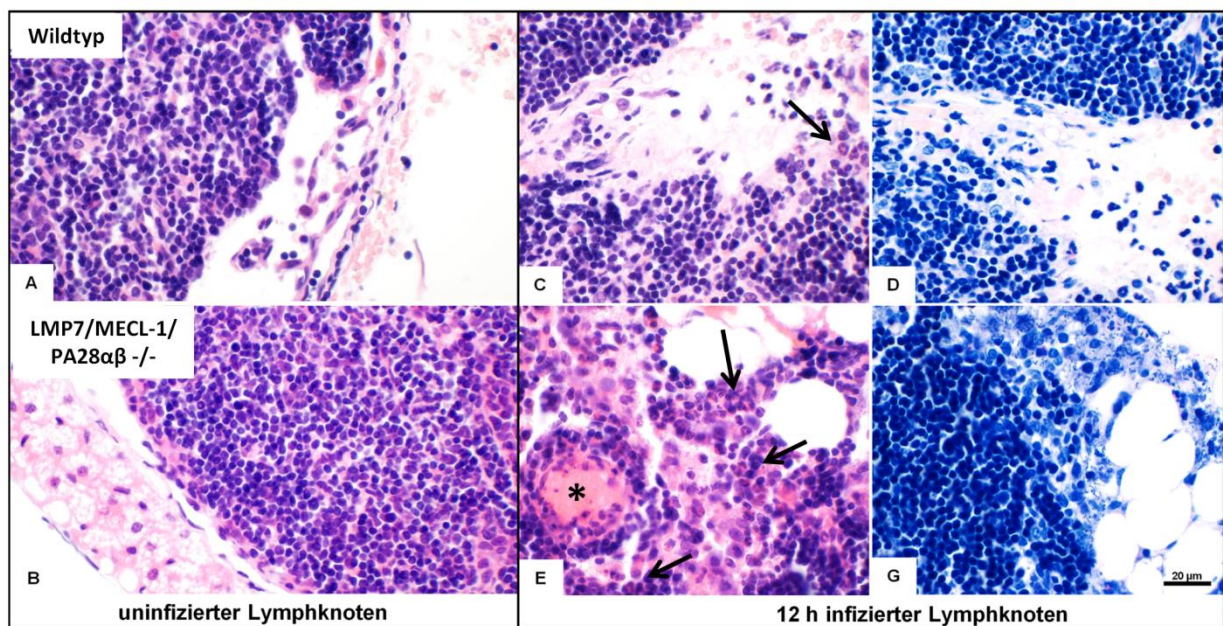


Abbildung 13: Histopathologie mediastinaler Lymphknoten

Gezeigt werden repräsentative HE und nach Giemsa gefärbte Paraffinschnitte von gesunden und 12 h infizierten Wildtyp-Mäusen (obere Reihe) im Vergleich zu gesunden und infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tieren (untere Reihe). **A** und **B** zeigen den intakten Randsinus uninfizierter Individuen. Im Vergleich werden in den Schnitten der infizierten Wildtypen (**C**) Infiltrate neutrophiler Granulozyten als Anzeichen einer Lymphadenitis (→) deutlich. Hochgradigere Befunde wurden in den Schnitten der I-Proteasom-Knock-Out-Tiere gefunden, welche in **E** repräsentativ in einem HE-gefärbten Randsinus dargestellt werden (* Thrombus). (**D**) In dem nach Giemsa gefärbten Randsinus der Wildtyp-Tiere sind keine Bakterien sichtbar, im Vergleich dazu zeigt **G** die massenhafte Infiltration von *E. coli* in den Randsinus eines infizierten Lymphknotens einer Knock-Out-Maus. Alle Abbildungen entsprechen einer 600-fachen Vergrößerung. Der in **H** dargestellte Balken misst 20 µm. Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen aus Untersuchungen von drei Tieren pro Gruppe. (Abbildung: PhD K. Dietert)

3.3 Analyse von Entzündungsparametern in Knock-Out- und Wildtyp-Tieren

3.3.1 Zirkulierende Zytokine im Blut der I-Proteasom-Knock-Out-Tiere zeigen kein stärkeres proinflammatorisches Muster als in den Wildtyp-Tieren

Die Bestimmung der Zytokine im Blut stellt eine unerlässliche Methode dar, um den Schweregrad der systemischen Entzündung zu ermitteln. In der Humanmedizin finden Zytokine in der frühen Phase der Sepsis für die Prognosestellung oder als sogenannte Biomarker Verwendung (Mera et al. 2011). Proinflammatorische Zytokine sind ein Hauptbestandteil der sofortigen Immunreaktion auf DAMPs. In der frühen Phase des Multi-Organ-Dysfunktions-Syndroms sind zirkulierende proinflammatorische Mediatoren jedoch ebenfalls Vermittler eines universalen Endothelschadens. In dieser frühen Phase führt die Überexpression der Mediatoren zu der Aktivierung von Endothel und Leukozyten, zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und zu einer gesteigerten PMN-Adhäsion sowie Migration. Diese erste massive Ausschüttung der Zytokine erfolgt durch Zellen des Blutes, der Leber und der Milz. In der späteren Phase verursachen inflammatorische Zellen im Interstitium der Organe eine vermehrte Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen und rekrutieren weitere ROS produzierende neutrophile Granulozyten, was zu Schädigungen des Parenchyms führt (H. Wang & Ma 2008). Letztendlich sind die Entzündungsmediatoren, reaktive Sauerstoffspezies, produziert von neutrophilen Granulozyten und die zytolytischen T-Lymphozyten verantwortlich für einen gesteigerten Endothelschaden (J. Wang & Qiao 2006), welcher mit Gewebsschädigungen einher geht. Um den vermehrten Gewebsschaden in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren zu erklären, wurden 14 Sepsis-relevante Zytokine und Chemokine mittels Multiplex-ELISA im Plasma der Tiere bestimmt (Abbildung 14). Da diese Mediatoren ihre Expressionsgipfel nach unterschiedlichen Zeiten erreichen (Bosmann et al. 2012), wurden die Zytokine nach 2 h, 6 h und 12 h *p. i.* im Plasma gemessen. Ein häufig betrachtetes Zytokin um den Verlauf der Erkrankung zu prognostizieren, ist TNF- α (Chaudhry et al. 2013). TNF- α ist ein sehr früh ausgeschüttetes Zytokin und ist verantwortlich für die Aktivierung weiterer proinflammatorischer Signalwege (Parameswaran & Patial 2010). Außerdem ist LPS ein potenter Stimulator für die Ausschüttung von TNF- α (Ermert et al. 2003), weshalb die Messung von TNF- α in dem *E. coli*-Mausmodell eine zusätzliche Relevanz erhält. Zu den histopathologischen Befunden passend, konnte nach zweistündiger Infektion eine signifikant erhöhte TNF- α -Plasmakonzentration in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren festgestellt werden. Für die proinflammatorischen und in der Sepsis relevanten Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN γ und G-CSF konnten keine signifikanten Unterschiede im Plasmalevel deutlich gemacht werden. Anders verhält es sich mit IL-17, welches in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren signifikant reduziert war. IL-17 wird vor allem von CD4⁺ T-Zellen, den Th17-Zellen, produziert und aktiviert im Gewebe die Produktion proinflammatorischer Chemokine, welche wichtig für das Rekrutieren von neutrophilen Granulozyten (Witowski et al. 2000) und Monozyten sind (Shahrara et al. 2010). Die These, dass die verstärkte Organschädigung der Knock-Out-Tiere durch ein erhöhtes Level an proinflammatorischen Mediatoren verursacht wurde, wird zusätzlich von der Analyse relevanter Chemokine entkräftet. KC (CXCL1), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1 β (CCL4) und RANTES (CCL5) weisen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen auf. Als Vertreter der antiinflammatorischen Immunantwort wurde IL-10 bestimmt. Ein stark erhöhtes IL-10 Plasmalevel

gilt als Hauptprädiktor für einen schweren Verlauf der Sepsis (Gogos et al. 2000). Die Messung ergab eine leichte aber nicht signifikante Erhöhung im Wildtyp-Plasma. Insgesamt sind die auch in der Humanmedizin prognostisch eingesetzten Mediatoren in diesem Modell nicht ursächlich für die erhöhte Gewebsschädigung verantwortlich, ausgenommen ist hierbei eine erhöhte Konzentration von TNF- α .

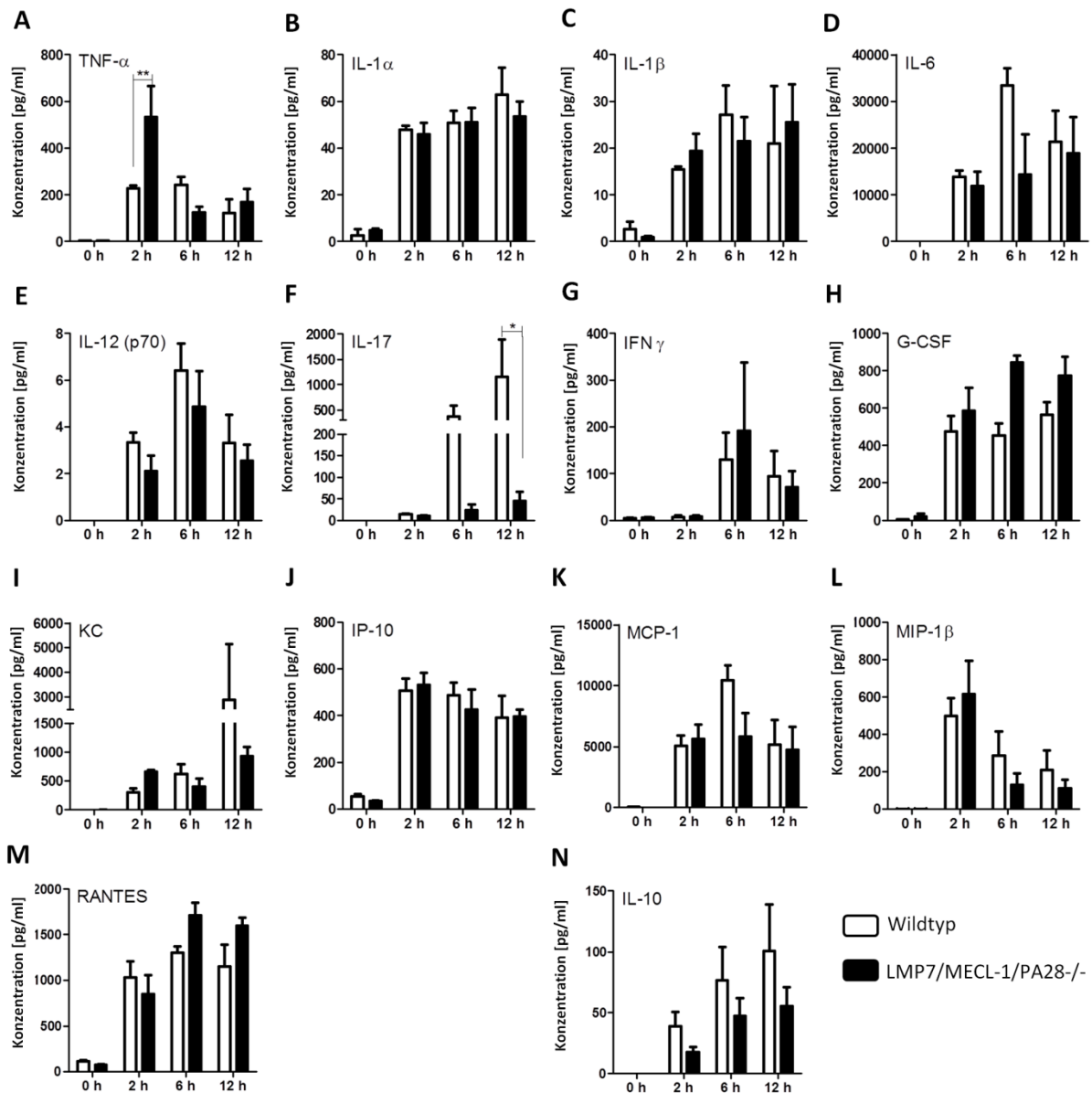


Abbildung 14: Plasmalevel ausgewählter Zytokine und Chemokine

Gezeigt werden die mittels Multiplex-ELISA bestimmten Plasmalevel wichtiger proinflammatorischer Zytokine: (A) TNF- α , (B) IL-1 α , (C) IL-1 β , (D) IL-6, (E) IL-12 p70, (F) IL-17A, (G) IFN γ und (H) G-CSF. Außerdem werden relevante proinflammatorische Chemokine: (I) KC (CXCL1), (J) IP-10 (CXCL10), (K) MCP-1 (CCL2), (L) MIP-1 β (CCL4) und (M) RANTES (CCL5) dargestellt. N zeigt IL-10 als Vertreter der antiinflammatorischen Zytokine. Gemessen wurden die Konzentrationen in Heparinplasma von uninferzierten, 2 h, 6 h und 12 h infizierten Wildtyp-Tieren und I-Proteasom-Knock-Out-Tieren. Die Proben wurden in drei unabhängigen Infektionsversuchen gesammelt. Verglichen wurden jeweils vier bis sechs Individuen pro Gruppe. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. (* p < 0,05; ** p < 0,01)

3.3.2 Die Expression ausgewählter Zytokine in Blutleukozyten unterscheidet sich kaum

Neben der Menge zirkulierender Mediatoren wurde die relative mRNA Expression ausgesuchter Zytokine in Blutleukozyten nach 6-stündiger Infektion mit Hilfe von qRT-PCR bestimmt (Abbildung 15). Da die erste Welle proinflammatorischer Mediatoren von Blutzellen, der Leber und der Milz ausgeschüttet werden (H. Wang & Ma 2008), findet die mRNA-Expression wichtiger Vertreter in diesen drei Systemen im Folgenden eine besondere Betrachtung. In 6 h nach der Infektion isolierten Blutleukozyten unterschied sich die relative mRNA-Expression zwischen den Tiergruppen kaum. Das proinflammatorische Zytokin TNF- α , welches in Proteinform im Blut erhöhte Konzentrationen in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren aufwies, ist zwar nach 6 h *p. i.* deutlich erhöht exprimiert, unterschied sich zwischen den Knock-Out- und Wildtyp-Tieren jedoch nicht. Hier sei zu bemerken, dass der Expressionsgipfel von TNF- α deutlich früher ist, weshalb dieser 6 h-Wert keine Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration nach 2 h im Blut zulässt. Ähnliche Ergebnisse wies die Expressionsanalyse der proinflammatorischen Mediatoren IL-1 β , IL-6 und KC auf. IL-1 α zeigte eine leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante Steigerung der mRNA-Expression in den Wildtypen und das Chemokin RANTES wurde im Zuge der Infektion kaum vermehrt von Blutleukozyten gebildet. Einzig IFN γ war nach 6 h *p. i.* signifikant unterschiedlich exprimiert. Die I-Proteasom-Knock-Out-Tiere zeigten einen geringeren Expressionsanstieg dieses wichtigen proinflammatorischen Zytokins im Zuge der *E. coli*-Infektion. Eine mögliche Ursache für die reduzierte Expression von IFN γ könnte eine Überexpression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 sein (Opal & DePalo 2000). Wie jedoch in Abbildung 15 dargestellt, war nach sechsständiger Infektion keine Überexpression von IL-10 in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren zu verzeichnen. Es ist eher von einer tendenziell geringeren, wenn auch nicht signifikant geringeren Expression dieses Zytokins in Blutleukozyten der I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen auszugehen. Ein weiterer antiinflammatorischer Mediator ist IL-1Ra. Dieser kompetitive Rezeptorantagonist hemmt die Wirkung der IL-1-Mitglieder durch Verdrängung der Agonisten von ihrem Rezeptor (Schreuder et al. 1997). Auch dieses Zytokin wurde in den untersuchten Proben nicht differenziell exprimiert und vervollständigt das Bild des gleichmäßigen mRNA-Expressionsusters der Sepsis-relevanten Zytokine in Blutleukozyten von I-Proteasom-Knock-Out- und Wildtyp-Tieren.

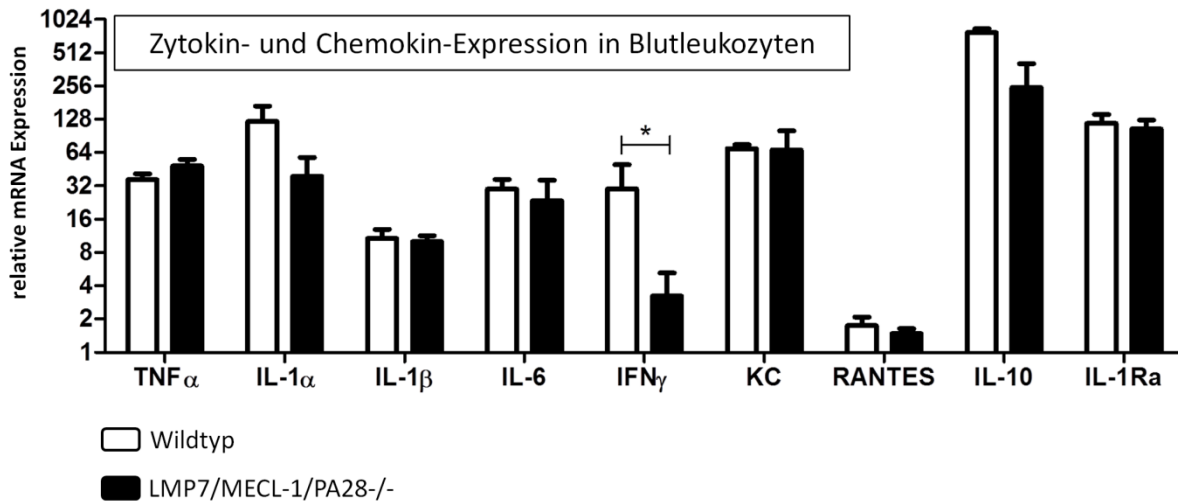


Abbildung 15: Zytokin- und Chemokin-Expression in Blutleukozyten

Die mittels qRT-PCR gemessenen relativen mRNA-Level von Sepsis-relevanten Zytokinen und Chemokinen in Blutleukozyten wurden in 6 h infizierten Mäusen bestimmt. Dargestellt wird die relative Expression, normalisiert zu den uninfizierten Kontrollen. Es wurden ausschließlich Tiere mit einem ähnlichen Schweregrad der Erkrankung verglichen. Abgebildet werden die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. (* $p < 0,05$)

3.3.3 Nur leichte Unterschiede im Zytokin-Expressionsmuster der Organe

Da auch in der Leber und der Milz, wie bereits erwähnt, die erste Welle proinflammatorischer Mediatoren produziert wird, wurde die mRNA-Expression mittels qRT-PCR relevanter Vertreter 2 h, 6 h und 12 h *p. i.* analysiert (Abbildung 16). Hierbei zeigt sich in der Untersuchung verschiedener Zytokine in Organhomogenaten ein sehr heterogenes Bild. Die für einen schweren Krankheitsverlauf prognostisch wichtigsten Zytokine TNF- α und IL-6 wiesen keinen Expressionsunterschied zwischen den Mausgruppen auf. Einzig IL-10, als prognostischer Marker, stellte sich in der Leber der Knock-Out-Tiere leicht erhöht dar. Nur das proinflammatorische Chemokin RANTES (CCL5) und der antiinflammatorische IL-1-Rezeptorantagonist, waren zumindest in der Leber der Knock-Out-Tiere während der frühen Immunantwort signifikant vermehrt exprimiert. In der Milz traf dies nur für RANTES (CCL5) zu, wobei hier generell eine sehr niedrige Expression dieses Chemokins vorlag. Vor allem die Überexpression von RANTES (CCL5) könnte durch seine starke chemotaktische Funktion (Schall et al. 1990) ausschlaggebend für eine massivere Gewebsdestruktion in der Leber sein. Gegenteilig verhielt sich die Expression von IL-1 β in Leber und Milz sowie in der Niere und im Herz (Letztere nicht dargestellt). Hierbei ist das Ergebnis in der Anfangsphase der Infektion (2 h *p. i.*) entscheidend, da IL-1 β wie auch IL-1 α , IL-6 und TNF- α zu den sofort ausgeschütteten Zytokinen gehört (Chaudhry et al. 2013). Trotz aller Heterogenität der Ergebnisse dieser Untersuchung kristallisierte sich heraus, dass IL-1 β das einzige Zytokin ist, welches in den Organen der I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse signifikant verringert exprimiert wurde. Ebenso deutlich war die Überexpression von RANTES (CCL5) in der Leber, der Milz und auch in Niere, Herz und Lunge zu beobachten, wobei dieses Chemokin am meisten in Leber, Herz und Niere exprimiert wurde. Alle weiteren proinflammatorischen Zytokine wiesen in den ersten Stunden der Erkrankung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausgruppen auf. In Bezug auf die antiinflammatorische Reaktion, vorwiegend durch IL-10 beeinflusst, wurde eine leicht erhöhte Expression in der späteren Phase der murinen *E. coli*-Sepsis (12 h *p. i.*) in den Knock-Out-Tieren erkennbar.

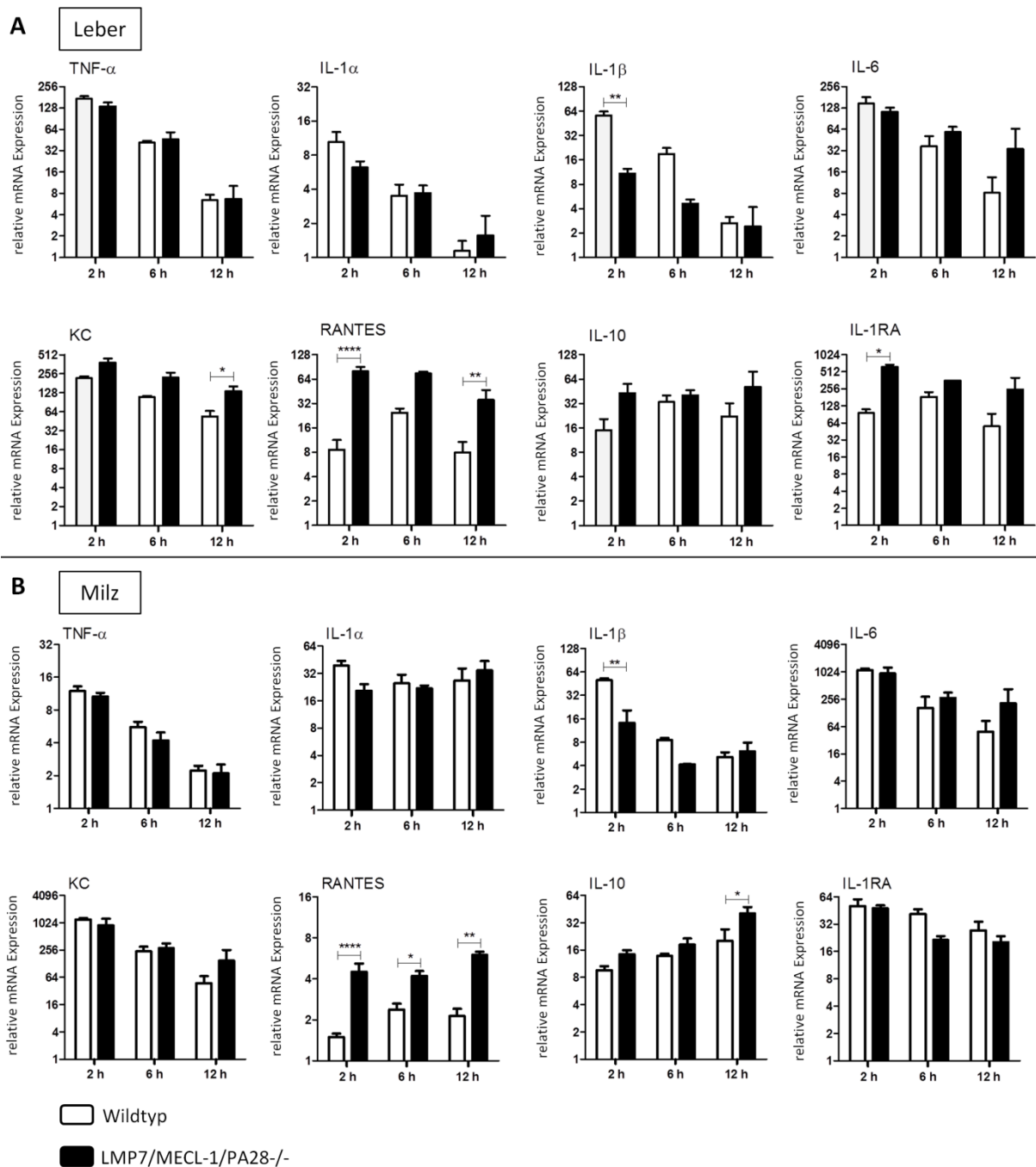


Abbildung 16: Zytokin- und Chemokin-Expression in Leber und Milz

Die mittels qRT-PCR gemessenen relativen mRNA-Level der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-6, sowie die Chemokine KC (CXCL1) und RANTES (CCL5) wurden in **(A)** Leberhomogenaten und **(B)** Milzhomogenaten von 2 h, 6 h und 12 h infizierten Tieren bestimmt und hier repräsentativ für alle untersuchten Organe dargestellt. Gleiches trifft für die Analyse der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1RA zu. Dargestellt wird die relative Expression normalisiert zu den uninfizierten Kontrollen. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden ausschließlich Tiere mit einem ähnlichen Schweregrad der Erkrankung verglichen. Abgebildet werden die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$)

3.4 Die Ausbreitung der Bakterien im Organismus

3.4.1 Nachweis einer erhöhten Bakterienlast in Peritonealflüssigkeit, Blut und Organen der I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse

Da bekannt ist, dass besonders Infektionen mit Gram-negativen Pathogenen zu starken Koagulopathien mit tiefen venösen Thrombembolien (Levi et al. 2012) und assoziierten ischämischen Nekrosen führen, wird in Abbildung 17 die Quantifizierung der Bakterien in der Peritonealflüssigkeit, im Blut und stellvertretend für weitere Organe, in der Leber dargestellt. Durch diese Analyse kann die These einer vermehrten Gewebsdestruktion durch eine signifikant erhöhte Bakterienlast in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren zugrunde gelegt werden. Auch in den nicht abgebildeten Organen Lunge, Milz, Herz und Niere wurden nach 12 h *p. i.* erhöhte, aber nicht signifikant erhöhte, Bakterienzahlen ermittelt. Eine schnellere Entwicklung der Diskrepanz in der Keimzahl war in der Lunge zu erkennen. Hier konnten schon nach 6 h *p. i.* in den Knock-Out-Tieren deutlich mehr Bakterien ausgezählt werden. Die erhöhte Bakterienlast in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren könnte ein Grund für das vermehrte Auftreten von Mikrothromben in den Organen, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, sein. Insbesondere in der Leber könnte dies ursächlich für die ischämischen Nekrosen sein.

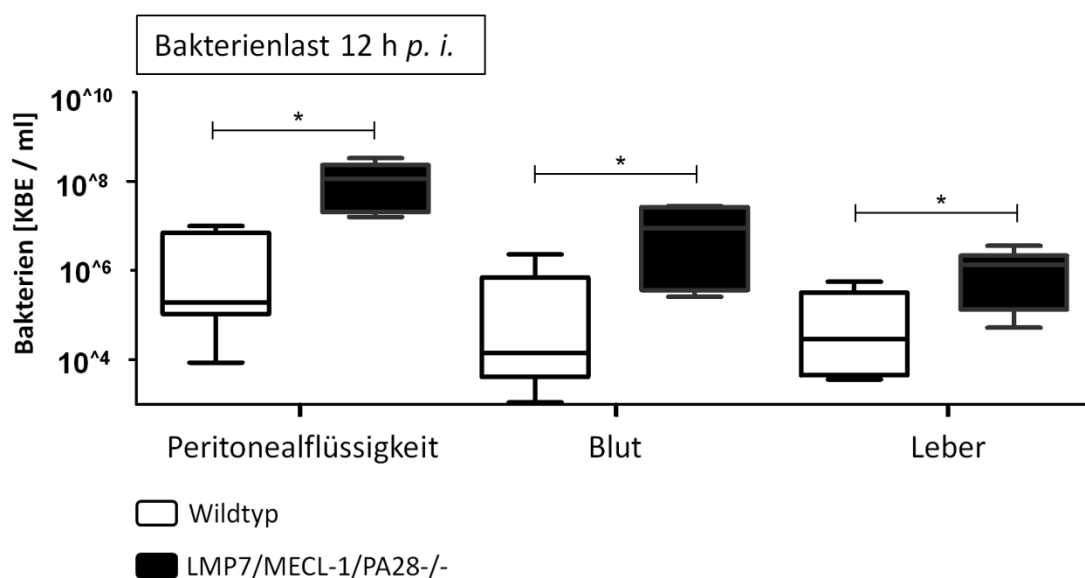


Abbildung 17: Bakterienlast in Peritonealflüssigkeit, Blut und Leber

Dargestellt wird die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten in 1 ml peritonealer Spülflüssigkeit, in 1 ml Blut und in der kompletten Leber, welche in 1 ml PBS homogenisiert wurde, 12 h *p. i.* in Wildtypen und I-Proteasom-Knock-Out-Tieren. Das Box- und Whisker-Diagramm stellt in den Boxen die Verteilung von 50 % der Daten inklusive des Medians dar. Zusätzlich wird die Verteilung maximaler Datenpunkte außerhalb des oberen und unteren Quartils mittels Whisker angezeigt. Dieses Kastendiagramm bildet Versuche mit 14 Individuen ab. (* $p < 0,05$)

3.4.2 Bakterien dringen in das Organparenchym infizierter Mäuse ein, bilden aber keine biofilmähnlichen Gruppierungen

Es ist bekannt, dass *E. coli* fähig ist im Uroepithel der Blase intrazelluläre biofilmähnliche Gruppen zu bilden, um sich damit einen Überlebensvorteil zu verschaffen (Anderson et al. 2003). Ob diese Evasionsstrategie auch in dem untersuchten Infektionsmodell vorkommt und somit die erhöhte Bakterienlast in den Organen erklären könnte, wurde mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung geprüft. Zur Visualisierung der Bakterien in den histologischen Präparaten wurden diese mit einer mRNA-Sonde, gekoppelt an ein spezifisches Fluorophor (EUB338-Sonde = Cy3, orange), markiert. Die Auswertung der Präparationen ergab ein hämatogenes Eindringen der Bakterien in das Organparenchym der Niere, der Milz, des Herzens, der Leber und der Lunge nach 12 stündiger Infektion (repräsentative Darstellung von Leber und Lunge in Abbildung 18). Desweiteren wurden phagozytierte Stäbchen in polymorphnukleären Entzündungszellen festgestellt. Eine Gruppenbildung der Bakterien konnte nicht nachgewiesen werden. Auch im Verteilungsmuster der Bakterien ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stellen jedoch nur einen Eindruck dar. Exakte Quantifizierungen der Bakterienlast konnten aufgrund der geringen Probenzahl nicht vorgenommen werden.

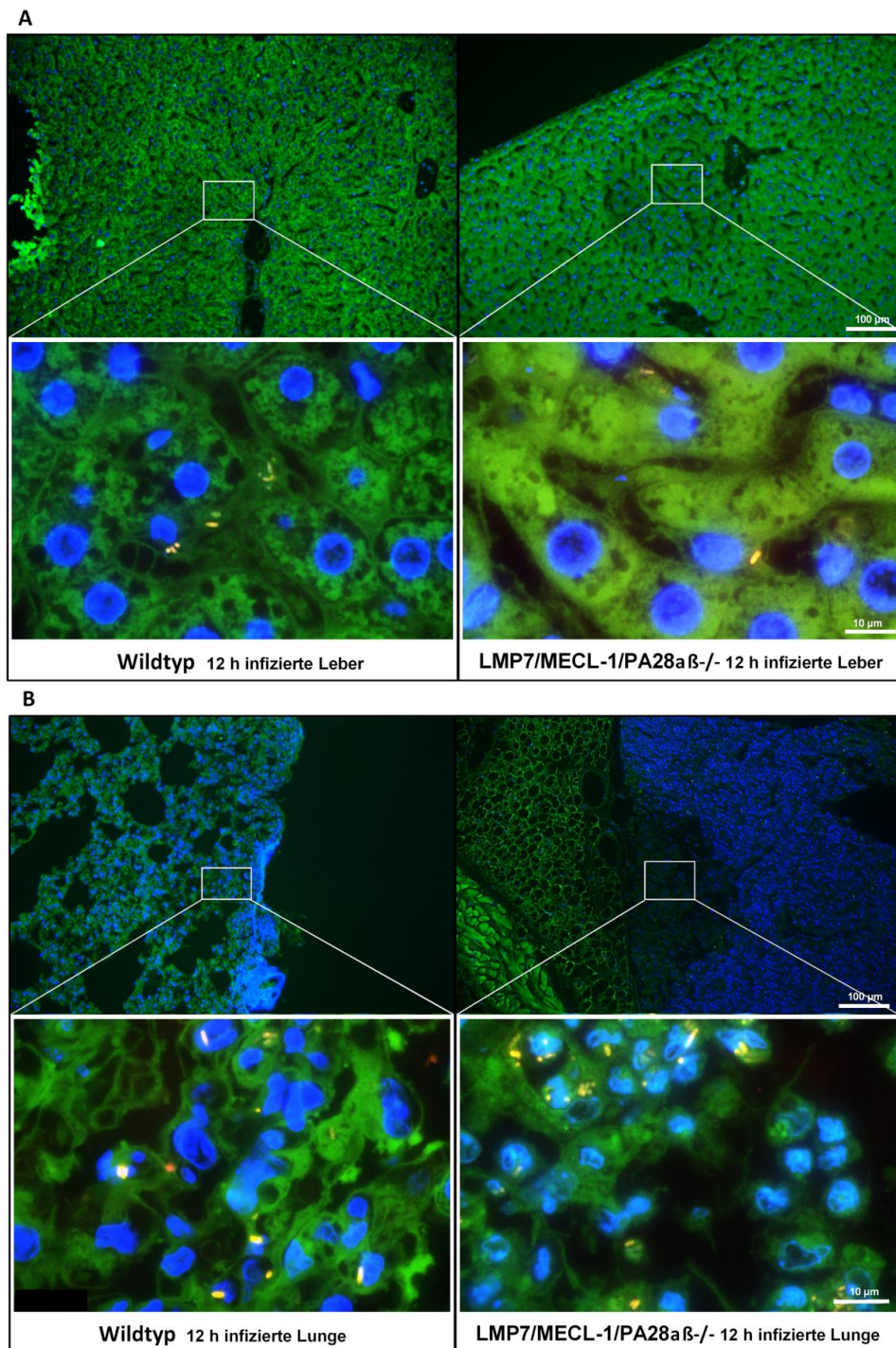


Abbildung 18: *E. coli* im Leber- und Lungenparenchym

Dargestellt werden Bilder der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von (A) Leber- und (B) Lungengewebe 12 h infizierter Wildtyp-Tiere (linke Reihe) und I-Proteasom-Knock-Out-Tiere (rechte Reihe). Die Visualisierung intrazellulärer *E. coli* im Parenchym sowie in Entzündungszellen, hier (A) in einer Kupferzelle und (B) in polymorphnukleären Entzündungszellen dargestellt, erfolgte mit der EUB338-Sonde, gekoppelt mit Cy3 (orange). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) und das Gewebe mit FITC (grün) markiert. Die abgebildeten Darstellungen der Leber sind repräsentativ für die Analyse von vier Individuen pro Gruppe. Die Analyse der Lunge wurde nur an je einem Tier durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer 100-fachen (obere Reihe) und mit 1000-fachen Vergrößerung (untere Reihe) aufgenommen. (Abbildung: AG A. Moter)

3.5 Quantifizierung der Leukozyten und Charakterisierung von Effektoreigenschaften

3.5.1 Kein signifikanter Unterschied der Leukozyten-Anzahl im Peritonealraum

Die zuvor dargestellten Ergebnisse vermitteln die Annahme, dass der vermehrte Gewebsschaden, welcher zu einer erheblichen Organdysfunktion und letztlich zum früheren Tod der I-Proteasom-Knock-Out-Tiere führte, durch die höhere Bakterienlast verursacht wurde. Im Folgenden stellt sich die Frage, warum sich die Bakterien in den Knock-Out-Mäusen ungehinderter vermehren konnten. Um dies zu klären soll in diesem Kapitel der Ort der Infektion und seine immunologische Abwehr eingehend betrachtet werden. Die Basis dieser Analyse bildet die Quantifizierung der im Peritoneum lokalisierten Leukozyten im gesunden und infizierten Tier. Abbildung 19 stellt repräsentative Zytozentrifugate der Peritonealflüssigkeit vor der Infektion und 12 h *p. i.* dar. In gesunden Tieren wurden keine Granulozyten, sondern einzig mononukleäre Leukozyten vorgefunden. Hierbei handelte es sich vorwiegend um residente, sogenannte *large* Peritonealmakrophagen (Ghosn et al. 2010). Während der Infektion veränderte sich die Zusammensetzung der Zellpopulationen durch das Einwandern etlicher neutrophiler aber auch einiger eosinophiler Granulozyten, hin zu einem vorwiegend polymorphnukleären Zellbild. 12 h *p. i.* konnten außerdem phagozytierte Stäbchen in den Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden (nicht abgebildet). Die angefertigten Zytozentrifugate wurden quantifiziert, wobei deutlich wurde, dass die I-Proteasom-Knock-Out-Tiere leicht verringerte Mengen Leukozyten vor- und während der Infektion im Peritoneum beherbergten. Dieses Ergebnis erreichte jedoch keine biologische Signifikanz und gilt somit nicht alleinig als Ursache für die verminderte antibakterielle Abwehr in den Knock-Out-Tieren.

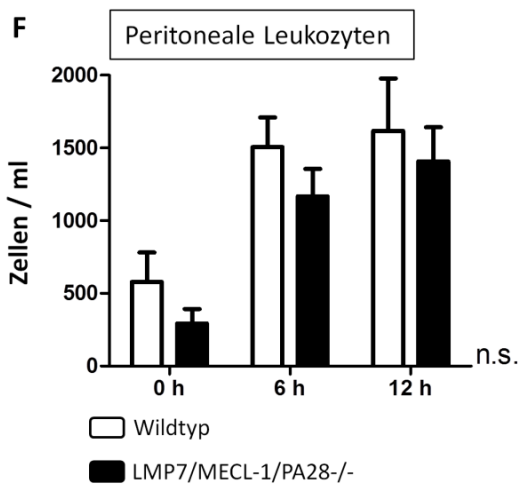
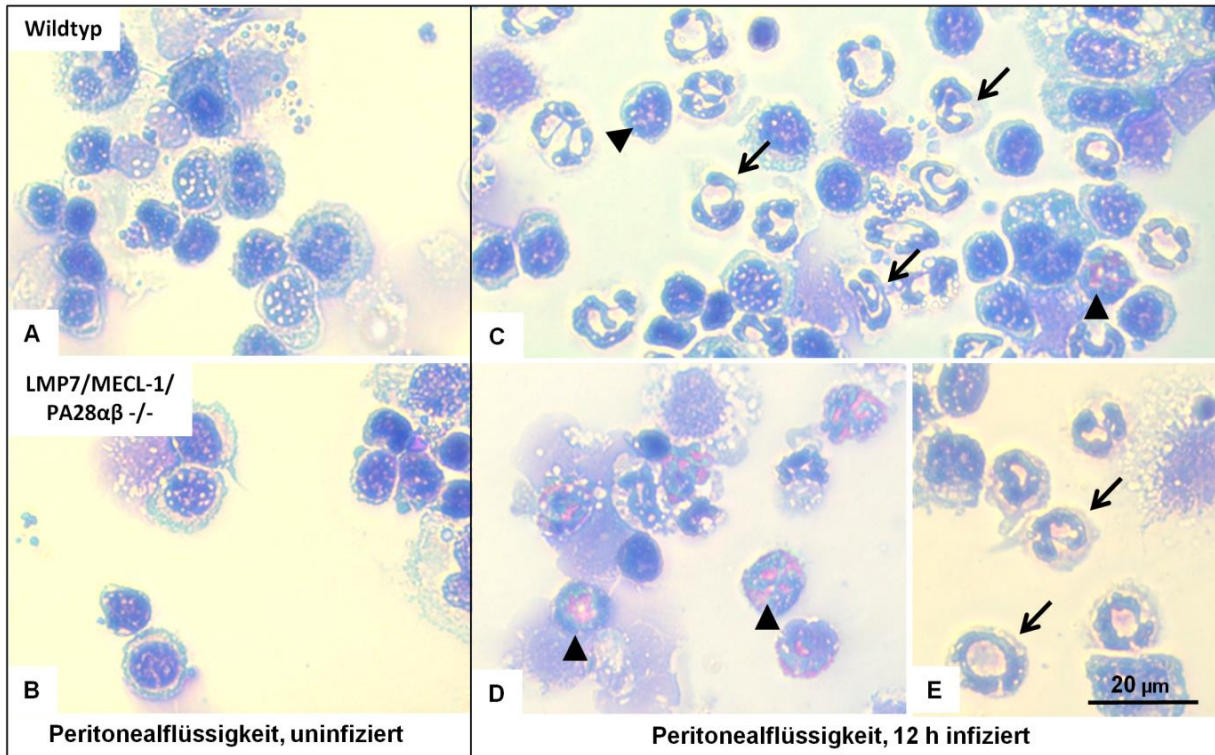


Abbildung 19: Gesamtzahl peritonealer Leukozyten

Es werden vergleichend Zytozentrifugate von Wildtypen (obere Reihe) und I-Proteasom-Knock-Out-Tieren (untere Reihe) dargestellt. **A** und **B** zeigen die typischen mononukleären Zellen der Peritonealflüssigkeit gesunder Tiere, wobei **C**, **D** und **E** die eingewanderten neutrophilen (\rightarrow) und eosinophilen (\blacktriangleright) Granulozyten 12 h *p. i.* zeigen. (Abbildung: C.v. Lachner) Die Zytozentrifugate wurden mit Diff-Quick angefärbt und mit 1000-fache Vergrößerung aufgenommen. **F** stellt die Quantifizierung der Zytozentrifugate von je 8 Individuen pro Gruppe und Zeitpunkt dar. Abgebildet werden die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Infektionsversuchen. (n.s. = nicht signifikant)

3.5.2 Vergleichbare Vitalität peritonealer Zellen in beiden Tiergruppen

Die aus der peritonealen Spülflüssigkeit isolierten und aufgereinigten Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde der Anteil toter Zellen mit dem Farbstoff *Viability dye eflour 780*[®] bestimmt. Abbildung 20 zeigt, dass der prozentuale Anteil toter Zellen zwischen Wildtyp- und Knock-Out-Tieren besonders 12 h *p. i.* nicht variiert. Als uninfizierte Kontrollen dienten hier mit 0,9%iger Natriumchloridlösung scheininfizierte (*sham infected*) Tiere.

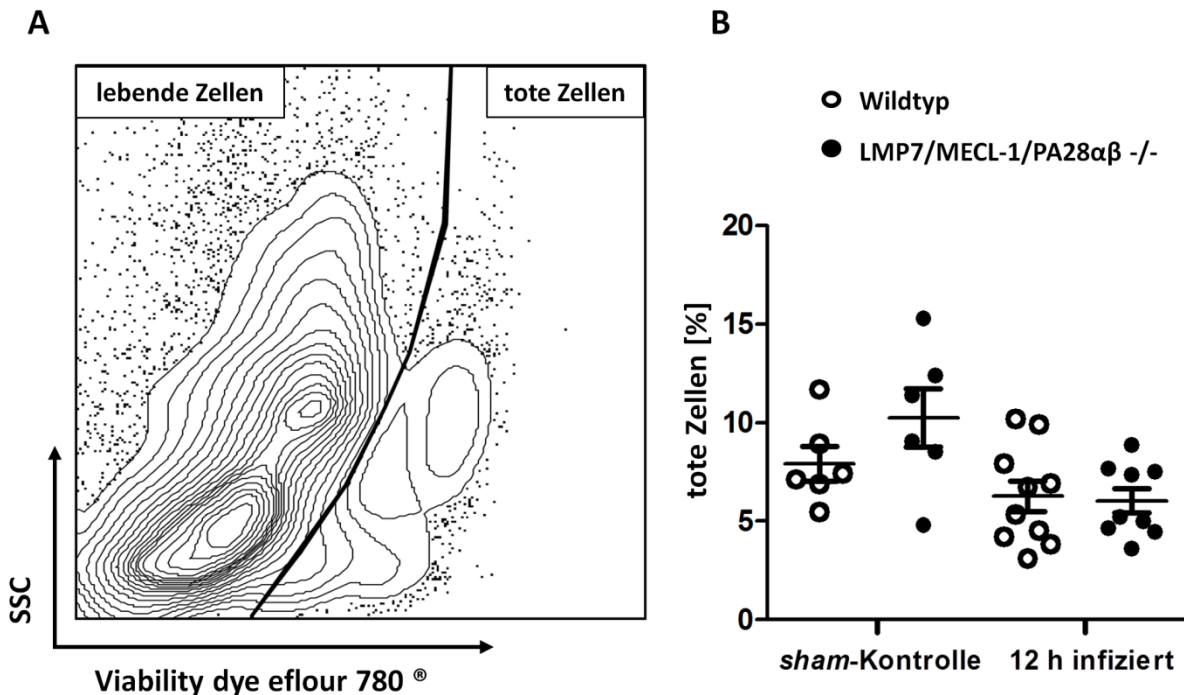


Abbildung 20: Anteil toter Zellen in peritonealer Spülflüssigkeit

Gezeigt wird der per Durchflusszytometrie bestimmte Anteil toter Zellen in der peritonealen Spülflüssigkeit von scheininfizierten und 12 h infizierten Mäusen. **A** zeigt den gewählten Ausschnitt der lebenden Zellen in einem repräsentativen *Dotplot*. **B** stellt den prozentualen Anteil der toten Zellen für jedes analysierte Individuum, inklusive Mittelwert \pm SD der Tiergruppen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen dar.

3.5.3 Gleiche Verteilung der Leukozytenpopulationen in beiden Versuchsgruppen

Unter Ausschluss toter Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil weiterer relevanter Leukozytenpopulationen in der peritonealen Spülflüssigkeit ermittelt. In Abbildung 21 und 22 wird jedoch deutlich, dass auch diese sich zwischen Wildtyp- und Knock-Out-Mäusen nicht unterschieden. Beobachtet wurde, wie schon in den Zytozentrifugaten visualisiert, dass im Zuge der Infektion neutrophile Granulozyten in das Peritoneum einströmten. Sie stellen neben den Makrophagen die Hauptpopulation phagozytischer Immunzellen dar, welche eine sofortige Reaktion auf das Pathogen hervorrufen. Sie sind somit der wichtigste Bestandteil der angeborenen Immunantwort auf das eindringende Pathogen und für die Eradikation dessen verantwortlich (Seeley et al. 2012). Sie sind Schlüsselzellen der Immunprozesse, die in diesem Fall im Peritoneum ihren Ursprung fanden. Die vermehrte Bakterienlast in den I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen lässt sich auf Grund dieser Ergebnisse nicht durch eine Reduktion oder einem mangelnden Rekrutieren neutrophiler Granulozyten in die Bauchhöhle erklären. Desweiteren befanden sich die Neutrophilen in einem ähnlich aktivierten Zustand, wie hier über den *Median Fluorescence Intensities* (MFI) des Oberflächenantigens CD11b ermittelt (Abbildung 21 E). Da neutrophile Granulozyten im Zuge bakterieller Infektion ihren Phänotyp von CD11b⁻ zu CD11b⁺ wechseln (Ren et al. 2016, Tsuda et al. 2004), lässt sich über diesen Oberflächenmarker ihr Aktivierungsstatus vergleichen. Ly6C⁺ Monozyten stellten einen geringen Anteil der analysierten Leukozyten dar (Abbildung 21 C), da sie eher als phänotypische Vorstufe der inflammatorischen Makrophagen zu betrachten sind (Geissmann et al. 2003, Ghosn et al. 2010). Auch hier wichen die Zellmengen zwischen den infizierten Mausgruppen kaum voneinander ab. Eine weitere für die erste Abwehr und Erkennung der Pathogene essentielle Zellgruppe stellen die Makrophagen dar. In dieser Untersuchung konnten zwei verschiedene Makrophagenpopulationen unterschieden werden, die im Folgenden als inflammatorische und residente Makrophagen bezeichnet werden. Das Hauptmerkmal der residenten Makrophagen ist ihre Größe, weshalb sie auch als *large peritoneal macrophages* (Ghosn et al. 2010) bezeichnet werden. Sie haben einen CD11b⁺, F4/80^{high}-Phänotyp und sind unabhängig von Immunreaktionen im Peritoneum ansässig. Im Zuge der Infektion verschwinden sie, während eine zweite Population, die inflammatorischen Makrophagen in den Fokus rückt. Sie sind kleiner und durch einen CD11b⁺, F4/80^{low}-Phänotyp von den residenten Makrophagen zu unterscheiden (Ghosn et al. 2010). In Abbildung 22 werden die beiden Makrophagenpopulationen sowie die Population der eosinophilen Granulozyten, welche mittels durchflusszytometrischer Messung abgegrenzt werden konnten (Abbildung 22 E), dargestellt. Wie bei den vorher beschriebenen Zellpopulationen unterscheiden sich auch die Makrophagen und Eosinophilen der beiden infizierten Mausgruppen prozentual kaum voneinander. Eine Einschränkung im Rekrutieren von Immunzellen, der Zellzahl wie auch der Vitalität von Makrophagen, Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten war in diesem Modell nicht die Ursache für die erhöhte Bakterienlast der I-Proteasom-Knock-Out-Tiere.

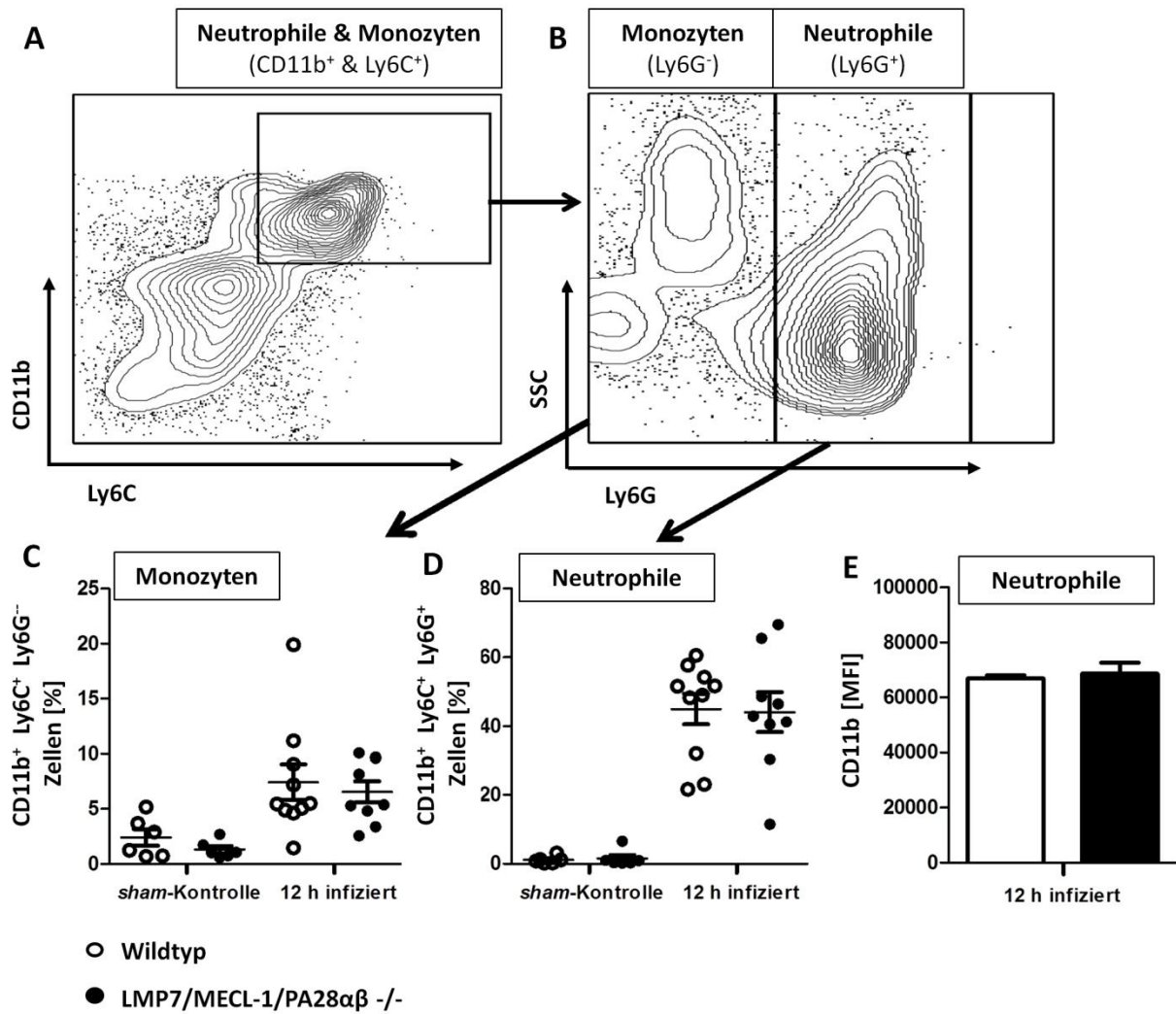


Abbildung 21: Anteil der Monozyten und Neutrophilen in peritonealer Spülflüssigkeit

Gezeigt wird der per Durchflusszytometrie bestimmte Anteil der Monozyten und neutrophilen Granulozyten in der peritonealen Spülflüssigkeit von scheininfizierten und 12 h infizierten Mäusen. **A** und **B** zeigen die *Gating*strategie an repräsentativen *Dotplots*. **C** stellt den prozentualen Anteil der Monozyten und **D** der Neutrophilen für jedes analysierte Individuum, inklusive Mittelwert \pm SD der Tiergruppen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen dar. **(E)** Zusätzlich wurde der Median Fluorescence Intensities (MFI) von CD11b auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten, 12 h *p. i.* als Aktivierungsmarker bestimmt. Die hier dargestellten Balken entsprechen ebenfalls den Mittelwerten \pm SD der analysierten Individuen aus zwei Infektionsversuchen.

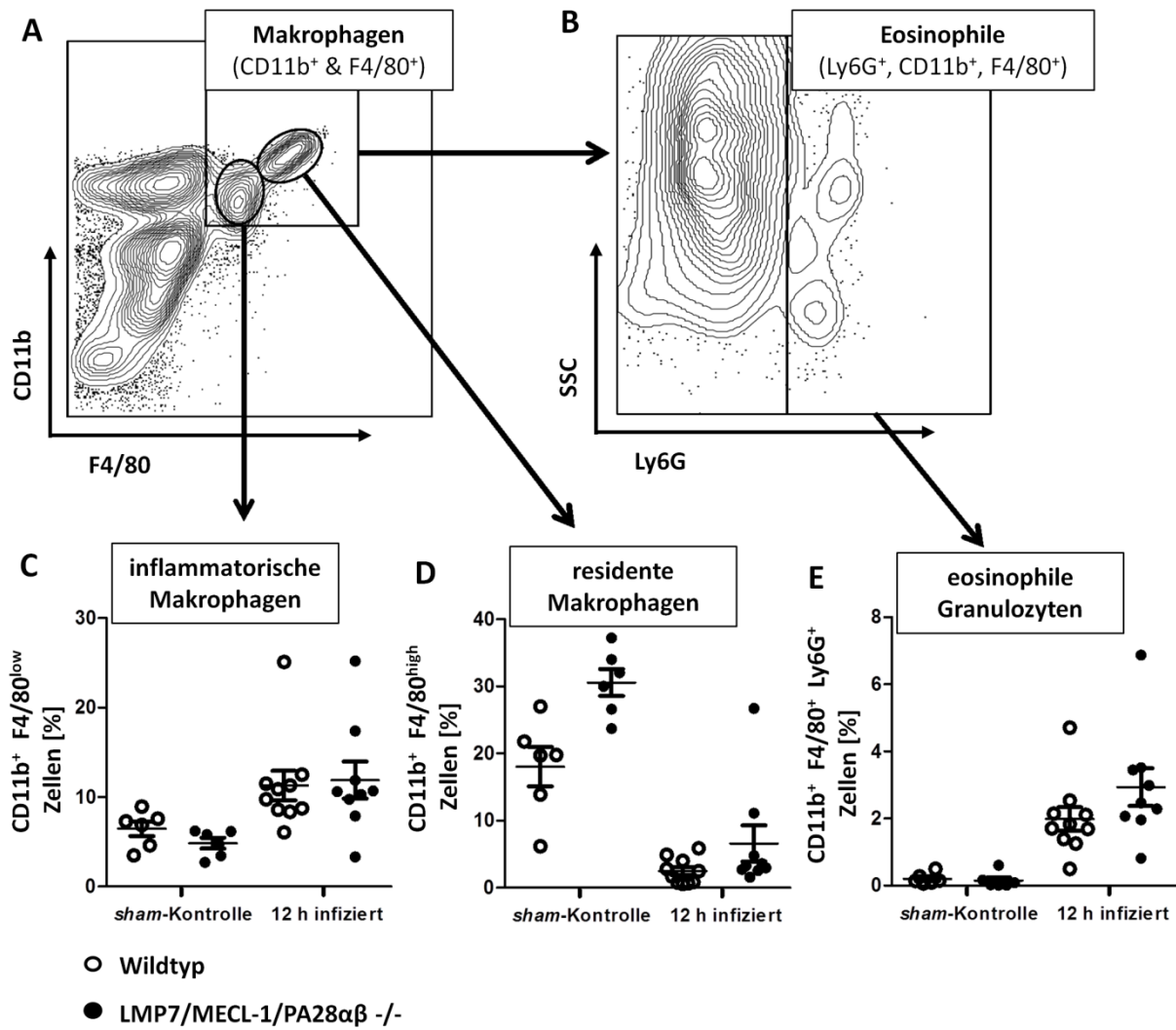


Abbildung 22: Anteil der Makrophagen und Eosinophilen in peritonealer Spülflüssigkeit

Gezeigt wird der per Durchflusszytometrie bestimmte Anteil der inflammatorischen und residenten Makrophagen, sowie der eosinophilen Granulozyten in der peritonealen Spülflüssigkeit von scheininfizierten und 12 h infizierten Mäusen. **A** und **B** zeigen die *Gating*strategie an repräsentativen *Dotplots*. Weiterhin wird der prozentuale Anteil (**C**) der inflammatorischen Makrophagen (**D**), der residenten Makrophagen und (**E**) eosinophiler Granulozyten für jedes analysierte Individuum, inklusive Mittelwert \pm SD der Tiergruppen aus zwei unabhängigen Infektionsversuchen dargestellt.

3.5.4 Makrophagen zeigen reduzierte PD-L1 und MHC-I Expressions-Level

Da die tatsächlichen Immunzellzahlen im Peritoneum nicht für die verminderte Eradikation der Pathogene verantwortlich waren und auch der Aktivierungsstatus der neutrophilen Granulozyten in den Tiergruppen identisch war, wurden nun immunrelevante Oberflächenantigene auf den peritonealen Makrophagen analysiert. Durch die Quantifizierung von PD-L1, CD86, MHC-I (Abbildung 23) und MHC-II (nicht abgebildet) sollte geklärt werden, ob eine Dysfunktion der Makrophagenpopulationen eine Ursache für die höhere Bakterienlast und den vermehrten Untergang von Lymphozyten in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren sein könnte. Das Oberflächenantigen PD-L1, welches den Liganden des auf Lymphozyten exprimierten Rezeptors PD-1 darstellt, wird in der Sepsis bei erhöhter Expression mit einem immunsuppressiven Zustand in Verbindung gebracht (Boomer et al. 2011). Hier zeigte die Population der inflammatorischen Makrophagen während der Durchflusszytometrie ähnliche Level (dargestellt als MFI) von PD-L1 auf der Zelloberfläche. Anders verhielten sich die sogenannten residenten Makrophagen. Im Zuge der Infektion exprimierten sie deutlich erhöhte PD-L1-Level. Dieser infektionsbedingte Anstieg fiel in den Knock-Out-Tieren signifikant vermindert aus, obwohl die Anzahl PD-L1⁺-Zellen in beiden Tiergruppen vergleichbar war (Abbildung 23 A-B). Dieses Ergebnis ist gegenläufig zu der Annahme, eine erhöhte Expression von PD-L1 könnte für die stark ausgeprägte Lymphopenie in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren verantwortlich sein. Neben PD-L1 wurde CD86, welcher zusammen mit CD80 als immunmodulatorischer Ligand gilt, quantifiziert. In diesem Fall unterlag die Expression von CD86 während der Infektion in den inflammatorischen Makrophagen einem dezenten Anstieg, wobei auch der relative Anteil CD86⁺-Zellen leicht zunahm. In den residenten Makrophagen änderte sich das Level der CD86-Expression im Vergleich zur scheininfizierten Kontrolle nicht und auch innerhalb der Tiergruppen gab es kaum Variationen (Abbildung 23 C-D). Eine weitere mögliche Dysfunktion der Makrophagen könnte eine verminderte MHC-Präsentation sein, welche sich unabhängig von der Infektion in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren bestätigte. Schon in inflammatorischen Makrophagen scheininfizierter Tiere wurde eine signifikant verminderte MHC-I-Expression nachgewiesen. In den residenten Makrophagen kam es während der Infektion zu einem Expressionsanstieg der MHC-I-Moleküle. Dieser Anstieg war in den Knock-Out-Zellen jedoch signifikant vermindert ausgeprägt (Abbildung 23 E-F). Die Expression der MHC-II-Moleküle konnte nur auf inflammatorischen Makrophagen untersucht werden (nicht abgebildet), da residente Peritonealmakrophagen diese nicht exprimieren (Ghosn et al. 2010). Trotz Infektionsbedingtem Expressionsanstiegs ergaben sich für die Expression der MHC-II-Moleküle keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen.

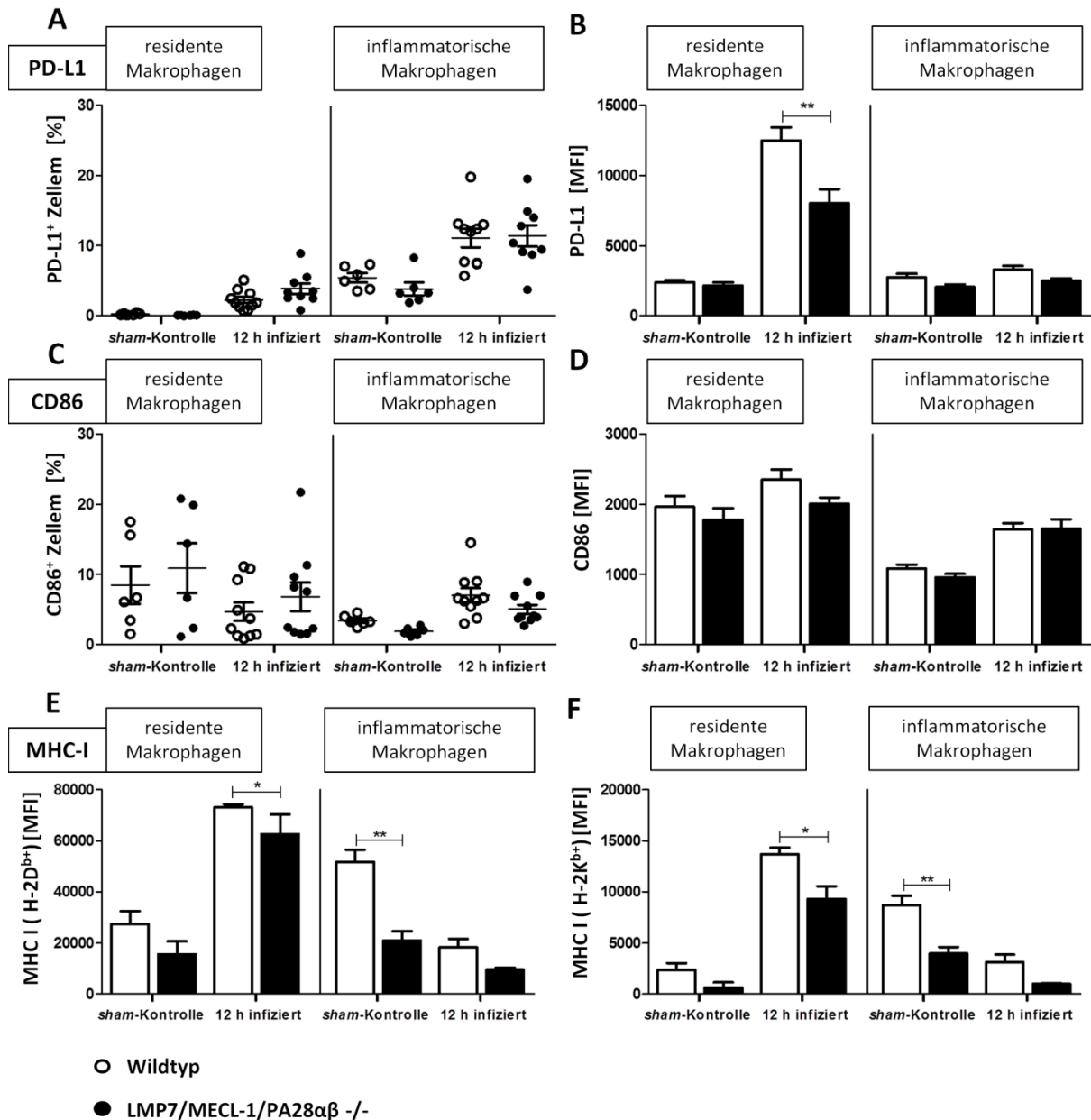


Abbildung 23: Expression von PD-L1, CD86 und MHC-I auf peritonealen Makrophagen

Gezeigt wird der per Durchflusszytometrie bestimmte Anteil der (A) PD-L1⁺ und (C) CD86⁺ inflammatorischen bzw. residenten peritonealen Makrophagen in 12 h infizierten und scheininfizierten Mäusen. Jedes analysierte Individuum wurde in den Diagrammen inklusive des Mittelwerts ± SD der Tiergruppen aus 2 unabhängigen Infektionsversuchen abgebildet. Die Expression von (B) PD-L1 und (D) CD86 wurde durch die *Median Fluorescence Intensities* (MFI) der entsprechenden Oberflächenantigene durchflusszytometrisch ermittelt. Desweiteren wurde mit der Bestimmung der MFI von (E) H-2D^b und (F) H-2K^b die Expression der MHC-I-Moleküle verglichen. Die Werte wurden als Mittelwert ± SD aus Tieren von zwei Infektionsversuchen dargestellt. (* p < 0,05; ** p < 0,01)

3.5.5 Residente Makrophagen der I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse zeigen keine Einschränkung in Phagozytose und intrazellulären Abtöten von *E. coli*

Um die Funktionalität der Makrophagen noch detaillierter zu untersuchen, wurden relevante Effektorfunktionen, wie das Phagozytieren und intrazelluläre Abtöten der Bakterien bewertet (Abbildung 24). Zwei verschiedene Versuchsansätze wurden für diese Funktionstests etabliert. Die residenten Makrophagen wurden aus gesunden Tieren durch peritoneale Lavage isoliert und wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, aufgereinigt und bis zu 20 Stunden kultiviert. Anschließend wurden sie für die erste Versuchsreihe mit vorher opsonisierten, nicht infektiösen FITC-gekoppelten *Escherichia coli* BioParticles® in einem Verhältnis 1:20 (MOI = 20) stimuliert. Nach 60 Minuten wurde die Reaktion mit kaltem PBS gestoppt. Die auf Kammerobjektträgern kultivierten Makrophagen wurden getrocknet, fixiert und mit einem DAPI-haltigem Eindeckelmedium für die Auswertung vorbereitet. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die phagozytierenden Zellen ausgezählt. Zusätzlich wurde die Menge der aufgenommenen Partikel in den Zellen quantifiziert. Wie in Abbildung 24 A-B dargestellt, haben Wildtyp- und I-Proteasom-Knock-Out-Zellen nach 60 Minuten die gleiche Menge *E. coli*-Partikel aufgenommen. Für den zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen zuvor mit 100 U/ml murinem IFN γ vorstimuliert. Nach etwa 12 h wurden sie dann in einem Verhältnis 1:2 (MOI = 2) mit vitalem *E. coli* A247 infiziert. Nach 30 Minuten wurde die Menge überlebender *E. coli* bestimmt. Die Zell-Bakterien-Suspension wurde nun mit Gentamicin versetzt, um alle restlichen noch außerhalb der Zelle lebenden Bakterien abzutöten. Die übrigen Zellen wurden anschließend mechanisch lysiert. Mittels Ausplattieren dieser Suspension konnte nun die Anzahl der *E. coli*, welche nach 30 Minuten in die Zelle aufgenommen, aber nicht getötet wurden, bestimmt werden. Abbildung 24 C-D zeigt, dass die Fähigkeit die Bakterien zu phagozytieren und zu töten in den I-Proteasom-Knock-Out-Makrophagen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nicht reduziert ist.

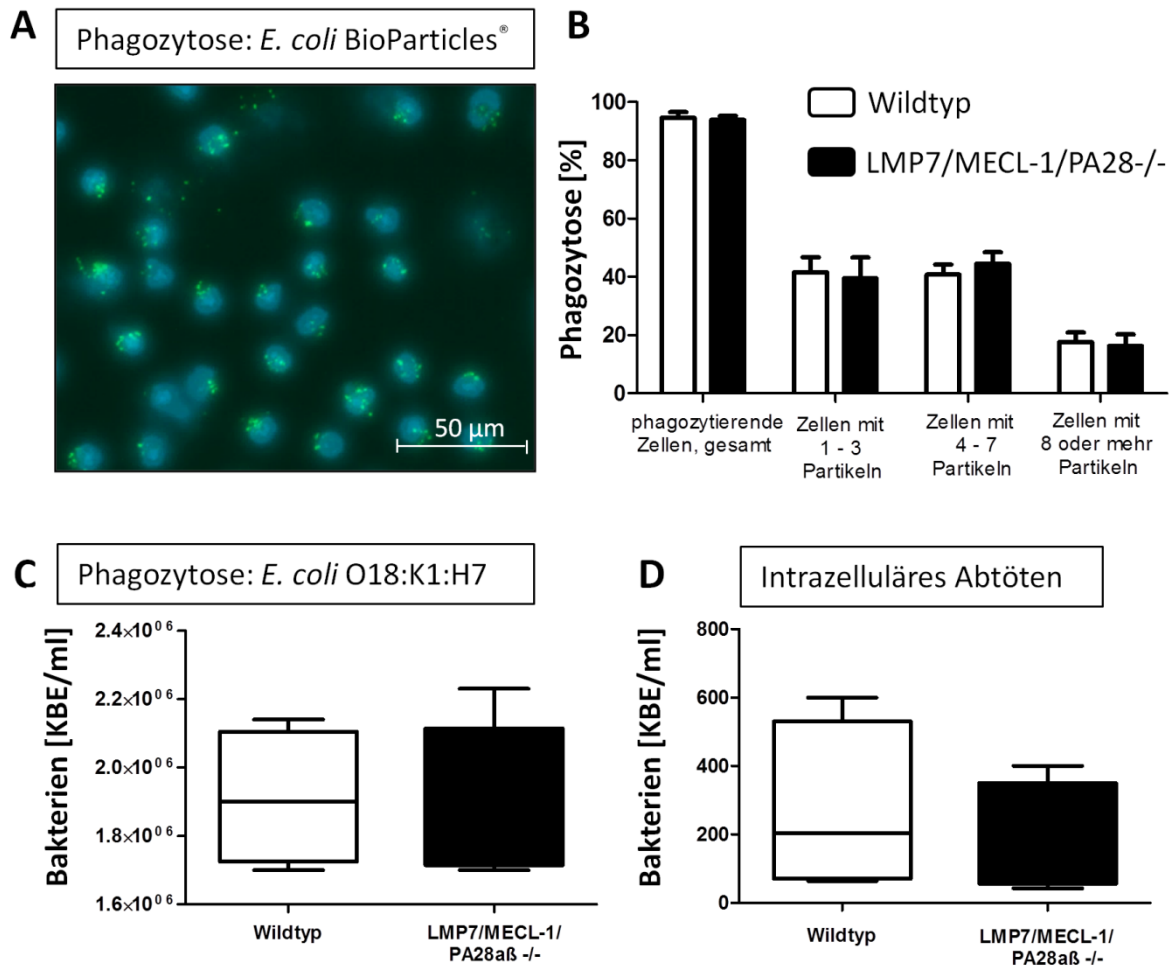


Abbildung 24: Phagozytose und intrazelluläres Abtöten muriner Peritonealmakrophagen

A zeigt repräsentativ die Phagozytoseeffizienz von residenten Peritonealmakrophagen aus Wildtyp- und I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen (Abbildung: C. v. Lachner). Die Zellen wurden isoliert und kultiviert und anschließend mit FITC-gekoppelten nicht infektiösen *E. coli*-Partikeln (grün) in einem Verhältnis 20:1 für 60 Minuten stimuliert. Nach Fixation der Zellen und Färbung der Kerne mit DAPI (blau) konnten die Partikel pro Zelle ausgezählt werden. **B** zeigt die Quantifizierung der Phagozytose-aktiven Makrophagen beider Tiergruppen und den Anteil der Zellen, welche 1-3, 4-7 bzw. 8 oder mehr Partikel nach 60 Minuten aufgenommen hatten. Die Darstellung umfasst Versuche mit Zellen von fünf unabhängig voneinander getesteten Tieren pro Gruppe. In **C** wird die Phagozytoseeffizienz und in **D** das intrazelluläre Abtöten der phagozytierten *E. coli* A247 in Peritonealmakrophagen aus Wildtyp- und I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen nach 30 Minuten dargestellt. Die mit 100 U/ml IFN γ vorstimulierten Makrophagen wurden mit vitalem *E. coli* (MOI 2) infiziert und nach 30 Minuten die noch vorhandene Bakterienmenge bestimmt. **(D)** Um das intrazelluläre Abtöten zu bestimmen wurden die Zellen gewaschen und mit Gentamicin behandelt bevor sie mechanisch lysiert und die Menge der in der Zelle überlebenden Bakterien bestimmt wurde. **B** bildet alle Daten als Mittelwert \pm SD ab. Das Box- und Whisker- Diagramm (**C**, **D**) stellt in den Boxen die Verteilung von 50 % der Daten inklusive des Medians dar. Zusätzlich wird die Verteilung maximaler Datenpunkte außerhalb des oberen und unteren Quartils mittels Whisker angezeigt. Alle Daten dieser Abbildung beschreiben Versuche mit Zellen von fünf Tieren pro Gruppe.

3.5.6 Die peritoneale Stickstoffmonoxid- und Zytokinproduktion ist in beiden Versuchsgruppen vergleichbar

Da die Bauchhöhle mit ihren residenten Immunzellen, die wie beschrieben mehrheitlich aus Makrophagen bestehen (Abbildung 22), die erste Verteidigungslinie in der hier induzierten Peritonitis darstellen, soll in diesem Kapitel auf die lokale peritoneale Immunantwort eingegangen werden. Dafür wurde die Peritonealflüssigkeit hinsichtlich der inflammatorischen Mediatoren (Abbildung 25) und dem ausgeschütteten Stickstoffmonoxid (Abbildung 26) beurteilt. Die Zytokine und Chemokine wurden für diese Analyse in der peritonealen Spülflüssigkeit aus 2 h, 6 h und 12 h infizierten sowie aus gesunden (0 h) Tieren mittels Multiplex-ELISA bestimmt. Betrachtet man die frühe Immunreaktion, bei der vorrangig TNF- α und IL-6 (Abbildung 25 A, D) eine Hauptrolle spielen, wurden nach zweistündiger Infektion leicht erhöhte, aber nicht signifikant erhöhte Level dieser beiden Schlüsselzytokine in den Knock-Out-Tieren gemessen. IL-1 (Abbildung 25 B, C) hingegen zeigt nach 2 h *p. i.* gleiche Level und stellt sich nach 6 h, im Gegensatz zu IL-6 und TNF- α signifikant verringert in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren dar. Weitere biologisch signifikant geringer ausgeschüttete Zytokine 6 h *p. i.* waren IL-12, IL-17 und IFN γ (Abbildung 25 E, F, G). Diese letzteren Resultate stehen im Einklang mit den Plasmazytokinleveln, beschrieben in Kapitel 3.3.1. Auch für die Chemokine (KC, IP-10, MCP-1, MIP-1 β und RANTES) stellte sich nach 6 h der Trend einer verminderten Ausschüttung in den Knock-Out-Tieren dar. Ein weiterer essentieller Mechanismus zur Abtötung extrazellulärer Bakterien ist die Befähigung einiger Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, zur Synthese von Stickstoffmonoxid (Fang 2004). Um Stickstoffmonoxid in der gewonnen peritonealen Spülflüssigkeit zu bestimmen wurde stellvertretend Nitrit in den Proben gemessen. Dieses entsteht durch die spontane Oxidation von Stickstoffmonoxid unter physiologischen Bedingungen. Mittels Griess-Reagenz, wie im Material- und Methodenteil (Kapitel 2.2.3.17) bereits beschrieben, wurde das Nitrit über eine Farbreaktion bestimmt. Abbildung 26 stellt die in 6 h infizierten Tieren kaum messbare Erhöhung des Nitritlevels in der peritonealen Spülflüssigkeit dar. Nach 12 h war eine Anreicherung von Nitrit in der Peritonealflüssigkeit detektierbar, jedoch gab es zwischen den Tiergruppen keinen biologisch signifikanten Unterschied.

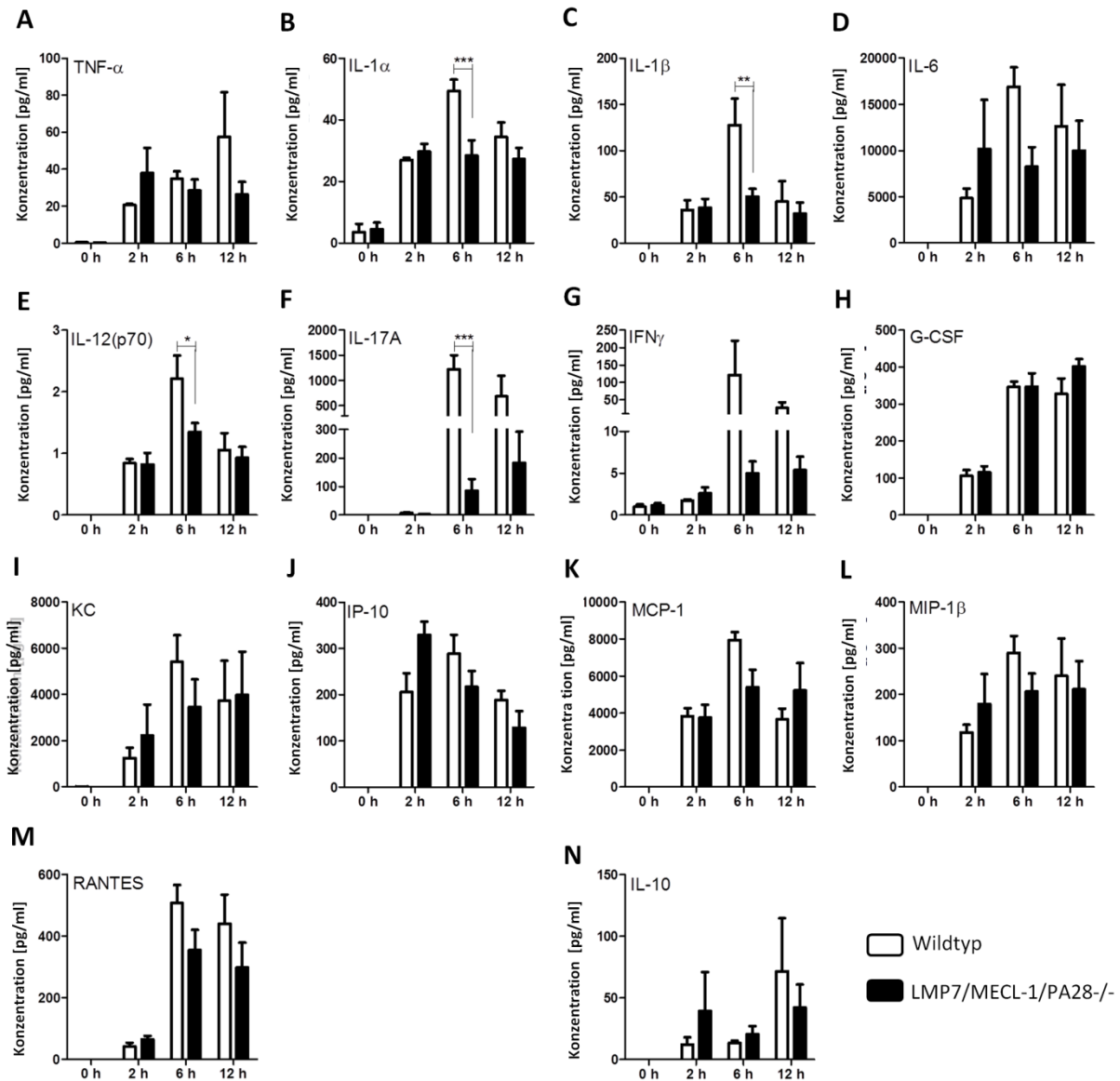


Abbildung 25: Ausgewählte Zytokine und Chemokine in der peritonealen Spülflüssigkeit Gezeigt werden die mittels Multiplex-ELISA bestimmten Level wichtiger proinflammatorischer Zytokine: **(A)** TNF- α , **(B)** IL-1 α , **(C)** IL-1 β , **(D)** IL-6, **(E)** IL-12 p70, **(F)** IL-17A, **(G)** IFN γ und **(H)** G-CSF in der Peritonealflüssigkeit. Außerdem werden relevante proinflammatorische Chemokine: **(I)** KC (CXCL1), **(J)** IP-10 (CXCL10), **(K)** MCP-1 (CCL2), **(L)** MIP-1 β (CCL4) und **(M)** RANTES (CCL5) dargestellt. **N** zeigt IL-10 als Vertreter der antiinflammatorischen Zytokine. Gemessen wurden die Konzentrationen in der peritonealen Spülflüssigkeit von uninfizierten, 2 h, 6 h und 12 h infizierten Wildtyp-Tieren und I-Proteasom-Knock-Out-Tieren. Die Proben wurden in drei unabhängigen Infektionsversuchen gesammelt. Verglichen wurden jeweils vier bis sechs Individuen pro Gruppe. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

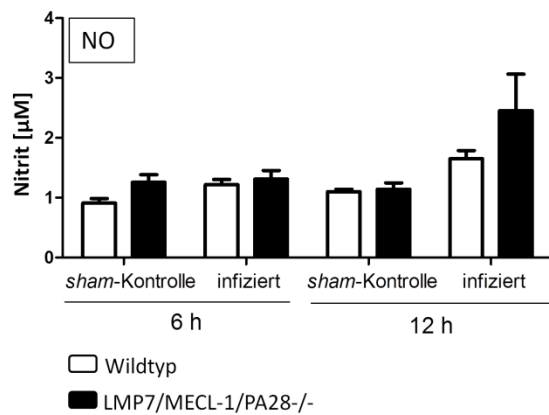


Abbildung 26: NO in Peritonealflüssigkeit

Es wird der indirekte Nachweis von NO durch den Umsatz der Griess-Reagenz und Nitrit zu einem Diazofarbstoff in der peritonealen Spülflüssigkeit dargestellt. Verglichen werden die akkumulierten Mengen von Nitrit in 6 h und 12 h infizierten Mäusen zu ihren mit 0,9%igem NaCl scheininfizierten Kontrollen. Die Darstellung umfasst vier unabhängig voneinander durchgeführte Versuche mit einer Gesamtzahl von zwölf Tieren pro Gruppe, wobei die Daten als Mittelwert \pm SD dargestellt werden.

3.6 Verminderte MHC-Expression auf B- und T-Zellen und reduzierte Anzahl zytotoxischer T-Zellen als Zeichen einer gestörten lymphozytären Abwehr

3.6.1 Verringerte Vitalität aus der Milz isolierter Immunzellen

Nach eingehender Untersuchung der generalisierten und lokalen Immunantwort ist der Hauptbefund auf Seiten der zellulären Immunabwehr die verstärkte Reduktion der Lymphozyten in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren, welche sich in einer gravierenden Lymphopenie manifestierte. Auch in der histopathologischen Untersuchung wurde ein deutlich verstärktes Ausmaß an Zelltod in Thymus und Milz beobachtet. Um die Lymphozyten näher zu charakterisieren wurden in vier unabhängigen Infektionsversuchen Milzen scheininfizierter, sowie 6 h und 12 h infizierter Tiere entnommen und aus ihnen, wie in Kapitel 2.2.3.10 beschrieben, Zellen isoliert. Für die statistischen Auswertungen dieser Versuche sei erwähnt, dass die 6 h und 12 h scheininfizierten Tiere zu einer Gesamtgruppe, den uninfizierten Kontrollen, zusammengefasst wurden, da sich in den Ergebnissen keine Unterschiede ergaben. Somit konnten einige Tiere eingespart werden und trotzdem valide Ergebnisse erzielt werden. Die Milzzellen wurden nun hinsichtlich ihrer Vitalität untersucht. Dafür wurden die Zellen mit dem Farbstoff *Viability dye eflour 780*[®] inkubiert, wodurch sich mittels Durchflusszytometrie der Anteil toter Zellen bestimmen ließ. Wie in Abbildung 27 B verdeutlicht, erreichte die statistische Auswertung keine biologische Signifikanz, da hier Werte aus vier unabhängigen Präparationen eine erhöhte Varianz verursachten. Sichtbar wird jedoch der Trend einer reduzierten Vitalität, dargestellt durch einen erhöhten Anteil toter Zellen der I-Proteasom-Knock-Out-Zellen zu allen Zeitpunkten der Infektion und ebenfalls schon in den uninfizierten Tieren. Dies spricht für eine scheinbar generalisierte ausgeprägtere Fragilität der Milzzellen in den Knock-Out-Tieren.

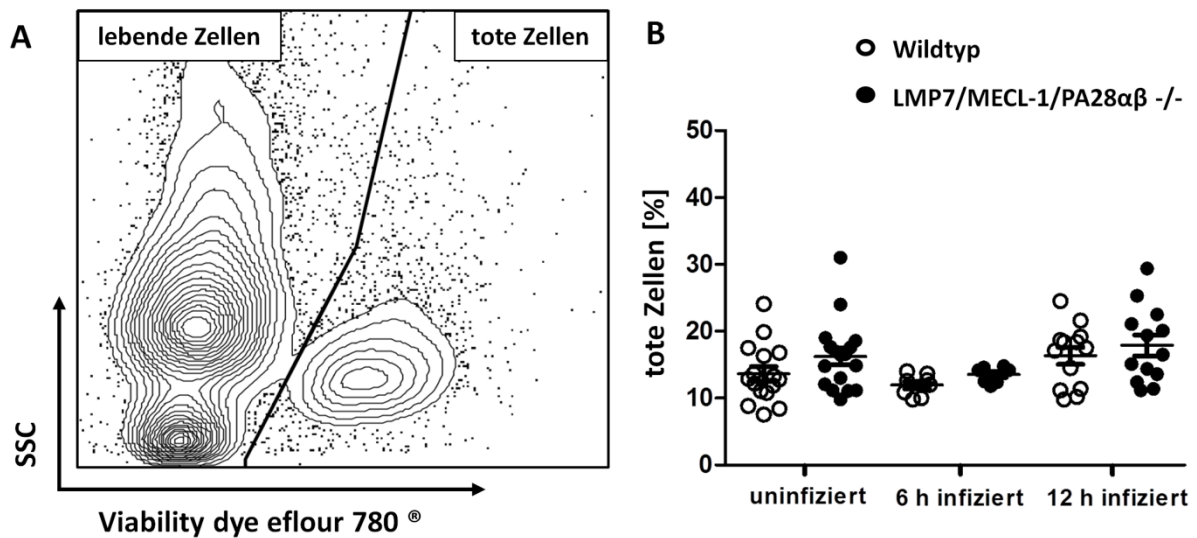


Abbildung 27: Anteil toter, aus der Milz isolierter Zellen

Gezeigt wird der per Durchflusszytometrie bestimmte Anteil toter Splenozyten von uninfizierten und 6 h sowie 12 h infizierten Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen. **A** zeigt den gewählten Ausschnitt der lebenden Zellen in einem repräsentativen *Dotplot*. **B** stellt den prozentualen Anteil der toten Zellen für jedes analysierte Individuum inklusive Mittelwert \pm SD der Tiergruppen aus vier unabhängigen Infektionsversuchen dar.

3.6.2 Quantifizierung ausgewählter Lymphozytenpopulationen und deren MHC-Expression

3.6.2.1 I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse weisen reduzierten Anteil $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen mit verringerter MHC-I-Expression auf

Von den isolierten Splenozyten wurde nun der Anteil ausgesuchter Lymphozytenpopulationen bestimmt. Per Durchflusszytometrie wurden, unter Ausschluss der toten Zellen und nach vorheriger Positivselektion der Zellen auf CD3, die $CD8^+$ sowie die $CD4^+$ Zellen bestimmt. Zusätzlich wurde die Oberflächenexpression von MHC-I auf diesen Zellen durch den *Median Fluorescence Intensities* bestimmt (Abbildung 28). Hierbei wurde eine stark verringerte Fraktion der $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen, unabhängig von der Infektion, in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren gemessen (Abbildung 28 B). Diese anteilig geringere Menge zytotoxischer T-Zellen bleibt über die Dauer der Infektion bestehen. Anders stellen sich die $CD4^+$ T-Helferzellen dar (Abbildung 28 D). Sie sind vor der Infektion in beiden Tiergruppen gleich vertreten und nehmen während der Infektion ab. Der Verlust der $CD4^+$ Zellen ist 12 h *p. i.* in den Knock-Out-Tieren jedoch signifikant stärker ausgeprägt. Die Analyse zweier relevanter Epitope der MHC-I-Moleküle, H-2D^b und H-2K^b auf den $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen, ergab in den Knock-Out-Mäusen schon in den gesunden Tieren eine verminderte Oberflächenexpression. Diese mit den Wildtyp-Tieren verglichene verminderte Expression intensivierte sich im Zuge der Infektion in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren (Abbildung 28 C, E).

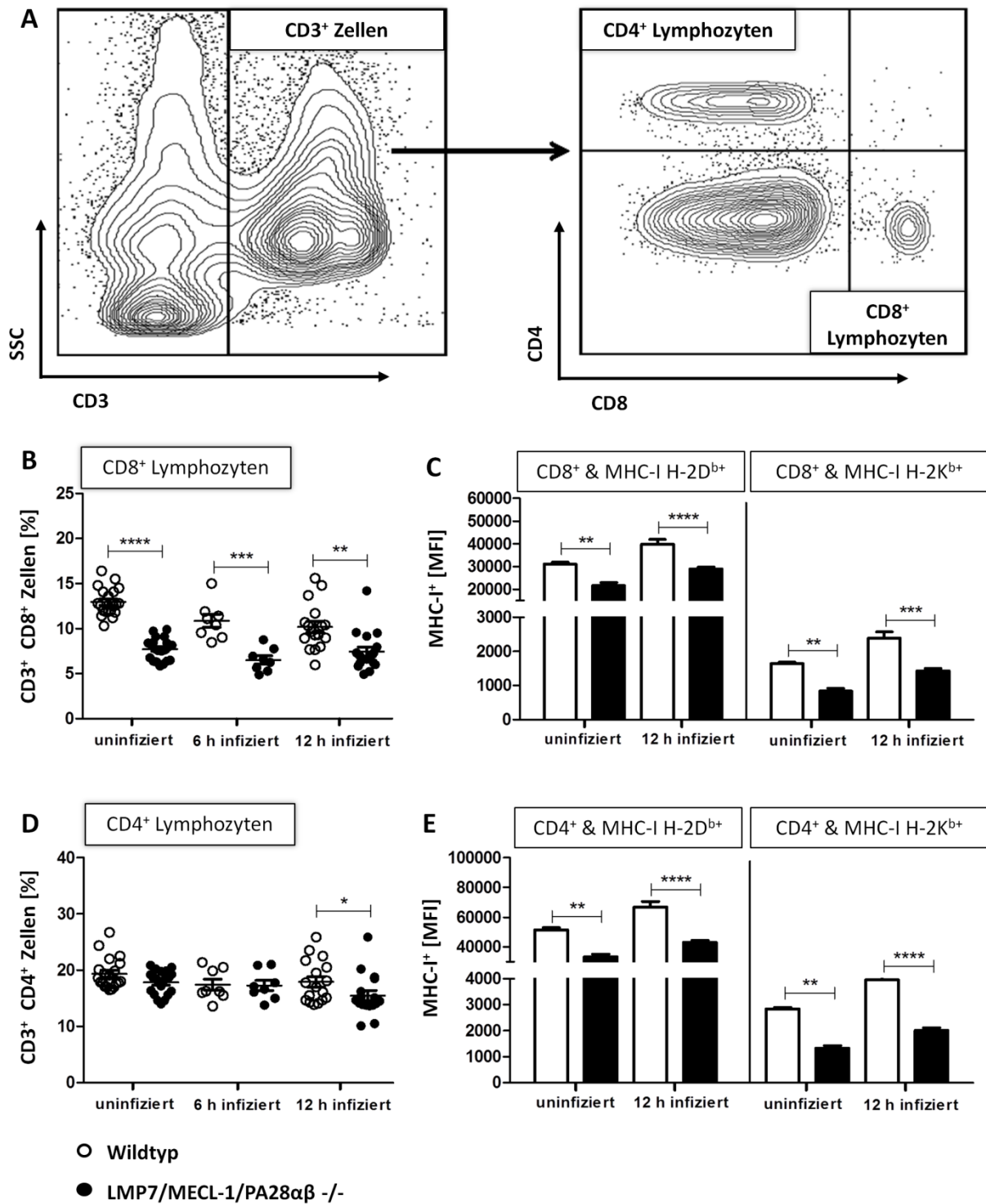


Abbildung 28: Anteil der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen und deren MHC-I-Expression

Gezeigt wird der per Durchflusszytometrie bestimmte Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der isolierten Splenozyten. Diese wurden aus uninfizierten, 6 h und 12 h infizierten Tieren gewonnen. **A** zeigt die *Gating*strategie an repräsentativen *Dotplots*. **B** stellt den prozentualen Anteil der CD8⁺T-Zellen und **D** der CD4⁺ T-Zellen für jedes analysierte Individuum inklusive Mittelwert ± SD der Tiergruppen aus vier unabhängigen Infektionsversuchen dar. (**C**, **E**) Zusätzlich wurde der *Median Fluorescence Intensities* (MFI) von H-2D^b und H-2K^b auf der Oberfläche der (**C**) CD8⁺ und (**E**) CD4⁺ Zellen uninfizierter und 12 h infizierter Tiere bestimmt. Die hier dargestellten Balken entsprechen ebenfalls den Mittelwerten ± SD der analysierten Individuen aus vier Infektionsversuchen.

(* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

3.6.2.2 Höherer Anteil B-Zellen mit verminderter MHC-I- und MHC-II-Expression in Knock-Out-Tieren

In der durchflusszytometrischen Analyse der Splenozyten wurden ebenfalls die B-Lymphozyten quantifiziert. Mittels Positivselektion auf den Oberflächenmarker B220 konnte die Population der B-Lymphozyten von den T-Lymphozyten unterschieden werden (Abbildung 29A). Die Analyse ergab einen erhöhten Anteil B-Lymphozyten in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren schon vor der Infektion. Außerdem war ein Verlust dieser Zellen im Zuge der Infektion, wie bei den T-Lymphozyten detektiert (Abbildung 28), nicht zu verzeichnen (Abbildung 29B). Ergänzend zeigt Abbildung 29C, dass die Oberflächenexpression von MHC-I ebenfalls auf den B-Zellen reduziert war. Ein weiteres Resultat war die Beobachtung einer zusätzlich verminderten Expression von MHC-II-Molekülen auf den B-Zellen von Knock-Out-Tieren. Dieses Ergebnis steht in scharfem Kontrast zu der einheitlichen MHC-II-Expression auf den Peritonealmakrophagen beider Versuchsgruppen (nicht abgebildet). Die unterschiedliche Expression der MHC-Moleküle kam im Laufe der Infektion noch intensiver zu tragen, wie hier in den 12 h *p. i.* analysierten Zellen dargestellt. In der Summe der in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse, kann von einer gestörten lymphozytären Immunantwort in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren ausgegangen werden. Diese war charakterisiert durch eine vermeintliche Fragilität der Zellen, geringere Anzahlen zytotoxischer T-Zellen und während der Infektion auch T-Helferzellen, sowie eine reduzierte Expression von MHC-I auf allen Zellen und MHC-II auf B-Zellen der I-Proteasom-Knock-Out-Tiere.

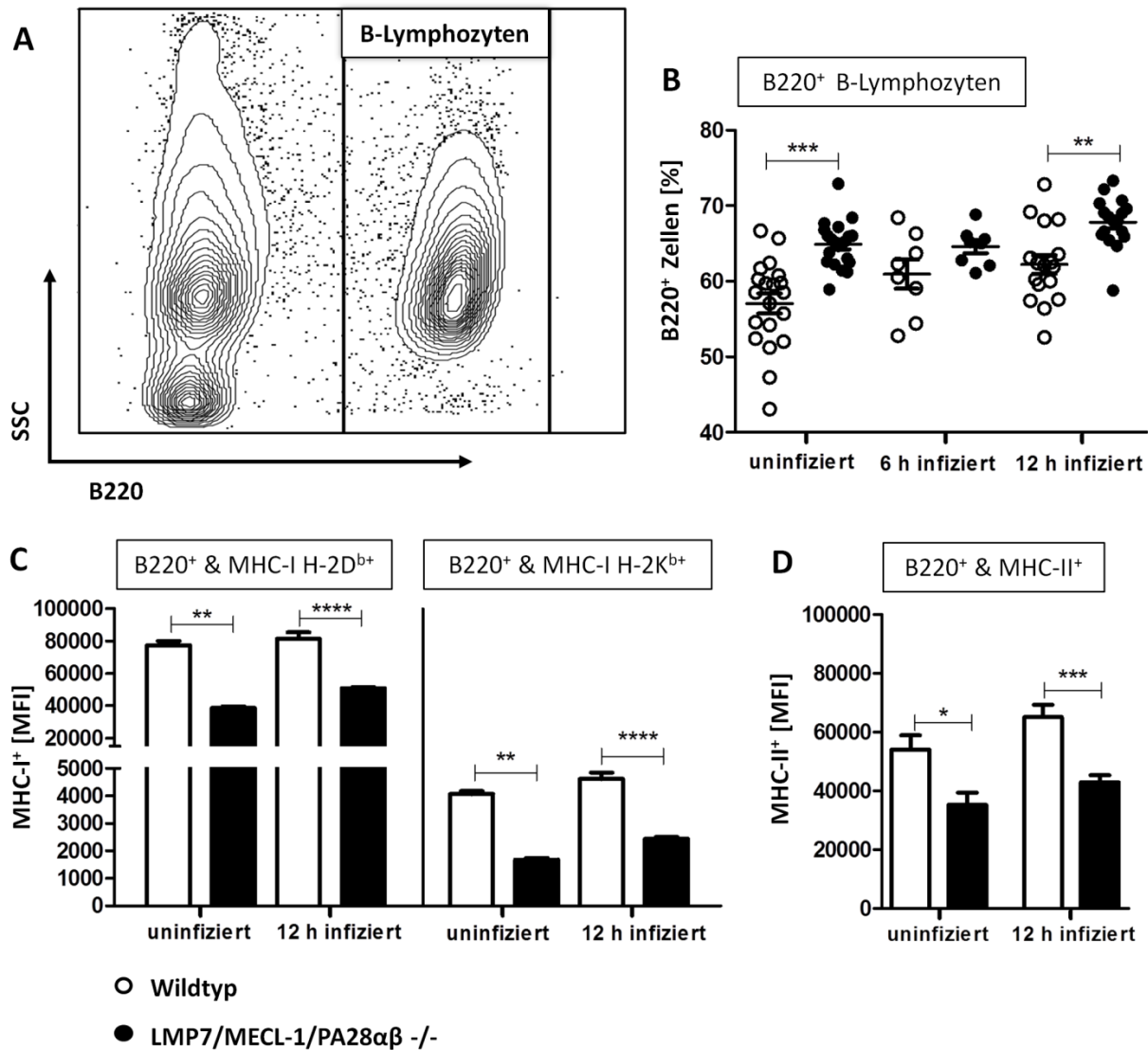


Abbildung 29: Anteil der B-Zellen und deren MHC-I- und -II Expression

Gezeigt wird der per Durchflusszytometrie bestimmte Anteil B220⁺ B-Zellen der aus uninfizierten, 6 h und 12 h infizierten Tieren isolierten Splenozyten. **A** zeigt die *Gating*strategie an einem repräsentativen *Dotplot*. **B** stellt den prozentualen Anteil der B-Zellen für jedes analysierte Individuum inklusive Mittelwert ± SD der Tiergruppen aus vier unabhängigen Infektionsversuchen dar. **(C)** Zusätzlich wurde der *Median Fluorescence Intensities* (MFI) von H-2D^b und H-2K^b und **(D)** von MHC-II auf der Oberfläche der B-Zellen uninfizierter und 12 h infizierter Tiere bestimmt. Die hier dargestellten Balken entsprechen ebenfalls den Mittelwerten ± SD der analysierten Individuen aus vier Infektionsversuchen. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

3.7 Einfluss des I-Proteasoms auf die gewebspezifische Genregulation

3.7.1 Verzögerter Abbau von IκBα im Lebergewebe gibt Hinweis auf Unterschiede in der NFκB-Aktivierung

Wie einleitend erläutert, ist das I-Proteasom eine wichtige Schaltstelle in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen und somit an der Regulation diverser Zellfunktionen beteiligt. Außerdem wurde die Funktion des Proteasoms in der Aktivierung von NFκB, eines für die

proinflammatorische Immunantwort überaus relevanten Transkriptionsfaktors erläutert. Dieses Kapitel fokussiert sich nun auf die Rolle des I-Proteasoms in der Aktivierung von NF κ B in Lebergewebe von 2 h (frühe Immunantwort) und 12 h (spätere Immunantwort) infizierten Mäusen (Abbildung 30). Der Nachweis der Aktivierung erfolgte indirekt über die Bestimmung von I κ B α mittels Western Blot. Wie anfangs beschrieben ist I κ B α eines der Proteine welche NF κ B in seinem inaktiven Zustand im Zytoplasma halten. Kommt es zur Aktivierung, wird I κ B α von der I κ B-Kinase (IKK) phosphoryliert und anschließend ubiquitiniert, wodurch es durch das Proteasom abgebaut wird und NF κ B frei gibt. Eine geringe Menge I κ B α stellt einen hohen Abbau des Inhibitors dar und spricht für eine NF κ B-Aktivierung. Wird I κ B α hingegen vermehrt in der Probe nachgewiesen, ist dies ein Zeichen für einen inaktiven NF κ B-Signalweg. In Abbildung 30 wird gezeigt, dass 2 h *p. i.* NF κ B in den Wildtyp-Tieren schon aktiviert wurde, wohingegen I κ B α in den Knock-Out-Tieren ähnlich stark nachzuweisen war, wie in den uninfizierten Kontrollen, was für eine verzögerte Aktivierung des NF κ B-Signalwegs sprach. In der späteren Reaktion (12 h *p. i.*) lag in den Wildtyp-Tieren vermehrt I κ B α vor. Hier wurde die Aktivierung von NF κ B durch ein zunehmendes Level an I κ B α gebremst. Dies stellte sich in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren gegenteilig dar, da hier sehr wenig I κ B α nachgewiesen werden konnte und somit auf einen hoch aktiven NF κ B-Signalweg geschlussfolgert werden konnte. In Summe zeigen die Ergebnisse, dass es in der Leber der Knock-Out-Tieren zu einer zeitlich versetzten NF κ B-Antwort kam.

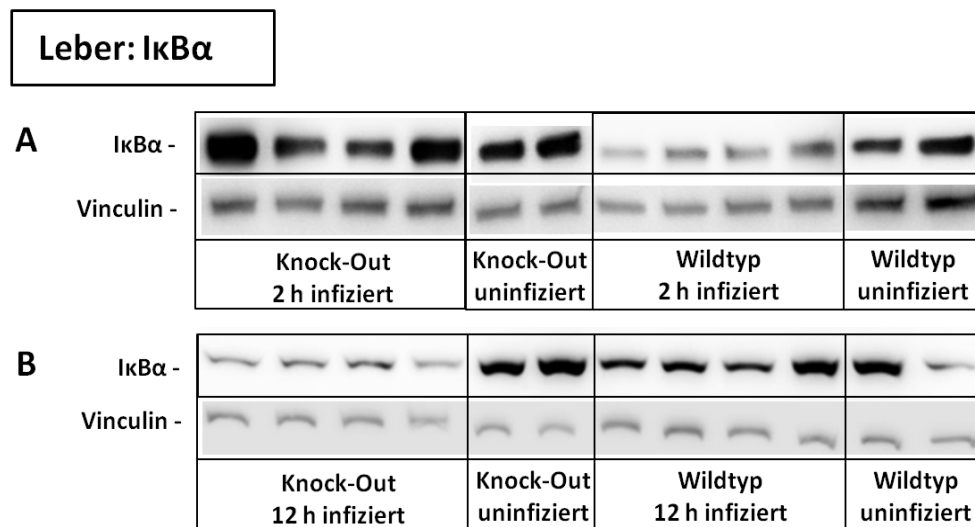


Abbildung 30: I κ B α in Lebergewebe

Die Western Blot-Analysen zeigen in **A** I κ B α (39 kDa) in Lebergewebe uninfizierter und 2 h infizierter I-Proteasom-Knock-Out- und Wildtyp-Tiere. **B** stellt die Analyse mit 12 h infizierten Tieren dar. Als Beladungskontrolle wurde jeweils das Protein Vinculin (124 kDa) genutzt. In diesen repräsentativen Blots werden jeweils vier infizierte und zwei uninfizierte Tiere aus einem Infektionsversuch dargestellt.

3.7.2 Abweichende Genregulation in Lebergewebe von Wildtyp- und Knock-Out-Mäusen

Für die genaue Analyse der leberspezifischen Genregulation wurden Leberhomogenate 12 h infizierter Tiere mittels RNASeq analysiert und mit uninfizierten Proben verglichen. Abbildung 31 stellt die signifikant höher und niedriger exprimierte Gene in den infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tieren im Vergleich zu den infizierten Wildtyp-Tieren dar. Die Grundexpression der Gene wurde durch den Bezug der infizierten auf die jeweiligen uninfizierten Individuen in der statistischen Analyse abgezogen, sodass nur die in der Infektion differenziell exprimierte Gene herausgefiltert wurden. Trotz einer Analyse von nur drei Individuen pro Gruppe aus unabhängigen Infektionsversuchen, wurden 12 höher regulierte Gene (Abbildung 31 A) und 25 geringer exprimierte Gene (Abbildung 31 B) in den infizierten Knock-Out-Tieren ermittelt. Diese Gene wurden ihren entsprechenden *Gene Ontology* (GO)-Kategorien zugeordnet. Ausgewählte Gene, die in den Kategorien der Angiogenese, Zellmigration- und Adhäsion, Vasokonstriktion- beziehungsweise -dilatation und der Interaktion und Beeinflussung der extrazellulären Matrix zu finden sind, wurden in Tabelle 3-1 mit ihren jeweiligen Funktionen zusammengefasst. In Abbildung 32 wurden sie mit den entsprechenden Log2FoldChanges in einer *Heatmap* dargestellt. Zusätzlich zu den erwähnten GO-Kategorien fielen außerdem einige Gene, welche mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden können auf. Zu ihnen zählen die Gene *BCL2 modifying factor* (*Bmf*), *glycerol-3-phosphate acyltransferase* (*Gpam*), *receptor tyrosine kinase* (*Axl*) und *heat shock protein 1B* (*Hspa1b*). Eine weitere GO-Kategorie der einige differenziell exprimierte Gene zugeordnet werden konnten, betrifft metabolische Prozesse in der Leber, welche im Zuge dieser Arbeit nicht detailliert betrachtet wurden. Um den Einfluss der zeitlich versetzten NFκB-Aktivierung zu verifizieren, wurden Gene, deren Expression direkt durch diesen Transkriptionsfaktor beeinflusst werden, betrachtet. Für diese Untersuchung wurden die differenziell exprimierte Gene einer *NFκB-Pathway*-Analyse mittels *Kegg*-Datenbank unterzogen. Mit der voraus gegangenen stringenten statistischen Auswertung der Analyse, wie in Kapitel 2.2.3.14 beschrieben, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression von NFκB-abhängigen Genen festgestellt werden.

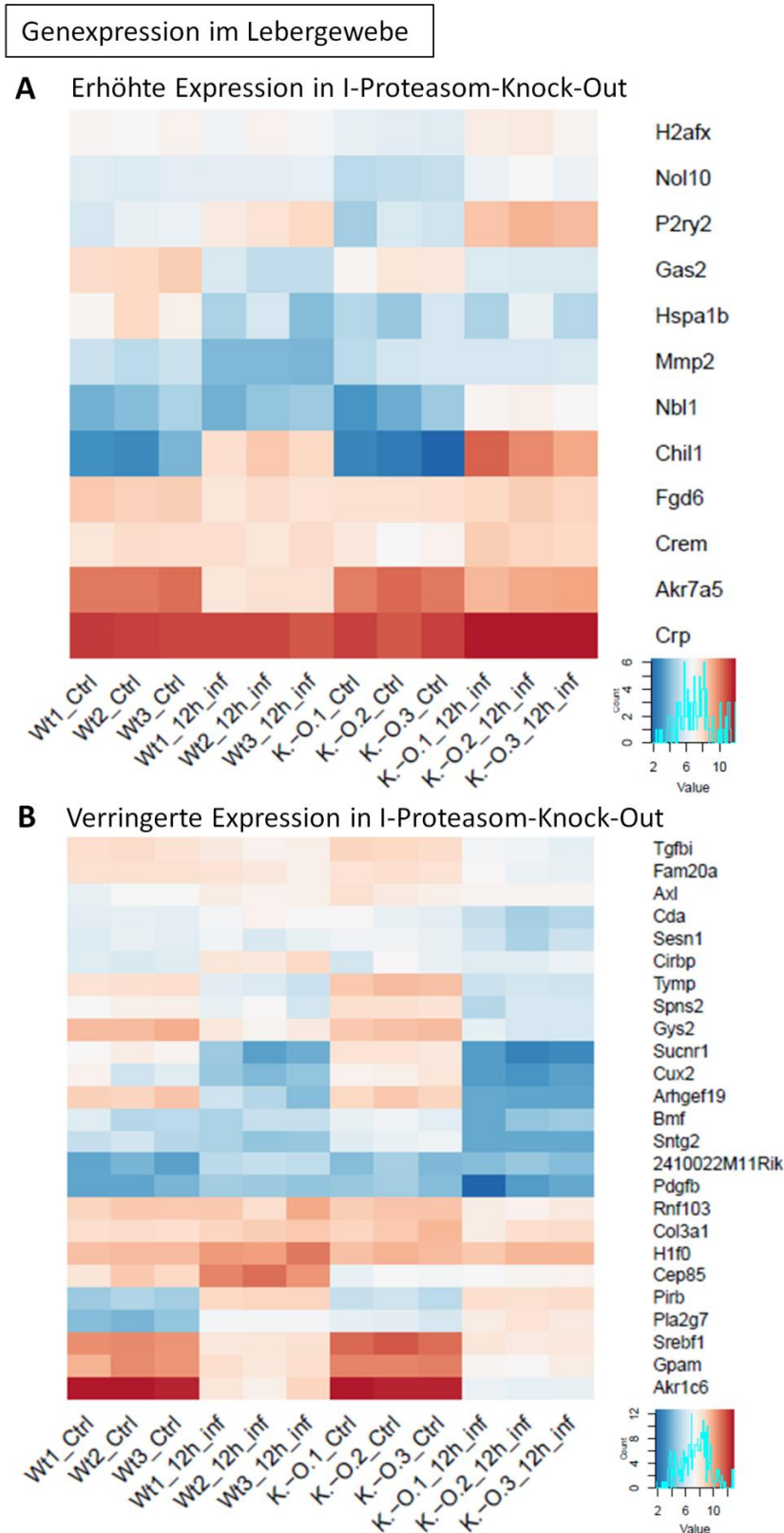


Abbildung 31: Genexpression im Lebergewebe

Dargestellt werden Gene, die 12 h *p. i.* in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren signifikant **(A)** vermehrt oder **(B)** vermindert exprimiert wurden. Mit dem Bioconductor-Paket *DESeq2* wurden die differenziell exprimierten Gene der NGS-Analyse der Leberhomogenate von je drei Individuen pro Gruppe ermittelt. Verglichen wurde die relative Expression aller Gene in der Infektion, die zuvor auf ihre uninferzierten Kontrolle bezogen wurden. Die hier abgebildeten Gene sind das Ergebnis einer Filterung mit einem $\log_2\text{FoldChange}$ größer als 1 bzw. kleiner als -1 und einem p-Wert kleiner als 0,05.

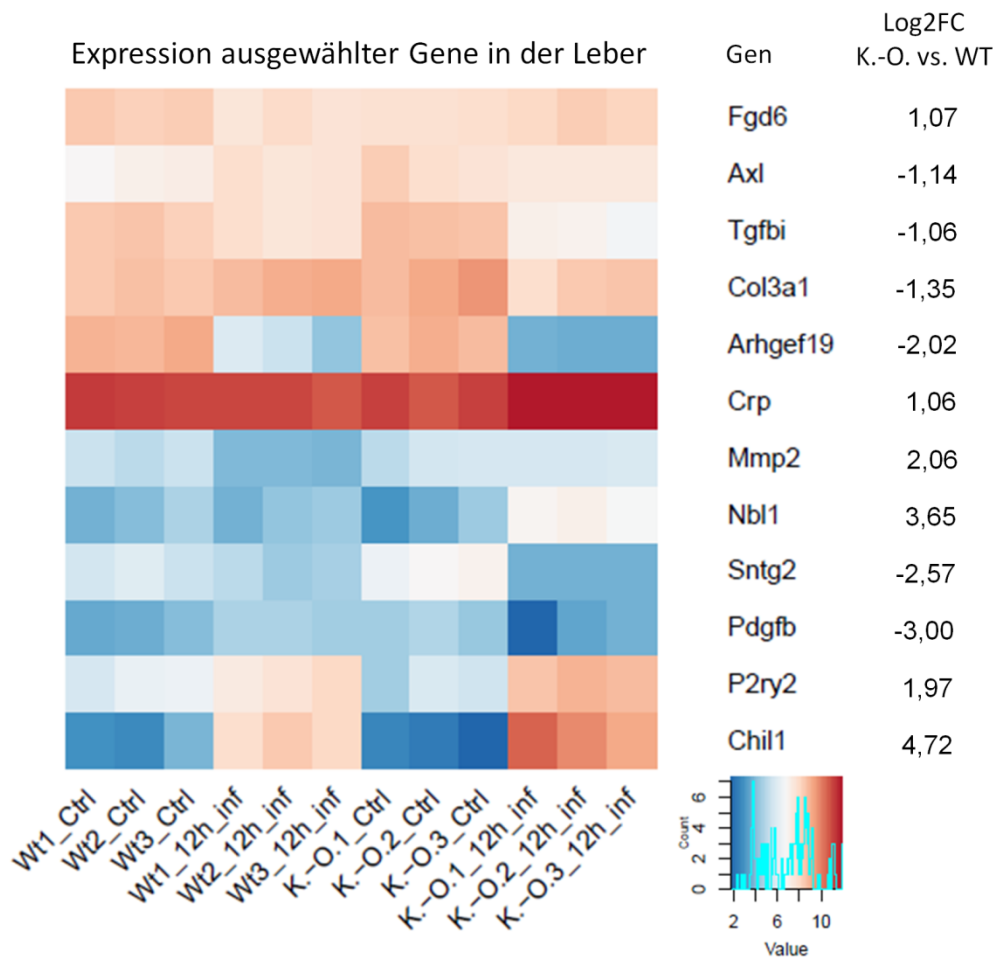


Abbildung 32: Expression ausgewählter Gene in der Leber

Dargestellt werden ausgewählte Gene, die 12 h *p. i.* in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren signifikant differenziell exprimiert wurden. Mit dem Bioconductor-Paket *DESeq2* wurden die unterschiedlich exprimierten Gene der NGS-Analyse der Leberhomogenate von je drei Individuen pro Gruppe ermittelt. Verglichen wurde die relative Expression aller Gene in der Infektion, die zuvor auf jeweilige uninfizierte Kontrolle bezogen wurden. Die hier abgebildeten Gene sind das Ergebnis einer Filterung mit einem $\log_2\text{FoldChange}$ größer als 1 bzw. kleiner als -1 und einem p-Wert kleiner als 0,05. Die angegebene relative Expressionsänderung ($\log_2\text{FoldChange}$) entsteht aus dem Vergleich der relativen Expression von Knock-Out-Kontrolle zu infizierten Knock-Out-Tieren und der relativen Expression von Wildtyp-Kontrolle zu infiziertem Wildtyp und unterliegt somit einer multifaktoriellen Analyse.

Tabelle 3-1: Proteinfunktion ausgewählter differenziell exprimierter Gene

WT > K.-O.		Proteinfunktion
Axl	<i>AXL receptor tyrosine kinase</i>	Umbau und Erneuerung bestehender Blutgefäße (Korshunov et al. 2006)
Tgfb1	<i>transforming growth factor, beta induced</i>	Zelladhäsion (Ferguson et al. 2003) Bindung und Organisation extrazellulärer Matrix (Manabe et al. 2008)
Col3a1	<i>collagen, type III, alpha 1</i>	Blutgefäßbildung, Wundheilung, Kollagenorganisation, Zell-Matrix-Adhäsion (Liu et al. 1997) positive Regulation der Rho-Protein-Signaltransduktion (Luo et al. 2011)
Arhgef19	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 19</i>	Aktin-Zytoskelet-Organisation, Wundheilung, Regulation der Rho-Protein-Signaltransduktion (Caddy et al. 2010)
Sntg2	<i>syntrophin, gamma 2</i>	Aktinbindung (Alessi et al. 2006)
Pdgfb	<i>platelet derived growth factor, B polypeptide</i>	Blutgefäßmorphogenese (Rolny et al. 2005), Aktin-Zytoskeletorganisation (Tao et al. 2002) Negativregulation der Zellmigration (F. Li et al. 2006)
WT < K.-O.		
Fgd6	<i>FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6</i>	Regulation der Rho-Protein-Signaltransduktion (Chhatriwala et al. 2007)
Crp	<i>C-reactive protein, pentraxin-related</i>	Negativregulation der Vasodilatation (Hein et al. 2014)
Mmp2	<i>matrix metalloproteinase 2</i>	Angiogenese, Blutgefäßmaturation (Oh et al. 2001)
Nbl1	<i>neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1</i>	Negativregulation der Bone-Morphogenic-Protein-Signalingtransduktion (Zhou et al. 2013)
P2ry2	<i>purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2</i>	Regulation der Vasodilatation (S. Wang et al. 2015)
Chil1	<i>chitinase-like 1</i>	Aktiviert Akt-Signaltransduktion (C. C. Chen et al. 2011), Bakterienadhäsion (Mizoguchi 2006), Wundheilung Regulation der TGF- β 1-Produktion (C. H. He et al. 2013)

3.8 MECL-1 als wichtigste I-Proteasom-Untereinheit in der *E. coli*-Infektion

Nach der eingehenden Analyse der I-Proteasom-3-fach-Knock-Out-Maus im Zuge der *E. coli*-Sepsis sollte nun bewertet werden, ob die erhöhte Letalität in den Tieren einem additiven Effekt zugrunde liegt oder ob eine einzelne Untereinheit für dieses Phänomen verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden weitere Letalitätsversuche durchgeführt, welche den Krankheitsverlauf in Wildtyp-Tieren verglichen mit Mäusen, in denen auf nur eine fehlende Untereinheit zurückgekreuzt wurde, im Folgenden als Einzel-Knock-Out-Tiere bezeichnet, dokumentierten. Das Überleben der unterschiedlichen Tiergruppen wird in Abbildung 33 mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Einzig die Einzel-Knock-Out-Mäuse, denen die Untereinheit MECL-1 fehlte, zeigten eine besonders fatale Letalität. 16 h *p. i.* erfüllten 100 % der infizierten MECL-1-Knock-Out-Tiere die tierschutzrelevanten Abbruchkriterien, wobei sich die LMP7-Knock-Out- und die PA28 α/β -Knock-Out-Mäuse ähnlich wie die Wildtypen verhielten und nach 16 stündiger Infektion eine Überlebensrate von etwa 55 % zeigten. Durch diese Experimente wird deutlich, dass die zuvor untersuchten Effekte in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren scheinbar der Elimination der Untereinheit MECL-1 zugrunde liegen.

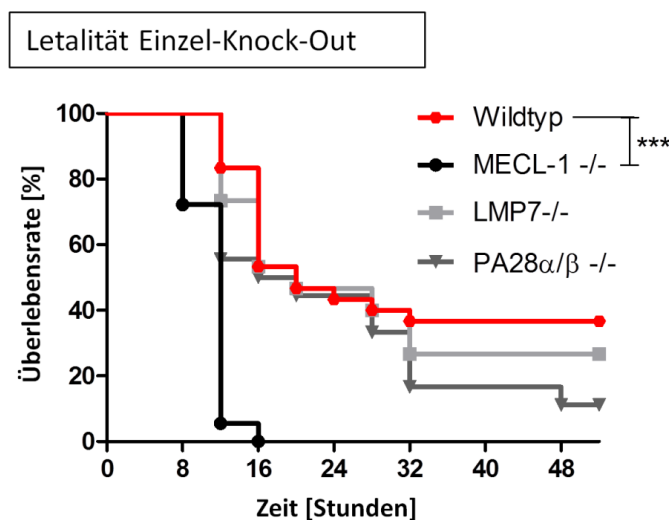


Abbildung 33: Letalität Einzel-K.-O.

Vergleichend dargestellt werden die Überlebenskurven von Wildtyp-, MECL-1-Knock-Out-, LMP7-Knock-Out und PA28-Knock-Out-Mäusen nach Kaplan-Meier. 15-18 Tiere pro Gruppe wurden in mehreren unabhängigen Infektionsversuchen über 52 h klinisch beurteilt. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Log-Rank-Test ermittelt.

(*** $p < 0,001$)

4 Diskussion

Die Sepsis ist eine mit hoher Mortalität assoziierte Erkrankung mit weltweit steigender Inzidenz (Fleischmann et al. 2016, Gaieski et al. 2013). Sie ist charakterisiert durch eine Organdysfunktion, hervorgerufen durch die Dysregulation der Immunantwort auf eine Infektion. Der septische Schock, eine mögliche schwere Verlaufsform der Sepsis, geht mit besonders gravierenden zirkulatorischen, metabolischen und zellulären Störungen einher und ist von einer Mortalität von über 40 % begleitet (Singer et al. 2016). Die derzeit noch inadäquate optimale Behandlung, erschwert durch verschiedene Verlaufsformen und Schweregrade, abhängig von der Ursache, dem Zeitpunkt der Diagnosestellung und individuellen Parametern des Patienten, lässt den Bedarf an neuen Studien und Erkenntnissen nicht versiegen. So ist es unerlässlich, Modelle für die Erforschung molekularer Sepsis-assoziiierter Regelmechanismen zu etablieren oder zu verbessern. Das hier verwendete murine *E. coli*-Modell, welches durch Induktion einer Peritonitis letztlich zu einer Sepsis führte, wurde wegen der häufigen Identifikation von *E. coli* in Sepsispatienten gewählt. Es wurde nachgewiesen, dass es sich bei *E. coli* um einen der häufigsten isolierten Sepsiserreger handelt (Laupland et al. 2004, Opal et al. 2003, Vincent et al. 2015). Nur die Gram-positiven Erreger *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* konnten in einigen Studien öfter nachgewiesen werden, obwohl auch hier *E. coli* der Hauptvertreter Gram-negativer Sepsis war (Martin et al. 2003, Vincent et al. 2006). Murine Modelle gelten in der Erforschung molekularer Sepsis-Mechanismen als strittig (Raven 2012). Nicht nur der Speziesunterschied, welcher sich in der Immunregulation am Beispiel ausgeschütteter Zytokine (Copeland et al. 2005) und in einer höheren Endotoxinresistenz (D. G. Remick & Ward 2005) verdeutlicht, auch die Auswahl der Tiere steht im Kontrast zu humanen Sepsispatienten. Während in der Forschung gesunde Mäuse im Alter von 6 – 16 Wochen eines Geschlechts untersucht werden, sind es in der Humanmedizin meistens ältere, komorbide Patienten, die an einer Sepsis erkranken. Auch der rapide Verlauf der murinen Sepsis entspricht nicht dem über Wochen bis Monate andauernden Fortschreiten der Erkrankung im Menschen (Dyson & Singer 2009, Rittirsch et al. 2007). Dennoch ist die Maus eine Spezies, welche verschiedenste genetische Modifikationen zulässt und ein deutlich komplexeres Krankheitsgeschehen abbilden kann, als es in der Zellkultur oder in entfernter verwandten Tiermodellen möglich wäre. In diesem Projekt wurde eine I-Proteasom-Knock-Out-Maus verwendet, welche gesund und phänotypisch nicht von Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden war. Desweiteren bietet sich die Maus im Falle des zu untersuchenden I-Proteasoms als Modell an, da sie dieses wie der Mensch exprimiert und auch von einer ähnlichen Funktionalität des Komplexes ausgegangen werden kann. Grund zu dieser Annahme bieten Untersuchungen zur Aminosäuresequenzhomologie und Ähnlichkeit der genomischen Organisation. So besitzen die primären Aminosäuresequenzen der I-Proteasom-Untereinheiten des Menschen und der Maus 83-96 % Identität und 90-100 % Ähnlichkeit. Ferner unterscheidet sich die genomische Organisation von LMP2 und MECL-1 kaum, bis auf die Lokalisation des humanen MECL-1 auf Chromosom 16, wogegen das der Maus auf Chromosom 8 zu finden ist. Einzig das humane Gen von LMP7 weist ein zusätzliches Exon auf, welches die Produktion zweier Isoformen im Gegensatz zu nur einem Protein in der Maus, begründet. Auch für die Funktionalität des I-Proteasoms wichtige Bindungsregionen für Transkriptionsfaktoren sind zwischen den Spezies vergleichbar (Ferrington & Gregerson 2012). Vor dem Start der Tierversuche wurden *in vitro* *E. coli*-Infektionsversuche mit aus

humanem Blut gesunder Spender isolierten PBMCs sowie Monozyten, durchgeführt (Daten nicht abgebildet). Die Expressionssteigerung der I-Proteaso-Untereinheiten in diesen Immunzellen war vergleichbar mit der aus den infizierten Mäusen isolierten Leukozyten und unterstreicht die These einer ähnlichen Regulation des I-Proteasoms in humanen wie auch in murinen Zellen. Die nun in diesem Modell durchgeführten Versuche sollten Aufschluss über den Einfluss des I-Proteasoms während einer *E. coli*-induzierten Peritonitis mit der Progredienz zur Sepsis geben. Hauptbefund dieser Untersuchungen war der rapidere Krankheitsverlauf mit signifikant höherer Letalität in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren. Auch die gravierendere Lymphopenie der Knock-Out-Tiere sprach für einen schwereren Verlauf der Sepsis. Das verminderte Überleben der Tiere wurde im Zuge der histopathologischen Beurteilung wichtiger Organsysteme erklärbar, da ausgeprägtere Thromben und Zelluntergänge für ein fortgeschrittenes Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom in den Knock-Out-Tieren sprachen. Ein detailliertes Profil pro- und antiinflammatorischer Entzündungsmediatoren konnte diese massiven entzündlichen Veränderungen jedoch nicht erklären. Erst die vermehrte Bakterienlast in Blut, Peritonealflüssigkeit und Organen der Knock-Out-Tiere ließ die Vermutung einer gestörten Immunreaktion auf den eingedrungenen Erreger zu. Hierbei stellte sich jedoch am Ort der Infektion in Bezug auf einwandernde Entzündungszellen deren Hauptpopulationen und Vitalität sowie wichtige Effektorfunktionen der residenten Peritonealmakrophagen, ein ähnliches Bild zwischen Knock-Out- und Wildtyp-Mäusen dar. Durch deutlich ausgeprägteren Zelltod in Milz und Thymus infizierter Knock-Out-Mäuse konnte nach Analyse der Splenozyten von einer gestörten lymphozytären Abwehr, charakterisiert durch eine reduzierte Vitalität der Zellen, verminderte Mengen CD8⁺ und CD4⁺ Zellen sowie eine reduzierte Expression der MHC-Moleküle, ausgegangen werden. Desweiteren warfen die Ergebnisse der Sequenzierung von infiziertem Lebergewebe die These einer gewebsspezifischen, bzw. zellspezifischen Genregulation durch das I-Proteasom auf. Es wurde deutlich, dass eine Gruppe von Genen, welche der Angiogenese, Wundheilung, Zelladhäsion und Migration zugeordnet werden können, in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren differenziell reguliert wurde. Ähnliches trifft für einige Apoptose-assoziierte Gene zu. Zum Ende des Projektes sollte noch der Frage nachgegangen werden, ob es sich bei der erhöhten Letalität der Tiere um einen additiven Effekt der fehlenden I-Proteasom-Untereinheiten handelte. Dies konnte nach weiteren Letalitätsversuchen widerlegt werden und MECL-1 als die scheinbar relevanteste Untereinheit in der Pathogenese der Gram-negativen *E. coli*-Sepsis identifiziert werden. Letztlich zeigte das Projekt, dass ein Unterbinden der I-Proteasom-Synthese in Sepsispatienten höchstwahrscheinlich keinen positiven Einfluss auf die Behandlung dieser Erkrankung hätte.

4.1 Durch die *E. coli*-Infektion werden I-Proteasom-Untereinheiten reguliert

Eine Vielzahl von Publikationen beschreiben das I-Proteasom im Zusammenhang autoimmuner Erkrankungen und intrazellulärer Infektionen durch Bakterien wie *L. monocytogenes* (Strehl et al. 2006), sowie Parasiten wie *T. gondii* (Tu et al. 2009) und einer Vielzahl von Viren, zu denen z. B. das Hepatitis B (Sijts et al. 2000) - und C Virus (Shin et al. 2007), das Coxsackievirus B3 (Paeschke et al. 2015) und das Vesicular Stomatitis Virus (Beilstein et al. 2015) zählen. In Bezug auf Autoimmunität wurde das I-Proteasom in Krankheiten wie z. B. dem systemischen Lupus erythematosus (SLE) (de Groot et al. 2015), Morbus Crohn und IBD (Inflammatory Bowel Disease) (Basler et al. 2010, Schmidt et al. 2010), rheumatoider Arthritis (Muchamuel et al. 2009) und Hashimotos Thyreoiditis (Kimura et al. 2009) untersucht. In diesen Untersuchungen konnten die Erkrankungen bzw. die Krankheitsprogredienz mittels pharmakologischer Hemmung, zumeist in experimentellem Rahmen, einzelner I-Proteasom-Untereinheiten behandelt werden. Ob die Deletion des I-Proteasoms die Progredienz der Sepsis ebenfalls beeinflussen kann, sollte in diesem Projekt gezeigt werden. Da das I-Proteasom in intrazellulären Infektionen bereits umfangreich untersucht wurde, widmet sich dieses Projekt zusätzlich der Regulation und Funktion dieses vielseitigen Komplexes während der Infektion mit einem Gram-negativen extrazellulären Erreger. Dass LPS neben IFN γ einen potenten Regulator der I-Proteasom-Untereinheiten darstellt, ist bekannt (Reis, Guan, et al. 2011, Stohwasser et al. 2000) und wurde in eigenen Vorversuchen durch die Stimulation humaner PBMCs mit LPS belegt (nicht abgebildet). Dies ließ den in Abbildung 2 dargestellten Anstieg der Expression von LMP2, LMP7, MECL-1 und PA28 β im Gewebe *E.coli*-infizierter Wildtyp-Tiere schon vor Beginn der Tierversuche vermuten. Die These von Steers *et al.*, dass auch PA28 α unter LipidA-Einfluss in Makrophagen stärker exprimiert wird (Steers et al. 2008), konnte auf die untersuchten Gewebe nach *E. coli*-Infektion nicht übertragen werden. Vielmehr entspricht die gleichbleibende, schon konstitutiv vorhandene Expression von PA28 α der Aussage von Ossendorp *et al.*, dass die Expression und *de-novo*-Synthese der Partner-Untereinheit PA28 β den limitierenden Faktor für die Zusammensetzung des Proteasom-Aktivator-28-Rings darstellt (Ossendorp et al. 2005). Um von einem totalen Knock-Out des I-Proteasoms zu sprechen, wurde in Abbildung 3 zwar die vorhandene Expression von LMP2 auf transkriptioneller Ebene in den LMP7/MECL-1/PA28-Knock-Out-Mäusen dargestellt, jedoch in Western Blot-Analysen die deutlich reduzierte Menge des Proteins nachgewiesen. Dies stützt die These, dass LMP2 ohne MECL-1 (Groettrup et al. 1997) und LMP7 (Griffin et al. 1998) nicht in gemischte Proteasome eingebaut werden kann und somit keine Funktion in der Zelle erfüllt. Da bekannt ist, dass die Zelle bei Verlust des konstitutiven Proteasoms mit einer *de novo* Synthese der Proteasome reagiert (Meiners et al. 2003, Radhakrishnan et al. 2010), bestand die Vermutung einer kompensatorischen Expressionssteigerung der β -Untereinheiten des Proteasoms, um die Deletion des I-Proteasoms in den Knock-Out-Tieren auszugleichen (McCarthy & Weinberg 2015). Wie in Abbildung 4 dargestellt, wurden die konstitutiven β -Untereinheiten nicht ausgleichend für den Verlust des I-Proteasoms höher exprimiert.

4.2 Der Schweregrad der Sepsis überwiegt in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren, ist aber nicht in einer Hyperinflammation begründet

4.2.1 Analytierte Sepsisparameter sind mit Befunden der humanen Sepsis vergleichbar

Wie bereits erwähnt, werden Mausmodelle in der Sepsisforschung kontrovers betrachtet. Auch in diesem Fall kann der rasante und schwere Verlauf der Erkrankung in den Mäusen nicht mit dem Verlauf einer humanen Sepsis verglichen werden. Schon nach 12 h erreichten einige Tiere die tierschutzrelevanten Abbruchkriterien. Eine weitere Diskrepanz, neben den Speziesunterschieden und der Auswahl gesunder, junger Tiere, ist der Verzicht auf jegliche Behandlung der Mäuse. Weder eine Antibiotikatherapie noch ein unterstützender Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes wurde an den Tieren vorgenommen. Somit ist der Verlauf der Sepsis nicht mit einem unter Behandlung stehenden Patienten nach erfolgter Diagnosestellung und Klinikaufenthalt vergleichbar. Hierbei sei ebenfalls zu beachten, dass es sich bei der erwähnten Mortalitätsrate von über 40 % im Zuge des septischen Schocks um eine In-Hospital-Mortalität handelt (Singer et al. 2016). Trotz des rapideren Verlaufs wurde dieses Modell gewählt und eingehend untersucht. Hierbei konnten, ungeachtet der erwähnten Diskrepanzen, Parallelen zu humanen Sepsispatienten gezogen werden. Der hohen Letalität dieses Modelles liegt nach eingehender Untersuchung der Organsysteme ein Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom zu Grunde, welches klar mit der Pathogenese einer Sepsis assoziiert ist (Semeraro et al. 2012). Eine generelle Gewebsschädigung in den septischen Tieren ließ sich über stark erhöhte LDH-Plasmalevel, ähnlich wie in Blutproben von Sepsispatienten, bestimmen (Zein et al. 2004). Erhöhte GOT (AST)- Werte im Plasma der erkrankten Tiere, in Verbindung mit der histopathologischen Bewertung der Leber, zeigten eine Beteiligung der Leber an dem Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom in den erkrankten Tieren. Dass die Beeinträchtigung der Leber in der Sepsis des Menschen ebenfalls eine große Rolle spielt, zeigt eine Studie von Kobashi et al., in der die Inzidenz einer Sepsis-assoziierten Störung der Leber bei 34,7 % lag (Kobashi et al. 2013). Bei einer histopathologischen Bewertung von Leberbiopsien gestorbener Sepsispatienten konnten die Veränderungen in einen hepatischen Typ mit portalen und lobulären Entzündungen sowie teilweise auftretende Nekrosen und Hämorrhagien und in einen gemischten Typ, welcher zusätzlich Läsionen im biliären System und eine deutliche Cholestase aufwies, eingeteilt werden (Koskinas et al. 2008). Wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben, weist die Beurteilung der erkrankten Tiere dieses Modells, neben den Mikrothromben in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren, Befunde des hepatischen Types auf. Da die Proben jedoch schon nach zwölfstündiger Infektion analysiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Leberläsionen zu einer ausgeprägten, histologisch darstellbaren Cholestase geführt hätten. Um die Syntheseleistung der Leber in den ersten 12 Stunden der *E. coli*-Sepsis zu bewerten, wurde das Albumin-Plasma-Level gemessen. Artigas *et al.* fasst umfangreich die Rolle des Albumins in der Sepsis zusammen, welchem ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden (Artigas et al. 2015). Die Ergebnisse der Albuminbestimmung (Abbildung 7 C) zeigen ein annähernd gleichbleibendes Albuminlevel in den ersten 12 h der Erkrankung. Für beide Tiergruppen war anfangs die Tendenz einer Reduktion und nach 12 h eine leichte Steigerung der Werte zu verzeichnen, was jedoch keine biologische Signifikanz erreichte. In LPS-infizierten Ratten konnte schon nach 12 h ein leichter Einbruch der Albuminsyntheseleistung detektiert werden (Moshage et al. 1987), was im Kontrast zu der

These einer maximalen Stimulation der Albuminsynthese in schwerkranken und intensivpflichtigen Patienten steht (Barle et al. 2006). Das Ergebnis gleichbleibender Albuminwerte zeigt in der perakuten Phase der Erkrankung keinen Verlust der Syntheseleistung der Leber, was höchstwahrscheinlich auf die Synthesestimulation bzw. auf eine noch weitgehend intakte Leberfunktion zu diesem frühen Zeitpunkt zurückzuführen ist. Das klinische Bild des Tachypnoes bis hin zu erschwerter bis pumpender Atmung kranker Tiere und die histopathologische Untersuchung der Lunge ergab eine interstitielle Pneumonie mit entzündlichen Infiltraten und Alveolarepithelnekrosen. Dieser Befund kann der in der Humanmedizin als diffuse Alveolarepithelschädigung (DAD = *diffuse alveolar damage*) bezeichneten, histologischen Veränderung in der Lunge zugeordnet werden. Die DAD ist das histologische Bild der akuten Lungenschädigung (ALI = *acute lung injury*), welche sich in ein akutes Atemnotsyndrom (ARDS = *acute respiratory distress syndrome*) steigern kann (Butt et al. 2016). Das ARDS zählt ebenfalls zu den klinischen Befunden eines sepsis-assoziierten Multi-Organ-Versagens (Angus & van der Poll 2013). Der Sepsissymptomatik zuzuordnen ist außerdem der deutlich reduzierte Allgemeinzustand der Tiere, bis hin zu einer ausgeprägten Dehydratation und Hypoglykämie. Obwohl reduzierte Blutglukosewerte ein beobachtetes Phänomen, trotz adäquater Behandlung, in einer Sepsis sind (Miller et al. 1980), können die hier gemessenen, enorm reduzierten Blutglukosewerte auf die Inappetenz der Tiere zurückgeführt werden, da der Flüssigkeits- und Nährstoffverlust nicht, wie im behandelten Patienten, ausgeglichen wurde. Die Annahme, der Pathogenität der Sepsis läge vorrangig eine ausufernde Immunreaktion des Wirtes zu Grunde, wurde 1997 von einer neuen These reformiert (Angus & van der Poll 2013). Hierbei wurde postuliert, dass der initialen entzündlichen Immunantwort eine kompensatorische Antiinflammation folge (Bone et al. 1997). Diese These als Basis betrachtend, beschäftigten sich eine Vielzahl von Untersuchungen der letzten Jahre mit der immunsuppressiven Phase der Sepsis. Neben Ergebnissen wie einer reduzierten MHC-Expression und der erhöhten parenchymalen Synthese von Liganden, welche T-Zell-Rezeptoren inhibieren (Boomer et al. 2011), wurde mehrfach der Verlust von Lymphozyten und der erhöhte Zelltod von Splenozyten in Sepsispatienten postuliert (Hotchkiss et al. 1997, Hotchkiss et al. 2001). Ein Verlust von Lymphozyten im Blut wie auch in der Milz konnte ebenfalls für das murine PCI- (*Peritoneal contamination and infection*) und LPS-Modell bestätigt werden, wobei in diesem Fall keine Störung der T-Zellfunktion detektierbar war (Markwart et al. 2014). In der hier untersuchten *E. coli*-Sepsis konnte schon nach einigen Stunden eine ausgeprägte Lymphopenie festgestellt werden. Auch im humanen System dargestellte Zelluntergänge in der Milz (Hotchkiss et al. 1997, Hotchkiss et al. 2001) konnten vergleichbar in der histopathologischen Untersuchung der Tiere dargestellt werden (Abbildung 11). Desweiteren bestätigten sich diese Befunde in der späteren Analyse und Quantifizierung der aus der Milz isolierten T-Zellen. Trotz des viel rapideren Verlaufs der Sepsis in der Maus scheint das Phänomen der im Menschen beobachteten Immunsuppression auch in der murinen *E. coli*-Sepsis seine Relevanz zu haben.

4.2.2 Besonders in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren induziert die *E. coli*-Sepsis Zellstress und steigert sich in ein Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom

Die zuvor aufgezählten Parameter, welche ein septisches Geschehen mit einem assoziierten Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom (MODS) kennzeichnen, wurden in den meisten Fällen vermehrt für die I-Proteasom-Knock-Out-Tiere festgestellt. Bezeichnend hierfür ist die signifikant erhöhte Letalität und der rapidere Krankheitsverlauf, wie in Abbildung 5 dargestellt. Hinzu kommen stärker erhöhte LDH- und GOT-Level (Abbildung 7 A, B), eine signifikant ausgeprägtere Lymphopenie (Abbildung 6), sowie schwerwiegendere histopathologische Befunde in den untersuchten Organen der I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse (Abbildungen 8-13). Zu Letzteren zählen ein höheres Ausmaß mikrovaskulärer Thrombosierung und vermehrte Zelluntergänge, vor allem in den lymphatischen Strukturen der Milz und des Thymus. Ziel weiterer Untersuchungen sollte nun das Aufdecken des kausalen Zusammenhangs zwischen der vermehrten Organschädigung und dem Verlust des I-Proteasoms sein. Nach eingehender histopathologischer Untersuchung von Leber, Niere, Milz, Lunge und Thymus konnte ein MODS als wahrscheinlichste Ursache der schnelleren Progredienz der Sepsis in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren ausgemacht werden. Die verstärkte, durch massive Thromben in den Organen sichtbare Störung der Mikrozirkulation könnte ursächlich an einem vermehrten Zelluntergang beteiligt sein. Wie beschrieben, wird durch die akute entzündliche Reaktion, als Antwort auf die schwere Infektion, in den Tieren die systemische Koagulation aktiviert (Levi et al. 2012). Durch eine Dysregulation der Gerinnung kommt es letztlich zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie mit Fibrinablagerungen, welche die Mikrozirkulation beeinträchtigen (Levi 2008, Semeraro et al. 2010). Neben der mikrovaskulären Thrombose führt die Hypotension und reduzierte Verformbarkeit der Erythrozyten zu einer mangelhaften Oxygenierung des Gewebes. Bekannt ist außerdem, dass vor allem Infektionen mit Gram-negativen Pathogenen zu starken Koagulopathien mit tiefen venösen Thrombembolien (Levi et al. 2012) und assoziierten ischämischen Nekrosen führen. Desweiteren führen rekrutierte polymorphnukleäre Entzündungszellen durch Ausschüttung von lytischen Enzymen und der Produktion von reaktiven sauerstoff- und nitrosativen Verbindungen zu direkter Zellschädigung (Brown et al. 2006). Auch von nekrotischen und apoptotischen Zellen freigesetzte Histone sind direkte Vermittler des MODS (Xu et al. 2009). In den extrazellulären Raum entlassenes HMGB-1 (Sunden-Cullberg et al. 2006) und von Neutrophilen produzierte NETs (A. C. Ma & Kubes 2008) verstärken die Schädigung des Gewebes weiterhin. All diese Faktoren induzieren in dem Gewebe der betroffenen Organe zellulären Stress. Dieser äußert sich in einem gehäuften Anfall oxidierter, fehlerhafter oder beschädigter Proteine, welche ubiquitiniert werden. Akkumulieren diese in der Zelle, entstehen sogenannte ALIS und es kann zu einem Entgleisen der Proteinhomeostase kommen. In solch einer Stressreaktion ist das normalerweise entstandene I-Proteasom in der Lage, die überdurchschnittlich große Menge der entstandenen ubiquitinierten Proteine zu degradieren (Seifert et al. 2010). Ist die Zelle nicht mehr befähigt, das I-Proteasom zu bilden, kann die Akkumulation dieser Proteine letztendlich zum Zelltod führen. So beschreiben Opitz *et al.* einen protektiven Mechanismus des I-Proteasoms in Cocksackie-Virus-B3-induzierter Myokarditis. Trotz gleicher Viruslast in Wildtypen und I-Proteasom-Knock-Out-Tieren konnte in Letzteren ein vermehrter Gewebsschaden und apoptotischer Zelltod beobachtet werden, was die Autoren auf ein Ungleichgewicht in der Proteinhomeostase zurückführen (Opitz et al. 2011). Nicht nur die Anreicherung

ubiquitiniertes Proteine kann die Homöostase gefährlich stören, auch die inadäquate Beseitigung zytotoxischer Bestandteile, wie durch die vermehrte Transkription in Zytokin gestressten Zellen frei werdende Histone, kann einen Zelltod begünstigen. Dass Proteasome an der Degradierung von Histonen beteiligt sind, beschreibt Singh *et al.* (R. K. Singh et al. 2009). In einer aktuellen Studie von Raule *et al.* wird zudem deutlich, dass 26S I-Proteasome vier- bis sechsfach höhere Umsetzungsraten von basischen Proteinsubstraten im Vergleich zu dem 26S Proteasomen aufweisen. Da Histone basisch sind, stellen die Autoren die These auf, dass I-Proteasome besonders an der Beseitigung potenziell zytotoxischer Histone beteiligt sind (Raule, Cerruti, & Cascio 2014). Obwohl Nathan *et al.* die vermehrte Degradierung von polyubiquitinierten Proteinen durch das I-Proteasom nicht belegen konnten (Nathan et al. 2013), spricht in dem hier diskutierten Projekt der histopathologisch evaluierte vermehrte Zelluntergang vor allem in sekundären lymphatischen Organen für die von Seifert *et al.* postulierte These der Bewahrung der Proteinhomöostase durch das I-Proteasom nach IFN γ induziertem Zellstress (Seifert et al. 2010).

4.2.3 Sepsis-relevante Zytokine der Pro- und Antiinflammation können den vermehrten Gewebsschaden in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren nicht erklären

Die Sepsis ist das Ergebnis einer komplizierten Interaktion zwischen der Infektion und dem Immunsystem des Wirtes (Chaudhry et al. 2013). Der mikrobiellen Erkennung der Pathogene durch PRRs stehen diverse regulatorische Mechanismen zur Seite, die für eine Balance der pro- und antiinflammatorischen Immunantwort sorgen sollen. Diese ist unerlässlich für einen adäquaten Schutz des Wirtes vor dem Pathogen und soll den Wirt gleichzeitig vor Gewebsschädigungen mit assoziiertem Organversagen bewahren (Wiersinga et al. 2014). Abstand nehmend von der 1990 postulierte Definition der SIRS, welche die umfassende proinflammatorische Immunantwort beschreibt, wissen wir heute, dass nicht nur die übermäßige Entzündung, sondern auch die Immunsuppression die Pathogenität einer so heterogenen Erkrankung wie der Sepsis ausmacht (Kumpf & Schumann 2010). Ein Beleg für das komplexe Zusammenspiel der Pro- und Antiinflammation ist die sofortige Ausschüttung einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren nach der Erkennung eines Pathogens. Zu ihnen zählen nicht nur endogene Pyrogene wie IL-6, TNF- α und IL-1, welche weitere Zielzellen aktivieren und für die Ausschüttung nachfolgender Mediatoren verantwortlich sind (Chaudhry et al. 2013, van der Poll & Opal 2008), sondern auch antiinflammatorisch wirksame Zytokine wie IL-10 und IL-1Ra, die synchron ausgeschüttet werden (Calvano et al. 2005). Die Wirkung dieser Mediatoren ist sehr heterogen und beeinflusst die Aktivierung der Koagulation und des Komplementsystems. Zytokine rekrutieren außerdem Immunzellen, vermitteln die Diapedese und sorgen für die Ausschüttung weiterer Mediatoren, wie z. B. HMGB-1 und IL-17A, welche in der übermäßigen Immunantwort und bei der Begünstigung von Gewebsschäden in der Sepsis eine wichtige Rolle spielen (Rittirsch et al. 2008). Wegen des ausgeprägteren Krankheitsbildes in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren wurde eine umfangreiche Untersuchung sepsisrelevanter Zytokine und Chemokine in diesem Modell vorgenommen. Diese wurden systemisch in Plasmaproben der Tiere bestimmt (Abbildung 14) und außerdem lokal in der peritonealen Spülflüssigkeit gemessen (Abbildung 25). In Peritonitis-Infektionsmodellen mit Ratten konnte gezeigt werden, dass die Menge der gemessenen Zytokine des Peritoneums nicht zwingend mit den systemisch gemessenen übereinstimmen müssen. Außerdem wurde deutlich, dass in sogenannten *nonsurvivors* die höheren TNF- α -, IL-6- und IL-10-Level nachweisbar waren (Hendriks et al. 2010, Martineau & Shek 2000). In der zusammenfassenden Betrachtung dieser Studien wird die peritoneale Zytokinmessung als geeigneterer Indikator für die Bestimmung der lokalen Immunantwort und der Prognose betrachtet (Xiao et al. 2015). So ist es nicht verwunderlich, dass auch in dem hier diskutierten Modell abweichende Werte in der Zytokinmessung des Plasmas und der peritonealen Flüssigkeit zu verzeichnen waren. Einzig das TNF- α -Level im Plasma der erkrankten I-Proteasom-Knock-Out-Tiere war signifikant höher als das Plasmalevel der Wildtyp-Tiere. Dies allein reicht jedoch nicht aus, um die deutlichere Letalität in den Knock-Out-Tieren zu erklären, zumal TNF- α auf mRNA-Ebene keine Unterschiede zwischen den Mausgruppen aufwies. Im Menschen ist TNF- α als Prädiktor eines schweren Krankheitsverlaufes bekannt (Gogos et al. 2000, Qiu et al. 2011). *Cecal ligation and puncture* Mausmodelle, in denen blockierende TNF- α -Antikörper das Plasmalevel deutlich sinken lassen, zeigen jedoch kein verbessertes Überleben für die mit Antikörpern behandelten Tiere (Eskandari et al. 1992, D. Remick et al. 1995). IL-1 α und IL-1 β stellten sich

nach sechsstündiger Infektion in der Peritonealflüssigkeit gegenüber den Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert dar. Dies konnte in der Zytokinbestimmung im Plasma nicht reproduziert werden, zeigte sich jedoch in der mRNA-Expression der beiden Zytokine in Leber- und Milzhomogenaten (Abbildung 16) ähnlich reduziert. Ob eine verminderte Ausschüttung dieser Zytokine wirklich eine ursächliche Bedeutung für die verstärkte Letalität in den Knock-Out-Tieren hatte, konnte im Zuge der Untersuchungen nicht geklärt werden. Auch die antiinflammatorischen Zytokine, allen voran IL-10, welches ebenfalls als Prädiktor eines schweren Krankheitsverlaufes gilt (Gogos et al. 2000), stellten sich heterogen dar. Auf Proteinebene zeigten sich in Plasma und peritonealer Flüssigkeit Tendenzen einer IL-10-Erhöhung in infizierten Wildtyp-Tieren, auf mRNA-Ebene in Leber und Milz jedoch eher eine Expressionverminderung. Experimentelle Gabe von IL-10 hat in murinen Modellen eine abgeschwächte Expression von TNF- α , IL-1 und IL-6 zur Folge (Lane et al. 1997, Rongione et al. 1997). Auf Grund ähnlicher IL-10-Werte konnte die Reduktion von IL-1 nicht auf dessen antiinflammatorischen, regulatorischen Effekt zurückgeführt werden. Zusammenfassend wird deutlich, dass die erhöhten Level von TNF- α , IL-6 und IL-1 in beiden Tiergruppen für eine starke Proinflammation stehen und dass hohe Mengen IL-10 und IL-1Ra in Wildtyp-, wie auch Knock-Out-Mäusen die für eine Sepsis zu erwartende, synchrone Antiinflammation darstellen. Da die sogenannte Hyperinflammation, gemessen an den Zytokinmengen, in beiden Tiergruppen ein ähnliches Level erreichte, können die Zytokine den ausgeprägteren Organschaden in den Knock-Out-Tieren nicht erklären.

4.2.4 IFN γ und IL-17A sind an der verstärkten Gewebsdestruktion der Knock-Out-Tiere nicht ursächlich beteiligt

Bei der Betrachtung weiterer sepsisrelevanter Zytokine, wird deutlich, dass in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren geringere Mengen IFN γ und IL-17A messbar waren. Typ II-Interferone, wie das IFN γ werden ursprünglich mit der Immunantwort auf Viren oder intrazelluläre bakterielle Infektionen in Verbindung gebracht. IFN γ wird von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, hauptsächlich aber von sogenannten Th1-Zellen, einer Untergruppe CD4⁺Zellen, nach erfolgter Antigenerkennung ausgeschüttet. Auch NK-Zellen können IFN γ freisetzen und somit eine proinflammatorische Reaktion hervorrufen (Schoenborn & Wilson 2007). Die genaue Rolle von IFN γ in der Sepsis ist noch weitestgehend unklar. Deutlich wurde bisher nur, dass es in *nonsurvivors* verstärkt messbar war (Mera et al. 2011) und scheinbar im Zuge des septischen Schocks, evaluiert in einem CLP-Modell, ein wichtiger proinflammatorischer Vermittler ist (Romero et al. 2010). Allerdings unterliegt es einer Verminderung in der späten antiinflammatorisch geprägten Phase der Sepsis, gezeigt in Modellen der experimentellen Peritonitis. Hier rückt eine Th2-Zytokin-Antwort in den Vordergrund, während typische Th1-Zytokine wie IFN γ vermindert gemessen wurden (Ono et al. 2001). Die Reduktion von IFN γ in der peritonealen Flüssigkeit der schwerkranken Knock-Out-Tiere passt zu dem Ergebnis dieser Studie. Gestützt wird dieser Befund mit einer zusätzlichen IL-12-Reduktion in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren, welches von B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen produziert wird und die Produktion von IFN γ (Macatonia et al. 1993) wie auch die Differenzierung von Th1-Zellen fördert (Hsieh et al. 1993). Ein weiteres Zytokin, welches mit schweren Gewebsdestruktionen in Verbindung gebracht wird, ist IL-17 (Hu et al. 2011). Es

wird von T-Helferzellen, insbesondere den Th17-Zellen, aber auch zytotoxischen T-Zellen (Kondo et al. 2009) produziert und hat einen proinflammatorischen Einfluss auf die Produktion von Schlüssel-Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowie Chemokinen wie KC und MCP-1 in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen (Reynolds et al. 2010). Bisher wird IL-17 vorwiegend mit einer antifungalen, aber auch antibakteriellen Immunantwort in Verbindung gebracht (van de Veerdonk et al. 2010) und Th17-Zellen mit diversen autoimmunen Prozessen und Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Lupus (Aggarwal & Gurney 2002). Wie in Abbildung 14 dargestellt, wurden in den I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen signifikant geringere Mengen IL-17A als in den Wildtyp-Tieren nachgewiesen. Also können Zytokine wie IFN γ , IL-12 und IL-17A nicht der Grund für die starke Gewebsdestruktion sein, obwohl vor allem IL-17A als Verursacher von Zellschädigungen bekannt ist (Hu et al. 2011). Trotz allem ist eine verminderte Menge dieser eben benannten Zytokine nicht vorteilhaft für das Überleben der *E. coli*-infizierten Tiere. Dies beschreibt auch Freitas *et al.* in seiner Studie zur polymikrobiellen Sepsis in Mäusen defizient für den IL-17-Rezeptor. Hier führte eine verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Peritoneum letztlich zu einer erhöhten Mortalität der Tiere (Freitas et al. 2009). Dass die Reduktion von IL-17A in dem hier untersuchten Modell nicht die Auswirkungen hat wie in der von Freitas *et al.* beschriebenen Studie, wurde deutlich, als die Menge eingewanderter Neutrophiler, inklusive deren Aktivierungsmarkern CD11b, in der Bauchhöhle infizierter Tiere verglichen wurde (Abbildung 21). Hierbei wichen die Gesamtzahlen rekrutierter polymorphnukleärer Zellen und die Menge exprimierter CD11b-Oberflächenantigene in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren, welche eine verminderte IL-17-Produktion aufwiesen, nicht von denen der Wildtyp-Tiere ab. Bei der Analyse der für die Rekrutierung von Entzündungszellen wichtiger Chemokine, konnten auf Proteinebene ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen ausgemacht werden. Eine IL-17- und IFN γ -Reduktion liegt auch im Zuge der Verminderung von Symptomen autoimmuner Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Muchamuel et al. 2009) oder Colitis (Basler et al. 2010) durch Blockierung des I-Proteasoms, in den meisten Fällen die Blockade von LMP7, vor. Weitere Erkenntnisse brachten Studien, die nach Inhibition oder genetischem Knock-Out des I-Proteasoms in Krankheitsmodellen auf eine Störung in der Th1- und Th17-Zelldifferenzierung stießen (Basler et al. 2014, Kalim et al. 2012), welche die Reduktion der zuvor genannten Zytokine maßgeblich beeinflusst. Die bisherigen Studien brachten die verminderte Ausschüttung von vor allem IL-17, jedoch eher mit geringeren Gewebsschäden und einer abgeschwächten Symptomatik in Autoimmunerkrankungen in Verbindung. Erst Mundt *et al.* zeigten, dass das I-Proteasom die T-Helferzell-vermittelte Immunantwort auf eine *Candida albicans*-Infektion beeinflusst. Die Tiere zeigten trotz verminderter IFN γ - und IL-17-Level eine ausgeprägtere Letalität, scheinbar auf eine erhöhte Pathogenmenge in LMP7-Knock-Out-Tieren zurückzuführen (Mundt et al. 2016). Diese zuletzt genannte Publikation macht den schmalen Grat zwischen einer ausbalancierten Immunantwort des Wirtes und der Kontrolle und Bekämpfung des eingedrungenen Pathogens in einer so komplexen Erkrankung wie der Sepsis deutlich.

4.3 Die erhöhte Bakterienlast als möglicher Grund für die stärkere Gewebsdestruktion in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren

Wie zuvor erwähnt, bedeutet eine Reduktion von Zytokinen, welche eng mit einer starken Gewebsdestruktion einhergehen und ein Organversagen begünstigen, nicht zwingend eine höhere Überlebenschance für die Mäuse, wenn das Pathogen sich synchron im Organismus etablieren kann. Diverse Publikationen zeigen die problematische Beteiligung des I-Proteasoms an der Pathogenität und Symptomatik von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Muchamuel et al. 2009), SLE (de Groot et al. 2015, Ichikawa et al. 2012) und Colitis (Basler et al. 2010, Schmidt et al. 2010). Zusätzlich scheint das I-Proteasom jedoch auch in Infektionserkrankungen eine überaus wichtige Rolle zu spielen. Die bisherigen Studien zeigten eine schlechtere Prognose für I-Proteasom-Untereinheiten-defiziente Mäuse während intrazellulären Infektionen. Gekennzeichnet waren diese durch eine höhere Letalität, in der eine inadäquate Bekämpfung des Pathogens im Mittelpunkt stand. So beschreibt Strehl *et al.* eine Persistenz von *Listeria monocytogenes* in der Leber von LMP7 defizienten Mäusen (Strehl et al. 2006) und Tu *et al.* die Empfänglichkeit der LMP7-Knock-Out-Maus für Infektionen mit dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* (Tu et al. 2009). Aktuell beschäftigen sich einige Arbeiten auch mit der Rolle des I-Proteasoms in extrazellulären Infektionen und gehen somit einen neuen Weg in der Aufdeckung immunmodulatorischer Eigenschaften des I-Proteasoms. Dabei wurde, wie bereits erwähnt, eine höhere Last von *Candida albicans* in Tieren, welche mit dem selektivem LMP7-Blocker ONX 0914 behandelt wurden, gezeigt (Mundt et al. 2016). Auch die Arbeit von Kirschner *et al.*, welche sich mit der transnasalen Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* in LMP7-Knock-Out-Mäusen beschäftigt, zeigt nach 48 stündiger Infektion eine signifikant höhere Bakterienlast in der Lunge der LMP7-defizienten Tiere (Kirschner et al. 2016). Mit der hier diskutierten Arbeit soll nun die vielversprechende Erkenntnis gewonnen werden, wie sich Gram-negative Bakterien wie *E. coli* in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren ausbreiten können. Arbeiten, die *in vitro*-Stimulationen mit LPS durchgeführt haben, ließen bereits eine wichtige Rolle des I-Proteasoms in der Immunabwehr gegen *E. coli* vermuten (Reis, Hassan, et al. 2011). Dem Weg der Infektion folgend, wurde in dieser Arbeit die Bakterienlast in der Peritonealflüssigkeit, dann im Blut und der Milz sowie in nicht-lymphatischen Organen wie der Leber, Niere und der Lunge bestimmt. Wie zu erwarten war, wurden die meisten Bakterien am Infektionsort, dem Peritoneum, detektiert. Von der Peritonitis aus kam es zu einer hämatogenen Ausbreitung der Erreger, welche mitunter schon nach vierstündiger Infektion im Blut nachweisbar waren. Nach zwölfstündiger Infektion konnten in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren gegenüber den Wildtyp-Tieren erhöhte Bakterienmengen in der Peritonealflüssigkeit, im Blut und auch in der Leber, welche ebenfalls einer sehr hohen bakteriellen Last unterlag, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). In der Lunge der Knock-Out-Tiere etablierten sich schon nach 6 stündiger Infektion mehr *E. coli* als in den Wildtyp-Tieren. Die Analyse der Niere ergab keine klaren Unterschiede in der Keimmenge, da sie im Zuge der *E. coli*-Sepsis nicht primär betroffen war, wie durch blutchemische Parameter und die histopathologische Beurteilung deutlich wurde. Auch in der Milz konnte nur eine tendenziell höhere Keimlast in den Knock-Out-Tieren gemessen werden, welche keine biologische Signifikanz erreichte. Dies passt zu den Ergebnissen von Strehl *et al.*, in denen die Bekämpfung von *Listeria monocytogenes* vor allem in der Leber, weniger jedoch in der Milz von dem I-Proteasom abhängig war (Strehl et al. 2006). Eine generelle Aussage

über die Fähigkeit, *E. coli* in lymphatischem Gewebe zu bekämpfen, kann mit diesem Befund jedoch nicht getroffen werden. Anders als in der Milz konnten in der histopathologischen Auswertung des Thymus sowie der mediastinalen Lymphknoten, enorme Mengen *E. coli* in den Knock-Out-Tieren dargestellt werden (Abbildung 12). Mit der Giemsa-Färbung konnten die Stäbchen zweifelsfrei im Parenchym von Lymphknoten und Thymus angefärbt werden (nur Thymusparenchym dargestellt). So wurde deutlich, dass in 90 % der analysierten I-Proteasom-Knock-Out-Proben 12 h *p. i.* der Nachweis von Bakterien im Thymus möglich war, was für die Wildtypen nur in vereinzelten Ausnahmen zutraf. Die messbaren Parameter einer fulminanten Immunreaktion, hervorgerufen durch die Erkennung von *E. coli* mittels TLR-4 und dem damit verbundenen *downstream signaling*, wurden mittels Analyse der exprimierten Zytokine genau untersucht. Hierbei verhielt sich das Level wichtiger Zytokine wie IL-6, IL-1 β und IL-1 α sowie proinflammatorischer Chemokine nicht proportional zu der in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren gemessenen höheren Keimmenge. Die Menge der sich im Organismus verbreitenden *E. coli* hat scheinbar keine über das Maß der Wildtyp-Tiere hinaus gehende Verstärkung der Immunantwort zur Folge. Laut Zytokinlevel müsste sich das Ausmaß der immunbedingten Zellschädigung in beiden Tiergruppen ähneln, was der histopathologischen Beurteilung der Organe jedoch widerspricht. Da Bakterien wie *E. coli* mit Virulenzfaktoren ausgestattet und zu zellschädigenden Mechanismen befähigt sind, geht von ihnen, ungeachtet der LPS-TLR4 vermittelten Immunantwort, eine direkte Zytotoxizität aus. Im Falle von Neonatal-Meningitis-auslösenden *Escherichia coli* (NMEC), welche zu den extraintestinal pathogenen *E. coli* zählen (Kaper et al. 2004), sind die Bakterien zu einer Adhäsion an die Wirtszellen mittels Typ 1 Pili (Mokady et al. 2005) und dem nachfolgenden Umbau des Aktin-Zytoskeletts befähigt, was in einer endosomalen Aufnahme der Bakterien gipfelt (Khan et al. 2007, Prasadarao 2002). Ausgehend von der Publikation von Sukumaran *et al.* wird angenommen, dass die hämatogene Ausbreitung des dort untersuchten *E. coli* durch die Replikation innerhalb von Makrophagen und Monozyten begünstigt wird. Desweiteren überleben die Bakterien neben der antiphagozytotischen Wirkung der K1-Kapsel (Kim et al. 2003) in Makrophagen und Monozyten durch Verhinderung der zellulären Apoptose (Sukumaran et al. 2004) und Verminderung proinflammatorischer Zytokinausschüttung (Selvaraj & Prasadarao 2005). Eine O-acetylierte K1-Kapsel (OAc⁺) wird außerdem mit einer erhöhten Pathogenität in Verbindung gebracht (Frasa et al. 1993). Welche Form der K1-Kapsel der hier verwendete *E. coli* A247 ausprägt müsste jedoch noch in stammspezifischen Folgeuntersuchungen ermittelt werden. Von uropathogenen *E. coli* (UPEC), einem weiteren wichtigen Vertreter extraintestinal pathogener *E. coli* (Kaper et al. 2004), ist bekannt, dass der Erreger durch den Virulenzfaktor Haemolysin A (*HlyA*) den Akt-Signalweg inhibieren und eine Apoptose auslösen kann (Wiles et al. 2008). Als weiteres Beispiel einer *E. coli*-vermittelten Zytotoxizität sei der Virulenzfaktor *sat* (*secreted autotransporter toxin*) uropathogener *E. coli*, der zu einer Zerstörung von Blasen- und Nierenepithel beiträgt, zu nennen (Guyer et al. 2002). Neben diesen Beispielen sind noch eine Vielzahl weiterer Virulenzfaktoren der UPEC und NMEC bekannt und obwohl nicht jeder *E. coli*-Stamm innerhalb der Gruppe extraintestinal pathogener *E. coli* über das gleiche Muster an Virulenzfaktoren verfügt (Ewers et al. 2007), steht dennoch die Zytotoxizität von UPEC und NMEC außer Frage. Über Adhäsionsmechanismen und Virulenzfaktoren hinaus sind *E. coli* zu spezifischen Evasionsstrategien befähigt. Neben der K1-Kapsel sind UPEC in der Lage, biofilmartige Komplexe zu bilden. Sind die Bakterien in das Uroepithel eingedrungen, lagern sie sich zu sogenannten *intracellular bacterial communities* (IBCs) zusammen, welche für die

Bakterien eine transiente und protektive Umwelt schaffen (Anderson et al. 2003). Ob die Deletion des I-Proteasoms die Bakterien zu dieser spezifischen und hoch wirksamen Evasionsstrategie befähigt, wurde in dem Projekt mittels FISH untersucht (Abbildung 18). Hierbei wurden die Bakterien mit fluoreszenzgekoppelten RNA-Sonden markiert und in infiziertem Gewebe sichtbar gemacht. Auffällig war eine Ausbreitung der Bakterien im gesamten Organismus der 12 h infizierten Tiere, da sie im Organparenchym von Lunge, Leber, Milz und Herz beider Mausgruppen darstellbar waren. Neben vereinzelt in polymorphnukleären Entzündungszellen sichtbaren *E. coli* konnte eine Mehrzahl der Erreger in unmittelbarer Umgebung von Gefäßen ausgemacht werden, was für die hämatogene Ausbreitung der Bakterien spricht. In der Nierenkapsel und Randzonen der Milz und der Leber konnten ebenfalls größere Mengen Bakterien gesichtet werden, die das Organparenchym vom Peritoneum ausgehend infizierten. Bei der Suche nach Überlebensstrategien der Bakterien im Wirt konnten keine biofilmartigen Gruppierungen nachgewiesen werden. Auch die Möglichkeit eines gesteigerten Überlebens in I-Proteasom-Knock-Out-Makrophagen konnte durch die Bestimmung des intrazellulären Abtötens von *E. coli* in Peritonealmakrophagen ausgeschlossen werden (Abbildung 24). Zusammenfassend wird deutlich, dass die direkte Zytotoxizität der Bakterien einen Einfluss auf die ausgeprägtere Organpathologie haben kann, ausgeschlossen ist jedoch, dass der Verlust des I-Proteasoms die Bakterien zu besonderen Evasionsstrategien befähigt. Der Frage, warum die Bakterien einen Überlebensvorteil in den Knock-Out-Tieren haben und sich schneller im gesamten Organismus verbreiten konnten, sollte durch Untersuchungen des Infektionsortes und der dortigen zellulären Abwehr nachgegangen werden.

4.4 Verminderte bakterielle Eradikation trotz uneingeschränkter angeborener Immunabwehr am Infektionsort

4.4.1 Vergleichbare Anzahl und Aktivität neutrophiler Granulozyten am Infektionsort

In Abbildung 19 wurde das Zellbild der akuten *E. coli*-induzierten Peritonitis dieses Modells dargestellt. Wie abgebildet, ist ein enormer Influx von polymorphnukleären Neutrophilen (PMNs) schon kurz nach der Infektion zu verzeichnen. Diese aktivierten Neutrophilen werden als erste Verteidigungslinie gegenüber einer bakteriellen Infektion betrachtet (Sonego et al. 2014). Zusätzlich ist die Peritonitis von einem Einstrom inflammatorischer Makrophagen, welche sich funktionell und morphologisch in einigen Details von den residenten Sentinel-Makrophagen des Peritoneums unterscheiden, gekennzeichnet (Ghosh et al. 2010). Auch Mastzellen, T-Zellen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen spielen in der akuten Reaktion auf ein eindringendes Pathogen eine Rolle (Laurin et al. 2012), wurden jedoch im Zuge dieses Projektes im Peritoneum nicht genauer untersucht. Eine gestörte Eradikation von Bakterien im Peritoneum liegt zu meist bei einer inadäquaten PMN und/oder Makrophagen-Rekrutierung, -Aktivierung, bzw. -Funktionalität vor. Diese Störung der zellulären Abwehr kann sich in diversen Mechanismen begründen, zu denen auch eine verminderte Zytokin/Chemokin-vermittelte Aktivierung und Attraktion der Entzündungszellen gehört. Beurteilt man das Zytokinprofil der peritonealen Flüssigkeit, fällt eine enorm reduzierte Menge des Zytokins IL-17A in der Bauchhöhle der I-Proteasom-Knock-Out-Mäuse auf. Dies wurde

bereits von Mundt *et al.* im Zuge der invasiven *Candida*-Infektion in der LMP7-defizienten Maus mit einer Reduktion der IL-17A und IFN γ produzierenden T-Zellen begründet (Kalim et al. 2012, Mundt et al. 2016). Auch in diesem Modell konnte eine Depletion der T-Zellen im Verlauf der Infektion und eine reduzierte Menge CD8⁺-T-Zellen im uninfizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tier festgestellt werden (Abbildung 28). Fraglich ist jedoch, ob allein die verringerte Menge der T-Zellen für ein massiv reduziertes Level von IL-17A, was ebenfalls in der Analyse des Plasmas verifizierbar war, verantwortlich ist. Bekannt ist, dass IL-17A initial von T-Zellen, jedoch auch in großen Mengen von Makrophagen und vor allem PMNs produziert werden kann, um bei einer hohen Bakterienlast weitere PMNs anzulocken (Ren et al. 2016). Ebenfalls lassen eine geringere Menge der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β in den Knock-Out-Tieren eine inadäquate PMN- und Makrophagenrekrutierung vermuten. Der Tatsache geschuldet, dass die immunologischen Funktionen des I-Proteasoms bisher erst selten in Bezug auf extrazelluläre bakterielle Infektionen untersucht wurden, gibt es bezüglich der These, der verminderten PMN-Rekrutierung kaum Erkenntnisse. Einzig Kirschner *et al.* zeigt, dass es im Zuge der Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* in der Maus nach 48 h zu einer Disproportionalität in der Anzahl der neutrophilen Granulozyten und der Bakterienlast kommt. In dieser Studie konnte die verminderte PMN-Zahl im Blut jedoch nicht mit einer Verminderung rekrutierender Zytokine und Chemokine begründet werden. Vielmehr stellt die Autorin eine gestörte Opsonisierung des Pathogens als Ursache verminderter PMN-Rekrutierung in den Mittelpunkt. Dies wurde mit einer geringeren Expression der Gene *complement component 1(C1qa)* und *pentraxin 3 (Ptx3)* in Lungen 48 h infizierter LMP7-Knock-Out-Mäuse belegt. Für die Leber wurde die Genexpression von *ficolin A (Fcna)*, *C reactive protein (Crp)*, *C1qa* und *mannose binding lectin 2 (Mbl2)* zwischen LMP7-Knock-Out und Wildtyp verglichen (Kirschner et al. 2016). Die verminderte Expression dieser vier Gene in der Leber der LMP7-Knock-Out-Mäuse konnte mit der Transkriptomanalyse 12 h infizierter Leberhomogenate in diesem *E. coli*-Modell nicht reproduziert werden. Desweiteren ergab die NGS-Analyse der Leber auch keinen Unterschied in der *Ptx3*-Expression. Somit sind die von Kirschner *et al.* publizierten Beobachtungen der Gram-positiven Streptokokken-Infektion in einem LMP7-Knock-Out-Modell nicht auf das Gram-negative *E. coli*-Modell mit einem funktional totalen I-Proteasom-Knock-Out zu beziehen. In der von Mundt *et al.* beschriebenen *Candida*-Sepsis konnten jedoch passend zu den präsentierten Ergebnissen verminderte IL-17A- und IFN γ -Level bei erhöhter Keimbelastung in den LMP7-Knock-Out-Tieren nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der Publikation von Kirschner *et al.* wurde hier eine adäquate, zu der Keimbelastung proportionale Einwanderung von PMNs beobachtet (Mundt et al. 2016), welche sich in das Bild des hier beschriebenen Modells einfügt. Wie die Abbildungen 21 und 22 darstellen, konnten in der Rekrutierung von PMNs und Makrophagen keine Unterschiede, die eine insuffiziente Eradikation der Bakterien am Ort der Infektion erklären könnten, gefunden werden. Die reduzierten Zytokinmengen von IL-17A, IL-12, IL-1 β und IL-1 α im Peritoneum, sowie leicht, aber nicht signifikant verminderte Chemokinlevel wirkten sich nicht auf die Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen aus. Außerdem war die Genexpression wichtiger für die Opsonierung der Pathogene relevanter Proteine laut Transkriptomanalyse nicht differenziell reguliert.

4.4.2 Peritoneale Makrophagen weisen reduzierte PD-L1 und MHC-I Expressions-Level, aber uneingeschränkte Effektorfunktionen auf

Die absolute Anzahl während der Infektion einwandernder Makrophagen und PMNs ist in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren nicht reduziert. Nun sollte für die inflammatorischen, wie auch residenten Makrophagen die Oberflächenexpression von PD-L1, CD86, MHC-I und MHC-II überprüft werden, da diese in der Sepsis Aufschluss über den Immunstatus der Zellen geben können. Der Ligand PD-L1 gilt als wesentlicher Modulator der Immunantwort in der Sepsis (Zhu et al. 2013). So wurde auf Monozyten von Sepsispatienten eine deutlich erhöhte Expression von PD-L1 gemessen (Y. Zhang et al. 2011). Außerdem ist PD-L1 als inhibitorischer Ligand bekannt (Dong et al. 1999, G. J. Freeman et al. 2000) und reduziert die Proliferation von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und induziert T-Zell-Apoptose (Muhlbauer et al. 2006). Studien ergaben eine verbesserte bakterielle Abwehr mit verminderten IL-10- und erhöhten TNF- α - und Il-6-Level, wenn PD-L1 blockiert wurde (Y. Zhang et al. 2010). Auch CD86, ein Costimulator des T-Zell-Rezeptors (McAdam et al. 1998), ist ein für die Sepsis relevantes Oberflächenantigen. Es wurde gezeigt, dass CD86 in muriner experimentell induzierter Sepsis in peritonealen Makrophagen reduziert exprimiert wird (Newton et al. 2004), es jedoch eigentlich zusammen mit CD80 in der frühen Phase von Infektionen stark hochreguliert wird (Lanier et al. 1995) und somit bei hoher Expression für einen proinflammatorischen Immunstatus antigenpräsentierender Zellen steht. Eine weitere mögliche Dysfunktion der Makrophagen könnte eine verminderte MHC-Präsentation sein. Betrachtet man die klassischen MHC-I- und MHC-II-Wege, ist der MHC-I-Weg bei der Präsentation phagozytierter exogener Bakterienbestandteile nicht relevant (Kaufmann & Schaible 2005). Doch schon seit einigen Jahren wird die These einer Beteiligung des MHC-I-Weges an der antibakteriellen Immunantwort in einer alternativen Form untersucht (Reimann & Kaufmann 1997, Svensson et al. 1997, Yrlid et al. 2000), die als *cross presentation* bezeichnet wird (Kaufmann & Schaible 2005). Es ist also davon auszugehen, dass nicht nur der MHC-II-Weg mittels CD4⁺-T-Zell-Antwort, sondern auch die MHC-I-Antigenpräsentation eine antibakterielle Funktion inne hat (Kaufmann & Schaible 2005). Bekannt ist, dass während der humanen Sepsis weniger MHC-II-Moleküle exprimiert werden. Dies beschreibt Rimmele *et al.* für humane Monozyten (Rimmele et al. 2016). In diesem Modell ist ein deutlicher MHC-II-Expressionsanstieg in den murinen inflammatorischen Peritonealmakrophagen im Zuge der Infektion zu beobachten (nicht abgebildet), wobei zu beachten ist, dass residente Peritonealmakrophagen keine MHC-II-Moleküle exprimieren (Ghosn et al. 2010). Diese neigen jedoch zu einer vermehrten MHC-I-Expression während der Infektion, welche deutlich stärker in den Wildtyp-Tieren ausfiel (Abbildung 23). In *E. coli*-infizierten Peritonealmakrophagen kommt es also zu einer reduzierten MHC-I-, jedoch einer ungestörten MHC-II-Expression in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren. Dieses Ergebnis reiht sich in die Erkenntnisse zahlreicher das I-Proteasom betreffende Studien ein (Fehling et al. 1994, Kincaid et al. 2012). Ob die Makrophagen der Knock-Out-Mäuse einen pro- oder antiinflammatorischen Status inne haben, der sich von dem der Wildtyp-Tiere unterscheidet, sollte über die Expressionuntersuchung von CD86 und PD-L1 geklärt werden (Abbildung 24). In den inflammatorischen Peritonealmakrophagen konnte für CD86 eine Expressionssteigerung detektiert werden, die zwischen den Versuchsgruppen nicht variierte. Dies steht im Kontrast zu *in vitro*-Ergebnissen, bei denen dendritische Zellen von Wildtypen und LMP7/MECL-1-

Doppel-Knock-Out-Mäusen mit LPS stimuliert wurden. Hier war der prozentuale Anteil CD86⁺ DCs in den Knock-Out-Tieren verringert (de Verteuil et al. 2014). Die Anzahl PD-L1-positiver Zellen stieg im Zuge der Infektion auch, nur wurde die Expression pro Zelle für dieses Antigen nicht erhöht. Die inflammatorischen Peritonealmakrophagen befanden sich 12 h *p. i.* folglich in einem proinflammatorisch geprägten Immunstatus. Die wenigen während der Infektion messbaren residenten Peritonealmakrophagen erhöhten die Expression für beide Oberflächenantigene, wobei eine verstärkte Expression für PD-L1 zu verzeichnen war. Diese PD-L1-Erhöhung fiel in I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen signifikant geringer aus. Bei Analysen der aus Milz und Lunge isolierten Zellen verstorbener Sepsispatienten korrelierte eine CD4⁺- und CD8⁺T-Zell-Depletion mit erhöhten Mengen PD-1 auf den verbliebenen Lymphozyten sowie dem Liganden PD-L1 auf antigenpräsentierenden Zellen. Desweiteren war die Oberflächenexpression von CD86 reduziert, was die These eines immunsuppressiven Status der Zellen unterstrich (Boomer et al. 2011). Die stärker ausgeprägte Lymphopenie und Letalität in den Knock-Out-Tieren ließ ein ähnliches Expressionsmuster für PD-L1 und CD86 in diesen Tieren vermuten, wie es Boomer *et al.* für die verstorbenen Sepsispatienten beschreibt. Dies kann jedoch durch die signifikant verringerte Menge PD-L1 in residenten Peritonealmakrophagen der I-Proteasom-Knock-Out-Tiere nicht verifiziert werden. PD-L1 und somit auch der Rezeptor PD-1 scheinen an der massiveren T-Zell-Depletion nicht ursächlich beteiligt zu sein. Ob die geringere PD-L1-Expression auf den Knock-Out-Makrophagen durch das verminderte IFN γ -Level verursacht wurde, bleibt nur zu vermuten. Klar beschrieben wurde jedoch die expressionsinduzierende Wirkung der Typ II Interferone auf PD-L1 in verschiedensten Zelltypen (S. J. Lee et al. 2006, S. K. Lee et al. 2005). Die Untersuchung immunmodulatorischer Oberflächenantigene der Peritonealmakrophagen ergab zwar eine reduzierte MHC-I- und PD-L1-Expression, sprach aber nicht für eine generelle Dysfunktion der Makrophagen, die eine gestörte Bakterieneradikation erklären könnte. Um die Haupteffektorfunktionen der Peritonealmakrophagen zu prüfen, wurden aus gesunden Tieren residente Peritonealmakrophagen entnommen und *in vitro* mit *E. coli* infiziert. Die beurteilte Phagozytoseaktivität sowie die Fähigkeit, intrazelluläre Bakterien zu töten, stellte sich in den Knock-Out-Makrophagen genauso effektiv wie in den Wildtyp-Makrophagen dar. Dieses Ergebnis korreliert mit den Befunden von Kirschner *et al.*, in denen die Phagozytose von Pneumokokken in Knochenmarksmakrophagen LMP7-defizienter Mäuse nicht eingeschränkt war (Kirschner et al. 2016). Die Fähigkeit, NO zu produzieren, obliegt Makrophagen, welche nach der Stimulation durch proinflammatorische Zytokine, vorrangig IL-12 und IFN γ (Mastroeni et al. 1998), aber auch LPS, das Enzym *inducible Nitric oxide synthase* (iNOS) bilden (Chan & Riches 2001). Reaktive Sauerstoff-Spezies und nitrosative Agentien, von denen NO hier repräsentativ untersucht wurde, bilden einen Hauptbestandteil der antibakteriellen Abwehr von Makrophagen und Neutrophilen. Dennoch rufen hohe NO-Level in der Sepsis gravierende Kollateralschäden hervor, was in Nagermodellen mit iNOS-defizienten Tieren evaluiert wurde (Astolfi et al. 2007). Zu hohe NO-Level könnten folglich die massiveren Organschädigungen begründen, hervorgerufen durch mikrovaskuläre Störungen. Im Kontrast könnten zu niedrige NO-Level die verminderte Bakterieneradikation verursachen (Cobb et al. 1999, Fang 2004). Die nach 6 h und 12 h untersuchte peritoneale Spülflüssigkeit von infizierten Tieren wies jedoch keinen Unterschied im NO-Level der beiden Tiergruppen auf (Abbildung 26). Dieses Ergebnis widerspricht der von Reis *et al.* postulierten Erkenntnis, dass peritoneale Makrophagen von I-Proteasom-Knock-Out-Tieren nach *in vitro*-

Stimulation mit LPS signifikant weniger NO produzieren (Reis, Hassan, et al. 2011). Auch in LMP7-defizienten Knochenmarksmakrophagen konnte nach 36-stündiger und 48-stündiger *in vitro*-LPS-Stimulation eine verminderte NO-Produktion, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, deutlich gemacht werden (Kirschner et al. 2016). Zu beachten sei, dass in den zwei zuletzt genannten Modellen die Akkumulation von Nitrit in Zellüberständen einer LPS-stimulierten Makrophagenkultur bestimmt wurde. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu der hier erfolgten Messung des Nitrits in der Peritonealflüssigkeit *E. coli*-infizierter Mäuse dar. Letztendlich wird deutlich, dass trotz reduzierter IL-12-, IL-1- und IFN γ -Level die Rekrutierung der Immunzellen in die Bauchhöhle sowie deren proinflammatorischer Aktivierungsstatus und deren Haupteffektorfunktionen nicht ursächlich an einer verminderten Bakterieneradikation beteiligt sind.

4.5 Begünstigung der Infektion durch eine systemisch eingeschränkte lymphozytäre Immunantwort

Bei der Analyse der isolierten Splenozyten aus infizierten und gesunden I-Proteasom-Knock-Out-Tieren konnte im Vergleich mit Wildtyp-Tieren eine tendenziell vermehrte Anzahl toter Zellen detektiert werden (Abbildung 27), was für eine höhere Fragilität der Zellen sprach. Die histopathologischen Befunde vermehrter Zelluntergänge in Milz und Thymus der infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tiere ergänzten dieses Ergebnis. Bisherige Studien konnten darstellen, dass LMP2-, LMP7- bzw. MECL-1 defiziente T-Zellen, welche in virusinfizierte Empfängermäuse transferiert wurden, ein vermindertes Überleben zeigten (Moebius et al. 2010). Weitere Studien stellen jedoch eine Hyperproliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in Knock-Out-Mäusen, denen die Fähigkeit fehlte, MECL-1 und LMP7 zu bilden, dar. In der Studie von Caudill *et al.* wurde dafür ein beschleunigter Zellzyklus als ursächlich betrachtet (Caudill et al. 2006). Darüber hinaus schreibt Zaiss *et al.* den höchsten Einfluss dieser Modulation des T-Zell-Repertoires der Untereinheit MECL-1 zu. Es wird beschrieben, dass MECL-1 scheinbar neben dem indirekten Effekt auf die Antigenpräsentation auch direkten Einfluss auf intrinsische T-Zell-Prozesse hat. Der Autor diskutiert hierbei die Vermutung von der Beeinflussung der homöostatischen Verteilung der T-Zell-Populationen durch einen Einfluss des I-Proteasoms auf die T-Zell spezifische transkriptionelle Regulation (Zaiss et al. 2008). Die hier diskutierte Studie kann an die Ergebnisse des Anstiegs des CD4/CD8-Verhältnisses der zuletzt genannten Publikationen, trotz LMP7- und MECL-1-Defizienz nicht anknüpfen. Neben einer generalisierten Fragilität der Splenozyten konnten Abweichungen in dem CD4⁺ und CD8⁺T-Zell-Verhältnis detektiert werden (Abbildung 28). Wie Basler *et al.* in MECL-1 defizienten Tieren 20 % weniger CD8⁺T-Zellen bestimmen konnte (Basler et al. 2006), wurden auch in uninfizierten I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen dieses Projektes signifikant geringere Mengen CD8⁺T-Zellen gemessen. Wie bereits für andere Infektionsmodelle beschrieben, wichen die Mengen der CD4⁺Zellen in den uninfizierten Knock-Out-Tieren nicht von Zellzahlen der Wildtypen ab (Basler et al. 2006, Van Kaer et al. 1994, Zaiss et al. 2008). Jedoch zeigte sich im Zuge der Infektion ein für die Sepsis typischer Verlust von T-Zellen (Boomer et al. 2011), welcher bezogen auf CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen signifikant verstärkt in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren zu verzeichnen war. Den Verlust von CD4⁺T-Helfer-Zellen beschreiben Kalim *et al.* im Zuge eines murinen LMP7^{-/-} Kolitis-

Modelles. Hierbei wird ein Verlust bzw. eine gestörte Differenzierung der Th1- und Th17-Zellen deutlich gemacht (Kalim et al. 2012). Weiterhin konnte ein erhöhter Anteil von B-Zellen an der untersuchten Lymphozytenpopulation in den Knock-Out-Tieren gemessen werden (Abbildung 29). Bisher wurde nur das alleinige Knock-Out von LMP2 als Ursache für eine reduzierte B-Zell-Population in der Milz publiziert (Hensley et al. 2010), wobei diese Ergebnisse von Basler *et al.* in LMP2^{-/-} sowie in LMP2- und MECL-1-Doppel-Knock-Out nicht reproduziert werden konnten (Basler et al. 2011). Ferner wurde in der hier diskutierten Arbeit die Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II auf antigenpräsentierenden Zellen, wie den Makrophagen, aber auch auf T- und B-Zellen analysiert. Laut zahlreicher Publikationen stellt eine Reduktion des MHC-I-Proteinkomplexes auf der Zelloberfläche den Phänotypen der I-Proteasom-Knock-Out-Zellen dar. (Craiu et al. 1997, K. L. Rock et al. 1994). So konnte für ein komplettes I-Proteasom-Knock-Out eine 50%ige Reduktion des zellulären Oberflächenlevels von MHC-I ausgemacht werden (Kincaid et al. 2012). Eine ähnlich ausgeprägte Verminderung der MHC-I-Expression dokumentierte schon Fehling *et al.* für LMP7-Knock-Out-Zellen (Fehling et al. 1994). Die Lokalisation von LMP2 und LMP7 auf dem MHC-Gen-Lokus und deren Nähe zu den Peptidtransportern TAP1 und TAP2 (Glynne et al. 1991) ließ die Verbindung des I-Proteasoms vorrangig zu der MHC-I gekoppelten Antigenpräsentation offensichtlich werden (Bai & Forman 1997). Dennoch steht das I-Proteasom nicht nur mit den TAP-kodierenden Genen, sondern auch mit zahlreichen anderen, die MHC-gebundene Antigenpräsentation beeinflussenden, auf dem selben Genlokus verschlüsselten Proteinen in Zusammenhang (Cerundolo et al. 1995, Ortiz-Navarrete et al. 1991). Obwohl eine generelle Beeinflussung der MHC-II-Antigenpräsentation, charakterisiert durch eine verminderte MHC-II-Expression auf professionellen APCs, bisher nicht gezeigt wurde, konnte dieses Projekt eine signifikante Reduktion des MHC-II-Levels auf der Oberfläche von B-Zellen deutlich machen (Abbildung 29). Wie bereits erwähnt, konnte dieser Befund nicht auf peritonealen Makrophagen reproduziert werden. Bei der Analyse der Peritonealmakrophagen wurden keine Unterschiede in der Oberflächenexpression von MHC-II detektiert (nicht abgebildet). Dieses erzielte Ergebnis deckt sich mit der von Becker *et al.* aktuell publizierten Erkenntnis, dass die Antigenpräsentation in B-Zellen über einen spezifischen, vom klassischen MHC-II-Weg abweichenden Mechanismus erfolgt. Zudem wurde in dieser Studie gezeigt, dass ein pharmakologisches Inhibieren des Proteasoms mit Epoxomicin zu einer reduzierten MHC-II-Epitop-Prozessierung in B-Zellen führte, was für dendritische Zellen nicht reproduziert werden konnte (Becker et al. 2016). Ebenfalls für zwei wichtige Epitope des MHC-I-Moleküls auf T- und B-Zellen gezeigt, war die Expression schon in uninfizierten I-Proteasom-Knock-Out-Tieren signifikant reduziert. Im Laufe der Infektion verschärfte sich der Expressionsunterschied für MHC-I und MHC-II noch zusätzlich (Abbildungen 28 und 29). Die Reduktion von MHC-II auf der Oberfläche von B-Zellen ist eine neue Erkenntnis und könnte im Zusammenhang mit der zusätzlichen Deletion des PA28-Aktivatorrings in den hier untersuchten Tieren stehen, da in bisherigen Studien, welche eine ungestörte Expression von MHC-II beschreiben, einzig die Funktionalität von I-Proteasom-Untereinheiten aufgehoben wurde. In einer übersichtlichen Erläuterung des Proteasom-Systems und dessen Einfluss auf die Antigenpräsentation stellt Strehl *et al.* dar, dass der durch IFN γ induzierbare Aktivatorring PA28 die zelluläre Immunabwehr nicht additiv mit dem I-Proteasom beeinflusst, sondern vielmehr unabhängig vom I-Proteasom die Peptidpräsentation optimiert (Strehl et al. 2005). Weiterhin zeigen Studien, dass die Unfähigkeit, den PA28-Ring

zu synthetisieren, in den Zellen keinen Einfluss auf den Einbau von Immununtereinheiten in das konstitutive Proteasom hat und umgekehrt eine I-Proteasom-Defizienz die Bildung und Zusammenarbeit des PA28-Rings mit dem 20S Proteasom nicht stört (Murata et al. 2001, Schwarz et al. 2000). Somit könnte ein zweifaches Knock-Out des I-Proteasoms und des PA28-Aktivatorrings durchaus weitere und bisher nicht bekannte Einflüsse auf die zelluläre Immunantwort haben, vor allem weil ihre Effekte als unabhängig voneinander beschrieben wurden und einer unterschiedlichen Wirkungsweise zu entspringen scheinen. Durch die Befunde einer verminderten CD8⁺T-Zellzahl sowie verminderter MHC-I auf T-Zellen und MHC-I und II-Expression auf B-Zellen in uninfizierten I-Proteasom-Knock-Out-Kontrollen kann schon vor der Infektion von einer reduzierten lymphozytären Abwehr ausgegangen werden. Im Verlauf der Infektion stellt sich eine verminderte Vitalität der Lymphozyten, eine massivere Lymphopenie und stärker ausgeprägte Thymus- und Milzzelluntergänge in der Histopathologie dar. Zusätzlich reduzierte sich auch die für die antibakterielle Infektionsabwehr wichtige CD4⁺Zellzahl und die Fähigkeit der B-Zellen, als antigenpräsentierende Zelle zu wirken, wurde durch den Verlust der Fähigkeit, die MHC-Proteinkomplexe adäquat auf der Zelloberfläche zu exprimieren, eingeschränkt. In Summe weisen diese Befunde auf eine starke Beeinträchtigung der lymphozytären Immunantwort hin, die über das stets publizierte Maß der verminderten Antigenpräsentation via MHC-I und der damit verbundenen reduzierten CD8⁺T-Zell-Antwort auf intrazelluläre Pathogene hinausgeht. Da bislang die verminderte MHC-I-Expression und CD8⁺T-Zellzahl mit einer Einschränkung der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene in Verbindung gebracht wurde, ist es nicht verwunderlich, dass die I-Proteasomforschung der letzten Jahrzehnte diesen Mechanismus fokussierte. Trotz allem ist bekannt, dass nicht nur IFN γ bei einer Virusinfektion, sondern auch LPS und, wie in dieser Studie gezeigt, ebenfalls vitale *E. coli* das I-Proteasom in Gewebe und Immunzellen induzieren können (Abbildung 2). Diese Erkenntnis verspricht eine viel weitergehende Beteiligung des I-Proteasoms an immunologischen Prozessen, abgesehen von der Abwehr intrazellulärer Pathogene. Durch Studien der letzten Jahrzehnte wurde außerdem deutlich, dass eine Vernetzung der angeborenen und erworbenen Immunität durchaus besteht. Eine entscheidende Erkenntnis war hierbei die Entdeckung sogenannter *innate lymphoid cells* (ILC). Diese Zellen stellen T-Lymphozyten, jedoch ohne ihren charakteristischen T-Zell-Rezeptor dar. Es wurde deutlich, dass dieser Zelltyp durch die Ausschüttung von Zytokinen, als eine sofortige Reaktion auf einen eindringenden Erreger, eher der Funktionsweise der Zellen der angeborenen Immunantwort folgt (Spits & Cupedo 2012). Seit diesen Erkenntnissen muss ein Umdenken stattfinden, welches die T-Zellen nicht mehr eindeutig der adaptiven Immunantwort zuordnet. Desweiteren wurde über die Entdeckung der Th17-Zellen den Lymphozyten eine erhöhte Gewichtung bei der Bekämpfung extrazellulärer bakterieller Infektionen zugeschrieben. Nicht nur CD4⁺-Zellen können sich in einen Th17-Phänotypen differenzieren (Harrington et al. 2005), sondern auch zytotoxische CD8⁺-Zellen, welche vormals der Bekämpfung intrazellulärer Bakterien und Viren zugeordnet wurden. Sind diese in der Lage, IL-17 und IL-22 zu produzieren, werden sie als Tc17-Zellen bezeichnet (Kondo et al. 2009). Wie in der Arbeit diskutiert, ist IL-17 ein essenzieller Vermittler der extrazellulären bakteriellen Abwehr, durch die Rekrutierung von PMNs und die Anregung zur Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Reynolds et al. 2010). Da dieses Zytokin eine starke Gewebsdestruktion initiieren kann (Hu et al. 2011), ist es nicht verwunderlich, dass IL-22, welches von gleichen Zelltypen ausgeschüttet wird, mit Gewebsreparationen in Verbindung

gebracht wird (Eyerich et al. 2009, Radaeva et al. 2004). Da in Versuchen dieser Arbeit ein signifikanter Mangel an IL-17 und dem Th17- bzw. Tc17- aktivierenden Zytokin IL-1 β bestand (Cosmi et al. 2008), ist anzunehmen, dass in den Knock-Out-Tieren ebenfalls zu wenig IL-22 produziert wurde. Laut Eyerich *et al.* exprimieren *in vitro*-Th22-Zellen ein Transkriptomprofil, welches Proteine des Gewebeumbaus und Chemokine assoziiert mit Fibrose und Angiogenese, kodiert (Eyerich et al. 2009). Einen ähnlichen Phänotyp, welcher zu der Produktion dieser Zytokine befähigt ist, fanden Forscher für die ILCs (Takatori et al. 2009). Weiterhin wurde deutlich, dass diese ILC-Typen wesentlich an der Entwicklung von sekundären lymphatischen Strukturen wie Lymphknoten und Peyerschen Platten, beteiligt sind (Eberl et al. 2004, Mebius et al. 1997). Für spätere Studien in I-Proteasom-Knock-Out-Modellen wäre eine Untersuchung der beteiligten ILCs im Zuge von Infektionen, aber auch in Bezug auf die Entwicklung lymphatischer Organe denkbar. Dass unterschiedliche T-Zellpopulationen nicht der spezifischen Abwehr eines Pathogentypus zugeordnet werden können, wurde anhand der Entwicklung der CD8⁺Zellen zu Tc1- oder Tc17-Zellen bzw. der CD4⁺Zellen zu Th1- oder Th17-Zellen deutlich, welche auch als IFN γ -produzierende oder IL-17-produzierende Zellen gelten. Dass ein Verlust genau dieser T-Zelltypen im Zuge der *E. coli*-Infektion bestand, kann von dem verringerten IFN γ - und IL-17-Level sowie der verminderten Produktion der die Differenzierung dieser Zelltypen anregender Zytokine IL-1 β und IL-12 abgeleitet werden und wird von bestehenden Publikationen gestützt (Kalim et al. 2012, Mundt et al. 2016). Dass von dieser T-Zell-Depletion ebenfalls IFN γ bzw. IL-17- und IL-22-produzierende ILCs betroffen sind, wäre denkbar und würde die Beteiligung der lymphozytären Abwehr an der akuten Immunantwort auf diesen Erreger erklären. Diese Vermutung kann zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht belegt werden. Ein weiteres im Zuge der Arbeit zu diskutierendes Phänomen ist die sogenannte *cross presentation* (Kaufmann & Schaible 2005), welche eine Alternative der klassischen MHC-I-Antigenprozessierung darstellt (Reimann & Kaufmann 1997, Svensson et al. 1997, Yrlid et al. 2000). Betrachtet man den üblichen MHC-I- und MHC-II-Antigenpräsentationsweg, wird deutlich, dass die Peptidpräsentation über MHC-I-Moleküle für die Präsentation phagozytierter exogener Bakterienbestandteile nicht relevant ist (Kaufmann & Schaible 2005). Dies ist ein weiterer Grund für den jahrelang bestehenden Fokus des I-Proteasoms auf virale und intrazelluläre Infektionen. Durch eine inadäquate Peptidpräsentation mittels MHC-I-Molekülen wurde eine CD8⁺T-Zell-Antwort auf intrazelluläre Infektionen erschwert, zusätzlich zu der schon verringerten Anzahl dieses Zelltyps. Nun eröffnet die *cross presentation* die Möglichkeit, auch exogene Antigene über den MHC-I-Peptidrezeptor zu präsentieren, was eine Erklärung für eine inadäquate CD8⁺T-Zell-Aktivierung auch in Bezug auf extrazelluläre bakterielle Infektionen darstellt. In diesem Projekt kommt neben der verminderten Expression des MHC-I-Moleküls jedoch als weiterer Störfaktor die reduzierte Expression von MHC-II auf B-Zellen zum Tragen. B-Zellen zählen ebenfalls zu antigenpräsentierenden Zellen und sind durch den B-Zell-Rezeptor befähigt, Antigene mittels rezeptorvermittelter Endozytose zu inkorporieren und über MHC-II-Moleküle zu präsentieren (Depoil et al. 2009, Yuseff et al. 2013). Durch eine reduzierte Expression dieses Moleküls auf B-Zellen kann hier auf eine, der Bakterienlast nicht entsprechenden, inadäquaten bidirektionalen Aktivierung von T- und B-Zellen geschlossen werden. Auch die B-Zellen besitzen ähnlich wie T-Zellen, Zellpopulationen, die nicht zwingend der adaptiven Immunantwort zugeschrieben werden können. So grenzt sich eine in der Peripherie und vor allem in der Peritoneal- und der Pleurahöhle zu findende Population der B1-Zellen von den

konventionellen B2-Zellen ab. Auch diese können nach ihrem Phänotyp weiter unterschieden werden. Gekennzeichnet sind diese B1-Zellen jedoch durch die Produktion natürlicher Antikörper und stehen für die Vermittlung einer frühen Immunantwort auf vorrangig extrazelluläre bakterielle Pathogene (Allman & Pillai 2008, Ansel et al. 2002). Die Untersuchung dieser Zellpopulation, die ähnlich wie die ILCs einen Bogen von der angeborenen zu der adaptiven Immunantwort schlägt und die Immunreaktion als einen ineinander fließenden Prozess darstellt, wurde in diesem Projekt nicht berücksichtigt. Der Hinweis der reduzierten MHC-II-Expression auf B-Zellen sollte jedoch genügen, um diesem Zelltyp in Bezug auf I-Proteasom-Knock-Out-Modelle einen Stellenwert einzuräumen.

4.6 Mögliche zell- und pathogenspezifische Funktionalität des I-Proteasoms

Neben dem I-Proteasom sind bislang zwei weitere Sonderformen des Proteasoms bekannt, das Spermatoproteasom und das Thymoproteasom (Kniepert & Groettrup 2014). Letzteres befindet sich in kortikalen Epithelzellen des Thymus und gilt durch die spezialisierte Untereinheit $\beta 5t$ als essenziell für die Positivselektion der T-Lymphozyten (Murata et al. 2007). Zusätzlich zu der Expression des Standardproteasoms in allen kernhaltigen eukaryotischen Zellen besitzen Zellen hämatopoetischen Ursprungs ein hohes Basallevel des I-Proteasoms (Frisan et al. 2000, Haorah et al. 2004). Aus diesem Grund zeichnet sich die Milz als das Organ mit der höchsten Dichte des I-Proteasoms aus (Noda et al. 2000). Gemischte Proteasome, welche Immununtereinheiten wie auch konstitutive Untereinheiten beherbergen, können ebenfalls in einer Vielzahl von Zellen und Geweben ohne $\text{IFN}\gamma$ -Stimulus detektiert werden. Im Menschen sind diese vor allem in der Leber, dem Kolon, dem Dünndarm und der Niere, aber auch in antigenpräsentierenden Zellen zu finden (Guillaume et al. 2010). In immunprivilegierten Organen wie zum Beispiel dem Gehirn können ohne Stimulus kaum I-Proteasome ausgemacht werden. Laut Kremer *et al.* konnten weitestgehend nur Mikroglia als Quelle des I-Proteasoms detektiert werden (Kremer et al. 2010). Obgleich das Auge wie auch das Gehirn, von generalisierten Immunreaktionen zumeist verschont bleiben, konnten auch hier I-Proteasome induziert werden (Piccinini et al. 2003, S. Singh et al. 2002). Basallevel exprimierter Immununtereinheiten konnten auch in diesem Projekt detektiert werden. So ergaben Western Blot-Analysen eine Expression aller I-Proteasomuntereinheiten sowie $\text{PA28}\alpha$ und β in Nieren-, Milz-, Lungen-, Herz- und Leberhomogenaten (nur Letzteres in Abbildung 2 dargestellt) von gesunden Wildtyp-Mäusen. Die Heterogenität, mit der Immununtereinheiten in unterschiedlichen Zellen bereits basal, ohne erkennbaren Stimulus, vorliegen und die Fähigkeit der Zellen aller Gewebe, unter $\text{IFN}\gamma$ -Stress das I-Proteasom zu exprimieren, spricht für mehr als nur immunmodulatorische Funktionen des I-Proteasoms. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Immununtereinheiten in zellspezifische Prozesse involviert sind. So könnten I-Proteasome nicht nur Immunfunktionen wie zum Beispiel die Antigenpräsentation in dafür spezialisierten Zellen inne haben, sondern auch je nach Gewebe und Funktion der Zellen weitaus mehr Prozesse beeinflussen.

4.7 Beeinflussung der Transkription durch das I-Proteasom

Da das I-Proteasom in den Immunzellen konstitutiv exprimiert wird und in Gewebe durch Stimuli wie LPS und $\text{IFN}\gamma$ induziert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass es in zellspezifische Prozesse involviert ist. Somit könnte das I-Proteasom über die Regulation der Genexpression in jedem Zelltyp oder Gewebe differierende Zellfunktionen beeinflussen. Diese könnten in Zusammenhang mit immunmodulatorischen, aber auch metabolischen oder homöostatischen Eigenschaften stehen. Neben der Bewahrung der Proteinhomöostase und der Proteolyse von Proteinen für eine adäquate Produktion von Peptiden zur Antigenpräsentation ist das Ubiquitin-Proteasom-System befähigt, kurzlebige regulatorische Proteine zu spalten und so Signaltransduktionswege der Zellen zu beeinflussen oder zu steuern. Bekannt ist die Eigenschaft des Proteasoms regulatorische Proteine wie das $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Vorläuferprotein p105 proteolytisch zu spalten und den Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, eines $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Inhibitors, zu forcieren (Palombella et al. 1994). Auch für die Vorläuferproteine von plasmamembranständigen Transkriptionsfaktoren wie Spt23 und MGA2 konnte eine posttranskriptionelle Prozessierung durch das Proteasom nachgewiesen werden (Hoppe et al. 2000). Bezüglich der Beeinflussung dieser posttranskriptionellen Prozesse wurde 1999 in einem NOD-Mausmodell, welches einen LMP2-Knock-Out-Phänotypen zeigte, eine gestörte Prozessierung von p50 bzw. p52 und eine reduzierte Degradierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in Splenozyten gezeigt (Hayashi & Faustman 1999). Dieses Erkenntnis wurde kontrovers diskutiert, da weitere Studien die LMP2-Defizienz in NOD-Mäusen nicht in diesem Maße verifizieren konnten (Runnels et al. 2000). Obschon die inadäquate I-Proteasomexpression in dem NOD-Mausmodell in Frage gestellt wurde, konnte die Forschung seit diesem Zeitpunkt auf eine Fülle von Projekten, welche sich auf die Rolle des I-Proteasoms in der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung fokussierten, zurückblicken. Durch die bereits erwähnte heterogene Expression von Immununtereinheiten in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, erwies sich die Erforschung des Zusammenhangs posttranskriptioneller Beeinflussung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ und dem I-Proteasom sowie des PA28-Aktivatorrings als äußerst mannigfaltig und oft nicht vergleichbar. So weisen einige Publikationen auf die Beeinflussung des alternativen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Weges durch das I-Proteasom hin, wobei andere den klassischen Weg als gestört bezeichnen. Hayashi und Faustmann beschrieben eine verminderte Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ durch eine reduzierte p50- und p52-Prozessierung bei adäquater Menge p100 bzw. p105 in der humanen Lymphozyten-Zelllinie T2, defizient für LMP2 und LMP7. Dieser Befund und ein gestörter $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Abbau sowie eine vermehrte Apoptose der Zellen wurden innerhalb vierstündiger $\text{TNF-}\alpha$ -Exposition verifiziert (Hayashi & Faustman 2000). In LMP2 und LMP7, durch siRNA defizienten Pankreas- und Lungenkrebszelllinien, konnten Jang *et al.* jedoch keine Beeinflussung des klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Weges nach 90-minütiger $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation feststellen (Jang et al. 2012). Opitz *et al.* zeigten zwar ein vermindertes p50-Level in Kardiomyozyten und Splenozyten nach 30-minütiger $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation, konnte jedoch mit dieser Methode nicht den alternativen oder klassischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Weg als beeinflusst erklären (Opitz et al. 2011). Einzig bei der 30-minütigen $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation von MEFs (*murine embryonic fibroblasts*), isoliert aus LMP7-Knock-Out-Mäusen, konnte in der Veröffentlichung von Schmidt *et al.* eine Beeinflussung des klassischen Weges beschrieben werden, da hier eine verminderte p65-Translokation in den Zellkern beobachtet wurde (Schmidt et al. 2010). Maldonado *et al.* beschreiben für LMP2-defiziente Retina-Epithel-Zellen eine verminderte Aktivierung des alternativen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Weges nach $\text{TNF-}\alpha$ -Stress sowie eine verspätete

Drosselung des klassischen Weges (Maldonado et al. 2013). Durch diese zuletzt genannte Studie wirft sich die Frage auf, ob das I-Proteasom nicht nur auf die pünktliche Aktivierung von NF κ B, sondern vielmehr auch auf die Terminierung dieser zellulären Stressantwort einen Einfluss hat. Somit wurde in diesem Projekt nicht der Frage, ob der Signalweg aktiv ist, sondern ob es zu einer zeitlich versetzten Aktivierung von NF κ B in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren während der *E. coli*-Sepsis kommt, nachgegangen. Für die Untersuchung dieser Frage wurden Leberhomogenate auf ihren Gehalt von I κ B α nach zwei- und zwölfstündiger Infektion untersucht. Für die Leber der erkrankten Tiere konnte im Zuge der histopathologischen Untersuchung ein gleichmäßigeres Entzündungsbild nach gewählten Zeitpunkten als in den anderen Organen ausgemacht werden. Aus diesem Grund konnten hier Leberhomogenate einzelner Tiere aus mehreren unabhängigen Infektionsversuchen verglichen werden. Diese in Abbildung 30 zusammengefassten Versuche konnten einen zeitlich versetzten Abbau von I κ B α darstellen. Ob es sich hierbei um die Beeinflussung des alternativen oder des klassische NF κ B-Weges handelte, konnte mit dieser Methode jedoch nicht deutlich gemacht werden. Ähnliche Ergebnisse stellt das 2014 publizierte Projekt von de Verteuil *et al.* dar, welches sich mit dem Einfluss von LMP7- und MECL-1-Doppel-Knock-Out-DCs auf die Regulation der Transkription nach LPS-Stimulation beschäftigte. Hier konnte nach einer Stunde LPS-Stimulation zwar kein verminderter Abbau von I κ B, somit keine verzögerte Aktivierung von NF κ B nachgewiesen werden, jedoch eine gestörte Abschaltung dieses Signalweges in Doppel-Knock-Out-DCs, da nach 6 h LPS deutlich mehr I κ B degradiert wurde als in Wildtyp-Zellen (de Verteuil et al. 2014). Ob die zeitlich versetzte NF κ B-Aktivierung einen maßgeblichen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen hat, konnte in diesem Projekt jedoch nicht ausreichend verifiziert werden. Nach zwölfstündiger Infektion wurde in den Tieren per Transkriptomanalyse die Expression NF κ B abhängiger Gene verglichen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und I-Proteasom-Knock-Out-Tieren gemessen werden konnte. Da jedoch durch ein funktionsfähiges konstitutives Proteasom die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nie in Frage gestellt wurde und in den Untersuchungen nur ein zeitabhängiger Mechanismus evaluiert werden konnte, ist die Transkriptomanalyse einzig 12 h *p. i.* nicht ausreichend. Ferner hätte die Verifikation der zeitlich versetzten I κ B α -Degradierung auf transkriptioneller Ebene durch eine Analyse der abhängigen Gene engmaschig zu mehreren Zeitpunkten erfolgen müssen. Durch die hier erfolgte Transkriptomanalyse konnte einzig ein punktueller Einblick in die genetische Regulation des Lebergewebes nach zwölfstündiger Infektion mit *E. coli* erfolgen. Einen Einfluss auf die Genregulation in der Entzündungsreaktion zeigten schon Schmidt *et al.* in ihrem Kolitis-Modell per Microarray-Analyse. Hier wurde eine verminderte Genexpression relevanter proinflammatorischer Zytokine, aber auch Adhäsionsmoleküle und Matrix-Metalloproteasen in LMP-Knock-Out-Tieren dargestellt (Schmidt et al. 2010). Auch de Verteuil *et al.* beschreiben in LMP7/MECL-1-Doppel-Knock-Out-DCs einen starken Einfluss der Immununtereinheiten auf die Genregulation nach LPS-Stimulation. Die differenziell exprimierten Gene wurden hier in Gruppen (*cluster*) zusammengefasst, um beteiligte Transkriptionsfaktoren zu ermitteln (de Verteuil et al. 2014). Die hohe Menge signifikant differenziell exprimierter Gene, wie es de Verteuil *et al.* beschreiben, konnte durch eine geringere Anzahl biologischer Replikate und das Setzen stringenterer Schwellenwerte bei der Auswertung der Transkriptomanalyse nicht reproduziert werden. Außerdem ist bei der hier durchgeführten Analyse von Lebergewebe und nicht einer reinen Immunzellpopulation, von einem differierenden Transkriptomprofil auszugehen.

Wurden die Schwellenwerte der hier durchgeführten Datenanalyse gesenkt, tauchten differenziell exprimierte Gene wie *CXCL11-Chemokine (Cxcl11)* und *Toll-like-receptor 11 (Tlr11)* auf, welche ebenfalls immunologisch relevante differenziell exprimierte Gene in der de Verteuil *et al.* Studie waren (de Verteuil *et al.* 2014). Obschon in dem hier diskutierten Projekt weniger Gene differenziell exprimiert wurden, konnten diese jedoch spezifischen GO-Kategorien zugeordnet werden und in den Zusammenhang mit der Immunreaktion der Tiere gebracht werden. Besondere Beachtung erhält dabei die Expression des *C-reactive proteins (Crp)*, welches stärker in infizierten I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen exprimiert wurde. Da das CRP als Marker für bakterielle Infektionen und besonders in der Früherkennung eines septischen Geschehens, ebenfalls in Mausmodellen gezeigt, eine Rolle spielt (van den Berg *et al.* 2013), spricht die starke Hochregulation dieses Gens für eine ausgeprägtere Immunantwort in den Knock-Out-Tieren. Auch die stärkere Expression von *chitinase-like1 (Chil1)*, welches als Aktivator der Akt-Signaltransduktion bekannt ist (C. C. Chen *et al.* 2011), sollte im Zusammenhang mit einer verstärkten Immunantwort in den Knock-Out-Tieren gesehen werden. Eine Gruppe differenziell exprimierter Gene, welche in Abbildung 32 und Tabelle 3-1 genauer dargestellt wurde, konnte den Kategorien der Angiogenese, Zellmigration und -adhäsion, Vasokonstriktion bzw. -dilatation und der Interaktion und Beeinflussung der extrazellulären Matrix zugeordnet werden. Hier zeigte sich für viele der Gene eine Mindereexpression in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren. Da sich im Zuge der Diskussion der Ergebnisse dieses Projektes ein erhöhter Gewebsschaden mit massiver mikrovaskulärer Störung als ursächlich für den früheren Tod der Knock-Out-Tiere herauskristallisiert, könnte die reduzierte Expression dieser Gene mit der vermehrten Gewebsdestruktion in Zusammenhang stehen. Desweiteren stehen einige der differenziell regulierten Gene funktionell in Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen. So wird zum Beispiel *BCL2 modifying factor (Bmf)* geringer exprimiert, was nach einer Publikation von Contreras *et al.* zu einer erhöhten IFN γ -induzierten Autophagie führt (Contreras *et al.* 2013). Das ebenfalls vermindert exprimierte Gen *glycerol-3-phosphate acyltransferase (Gpam)* hat einen bedeutenden Einfluss auf die Proliferation und Zytokin-Expression von T-Lymphozyten. Eine verminderte *Gpam*-Expression verursacht die Apoptose von T-Zellen und sorgt für niedrigere IL-2- und IFN γ -Level sowie eine erhöhte Ausschüttung von IL-10 und IL-4 (Collison *et al.* 2008). Auch die Expression von *AXL receptor tyrosine kinase (Axl)*, welches Zellen vor TNF- α -induzierter Apoptose schützt (Bellosta *et al.* 1997), stellt sich in den Knock-Out-Tieren während der Infektion als reduziert exprimiert dar. Einzig das *heat shock protein 1B (Hspa1b)*, das vor Stickstoffmonoxid-induziertem Zelltod schützt (Klein & Brune 2002), wird vermehrt in den I-Proteasom-Knock-Out-Tieren exprimiert. Weitere differenziell exprimierte Gene konnten metabolischen Prozessen zugeordnet werden und beweisen die mannigfaltige Einflussnahme des I-Proteasoms. Diese Arbeit belegt somit die Fähigkeit des I-Proteasoms, auf transkriptioneller Ebene in vielseitige Zellfunktionen einzugreifen, sie zu beeinflussen oder gezielt zu steuern. Welche genauen Mechanismen sich hinter dieser Regulation verbergen, konnte bisher nicht geklärt werden. Einzig die gestörte Aktivierung von NF κ B gibt einen Hinweis auf die Wirkungsweise der posttranskriptionalen Einflussnahme des I-Proteasoms. Komplett ungeklärt ist, ob diese regulatorischen Mechanismen von den heterogen exprimierten Immununtereinheiten und somit auch den gemischten Proteasomen unterschiedlich beeinflusst werden. Da bekannt ist, dass unterschiedliche Immununtereinheiten, inkorporiert in gemischte Proteasome und I-Proteasome, sowie zusätzlich die PA28-Untereinheiten,

sogenannte Hybridproteasome bildend, differierende Proteinspaltpräferenzen besitzen und somit ein unterschiedliches Peptidrepertoire produzieren (Raule, Cerruti, Benaroudj, et al. 2014, Vigneron & Van den Eynde 2012), wäre eine spezifische Aufgabenverteilung der Untereinheiten denkbar.

4.8 MECL-1 als protektive I-Proteasom-Untereinheit in der *E. coli*-Peritonitis

Mit dem Nachweis verschiedener Spaltpräferenzen und somit unterschiedlicher Peptidasefunktionen der einzelnen Immununtereinheiten (Vigneron & Van den Eynde 2012) sowie des PA28 $\alpha\beta$ -Rings (Raule, Cerruti, Benaroudj, et al. 2014) wurde bisher dem unterschiedlichen Peptidrepertoire bei der Antigenpräsentation sowie dem Einfluss auf die T-Zell-Populationen und der Selektion der T-Zellen im Thymus nachgegangen. Differierende Funktionen der I-Proteasom-Untereinheiten und des PA28-Rings wurden demzufolge zumeist in Bezug auf Virusinfektionen untersucht (Basler et al. 2006, Fehling et al. 1994, Van Kaer et al. 1994). Dieses Projekt arbeitet jedoch einen deutlichen Einfluss des I-Proteasoms auf Gram-negative bakterielle Infektionen heraus. Zusätzlich zeigen neueste Erkenntnisse den Einfluss der Untereinheit LMP7 auf die Gram-positive Pneumokokken-Infektion (Kirschner et al. 2016) und sprechen LMP7 eine Rolle in der antifungalen Immunantwort auf *Candida albicans* zu (Mundt et al. 2016). Nach den aufgeführten und diskutierten Ergebnissen des letzten Kapitels wird außerdem deutlich, dass die Funktionen des I-Proteasoms über das Maß der in Virusinfektionen ermittelten immunmodulatorischen Eigenschaften hinausgeht. Durch den Vergleich der Letalität während der *E. coli*- Infektion von LMP7^{-/-}, MECL-1^{-/-} und PA28 $\alpha\beta$ ^{-/-} Einzel-Knock-Out-Tieren mit der Letalität der 3-fach-Knock-Out-Maus konnte erstaunlicherweise ein additiver Effekt der Untereinheiten ausgeschlossen werden. Vielmehr kristallisierte sich allein die Untereinheit MECL-1 als der ausschlaggebende Faktor einer stärkeren Pathologie im Zuge dieser Erkrankung heraus (Abbildung 33). Gezeigt wurde dies in der hier diskutierten Arbeit jedoch nur in Letalitätsversuchen. Ob sich die MECL-1-Knock-Out-Maus im Detail wie die 3-fach-Knock-Out-Maus verhält oder ob es doch zu Interferenzen der einzelnen Untereinheiten gekommen ist, müsste in komplexeren Versuchen zusätzlich ermittelt werden. Selbst die mannigfaltigen Eigenschaften von PA28 $\alpha\beta$, welche mit dem I-Proteasom wie auch dem konstitutiven Proteasom in Zusammenhang stehen (Yang & Schmidt 2014), hatten keinen Einfluss auf die Letalität der Knock-Out-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Der herausragende Einfluss von MECL-1 in den Einzel-Knock-Out-Tieren sollte jedoch kritisch in Bezug auf den Einbau von LMP2 betrachtet werden. Trotzdem De *et al.* eine von MECL-1 unabhängige Inkorporation von LMP2 in das Proteasom beschreiben (De et al. 2003), besteht die These einer gegenseitigen Abhängigkeit von LMP2 und MECL-1 beim Einbau dieser Untereinheiten in das Proteasom (Groettrup et al. 1997). Trifft diese zuletzt genannte Erkenntnis zu, kann von einem alleinigen MECL-1-induzierten Effekt ausgegangen werden. Eine nähere Charakterisierung in Bezug auf die I-Proteasom-Generierung und die Produktion und Zusammensetzung von gemischten Proteasomen in den Einzel-Knock-Out-Tieren könnte hier Klarheit schaffen. Betrachtet man Literatur der erst 1996 identifizierten Untereinheit MECL-1 genauer, drängt sich der Verdacht einer von LMP2 und LMP7 unabhängigen Aufgabe dieser Immununtereinheit auf. Das deutlichste Indiz besteht in der

unterschiedlichen Lokalisation des kodierenden Genortes. MECL-1 wird nicht, wie LMP2 und LMP7, in dem MHC-Lokus verschlüsselt (Groettrup et al. 1996, Hisamatsu et al. 1996), sondern befindet sich auf dem humanen Chromosom 16 (Larsen et al. 1993). Weiterhin beschreibt Kuckelkorn *et al.* unterschiedliche MECL-1-Formen, welche sich zwar nicht in der Proteingröße, jedoch in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden und eine differierende Gewebsdistribution aufweisen. Es wurde gezeigt, dass diese verschiedenen Isoformen von MECL-1 in der Leber, dem Thymus, dem Dünndarm und dem Colon zu finden sind (Kuckelkorn et al. 2002). Zusätzlich ermittelten Stohwasser *et al.* neben den sekundären lymphatischen Geweben auch eine Basalexpression von MECL-1 in Niere und Muskel (Stohwasser et al. 1997). In einer aktuellen Studie von Raule *et al.* wird die Inhibition von MECL-1 außerdem mit einer reduzierten Degradierung von basischen Proteinsubstraten in Verbindung gebracht. Die Autoren vermuten hier eine essenzielle Rolle von MECL-1 in der Beseitigung basischer Proteine, wie zum Beispiel freier Histone, welche eine hohe Zytotoxizität vermitteln können (Raule, Cerruti, & Cascio 2014). Der hier beobachtete fulminante Krankheitsverlauf der *E. coli*-Sepsis in MECL-1-Knock-Out-Mäusen wirft ein neues Licht auf diese induzierbare I-Proteasom-Untereinheit und lässt Raum für weitere Untersuchungen bezüglich bakterieller Infektionen in MECL-1-Knock-Out-Modellen. Zu klären wären die Fragen, ob MECL-1 durch Bakterien und deren Produkte verstärkt induziert wird und welcher Mechanismus hinter der Immunmodulation dieser Untereinheit steht. Generell leitet sich von diesen Ergebnissen neben der gewebespezifischen Funktion des I-Proteasoms die These einer pathogenspezifischen Regulation der Immununtereinheiten ab.

4.9 Medizinische Relevanz des Projektes

Seitdem die Produktion und erfolgreiche Anwendung von Proteasominhibitoren bekannt ist, und somit ein neuer pharmakologischer Wirkmechanismus etabliert wurde, ist es von zunehmender Bedeutung, die Rolle des Proteasoms in mannigfaltigen Erkrankungen zu studieren. Das in den USA seit 2003 für die Behandlung des multiplen Myeloms (Kane et al. 2003) und seit 2007 für die Behandlung von Rezidiven des Mantelzelllymphoms (Kane et al. 2007) zugelassene Bortezomib ist ein Proteasominhibitor der ersten Generation. Diese den Borsäuren zuzuordnende Chemikalie blockiert LMP2 und LMP7 sowie dessen konstitutives Gegenstück $\beta 5$ (Adams et al. 1999, Groll et al. 2006). Höher konzentriert eingesetzt, wird ebenfalls von einer Blockade von $\beta 1$, $\beta 2$ und MECL-1 ausgegangen (Altun et al. 2005). Carfilzomib, ein Epoxyketon (Michael Groll et al. 2000), welches für Patienten in denen Bortezomib keine Wirksamkeit zeigte, zugelassen ist (Fostier et al. 2012), inhibiert LMP7 und $\beta 5$ (Demo et al. 2007). Darüber hinaus weist dieses Pharmakon eine geringere Neurotoxizität als Bortezomib auf (Arastu-Kapur et al. 2011). Ein strukturell naher Verwandter des Carfilzomibs, das Oprozomib, ist ein oral verfügbarer Inhibitor von LMP7 und $\beta 5$ und befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung für die Zulassung als Mittel gegen hämatologische Krebsformen und solide Tumore (H. J. Zhou et al. 2009). Als Krebsmedikament gegen verschiedenste Tumorarten befindet sich außerdem der Proteasominhibitor Marizomib in klinischen Zulassungsstudien (Potts et al. 2011). Diese erprobten und teilweise als Medikamente verfügbaren Mittel sind durch eine Blockade des I-Proteasoms und des konstitutivem Proteasoms gekennzeichnet. In der Reihe der Epoxyketone finden sich weitere

Vertreter, welche gezielt und selektiv auf bestimmte I-Proteasom-Untereinheiten wirken sollen und somit die Funktionen des konstitutiven Proteasoms nicht beeinträchtigen. Hierbei tritt vor allem das Epoxyketon ONX 0914 in den Vordergrund, welches selektiv LMP7 blockiert. In diversen Mausmodellen getestet, könnte es in der Zukunft eine wichtige Rolle in der Behandlung autoimmuner Erkrankungen spielen (Basler et al. 2010, Muchamuel et al. 2009, Nagayama et al. 2012). In den vielfältigen Tiermodellen drosselt es in erster Linie über eine verminderte Produktion von Schlüsselzytokinen und ein verändertes T-Zellrepertoire eine überschießende Immunreaktion. Da massive Gewebeschäden in der Sepsis ebenfalls als Kollateralschäden einer überbordenden Proinflammation betrachtet werden, ergab sich die Absicht, in diesem I-Proteasom-Knock-Out-Modell zu klären, ob der Einsatz von spezifischen I-Proteasom-Inhibitoren in der Sepsis empfehlenswert wäre. Durch detaillierte Untersuchungen der 3-fach-Knock-Out-Maus, welche ebenfalls die Fähigkeit, Hybridproteasome zu bilden, durch das Knock-Out von PA28 verloren hat, ist es möglich, dem I-Proteasom und primär der Untereinheit MECL-1 eine wichtige Rolle in dem Erhalt von Organfunktionen und der antibakteriellen Immunantwort während der Gram-negativen Sepsis zuzusprechen. Somit kann für dieses Projekt klinisch relevant geschlussfolgert werden, dass autoimmune Überreaktionen mittels Inhibition des I-Proteasoms voraussichtlich behandelt werden können, der Einsatz dieser Inhibitoren gegen die Auswirkungen einer starken Immunantwort in der Gram-negativen Sepsis jedoch nicht mit einem gesteigerten Behandlungserfolg assoziiert sein wird.

5 Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der Sepsis, definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, verursacht durch eine dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion, stellt weltweit die häufigste Komplikation auf Intensivstationen dar. Der septische Schock, ein dem komplexen Krankheitssyndrom unterliegendes Ereignis, welches sich durch besonders schwere zirkulatorische, zelluläre und metabolische Abnormalitäten auszeichnet, ist zudem mit einer Mortalität von bis zu 40 % assoziiert. Eine sensitivere Diagnostik, das steigende Alter sowie häufig auftretende Komorbiditäten der Patienten führen zu einer steigenden Inzidenz der Erkrankung. Weiterhin zieht die Sepsis auch in erfolgreich therapierten Patienten schwerwiegende gesundheitliche Probleme nach sich. Unabhängig von der öffentlichen Meinung, welche die Sepsis zuweilen unterschätzt, rückt das Krankheitsbild durch einen Mangel an adäquaten Therapieoptionen in den Fokus der Wissenschaft. Trotz intensiver Forschung besteht ein beständiges Interesse an neuen Erkenntnissen, welche die vielfältige und komplizierte Pathogenese der Sepsis erklären könnten. In dieser Studie soll durch ein murines Infektionsmodell die Pathogenese der Sepsis, induziert durch eine Peritonitis, in Bezug auf die immunologisch relevante Sonderform des Proteasoms betrachtet werden. Das Proteasom, der wichtigste proteolytische Enzymkomplex des nicht lysosomalen Proteinabbaus eukaryotischer Zellen, ist unter Einfluss von Interferon γ und Lipopolysaccharid, einem Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, befähigt, proteolytisch aktivere Immununtereinheiten einzubauen. Welche immunmodulatorischen Funktionen das neu gebildete Immunoproteasom (I-Proteasom) besitzt, wurde in dieser Studie durch *Escherichia coli*-infizierte I-Proteasomdefiziente Mäuse für die Gram-negative Sepsis beschrieben. Die zentrale Rolle des I-Proteasoms wurde durch eine verstärkte Symptomatik und Organpathologie in I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen, welche letztlich in einem forcierten Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom und einer erhöhten Letalität gipfelten, deutlich. Eine verminderte Eradikation der Erreger und die erhöhte bakterielle Last im gesamten Organismus konnte jedoch nicht mit einer eingeschränkten Funktionalität von Zellen des angeborenen Immunsystems am Infektionsort erklärt werden. Neben der uneingeschränkten Produktion systemisch wirkender pro- und antiinflammatorischer Mediatoren wurde in I-Proteasom-Knock-Out-Tieren jedoch eine verminderte lymphozytäre Abwehr detektiert, welche sich in einer ausgeprägteren Lymphopenie und einer eingeschränkten Expression von MHC-II-Molekülen auf B-Zellen der Knock-Out-Tiere manifestierte. Desweiteren ergaben Analysen der Genexpression von Lebergewebe septischer Tiere Unterschiede im Transkriptomprofil zwischen Wildtyp- und I-Proteasom-Knock-Out-Mäusen. Der Einfluss des I-Proteasoms auf die Regulation von Genkomplexen unter anderem die Angiogenese, Wundheilung und Apoptose betreffend, ermöglicht eine neue Sicht auf die Rolle des I-Proteasoms in Immunreaktionen und gibt Hinweise auf eine zell- und gewebsspezifische Funktionalität. Durch die Versuche dieser Studie wurde ein umfassendes Bild des protektiven Charakters des I-Proteasoms und im Besonderen der Immununtereinheit *Multicatalytic Endopeptidase Complex-1* (MECL-1) in der *Escherichia coli*-induzierten Sepsis dargestellt. Somit stellt die selektive Hemmung des I-Proteasoms in der Behandlungsstrategie der Gram-negativen Sepsis höchstwahrscheinlich kein klinisch relevantes pharmakologisches Ziel dar.

6 Summary

„The Pathogenesis of *Escherichia coli* induces Sepsis in an immunoproteasome deficient mouse model“

Sepsis is a life threatening organ dysfunction induced by a dysregulated immune reaction on an infectious agent and is the main reason for complications in intensive care units worldwide. Moreover, the septic shock, a sepsis underlying event caused by particularly profound circulatory, cellular and metabolic abnormalities is responsible for an in-hospital-mortality of almost 40 %. The incidence of this complex syndrome is rising due to sensitive diagnostics and the increasing rate of older and co-morbidity patients. Even successfully treated patients who survived sepsis suffer from long-time health restrictions. While sepsis is underestimated in public mind, it is a main issue in science due to the lack of adequate therapy options. Despite intense research it is of continual interest to find new results which are able to explain the diverse and complicated pathogenesis of sepsis and septic shock. This study is investigating the pathogenesis of the Gram-negative sepsis with the focus on an immune relevant subtype of the proteasome in a murine infection model. The proteasome is the major non-lysosomal protein degradation machinery in eukaryotic cells. Interferon γ and lipopolysaccharide, a cell wall component of gram-negative bacteria, cause a change in proteasome *de novo* composition and lead to an incorporation of proteolytic higher active immunosubunits. This study is investigating the immune modulatory function of this newly synthesized so called immunoproteasome (i-proteasome) during the infection of i-proteasome-knock-out-mice with *Escherichia coli*, the major representative pathogen causing Gram-negative sepsis. We observed severe symptoms and particularly profound organ damage in i-proteasome-knock-out-mice forcing a multi-organ dysfunction syndrome and an accelerated lethality, indicating the crucial role of the i-proteasome during the pathogenesis of sepsis in this model. Nevertheless, neither the deficient eradication of this bacterial agent nor the higher bacterial burden found in the whole organism of knock-out-animals could be explained due to impaired function and quantity of innate immune cells at the site of infection. Furthermore, we noticed an unrestricted systemic production of pro- and anti-inflammatory mediators in i-proteasome-knock-out-mice. However, we identified an impaired lymphocytic immune response characterized by reduced lymphocyte counts and a diminished MHC-II-expression on B-cells of i-proteasome-knock-out-animals. Additionally, analyses of gene-expression in liver tissue of septic animals indicated differences in the transcriptomic profile between wild-type and i-proteasome-knock-out-animals regarding groups of genes associated with angiogenesis, wound healing and apoptosis. These findings offer new insights in the immune modulatory role of the i-proteasome in Gram-negative sepsis and raise the hypothesis of a cell- and tissue specific function of the i-proteasome. Experiments of this study highlighted the protective character of the i-proteasome, particularly the immunosubunit *Multicatalytic Endopeptidase Complex-1* (MECL-1) during the pathogenesis of *Escherichia coli* induced sepsis. As a consequence of this work we can conclude that the selective inhibition of the i-proteasome might not be a successful and clinically relevant pharmacological target to treat Gram-negative sepsis.

7 Referenzen

- Abele, R.; Tampe, R. (2004): The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. In: *Physiology (Bethesda)* 19, S. 216-224.
- Achtman, M.; Mercer, A.; Kusecek, B.; Pohl, A.; Heuzenroeder, M.; Aaronson, W.; Sutton, A.; Silver, R. P. (1983): Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. In: *Infect Immun* 39(1), S. 315-335.
- Adams, J.; Palombella, V. J.; Sausville, E. A.; Johnson, J.; Destree, A.; Lazarus, D. D.; Maas, J.; Pien, C. S.; Prakash, S.; Elliott, P. J. (1999): Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. In: *Cancer Res* 59(11), S. 2615-2622.
- Aggarwal, S.; Gurney, A. L. (2002): IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. In: *J Leukoc Biol* 71(1), S. 1-8.
- Aki, M.; Shimbara, N.; Takashina, M.; Akiyama, K.; Kagawa, S.; Tamura, T.; Tanahashi, N.; Yoshimura, T.; Tanaka, K.; Ichihara, A. (1994): Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. In: *J Biochem* 115(2), S. 257-269.
- Alessi, A.; Bragg, A. D.; Percival, J. M.; Yoo, J.; Albrecht, D. E.; Froehner, S. C.; Adams, M. E. (2006): gamma-Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the alpha/beta syntrophins. In: *Exp Cell Res* 312(16), S. 3084-3095.
- Allman, D.; Pillai, S. (2008): Peripheral B cell subsets. In: *Curr Opin Immunol* 20(2), S. 149-157.
- Altun, M.; Galardy, P. J.; Shringarpure, R.; Hideshima, T.; Leblanc, R.; Anderson, K. C.; Ploegh, H. L.; Kessler, B. M. (2005): Effects of PS-341 on the activity and composition of proteasomes in multiple myeloma cells. In: *Cancer Res* 65(17), S. 7896-7901.
- Amann, R. I.; Binder, B. J.; Olson, R. J.; Chisholm, S. W.; Devereux, R.; Stahl, D. A. (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. In: *Appl Environ Microbiol* 56(6), S. 1919-1925.
- Amigorena, S.; Webster, P.; Drake, J.; Newcomb, J.; Cresswell, P.; Mellman, I. (1995): Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. In: *J Exp Med* 181(5), S. 1729-1741.
- Anders, S.; McCarthy, D. J.; Chen, Y.; Okoniewski, M.; Smyth, G. K.; Huber, W.; Robinson, M. D. (2013): Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. In: *Nat Protoc* 8(9), S. 1765-1786.
- Anderson, G. G.; Palermo, J. J.; Schilling, J. D.; Roth, R.; Heuser, J.; Hultgren, S. J. (2003): Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. In: *Science* 301(5629), S. 105-107.
- Angus, D. C.; Linde-Zwirble, W. T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M. R. (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. In: *Crit Care Med* 29(7), S. 1303-1310.
- Angus, D. C.; Van Der Poll, T. (2013): Severe sepsis and septic shock. In: *N Engl J Med* 369(9), S. 840-851.
- Angus, D. C.; Wax, R. S. (2001): Epidemiology of sepsis: an update. In: *Crit Care Med* 29(7 Suppl), S. S109-116.
- Ansel, K. M.; Harris, R. B.; Cyster, J. G. (2002): CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. In: *Immunity* 16(1), S. 67-76.
- Arastu-Kapur, S.; Anderl, J. L.; Kraus, M.; Parlati, F.; Shenk, K. D.; Lee, S. J.; Muchamuel, T.; Bennett, M. K.; Driessen, C.; Ball, A. J.; Kirk, C. J. (2011): Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. In: *Clin Cancer Res* 17(9), S. 2734-2743.
- Artigas, A.; Wernerman, J.; Arroyo, V.; Vincent, J. L.; Levy, M. (2015): Role of albumin in diseases associated with severe systemic inflammation: Pathophysiologic and clinical evidence in sepsis and in decompensated cirrhosis. In: *J Crit Care*.
- Astolfi, R. S.; Khouri, D. G.; Brandizzi, L. I.; Avila-Campos, M. J.; Andrade, H. F., Jr. (2007): Antagonistic effect of the inhibition of inducible nitric oxide on the mortality of mice acutely infected with *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis*. In: *Braz J Med Biol Res* 40(3), S. 317-322.
- Bai, A.; Forman, J. (1997): The effect of the proteasome inhibitor lactacystin on the presentation of transporter associated with antigen processing (TAP)-dependent and TAP-independent peptide epitopes by class I molecules. In: *J Immunol* 159(5), S. 2139-2146.

- Barle, H.; Hammarqvist, F.; Westman, B.; Klaude, M.; Rooyackers, O.; Garlick, P. J.; Wernerman, J. (2006): Synthesis rates of total liver protein and albumin are both increased in patients with an acute inflammatory response. In: *Clin Sci (Lond)* 110(1), S. 93-99.
- Basler, M.; Beck, U.; Kirk, C. J.; Groettrup, M. (2011): The antiviral immune response in mice devoid of immunoproteasome activity. In: *J Immunol* 187(11), S. 5548-5557.
- Basler, M.; Dajee, M.; Moll, C.; Groettrup, M.; Kirk, C. J. (2010): Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. In: *J Immunol* 185(1), S. 634-641.
- Basler, M.; Moebius, J.; Elenich, L.; Groettrup, M.; Monaco, J. J. (2006): An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice. In: *J Immunol* 176(11), S. 6665-6672.
- Basler, M.; Mundt, S.; Muchamuel, T.; Moll, C.; Jiang, J.; Groettrup, M.; Kirk, C. J. (2014): Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *EMBO Mol Med* 6(2), S. 226-238.
- Bauer, M.; Press, A. T.; Trauner, M. (2013): The liver in sepsis: patterns of response and injury. In: *Curr Opin Crit Care* 19(2), S. 123-127.
- Becker, H. J.; Kondo, E.; Shimabukuro-Vornhagen, A.; Theurich, S.; Von Bergwelt-Baildon, M. S. (2016): Processing and MHC class II presentation of exogenous soluble antigen involving a proteasome-dependent cytosolic pathway in CD40-activated B cells. In: *Eur J Haematol* 97(2), S. 166-174.
- Beilstein, F.; Obiang, L.; Raux, H.; Gaudin, Y. (2015): Characterization of the Interaction between the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and the Immunoproteasome Subunit LMP2. In: *J Virol* 89(21), S. 11019-11029.
- Bellosta, P.; Zhang, Q.; Goff, S. P.; Basilico, C. (1997): Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. In: *Oncogene* 15(20), S. 2387-2397.
- Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. In: *J Biol Chem* 272(33), S. 20313-20316.
- Bhatia, R. K.; Pallister, I.; Dent, C.; Jones, S. A.; Topley, N. (2005): Enhanced neutrophil migratory activity following major blunt trauma. In: *Injury* 36(8), S. 956-962.
- Bianchi, M. E. (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. In: *J Leukoc Biol* 81(1), S. 1-5.
- Bone, R. C. (1996): Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. In: *Crit Care Med* 24(7), S. 1125-1128.
- Bone, R. C.; Grodzin, C. J.; Balk, R. A. (1997): Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. In: *Chest* 112(1), S. 235-243.
- Boomer, J. S.; To, K.; Chang, K. C.; Takasu, O.; Osborne, D. F.; Walton, A. H.; Bricker, T. L.; Jarman, S. D.; Kreisel, D.; Krupnick, A. S.; Srivastava, A.; Swanson, P. E.; Green, J. M.; Hotchkiss, R. S. (2011): Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. In: *JAMA* 306(23), S. 2594-2605.
- Bosmann, M.; Russkamp, N. F.; Ward, P. A. (2012): Fingerprinting of the TLR4-induced acute inflammatory response. In: *Exp Mol Pathol* 93(3), S. 319-323.
- Brown, K. A.; Brain, S. D.; Pearson, J. D.; Edgeworth, J. D.; Lewis, S. M.; Treacher, D. F. (2006): Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. In: *Lancet* 368(9530), S. 157-169.
- Bryant, P.; Ploegh, H. (2004): Class II MHC peptide loading by the professionals. In: *Curr Opin Immunol* 16(1), S. 96-102.
- Butt, Y.; Kurdowska, A.; Allen, T. C. (2016): Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. In: *Arch Pathol Lab Med* 140(4), S. 345-350.
- Caddy, J.; Wilanowski, T.; Darido, C.; Dworkin, S.; Ting, S. B.; Zhao, Q.; Rank, G.; Auden, A.; Srivastava, S.; Papenfuss, T. A.; Murdoch, J. N.; Humbert, P. O.; Parekh, V.; Boulos, N.; Weber, T.; Zuo, J.; Cunningham, J. M.; Jane, S. M. (2010): Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. In: *Dev Cell* 19(1), S. 138-147.
- Calvano, S. E.; Xiao, W.; Richards, D. R.; Felciano, R. M.; Baker, H. V.; Cho, R. J.; Chen, R. O.; Brownstein, B. H.; Cobb, J. P.; Tschoeke, S. K.; Miller-Graziano, C.; Moldawer, L. L.; Mindrinos, M. N.; Davis, R. W.; Tompkins, R. G.; Lowry, S. F. (2005): A network-based analysis of systemic inflammation in humans. In: *Nature* 437(7061), S. 1032-1037.

- Cascio, P.; Call, M.; Petre, B. M.; Walz, T.; Goldberg, A. L. (2002): Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. In: *EMBO J* 21(11), S. 2636-2645.
- Caudill, C. M.; Jayarapu, K.; Elenich, L.; Monaco, J. J.; Colbert, R. A.; Griffin, T. A. (2006): T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. In: *J Immunol* 176(7), S. 4075-4082.
- Cerruti, F.; Martano, M.; Petterino, C.; Bollo, E.; Morello, E.; Bruno, R.; Buracco, P.; Cascio, P. (2007): Enhanced expression of interferon-gamma-induced antigen-processing machinery components in a spontaneously occurring cancer. In: *Neoplasia* 9(11), S. 960-969.
- Cerundolo, V.; Kelly, A.; Elliott, T.; Trowsdale, J.; Townsend, A. (1995): Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. In: *Eur J Immunol* 25(2), S. 554-562.
- Chan, E. D.; Riches, D. W. (2001): IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 280(3), S. C441-450.
- Chau, V.; Tobias, J. W.; Bachmair, A.; Marriott, D.; Ecker, D. J.; Gonda, D. K.; Varshavsky, A. (1989): A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. In: *Science* 243(4898), S. 1576-1583.
- Chaudhry, H.; Zhou, J.; Zhong, Y.; Ali, M. M.; Mcguire, F.; Nagarkatti, P. S.; Nagarkatti, M. (2013): Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. In: *In Vivo* 27(6), S. 669-684.
- Chen, C. C.; Llado, V.; Eurich, K.; Tran, H. T.; Mizoguchi, E. (2011): Carbohydrate-binding motif in chitinase 3-like 1 (CHI3L1/YKL-40) specifically activates Akt signaling pathway in colonic epithelial cells. In: *Clin Immunol* 140(3), S. 268-275.
- Chen, Y. S.; Qiu, X. B. (2012): Transcription-coupled replacement of histones: degradation or recycling? In: *J Genet Genomics* 39(11), S. 575-580.
- Chen, Z.; Hagler, J.; Palombella, V. J.; Melandri, F.; Scherer, D.; Ballard, D.; Maniatis, T. (1995): Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. In: *Genes Dev* 9(13), S. 1586-1597.
- Chhatrivala, M. K.; Betts, L.; Worthylake, D. K.; Sondek, J. (2007): The DH and PH domains of Trio coordinately engage Rho GTPases for their efficient activation. In: *J Mol Biol* 368(5), S. 1307-1320.
- Cho, S.; Attaya, M.; Brown, M. G.; Monaco, J. J. (1991): A cluster of transcribed sequences between the Pb and Ob genes of the murine major histocompatibility complex. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12), S. 5197-5201.
- Cinel, I.; Opal, S. M. (2009): Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. In: *Crit Care Med* 37(1), S. 291-304.
- Cobb, J. P.; Hotchkiss, R. S.; Swanson, P. E.; Chang, K.; Qiu, Y.; Laubach, V. E.; Karl, I. E.; Buchman, T. G. (1999): Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. In: *Surgery* 126(2), S. 438-442.
- Collins, G. A.; Tansey, W. P. (2006): The proteasome: a utility tool for transcription? In: *Curr Opin Genet Dev* 16(2), S. 197-202.
- Collison, L. W.; Murphy, E. J.; Jolly, C. A. (2008): Glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 regulates murine T-lymphocyte proliferation and cytokine production. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 295(6), S. C1543-1549.
- Conti, P.; Digioacchino, M. (2001): MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. In: *Allergy Asthma Proc* 22(3), S. 133-137.
- Contreras, A. U.; Mebratu, Y.; Delgado, M.; Montano, G.; Hu, C. A.; Ryter, S. W.; Choi, A. M.; Lin, Y.; Xiang, J.; Chand, H.; Tesfaiqzi, Y. (2013): Deacetylation of p53 induces autophagy by suppressing Bmf expression. In: *J Cell Biol* 201(3), S. 427-437.
- Copeland, S.; Warren, H. S.; Lowry, S. F.; Calvano, S. E.; Remick, D. (2005): Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. In: *Clin Diagn Lab Immunol* 12(1), S. 60-67.
- Cosmi, L.; De Palma, R.; Santarlasci, V.; Maggi, L.; Capone, M.; Frosali, F.; Rodolico, G.; Querci, V.; Abbate, G.; Angeli, R.; Berrino, L.; Fambrini, M.; Caproni, M.; Tonelli, F.; Lazzeri, E.; Parronchi, P.; Liotta, F.; Maggi, E.; Romagnani, S.; Annunziato, F. (2008): Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. In: *J Exp Med* 205(8), S. 1903-1916.

- Coux, O.; Tanaka, K.; Goldberg, A. L. (1996): Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. In: *Annu Rev Biochem* 65, S. 801-847.
- Craiu, A.; Gaczynska, M.; Akopian, T.; Gramm, C. F.; Fenteany, G.; Goldberg, A. L.; Rock, K. L. (1997): Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. In: *J Biol Chem* 272(20), S. 13437-13445.
- Cummings, C. J.; Martin, T. R.; Frevert, C. W.; Quan, J. M.; Wong, V. A.; Mongovin, S. M.; Hagen, T. R.; Steinberg, K. P.; Goodman, R. B. (1999): Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. In: *J Immunol* 162(4), S. 2341-2346.
- Dahlmann, B. (2016): Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. In: *Arch Biochem Biophys* 591, S. 132-140.
- Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kuehn, L.; Merforth, S.; Kloetzel, P. M. (2000): Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. In: *J Mol Biol* 303(5), S. 643-653.
- De Graaf, N.; Van Helden, M. J.; Textoris-Taube, K.; Chiba, T.; Topham, D. J.; Kloetzel, P. M.; Zaiss, D. M.; Sijts, A. J. (2011): PA28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of MHC class I-binding peptides in vivo. In: *Eur J Immunol* 41(4), S. 926-935.
- De Groot, K. A.; Tsang, A. Sjoel M.; Niewerth, D.; Cloos, J.; Blank, J. L.; Niessen, H. W.; Zweegman, S.; Voskuyl, A. E.; Jansen, G.; Van Der Heijden, J. W. (2015): Pharmacodynamic monitoring of (immuno)proteasome inhibition during bortezomib treatment of a critically ill patient with lupus nephritis and myocarditis. In: *Lupus Sci Med* 2(1), S. e000121.
- De, M.; Jayarapu, K.; Elenich, L.; Monaco, J. J.; Colbert, R. A.; Griffin, T. A. (2003): Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly. In: *J Biol Chem* 278(8), S. 6153-6159.
- De Verteuil, D. A.; Rouette, A.; Hardy, M. P.; Lavalley, S.; Trofimov, A.; Gaucher, E.; Perreault, C. (2014): Immunoproteasomes shape the transcriptome and regulate the function of dendritic cells. In: *J Immunol* 193(3), S. 1121-1132.
- Demartino, G. N.; Slaughter, C. A. (1999): The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. In: *J Biol Chem* 274(32), S. 22123-22126.
- Demo, S. D.; Kirk, C. J.; Aujay, M. A.; Buchholz, T. J.; Dajee, M.; Ho, M. N.; Jiang, J.; Laidig, G. J.; Lewis, E. R.; Parlati, F.; Shenk, K. D.; Smyth, M. S.; Sun, C. M.; Vallone, M. K.; Woo, T. M.; Molineaux, C. J.; Bennett, M. K. (2007): Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. In: *Cancer Res* 67(13), S. 6383-6391.
- Depoil, D.; Weber, M.; Treanor, B.; Fleire, S. J.; Carrasco, Y. R.; Harwood, N. E.; Batista, F. D. (2009): Early events of B cell activation by antigen. In: *Sci Signal* 2(63), S. pt1.
- Desjardins, M. (2003): ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. In: *Nat Rev Immunol* 3(4), S. 280-291.
- Deutschman, C. S.; Tracey, K. J. (2014): Sepsis: current dogma and new perspectives. In: *Immunity* 40(4), S. 463-475.
- Dong, H.; Zhu, G.; Tamada, K.; Chen, L. (1999): B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. In: *Nat Med* 5(12), S. 1365-1369.
- Driscoll, J.; Brown, M. G.; Finley, D.; Monaco, J. J. (1993): MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. In: *Nature* 365(6443), S. 262-264.
- Dubiel, W.; Pratt, G.; Ferrell, K.; Rechsteiner, M. (1992): Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. In: *J Biol Chem* 267(31), S. 22369-22377.
- Dyson, A.; Singer, M. (2009): Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? In: *Crit Care Med* 37(1 Suppl), S. S30-37.
- Eberl, G.; Marmon, S.; Sunshine, M. J.; Rennert, P. D.; Choi, Y.; Littman, D. R. (2004): An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. In: *Nat Immunol* 5(1), S. 64-73.
- Ebstein, F.; Kloetzel, P. M.; Kruger, E.; Seifert, U. (2012): Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. In: *Cell Mol Life Sci* 69(15), S. 2543-2558.
- Egerer, T.; Martinez-Gamboa, L.; Dankof, A.; Stuhlmüller, B.; Dorner, T.; Krenn, V.; Egerer, K.; Rudolph, P. E.; Burmester, G. R.; Feist, E. (2006): Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjogren's syndrome. In: *Arthritis Rheum* 54(5), S. 1501-1508.

- Engel, C.; Brunkhorst, F. M.; Bone, H. G.; Brunkhorst, R.; Gerlach, H.; Grond, S.; Gruendling, M.; Huhle, G.; Jaschinski, U.; John, S.; Mayer, K.; Oppert, M.; Olthoff, D.; Quintel, M.; Ragaller, M.; Rossaint, R.; Stuber, F.; Weiler, N.; Welte, T.; Bogatsch, H.; Hartog, C.; Loeffler, M.; Reinhart, K. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. In: *Intensive Care Med* 33(4), S. 606-618.
- Ermert, M.; Pantazis, C.; Duncker, H. R.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Ermert, L. (2003): In situ localization of TNFalpha/beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. In: *Cytokine* 22(3-4), S. 89-100.
- Eskandari, M. K.; Bolgos, G.; Miller, C.; Nguyen, D. T.; Deforge, L. E.; Remick, D. G. (1992): Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. In: *J Immunol* 148(9), S. 2724-2730.
- Ewers, C.; Li, G.; Wilking, H.; Kiessling, S.; Alt, K.; Antao, E. M.; Laternus, C.; Diehl, I.; Glodde, S.; Homeier, T.; Bohnke, U.; Steinrueck, H.; Philipp, H. C.; Wieler, L. H. (2007): Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? In: *Int J Med Microbiol* 297(3), S. 163-176.
- Eyerich, S.; Eyerich, K.; Pennino, D.; Carbone, T.; Nasorri, F.; Pallotta, S.; Cianfarani, F.; Odorisio, T.; Traidl-Hoffmann, C.; Behrendt, H.; Durham, S. R.; Schmidt-Weber, C. B.; Cavani, A. (2009): Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. In: *J Clin Invest* 119(12), S. 3573-3585.
- Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Konowal, A.; Freed, P. W.; Westcott, J. Y.; Henson, P. M. (1998): Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. In: *J Clin Invest* 101(4), S. 890-898.
- Fang, F. C. (2004): Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. In: *Nat Rev Microbiol* 2(10), S. 820-832.
- Fehling, H. J.; Swat, W.; Laplace, C.; Kuhn, R.; Rajewsky, K.; Muller, U.; Von Boehmer, H. (1994): MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. In: *Science* 265(5176), S. 1234-1237.
- Feikova, S.; Wolff, L.; Bies, J. (2000): Constitutive ubiquitination and degradation of c-myc by the 26S proteasome during proliferation and differentiation of myeloid cells. In: *Neoplasma* 47(4), S. 212-218.
- Ferguson, J. W.; Mikesch, M. F.; Wheeler, E. F.; Lebaron, R. G. (2003): Developmental expression patterns of Beta-ig (betaIG-H3) and its function as a cell adhesion protein. In: *Mech Dev* 120(8), S. 851-864.
- Ferrington, D. A.; Gregerson, D. S. (2012): Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. In: *Prog Mol Biol Transl Sci* 109, S. 75-112.
- Fleischmann, C.; Scherag, A.; Adhikari, N. K.; Hartog, C. S.; Tsaganos, T.; Schlattmann, P.; Angus, D. C.; Reinhart, K. (2016): Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. In: *Am J Respir Crit Care Med* 193(3), S. 259-272.
- Fostier, K.; De Becker, A.; Schots, R. (2012): Carfilzomib: a novel treatment in relapsed and refractory multiple myeloma. In: *Onco Targets Ther* 5, S. 237-244.
- Frasa, H.; Procee, J.; Torensma, R.; Verbruggen, A.; Algra, A.; Rozenberg-Arska, M.; Kraaijeveld, K.; Verhoef, J. (1993): *Escherichia coli* in bacteremia: O-acetylated K1 strains appear to be more virulent than non-O-acetylated K1 strains. In: *J Clin Microbiol* 31(12), S. 3174-3178.
- Freeman, B. D.; Natanson, C. (2000): Anti-inflammatory therapies in sepsis and septic shock. In: *Expert Opin Investig Drugs* 9(7), S. 1651-1663.
- Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L. J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M. C.; Horton, H. F.; Fouser, L.; Carter, L.; Ling, V.; Bowman, M. R.; Carreno, B. M.; Collins, M.; Wood, C. R.; Honjo, T. (2000): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. In: *J Exp Med* 192(7), S. 1027-1034.
- Freitas, A.; Alves-Filho, J. C.; Victoni, T.; Secher, T.; Lemos, H. P.; Sonogo, F.; Cunha, F. Q.; Ryffel, B. (2009): IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. In: *J Immunol* 182(12), S. 7846-7854.
- Freudenburg, W.; Gautam, M.; Chakraborty, P.; James, J.; Richards, J.; Salvatori, A. S.; Baldwin, A.; Schriewer, J.; Buller, R. M.; Corbett, J. A.; Skowrya, D. (2013): Reduction in ATP levels

- triggers immunoproteasome activation by the 11S (PA28) regulator during early antiviral response mediated by IFN β in mouse pancreatic beta-cells. In: *PLoS One* 8(2), S. e52408.
- Frisan, T.; Levitsky, V.; Masucci, M. G. (2000): Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-lymphoma lines and normal B cells. In: *Int J Cancer* 88(6), S. 881-888.
- Fritz, J. H.; Ferrero, R. L.; Philpott, D. J.; Girardin, S. E. (2006): Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. In: *Nat Immunol* 7(12), S. 1250-1257.
- Gaczynska, M.; Rock, K. L.; Spies, T.; Goldberg, A. L. (1994): Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20), S. 9213-9217.
- Gagnon, E.; Duclos, S.; Rondeau, C.; Chevet, E.; Cameron, P. H.; Steele-Mortimer, O.; Paiement, J.; Bergeron, J. J.; Desjardins, M. (2002): Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. In: *Cell* 110(1), S. 119-131.
- Gaieski, D. F.; Edwards, J. M.; Kallan, M. J.; Carr, B. G. (2013): Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. In: *Crit Care Med* 41(5), S. 1167-1174.
- Gallastegui, N.; Groll, M. (2010): The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. In: *Trends Biochem Sci* 35(11), S. 634-642.
- Geissmann, F.; Jung, S.; Littman, D. R. (2003): Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. In: *Immunity* 19(1), S. 71-82.
- Ghosh, E. E.; Cassado, A. A.; Govoni, G. R.; Fukuhara, T.; Yang, Y.; Monack, D. M.; Bortoluci, K. R.; Almeida, S. R.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A. (2010): Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(6), S. 2568-2573.
- Gilmore, T. D. (2006): Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. In: *Oncogene* 25(51), S. 6680-6684.
- Glynne, R.; Powis, S. H.; Beck, S.; Kelly, A.; Kerr, L. A.; Trowsdale, J. (1991): A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. In: *Nature* 353(6342), S. 357-360.
- Gogos, C. A.; Drosou, E.; Bassaris, H. P.; Skoutelis, A. (2000): Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. In: *J Infect Dis* 181(1), S. 176-180.
- Goldberg, A. L. (2003): Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. In: *Nature* 426(6968), S. 895-899.
- Goldberg, A. L.; Cascio, P.; Saric, T.; Rock, K. L. (2002): The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. In: *Mol Immunol* 39(3-4), S. 147-164.
- Gordon, S. (2002): Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. In: *Cell* 111(7), S. 927-930.
- Griffin, T. A.; Nandi, D.; Cruz, M.; Fehling, H. J.; Kaer, L. V.; Monaco, J. J.; Colbert, R. A. (1998): Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. In: *J Exp Med* 187(1), S. 97-104.
- Groettrup, M.; Kraft, R.; Kostka, S.; Standera, S.; Stohwasser, R.; Kloetzel, P. M. (1996): A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. In: *Eur J Immunol* 26(4), S. 863-869.
- Groettrup, M.; Standera, S.; Stohwasser, R.; Kloetzel, P. M. (1997): The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17), S. 8970-8975.
- Groll, M.; Bajorek, M.; Kohler, A.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H.; Finley, D. (2000): A gated channel into the proteasome core particle. In: *Nat Struct Biol* 7(11), S. 1062-1067.
- Groll, M.; Berkers, C. R.; Ploegh, H. L.; Ovaa, H. (2006): Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. In: *Structure* 14(3), S. 451-456.
- Groll, Michael; Kim, Kyung Bo; Kairies, Norman; Huber, Robert; Crews, Craig M. (2000): Crystal Structure of Epoxomicin:20S Proteasome Reveals a Molecular Basis for Selectivity of α' , β' -Epoxyketone Proteasome Inhibitors. In: *Journal of the American Chemical Society* 122(6), S. 1237-1238.

- Gromme, M.; Uytdehaag, F. G.; Janssen, H.; Calafat, J.; Van Binnendijk, R. S.; Kenter, M. J.; Tulp, A.; Verwoerd, D.; Neefjes, J. (1999): Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18), S. 10326-10331.
- Groothuis, T. A.; Neefjes, J. (2005): The many roads to cross-presentation. In: *J Exp Med* 202(10), S. 1313-1318.
- Gross-Mesilaty, S.; Hargrove, J. L.; Ciechanover, A. (1997): Degradation of tyrosine aminotransferase (TAT) via the ubiquitin-proteasome pathway. In: *FEBS Lett* 405(2), S. 175-180.
- Guermontprez, P.; Saveanu, L.; Kleijmeer, M.; Davoust, J.; Van Endert, P.; Amigorena, S. (2003): ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. In: *Nature* 425(6956), S. 397-402.
- Guillaume, B.; Chapiro, J.; Stroobant, V.; Colau, D.; Van Holle, B.; Parvizi, G.; Bousquet-Dubouch, M. P.; Theate, I.; Parmentier, N.; Van Den Eynde, B. J. (2010): Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(43), S. 18599-18604.
- Guyer, D. M.; Radulovic, S.; Jones, F. E.; Mobley, H. L. (2002): Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. In: *Infect Immun* 70(8), S. 4539-4546.
- Haak, B. W.; Rottier, N. M.; Vos, J. M.; Moeniralam, H. S. (2016): Massive haemolysis and erythrophagocytosis in Gram-negative sepsis. In: *Br J Haematol* 172(1), S. 10.
- Haorah, J.; Heilman, D.; Diekmann, C.; Osna, N.; Donohue, T. M., Jr.; Ghorpade, A.; Persidsky, Y. (2004): Alcohol and HIV decrease proteasome and immunoproteasome function in macrophages: implications for impaired immune function during disease. In: *Cell Immunol* 229(2), S. 139-148.
- Harrington, L. E.; Hatton, R. D.; Mangan, P. R.; Turner, H.; Murphy, T. L.; Murphy, K. M.; Weaver, C. T. (2005): Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. In: *Nat Immunol* 6(11), S. 1123-1132.
- Hayashi, T.; Faustman, D. (1999): NOD mice are defective in proteasome production and activation of NF-kappaB. In: *Mol Cell Biol* 19(12), S. 8646-8659.
- Hayashi, T.; Faustman, D. (2000): Essential role of human leukocyte antigen-encoded proteasome subunits in NF-kappaB activation and prevention of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. In: *J Biol Chem* 275(7), S. 5238-5247.
- Hayden, M. S.; Ghosh, S. (2008): Shared principles in NF-kappaB signaling. In: *Cell* 132(3), S. 344-362.
- Haziot, A.; Ferrero, E.; Kontgen, F.; Hijiya, N.; Yamamoto, S.; Silver, J.; Stewart, C. L.; Goyert, S. M. (1996): Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. In: *Immunity* 4(4), S. 407-414.
- He, C. H.; Lee, C. G.; Dela Cruz, C. S.; Lee, C. M.; Zhou, Y.; Ahangari, F.; Ma, B.; Herzog, E. L.; Rosenberg, S. A.; Li, Y.; Nour, A. M.; Parikh, C. R.; Schmidt, I.; Modis, Y.; Cantley, L.; Elias, J. A. (2013): Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor alpha2. In: *Cell Rep* 4(4), S. 830-841.
- He, J.; Cui, L.; Zeng, Y.; Wang, G.; Zhou, P.; Yang, Y.; Ji, L.; Zhao, Y.; Chen, J.; Wang, Z.; Shi, T.; Zhang, P.; Chen, R.; Li, X. (2012): REGgamma is associated with multiple oncogenic pathways in human cancers. In: *BMC Cancer* 12, S. 75.
- Hein, T. W.; Qamirani, E.; Ren, Y.; Xu, X.; Thengchaisri, N.; Kuo, L. (2014): Selective activation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 mediates C-reactive protein-evoked endothelial vasodilator dysfunction in coronary arterioles. In: *Circ Res* 114(1), S. 92-100.
- Heinemeyer, W.; Kleinschmidt, J. A.; Saidowsky, J.; Escher, C.; Wolf, D. H. (1991): Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. In: *EMBO J* 10(3), S. 555-562.
- Heink, S.; Ludwig, D.; Kloetzel, P. M.; Kruger, E. (2005): IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26), S. 9241-9246.
- Hendriks, T.; Bleichrodt, R. P.; Lomme, R. M.; De Man, B. M.; Van Goor, H.; Buysne, O. R. (2010): Peritoneal cytokines predict mortality after surgical treatment of secondary peritonitis in the rat. In: *J Am Coll Surg* 211(2), S. 263-270.

- Hensley, S. E.; Zanker, D.; Dolan, B. P.; David, A.; Hickman, H. D.; Embry, A. C.; Skon, C. N.; Grebe, K. M.; Griffin, T. A.; Chen, W.; Bennink, J. R.; Yewdell, J. W. (2010): Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. In: *J Immunol* 184(8), S. 4115-4122.
- Hershko, A.; Ganoth, D.; Pehrson, J.; Palazzo, R. E.; Cohen, L. H. (1991): Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts. In: *J Biol Chem* 266(25), S. 16376-16379.
- Hisamatsu, H.; Shimbara, N.; Saito, Y.; Kristensen, P.; Hendil, K. B.; Fujiwara, T.; Takahashi, E.; Tanahashi, N.; Tamura, T.; Ichihara, A.; Tanaka, K. (1996): Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. In: *J Exp Med* 183(4), S. 1807-1816.
- Hoffmann, A.; Levchenko, A.; Scott, M. L.; Baltimore, D. (2002): The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. In: *Science* 298(5596), S. 1241-1245.
- Hoffmann, A.; Natoli, G.; Ghosh, G. (2006): Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. In: *Oncogene* 25(51), S. 6706-6716.
- Hoppe, T.; Matuschewski, K.; Rape, M.; Schlenker, S.; Ulrich, H. D.; Jentsch, S. (2000): Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. In: *Cell* 102(5), S. 577-586.
- Hotchkiss, R. S.; Osmon, S. B.; Chang, K. C.; Wagner, T. H.; Coopersmith, C. M.; Karl, I. E. (2005): Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. In: *J Immunol* 174(8), S. 5110-5118.
- Hotchkiss, R. S.; Swanson, P. E.; Cobb, J. P.; Jacobson, A.; Buchman, T. G.; Karl, I. E. (1997): Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. In: *Crit Care Med* 25(8), S. 1298-1307.
- Hotchkiss, R. S.; Swanson, P. E.; Freeman, B. D.; Tinsley, K. W.; Cobb, J. P.; Matuschak, G. M.; Buchman, T. G.; Karl, I. E. (1999): Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. In: *Crit Care Med* 27(7), S. 1230-1251.
- Hotchkiss, R. S.; Tinsley, K. W.; Swanson, P. E.; Grayson, M. H.; Osborne, D. F.; Wagner, T. H.; Cobb, J. P.; Coopersmith, C.; Karl, I. E. (2002): Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. In: *J Immunol* 168(5), S. 2493-2500.
- Hotchkiss, R. S.; Tinsley, K. W.; Swanson, P. E.; Schmiege, R. E., Jr.; Hui, J. J.; Chang, K. C.; Osborne, D. F.; Freeman, B. D.; Cobb, J. P.; Buchman, T. G.; Karl, I. E. (2001): Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. In: *J Immunol* 166(11), S. 6952-6963.
- Houde, M.; Bertholet, S.; Gagnon, E.; Brunet, S.; Goyette, G.; Laplante, A.; Princiotta, M. F.; Thibault, P.; Sacks, D.; Desjardins, M. (2003): Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. In: *Nature* 425(6956), S. 402-406.
- Hsieh, C. S.; Macatonia, S. E.; Tripp, C. S.; Wolf, S. F.; O'garra, A.; Murphy, K. M. (1993): Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. In: *Science* 260(5107), S. 547-549.
- Hu, Y.; Shen, F.; Crellin, N. K.; Ouyang, W. (2011): The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. In: *Ann N Y Acad Sci* 1217, S. 60-76.
- Ichikawa, H. T.; Conley, T.; Muchamuel, T.; Jiang, J.; Lee, S.; Owen, T.; Barnard, J.; Nevarez, S.; Goldman, B. I.; Kirk, C. J.; Looney, R. J.; Anolik, J. H. (2012): Beneficial effect of novel proteasome inhibitors in murine lupus via dual inhibition of type I interferon and autoantibody-secreting cells. In: *Arthritis Rheum* 64(2), S. 493-503.
- Inoue, Y.; Imamura, T. (2008): Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. In: *Cancer Sci* 99(11), S. 2107-2112.
- Iwashyna, T. J.; Ely, E. W.; Smith, D. M.; Langa, K. M. (2010): Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. In: *JAMA* 304(16), S. 1787-1794.
- Jang, E. R.; Lee, N. R.; Han, S.; Wu, Y.; Sharma, L. K.; Carmony, K. C.; Marks, J.; Lee, D. M.; Ban, J. O.; Wehenkel, M.; Hong, J. T.; Kim, K. B.; Lee, W. (2012): Revisiting the role of the immunoproteasome in the activation of the canonical NF-kappaB pathway. In: *Mol Biosyst* 8(9), S. 2295-2302.
- Jiang, H.; Monaco, J. J. (1997): Sequence and expression of mouse proteasome activator PA28 and the related autoantigen Ki. In: *Immunogenetics* 46(2), S. 93-98.

- Jin, L.; Batra, S.; Doua, D. N.; Palaniyar, N.; Jeyaseelan, S. (2014): CXCL1 contributes to host defense in polymicrobial sepsis via modulating T cell and neutrophil functions. In: *J Immunol* 193(7), S. 3549-3558.
- Johnson, J. R.; Delavari, P.; O'bryan, T. T. (2001): Escherichia coli O18:K1:H7 isolates from patients with acute cystitis and neonatal meningitis exhibit common phylogenetic origins and virulence factor profiles. In: *J Infect Dis* 183(3), S. 425-434.
- Kalim, K. W.; Basler, M.; Kirk, C. J.; Groettrup, M. (2012): Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation. In: *J Immunol* 189(8), S. 4182-4193.
- Kane, R. C.; Bross, P. F.; Farrell, A. T.; Pazdur, R. (2003): Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. In: *Oncologist* 8(6), S. 508-513.
- Kane, R. C.; Dagher, R.; Farrell, A.; Ko, C. W.; Sridhara, R.; Justice, R.; Pazdur, R. (2007): Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. In: *Clin Cancer Res* 13(18 Pt 1), S. 5291-5294.
- Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. (2004): Pathogenic Escherichia coli. In: *Nat Rev Microbiol* 2(2), S. 123-140.
- Kaufmann, S. H.; Schaible, U. E. (2005): Antigen presentation and recognition in bacterial infections. In: *Curr Opin Immunol* 17(1), S. 79-87.
- Khan, N. A.; Kim, Y.; Shin, S.; Kim, K. S. (2007): FimH-mediated Escherichia coli K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. In: *Cell Microbiol* 9(1), S. 169-178.
- Kim, K. J.; Elliott, S. J.; Di Cello, F.; Stins, M. F.; Kim, K. S. (2003): The K1 capsule modulates trafficking of E. coli-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. In: *Cell Microbiol* 5(4), S. 245-252.
- Kimura, H. J.; Chen, C. Y.; Tzou, S. C.; Rocchi, R.; Landek-Salgado, M. A.; Suzuki, K.; Kimura, M.; Rose, N. R.; Caturegli, P. (2009): Immunoproteasome overexpression underlies the pathogenesis of thyroid oncocytes and primary hypothyroidism: studies in humans and mice. In: *PLoS One* 4(11), S. e7857.
- Kincaid, E. Z.; Che, J. W.; York, I.; Escobar, H.; Reyes-Vargas, E.; Delgado, J. C.; Welsh, R. M.; Karow, M. L.; Murphy, A. J.; Valenzuela, D. M.; Yancopoulos, G. D.; Rock, K. L. (2012): Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. In: *Nat Immunol* 13(2), S. 129-135.
- Kirschner, F.; Reppe, K.; Andresen, N.; Witzernath, M.; Ebstein, F.; Kloetzel, P. M. (2016): Proteasome beta5i Subunit Deficiency Affects Opsonin Synthesis and Aggravates Pneumococcal Pneumonia. In: *PLoS One* 11(4), S. e0153847.
- Klare, N.; Seeger, M.; Janek, K.; Jungblut, P. R.; Dahlmann, B. (2007): Intermediate-type 20 S proteasomes in HeLa cells: "asymmetric" subunit composition, diversity and adaptation. In: *J Mol Biol* 373(1), S. 1-10.
- Klein, S. D.; Brune, B. (2002): Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release. In: *Biochem J* 362(Pt 3), S. 635-641.
- Kniepert, A.; Groettrup, M. (2014): The unique functions of tissue-specific proteasomes. In: *Trends Biochem Sci* 39(1), S. 17-24.
- Kobashi, H.; Toshimori, J.; Yamamoto, K. (2013): Sepsis-associated liver injury: Incidence, classification and the clinical significance. In: *Hepatol Res* 43(3), S. 255-266.
- Kochanek, K. D.; Xu, J.; Murphy, S. L.; Minino, A. M.; Kung, H. C. (2011): Deaths: preliminary data for 2009. In: *Natl Vital Stat Rep* 59(4), S. 1-51.
- Komander, D. (2009): The emerging complexity of protein ubiquitination. In: *Biochem Soc Trans* 37(Pt 5), S. 937-953.
- Kondo, T.; Takata, H.; Matsuki, F.; Takiguchi, M. (2009): Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. In: *J Immunol* 182(4), S. 1794-1798.
- Korshunov, V. A.; Mohan, A. M.; Georger, M. A.; Berk, B. C. (2006): Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. In: *Circ Res* 98(11), S. 1446-1452.
- Koskinas, J.; Gomatos, I. P.; Tiniakos, D. G.; Memos, N.; Boutsikou, M.; Garatzioti, A.; Archimandritis, A.; Betrosian, A. (2008): Liver histology in ICU patients dying from sepsis: a clinicopathological study. In: *World J Gastroenterol* 14(9), S. 1389-1393.
- Kovach, M. A.; Standiford, T. J. (2012): The function of neutrophils in sepsis. In: *Curr Opin Infect Dis* 25(3), S. 321-327.

- Kravtsova-Ivantsiv, Y.; Sommer, T.; Ciechanover, A. (2013): The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 52(1), S. 192-198.
- Kremer, M.; Henn, A.; Kolb, C.; Basler, M.; Moebius, J.; Guillaume, B.; Leist, M.; Van Den Eynde, B. J.; Groettrup, M. (2010): Reduced immunoproteasome formation and accumulation of immunoproteasomal precursors in the brains of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice. In: *J Immunol* 185(9), S. 5549-5560.
- Kubista, M.; Andrade, J. M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonak, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjoback, R.; Sjogreen, B.; Strombom, L.; Stahlberg, A.; Zoric, N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. In: *Mol Aspects Med* 27(2-3), S. 95-125.
- Kuckelkorn, U.; Ruppert, T.; Strehl, B.; Jungblut, P. R.; Zimny-Arndt, U.; Lamer, S.; Prinz, I.; Drung, I.; Kloetzel, P. M.; Kaufmann, S. H.; Steinhoff, U. (2002): Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. In: *J Exp Med* 195(8), S. 983-990.
- Kuipers, M. T.; Van Der Poll, T.; Schultz, M. J.; Wieland, C. W. (2011): Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury. In: *Crit Care* 15(6), S. 235.
- Kumpf, O.; Schumann, R. R. (2010): Genetic variation in innate immunity pathways and their potential contribution to the SIRS/CARS debate: evidence from human studies and animal models. In: *J Innate Immun* 2(5), S. 381-394.
- Lane, J. S.; Todd, K. E.; Lewis, M. P.; Gloor, B.; Ashley, S. W.; Reber, H. A.; Mcfadden, D. W.; Chandler, C. F. (1997): Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. In: *Surgery* 122(2), S. 288-294.
- Langenberg, C.; Bagshaw, S. M.; May, C. N.; Bellomo, R. (2008): The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. In: *Crit Care* 12(2), S. R38.
- Lanier, L. L.; O'fallon, S.; Somoza, C.; Phillips, J. H.; Linsley, P. S.; Okumura, K.; Ito, D.; Azuma, M. (1995): CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. In: *J Immunol* 154(1), S. 97-105.
- Larsen, F.; Solheim, J.; Kristensen, T.; Kolsto, A. B.; Prydz, H. (1993): A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1. In: *Hum Mol Genet* 2(10), S. 1589-1595.
- Laupland, K. B.; Gregson, D. B.; Zygun, D. A.; Doig, C. J.; Mortis, G.; Church, D. L. (2004): Severe bloodstream infections: a population-based assessment. In: *Crit Care Med* 32(4), S. 992-997.
- Laurin, L. P.; Brissette, M. J.; Lepage, S.; Cailhier, J. F. (2012): Regulation of experimental peritonitis: a complex orchestration. In: *Nephron Exp Nephrol* 120(1), S. e41-46.
- Lee, E. G.; Boone, D. L.; Chai, S.; Libby, S. L.; Chien, M.; Lodolce, J. P.; Ma, A. (2000): Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. In: *Science* 289(5488), S. 2350-2354.
- Lee, S. J.; Jang, B. C.; Lee, S. W.; Yang, Y. I.; Suh, S. I.; Park, Y. M.; Oh, S.; Shin, J. G.; Yao, S.; Chen, L.; Choi, I. H. (2006): Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). In: *FEBS Lett* 580(3), S. 755-762.
- Lee, S. K.; Seo, S. H.; Kim, B. S.; Kim, C. D.; Lee, J. H.; Kang, J. S.; Maeng, P. J.; Lim, J. S. (2005): IFN-gamma regulates the expression of B7-H1 in dermal fibroblast cells. In: *J Dermatol Sci* 40(2), S. 95-103.
- Levi, M. (2008): The coagulant response in sepsis. In: *Clin Chest Med* 29(4), S. 627-642, viii.
- Levi, M.; Schultz, M.; Van Der Poll, T. (2010): Disseminated intravascular coagulation in infectious disease. In: *Semin Thromb Hemost* 36(4), S. 367-377.
- Levi, M.; Van Der Poll, T.; Schultz, M. (2012): New insights into pathways that determine the link between infection and thrombosis. In: *Neth J Med* 70(3), S. 114-120.
- Li, F.; Munchhof, A. M.; White, H. A.; Mead, L. E.; Krier, T. R.; Fenoglio, A.; Chen, S.; Wu, X.; Cai, S.; Yang, F. C.; Ingram, D. A. (2006): Neurofibromin is a novel regulator of RAS-induced signals in primary vascular smooth muscle cells. In: *Hum Mol Genet* 15(11), S. 1921-1930.
- Li, L.; Zhao, D.; Wei, H.; Yao, L.; Dang, Y.; Amjad, A.; Xu, J.; Liu, J.; Guo, L.; Li, D.; Li, Z.; Zuo, D.; Zhang, Y.; Liu, J.; Huang, S.; Jia, C.; Wang, L.; Wang, Y.; Xie, Y.; Luo, J.; Zhang, B.; Luo, H.; Donehower, L. A.; Moses, R. E.; Xiao, J.; O'malley, B. W.; Li, X. (2013): REGgamma deficiency promotes premature aging via the casein kinase 1 pathway. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 110(27), S. 11005-11010.

- Liao, Y.; Smyth, G. K.; Shi, W. (2014): featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. In: *Bioinformatics* 30(7), S. 923-930.
- Liu, X.; Wu, H.; Byrne, M.; Krane, S.; Jaenisch, R. (1997): Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5), S. 1852-1856.
- Love, M. I.; Huber, W.; Anders, S. (2014): Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. In: *Genome Biol* 15(12), S. 550.
- Lowe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R. (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. In: *Science* 268(5210), S. 533-539.
- Lu, Y.; Lee, B. H.; King, R. W.; Finley, D.; Kirschner, M. W. (2015): Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis. In: *Science* 348(6231), S. 1250834.
- Luo, R.; Jeong, S. J.; Jin, Z.; Strokes, N.; Li, S.; Piao, X. (2011): G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(31), S. 12925-12930.
- Ma, A. C.; Kubes, P. (2008): Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. In: *J Thromb Haemost* 6(3), S. 415-420.
- Ma, C. P.; Slaughter, C. A.; Demartino, G. N. (1992): Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). In: *J Biol Chem* 267(15), S. 10515-10523.
- Macatonia, S. E.; Hsieh, C. S.; Murphy, K. M.; O'garra, A. (1993): Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. In: *Int Immunol* 5(9), S. 1119-1128.
- Maldonado, M.; Kapphahn, R. J.; Terluk, M. R.; Heuss, N. D.; Yuan, C.; Gregerson, D. S.; Ferrington, D. A. (2013): Immunoproteasome deficiency modifies the alternative pathway of NFkappaB signaling. In: *PLoS One* 8(2), S. e56187.
- Manabe, R.; Tsutsui, K.; Yamada, T.; Kimura, M.; Nakano, I.; Shimono, C.; Sanzen, N.; Furutani, Y.; Fukuda, T.; Oguri, Y.; Shimamoto, K.; Kiyozumi, D.; Sato, Y.; Sado, Y.; Senoo, H.; Yamashina, S.; Fukuda, S.; Kawai, J.; Sugiura, N.; Kimata, K.; Hayashizaki, Y.; Sekiguchi, K. (2008): Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35), S. 12849-12854.
- Markson, G.; Kiel, C.; Hyde, R.; Brown, S.; Charalabous, P.; Bremm, A.; Semple, J.; Woodsmith, J.; Duley, S.; Salehi-Ashtiani, K.; Vidal, M.; Komander, D.; Serrano, L.; Lehner, P.; Sanderson, C. M. (2009): Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. In: *Genome Res* 19(10), S. 1905-1911.
- Markwart, R.; Condotta, S. A.; Requardt, R. P.; Borcken, F.; Schubert, K.; Weigel, C.; Bauer, M.; Griffith, T. S.; Forster, M.; Brunkhorst, F. M.; Badovinac, V. P.; Rubio, I. (2014): Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naive T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. In: *PLoS One* 9(12), S. e115094.
- Martin, G. S.; Mannino, D. M.; Eaton, S.; Moss, M. (2003): The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. In: *N Engl J Med* 348(16), S. 1546-1554.
- Martineau, L.; Shek, P. N. (2000): Peritoneal cytokine concentrations and survival outcome in an experimental bacterial infusion model of peritonitis. In: *Crit Care Med* 28(3), S. 788-794.
- Mastroeni, P.; Harrison, J. A.; Robinson, J. H.; Clare, S.; Khan, S.; Maskell, D. J.; Dougan, G.; Hormaeche, C. E. (1998): Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compound-dependent salmonellae in BALB/c mice: role of gamma interferon and macrophage activation. In: *Infect Immun* 66(10), S. 4767-4776.
- Mcadam, A. J.; Schweitzer, A. N.; Sharpe, A. H. (1998): The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. In: *Immunol Rev* 165, S. 231-247.
- Mccarthy, M. K.; Weinberg, J. B. (2015): The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. In: *Front Microbiol* 6.
- Mebius, R. E.; Rennert, P.; Weissman, I. L. (1997): Developing lymph nodes collect CD4+CD3-LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. In: *Immunity* 7(4), S. 493-504.

- Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity. In: *Nat Rev Immunol* 1(2), S. 135-145.
- Meiners, S.; Heyken, D.; Weller, A.; Ludwig, A.; Stangl, K.; Kloetzel, P. M.; Kruger, E. (2003): Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. In: *J Biol Chem* 278(24), S. 21517-21525.
- Mera, S.; Tatulescu, D.; Cismaru, C.; Bondor, C.; Slavcovici, A.; Zanc, V.; Carstina, D.; Oltean, M. (2011): Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. In: *Apmis* 119(2), S. 155-163.
- Miller, S. I.; Wallace, R. J., Jr.; Musher, D. M.; Septimus, E. J.; Kohl, S.; Baughn, R. E. (1980): Hypoglycemia as a manifestation of sepsis. In: *Am J Med* 68(5), S. 649-654.
- Mishto, M.; Bellavista, E.; Santoro, A.; Stolzing, A.; Ligorio, C.; Nacmias, B.; Spazzafumo, L.; Chiappelli, M.; Licastro, F.; Sorbi, S.; Pession, A.; Ohm, T.; Grune, T.; Franceschi, C. (2006): Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. In: *Neurobiol Aging* 27(1), S. 54-66.
- Mizoguchi, E. (2006): Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells. In: *Gastroenterology* 130(2), S. 398-411.
- Moebius, J.; Van Den Broek, M.; Groettrup, M.; Basler, M. (2010): Immunoproteasomes are essential for survival and expansion of T cells in virus-infected mice. In: *Eur J Immunol* 40(12), S. 3439-3449.
- Mokady, D.; Gophna, U.; Ron, E. Z. (2005): Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. In: *J Clin Microbiol* 43(1), S. 66-73.
- Moshage, H. J.; Janssen, J. A.; Franssen, J. H.; Hafkenscheid, J. C.; Yap, S. H. (1987): Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. In: *J Clin Invest* 79(6), S. 1635-1641.
- Moter, A.; Leist, G.; Rudolph, R.; Schrank, K.; Choi, B. K.; Wagner, M.; Gobel, U. B. (1998): Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. In: *Microbiology* 144 (Pt 9), S. 2459-2467.
- Muchamuel, T.; Basler, M.; Aujay, M. A.; Suzuki, E.; Kalim, K. W.; Lauer, C.; Sylvain, C.; Ring, E. R.; Shields, J.; Jiang, J.; Shwonek, P.; Parlati, F.; Demo, S. D.; Bennett, M. K.; Kirk, C. J.; Groettrup, M. (2009): A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. In: *Nat Med* 15(7), S. 781-787.
- Muhlbauer, M.; Fleck, M.; Schutz, C.; Weiss, T.; Froh, M.; Blank, C.; Scholmerich, J.; Hellerbrand, C. (2006): PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. In: *J Hepatol* 45(4), S. 520-528.
- Mundt, S.; Basler, M.; Buerger, S.; Engler, H.; Groettrup, M. (2016): Inhibiting the immunoproteasome exacerbates the pathogenesis of systemic *Candida albicans* infection in mice. In: *Sci Rep* 6, S. 19434.
- Murata, S.; Kawahara, H.; Tohma, S.; Yamamoto, K.; Kasahara, M.; Nabeshima, Y.; Tanaka, K.; Chiba, T. (1999): Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. In: *J Biol Chem* 274(53), S. 38211-38215.
- Murata, S.; Sasaki, K.; Kishimoto, T.; Niwa, S.; Hayashi, H.; Takahama, Y.; Tanaka, K. (2007): Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. In: *Science* 316(5829), S. 1349-1353.
- Murata, S.; Udono, H.; Tanahashi, N.; Hamada, N.; Watanabe, K.; Adachi, K.; Yamano, T.; Yui, K.; Kobayashi, N.; Kasahara, M.; Tanaka, K.; Chiba, T. (2001): Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. In: *EMBO J* 20(21), S. 5898-5907.
- Nagayama, Y.; Nakahara, M.; Shimamura, M.; Horie, I.; Arima, K.; Abiru, N. (2012): Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. In: *Clin Exp Immunol* 168(3), S. 268-273.
- Nathan, J. A.; Spinnenhirn, V.; Schmidtke, G.; Basler, M.; Groettrup, M.; Goldberg, A. L. (2013): Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. In: *Cell* 152(5), S. 1184-1194.
- Navon, A.; Goldberg, A. L. (2001): Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. In: *Mol Cell* 8(6), S. 1339-1349.

- Neijssen, J.; Herberts, C.; Drijfhout, J. W.; Reits, E.; Janssen, L.; Neeffjes, J. (2005): Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. In: *Nature* 434(7029), S. 83-88.
- Newton, S.; Ding, Y.; Chung, C. S.; Chen, Y.; Lomas-Neira, J. L.; Ayala, A. (2004): Sepsis-induced changes in macrophage co-stimulatory molecule expression: CD86 as a regulator of anti-inflammatory IL-10 response. In: *Surg Infect (Larchmt)* 5(4), S. 375-383.
- Niedermann, G.; Butz, S.; Ihlenfeldt, H. G.; Grimm, R.; Lucchiari, M.; Hoschutzky, H.; Jung, G.; Maier, B.; Eichmann, K. (1995): Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. In: *Immunity* 2(3), S. 289-299.
- Noda, C.; Tanahashi, N.; Shimbara, N.; Hendil, K. B.; Tanaka, K. (2000): Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats. In: *Biochem Biophys Res Commun* 277(2), S. 348-354.
- O'Neill, L. A.; Bowie, A. G. (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. In: *Nat Rev Immunol* 7(5), S. 353-364.
- Oh, J.; Takahashi, R.; Kondo, S.; Mizoguchi, A.; Adachi, E.; Sasahara, R. M.; Nishimura, S.; Imamura, Y.; Kitayama, H.; Alexander, D. B.; Ide, C.; Horan, T. P.; Arakawa, T.; Yoshida, H.; Nishikawa, S.; Itoh, Y.; Seiki, M.; Itoharu, S.; Takahashi, C.; Noda, M. (2001): The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. In: *Cell* 107(6), S. 789-800.
- Ono, S.; Ueno, C.; Aosasa, S.; Tsujimoto, H.; Seki, S.; Mochizuki, H. (2001): Severe sepsis induces deficient interferon-gamma and interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy improves survival in peritonitis. In: *Am J Surg* 182(5), S. 491-497.
- Opal, S. M.; Depalo, V. A. (2000): Anti-inflammatory cytokines. In: *Chest* 117(4), S. 1162-1172.
- Opal, S. M.; Garber, G. E.; Larosa, S. P.; Maki, D. G.; Freebairn, R. C.; Kinasewitz, G. T.; Dhainaut, J. F.; Yan, S. B.; Williams, M. D.; Graham, D. E.; Nelson, D. R.; Levy, H.; Bernard, G. R. (2003): Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). In: *Clin Infect Dis* 37(1), S. 50-58.
- Opitz, E.; Koch, A.; Klingel, K.; Schmidt, F.; Prokop, S.; Rahnefeld, A.; Sauter, M.; Heppner, F. L.; Volker, U.; Kandolf, R.; Kuckelkorn, U.; Stangl, K.; Kruger, E.; Kloetzel, P. M.; Voigt, A. (2011): Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. In: *PLoS Pathog* 7(9), S. e1002233.
- Orlowski, M.; Wilk, S. (2000): Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. In: *Arch Biochem Biophys* 383(1), S. 1-16.
- Ortiz-Navarrete, V.; Seelig, A.; Gernold, M.; Frenzels, S.; Kloetzel, P. M.; Hammerling, G. J. (1991): Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. In: *Nature* 353(6345), S. 662-664.
- Osmulski, P. A.; Hochstrasser, M.; Gaczynska, M. (2009): A tetrahedral transition state at the active sites of the 20S proteasome is coupled to opening of the alpha-ring channel. In: *Structure* 17(8), S. 1137-1147.
- Ossendorp, F.; Fu, N.; Camps, M.; Granucci, F.; Gobin, S. J.; Van Den Elsen, P. J.; Schuurhuis, D.; Adema, G. J.; Lipford, G. B.; Chiba, T.; Sijts, A.; Kloetzel, P. M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Melief, C. J. (2005): Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells. In: *J Immunol* 174(12), S. 7815-7822.
- Otto, G. P.; Sossdorf, M.; Claus, R. A.; Rodel, J.; Menge, K.; Reinhart, K.; Bauer, M.; Riedemann, N. C. (2011): The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. In: *Crit Care* 15(4), S. R183.
- Ozkan, E.; Yu, H.; Deisenhofer, J. (2005): Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(52), S. 18890-18895.
- Paeschke, A.; Possehl, A.; Klingel, K.; Voss, M.; Voss, K.; Kesphol, M.; Sauter, M.; Overkleeft, H. S.; Althof, N.; Garlanda, C.; Voigt, A. (2015): The immunoproteasome controls the availability of the cardio-protective pattern recognition molecule Pentraxin3. In: *Eur J Immunol*.
- Pahl, H. L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. In: *Oncogene* 18(49), S. 6853-6866.

- Palombella, V. J.; Rando, O. J.; Goldberg, A. L.; Maniatis, T. (1994): The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. In: *Cell* 78(5), S. 773-785.
- Pamer, E.; Cresswell, P. (1998): Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. In: *Annu Rev Immunol* 16, S. 323-358.
- Pang, K. C.; Sanders, M. T.; Monaco, J. J.; Doherty, P. C.; Turner, S. J.; Chen, W. (2006): Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8+ T cell responses. In: *J Immunol* 177(11), S. 7680-7688.
- Parameswaran, N.; Patial, S. (2010): Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. In: *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20(2), S. 87-103.
- Pettila, V.; Bellomo, R. (2014): Understanding acute kidney injury in sepsis. In: *Intensive Care Med* 40(7), S. 1018-1020.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res* 29(9), S. e45.
- Piccinini, M.; Mostert, M.; Croce, S.; Baldovino, S.; Papotti, M.; Rinaudo, M. T. (2003): Interferon-gamma-inducible subunits are incorporated in human brain 20S proteasome. In: *J Neuroimmunol* 135(1-2), S. 135-140.
- Pickering, A. M.; Davies, K. J. (2012): Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28alphabeta, Pa28gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins. In: *Arch Biochem Biophys* 523(2), S. 181-190.
- Pickering, A. M.; Koop, A. L.; Teoh, C. Y.; Ermak, G.; Grune, T.; Davies, K. J. (2010): The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28alphabeta proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. In: *Biochem J* 432(3), S. 585-594.
- Potts, B. C.; Albitar, M. X.; Anderson, K. C.; Baritaki, S.; Berkers, C.; Bonavida, B.; Chandra, J.; Chauhan, D.; Cusack, J. C., Jr.; Fenical, W.; Ghobrial, I. M.; Groll, M.; Jensen, P. R.; Lam, K. S.; Lloyd, G. K.; McBride, W.; Mcconkey, D. J.; Miller, C. P.; Neuteboom, S. T.; Oki, Y.; Ovaa, H.; Pajonk, F.; Richardson, P. G.; Roccaro, A. M.; Sloss, C. M.; Spear, M. A.; Valashi, E.; Younes, A.; Palladino, M. A. (2011): Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. In: *Curr Cancer Drug Targets* 11(3), S. 254-284.
- Prasadarao, N. V. (2002): Identification of Escherichia coli outer membrane protein A receptor on human brain microvascular endothelial cells. In: *Infect Immun* 70(8), S. 4556-4563.
- Qiu, P.; Cui, X.; Barochia, A.; Li, Y.; Natanson, C.; Eichacker, P. Q. (2011): The evolving experience with therapeutic TNF inhibition in sepsis: considering the potential influence of risk of death. In: *Expert Opin Investig Drugs* 20(11), S. 1555-1564.
- Radaeva, S.; Sun, R.; Pan, H. N.; Hong, F.; Gao, B. (2004): Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. In: *Hepatology* 39(5), S. 1332-1342.
- Radhakrishnan, S. K.; Lee, C. S.; Young, P.; Beskow, A.; Chan, J. Y.; Deshaies, R. J. (2010): Transcription factor Nrfl mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. In: *Mol Cell* 38(1), S. 17-28.
- Raule, M.; Cerruti, F.; Benaroudj, N.; Migotti, R.; Kikuchi, J.; Bachi, A.; Navon, A.; Dittmar, G.; Cascio, P. (2014): PA28alphabeta reduces size and increases hydrophilicity of 20S immunoproteasome peptide products. In: *Chem Biol* 21(4), S. 470-480.
- Raule, M.; Cerruti, F.; Cascio, P. (2014): Enhanced rate of degradation of basic proteins by 26S immunoproteasomes. In: *Biochim Biophys Acta* 1843(9), S. 1942-1947.
- Raven, K. (2012): Rodent models of sepsis found shockingly lacking. In: *Nat Med* 18(7), S. 998.
- Rechsteiner, M.; Realini, C.; Ustrell, V. (2000): The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. In: *Biochem J* 345 Pt 1, S. 1-15.
- Reimann, J.; Kaufmann, S. H. (1997): Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. In: *Curr Opin Immunol* 9(4), S. 462-469.
- Reis, J.; Guan, X. Q.; Kisselev, A. F.; Papsasian, C. J.; Qureshi, A. A.; Morrison, D. C.; Van Way, C. W., 3rd; Vogel, S. N.; Qureshi, N. (2011): LPS-induced formation of immunoproteasomes: TNF-alpha and nitric oxide production are regulated by altered composition of proteasome-active sites. In: *Cell Biochem Biophys* 60(1-2), S. 77-88.

- Reis, J.; Hassan, F.; Guan, X. Q.; Shen, J.; Monaco, J. J.; Papasian, C. J.; Qureshi, A. A.; Van Way, C. W., 3rd; Vogel, S. N.; Morrison, D. C.; Qureshi, N. (2011): The immunoproteasomes regulate LPS-induced TRIF/TRAM signaling pathway in murine macrophages. In: *Cell Biochem Biophys* 60(1-2), S. 119-126.
- Remick, D. G. (2007): Pathophysiology of sepsis. In: *Am J Pathol* 170(5), S. 1435-1444.
- Remick, D. G.; Ward, P. A. (2005): Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. In: *Shock* 24 Suppl 1, S. 7-11.
- Remick, D.; Manohar, P.; Bolgos, G.; Rodriguez, J.; Moldawer, L.; Wollenberg, G. (1995): Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. In: *Shock* 4(2), S. 89-95.
- Ren, Y.; Hua, L.; Meng, X.; Xiao, Y.; Hao, X.; Guo, S.; Zhao, P.; Wang, L.; Dong, B.; Yu, Y.; Wang, L. (2016): Correlation of Surface Toll-Like Receptor 9 Expression with IL-17 Production in Neutrophils during Septic Peritonitis in Mice Induced by E. coli. In: *Mediators Inflamm* 2016, S. 3296307.
- Reynolds, J. M.; Angkasekwinai, P.; Dong, C. (2010): IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 21(6), S. 413-423.
- Rimmele, T.; Payen, D.; Cantaluppi, V.; Marshall, J.; Gomez, H.; Gomez, A.; Murray, P.; Kellum, J. A. (2016): IMMUNE CELL PHENOTYPE AND FUNCTION IN SEPSIS. In: *Shock* 45(3), S. 282-291.
- Rittirsch, D.; Flierl, M. A.; Ward, P. A. (2008): Harmful molecular mechanisms in sepsis. In: *Nat Rev Immunol* 8(10), S. 776-787.
- Rittirsch, D.; Hoesel, L. M.; Ward, P. A. (2007): The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. In: *J Leukoc Biol* 81(1), S. 137-143.
- Robinson, M. J.; Sancho, D.; Slack, E. C.; Leibundgut-Landmann, S.; Reis E Sousa, C. (2006): Myeloid C-type lectins in innate immunity. In: *Nat Immunol* 7(12), S. 1258-1265.
- Rock, F. L.; Hardiman, G.; Timans, J. C.; Kastelein, R. A.; Bazan, J. F. (1998): A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2), S. 588-593.
- Rock, K. L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D.; Goldberg, A. L. (1994): Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. In: *Cell* 78(5), S. 761-771.
- Rolny, C.; Lu, L.; Agren, N.; Nilsson, I.; Roe, C.; Webb, G. C.; Welsh, M. (2005): Shb promotes blood vessel formation in embryoid bodies by augmenting vascular endothelial growth factor receptor-2 and platelet-derived growth factor receptor-beta signaling. In: *Exp Cell Res* 308(2), S. 381-393.
- Romero, C. R.; Herzig, D. S.; Etogo, A.; Nunez, J.; Mahmoudizad, R.; Fang, G.; Murphey, E. D.; Toliver-Kinsky, T.; Sherwood, E. R. (2010): The role of interferon-gamma in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. In: *J Leukoc Biol* 88(4), S. 725-735.
- Rongione, A. J.; Kusske, A. M.; Ashley, S. W.; Reber, H. A.; Mcfadden, D. W. (1997): Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. In: *J Surg Res* 70(2), S. 107-112.
- Rosenberg-Hasson, Y.; Hansmann, L.; Liedtke, M.; Herschmann, I.; Maecker, H. T. (2014): Effects of serum and plasma matrices on multiplex immunoassays. In: *Immunol Res* 58(2-3), S. 224-233.
- Rotenberg, Z.; Squires, J. E.; Johnston, M. T.; Hoyt, J.; Gibson, R. S.; Bruns, D. E. (1988): Lactate dehydrogenase isoenzyme-1 in serum for detection of peri-operative myocardial infarction after cardiac surgery. In: *Clin Chem* 34(12), S. 2469-2474.
- Rouhiainen, A.; Tumova, S.; Valmu, L.; Kalkkinen, N.; Rauvala, H. (2007): Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). In: *J Leukoc Biol* 81(1), S. 49-58.
- Rubin, D. M.; Coux, O.; Wefes, I.; Hengartner, C.; Young, R. A.; Goldberg, A. L.; Finley, D. (1996): Identification of the gal4 suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. In: *Nature* 379(6566), S. 655-657.
- Rubulotta, F. M.; Ramsay, G.; Parker, M. M.; Dellinger, R. P.; Levy, M. M.; Poeze, M. (2009): An international survey: Public awareness and perception of sepsis. In: *Crit Care Med* 37(1), S. 167-170.

- Rudolph, M. G.; Stanfield, R. L.; Wilson, I. A. (2006): How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. In: *Annu Rev Immunol* 24, S. 419-466.
- Runnels, H. A.; Watkins, W. A.; Monaco, J. J. (2000): LMP2 expression and proteasome activity in NOD mice. In: *Nat Med* 6(10), S. 1064-1065; author reply 1065-1066.
- Schall, T. J.; Bacon, K.; Toy, K. J.; Goeddel, D. V. (1990): Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. In: *Nature* 347(6294), S. 669-671.
- Scheidereit, C. (2006): I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. In: *Oncogene* 25(51), S. 6685-6705.
- Schmidt, N.; Gonzalez, E.; Visekruna, A.; Kuhl, A. A.; Loddenkemper, C.; Mollenkopf, H.; Kaufmann, S. H.; Steinhoff, U.; Joeris, T. (2010): Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. In: *Gut* 59(7), S. 896-906.
- Schoenborn, J. R.; Wilson, C. B. (2007): Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. In: *Adv Immunol* 96, S. 41-101.
- Schreuder, H.; Tardif, C.; Trump-Kallmeyer, S.; Soffientini, A.; Sarubbi, E.; Akeson, A.; Bowlin, T.; Yanofsky, S.; Barrett, R. W. (1997): A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. In: *Nature* 386(6621), S. 194-200.
- Schwarz, K.; Eggers, M.; Soza, A.; Koszinowski, U. H.; Kloetzel, P. M.; Groettrup, M. (2000): The proteasome regulator PA28 α /beta can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. In: *Eur J Immunol* 30(12), S. 3672-3679.
- Seeley, E. J.; Matthay, M. A.; Wolters, P. J. (2012): Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303(5), S. L355-363.
- Seifert, U.; Bialy, L. P.; Ebstein, F.; Bech-Otschir, D.; Voigt, A.; Schroter, F.; Prozorovski, T.; Lange, N.; Steffen, J.; Rieger, M.; Kuckelkorn, U.; Aktas, O.; Kloetzel, P. M.; Kruger, E. (2010): Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. In: *Cell* 142(4), S. 613-624.
- Seifert, U.; Kruger, E. (2008): Remodelling of the ubiquitin-proteasome system in response to interferons. In: *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5), S. 879-884.
- Selvaraj, S. K.; Prasadarao, N. V. (2005): Escherichia coli K1 inhibits proinflammatory cytokine induction in monocytes by preventing NF- κ B activation. In: *J Leukoc Biol* 78(2), S. 544-554.
- Semeraro, N.; Ammollo, C. T.; Semeraro, F.; Colucci, M. (2010): Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease. In: *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2(3), S. e2010024.
- Semeraro, N.; Ammollo, C. T.; Semeraro, F.; Colucci, M. (2012): Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. In: *Thromb Res* 129(3), S. 290-295.
- Senftleben, U.; Cao, Y.; Xiao, G.; Greten, F. R.; Krahn, G.; Bonizzi, G.; Chen, Y.; Hu, Y.; Fong, A.; Sun, S. C.; Karin, M. (2001): Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. In: *Science* 293(5534), S. 1495-1499.
- Shahrara, S.; Pickens, S. R.; Mandelin, A. M., 2nd; Karpus, W. J.; Huang, Q.; Kolls, J. K.; Pope, R. M. (2010): IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. In: *J Immunol* 184(8), S. 4479-4487.
- Shin, E. C.; Seifert, U.; Urban, S.; Truong, K. T.; Feinstone, S. M.; Rice, C. M.; Kloetzel, P. M.; Rehmann, B. (2007): Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in the hepatitis C virus-infected liver. In: *J Interferon Cytokine Res* 27(12), S. 985-990.
- Shirley, R. B.; Kaddour-Djebbar, I.; Patel, D. M.; Lakshmikanthan, V.; Lewis, R. W.; Kumar, M. V. (2005): Combination of proteasomal inhibitors lactacystin and MG132 induced synergistic apoptosis in prostate cancer cells. In: *Neoplasia* 7(12), S. 1104-1111.
- Sibille, C.; Gould, K. G.; Willard-Gallo, K.; Thomson, S.; Rivett, A. J.; Powis, S.; Butcher, G. W.; De Baetselier, P. (1995): LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. In: *Curr Biol* 5(8), S. 923-930.
- Sijts, A. J.; Ruppert, T.; Rehmann, B.; Schmidt, M.; Koszinowski, U.; Kloetzel, P. M. (2000): Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. In: *J Exp Med* 191(3), S. 503-514.

- Singer, M.; Deutschman, C. S.; Seymour, C. W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G. R.; Chiche, J. D.; Coopersmith, C. M.; Hotchkiss, R. S.; Levy, M. M.; Marshall, J. C.; Martin, G. S.; Opal, S. M.; Rubenfeld, G. D.; Van Der Poll, T.; Vincent, J. L.; Angus, D. C. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). In: *JAMA* 315(8), S. 801-810.
- Singh, R. K.; Kabbaj, M. H.; Paik, J.; Gunjan, A. (2009): Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. In: *Nat Cell Biol* 11(8), S. 925-933.
- Singh, Shaneen; Awasthi, Niranjan; Ekwuagu, Charles E.; Wagner, B. J. (2002): Immunoproteasome expression in a nonimmune tissue, the ocular lens. In: *Arch Biochem Biophys* 405(2), S. 147-153.
- Sonego, F.; Alves-Filho, J. C.; Cunha, F. Q. (2014): Targeting neutrophils in sepsis. In: *Expert Rev Clin Immunol* 10(8), S. 1019-1028.
- Spits, H.; Cupedo, T. (2012): Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. In: *Annu Rev Immunol* 30, S. 647-675.
- Steers, N. J.; Alving, C. R.; Rao, M. (2008): Modulation of immunoproteasome subunits by liposomal lipid A. In: *Vaccine* 26(23), S. 2849-2859.
- Stohwasser, R.; Giesebrecht, J.; Kraft, R.; Muller, E. C.; Hausler, K. G.; Kettenmann, H.; Hanisch, U. K.; Kloetzel, P. M. (2000): Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide. In: *Glia* 29(4), S. 355-365.
- Stohwasser, R.; Standera, S.; Peters, I.; Kloetzel, P. M.; Groettrup, M. (1997): Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits. In: *Eur J Immunol* 27(5), S. 1182-1187.
- Strehl, B.; Joeris, T.; Rieger, M.; Visekruna, A.; Textoris-Taube, K.; Kaufmann, S. H.; Kloetzel, P. M.; Kuckelkorn, U.; Steinhoff, U. (2006): Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8⁺ T cells. In: *J Immunol* 177(9), S. 6238-6244.
- Strehl, B.; Seifert, U.; Kruger, E.; Heink, S.; Kuckelkorn, U.; Kloetzel, P. M. (2005): Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. In: *Immunol Rev* 207, S. 19-30.
- Sukumaran, S. K.; Selvaraj, S. K.; Prasadarao, N. V. (2004): Inhibition of apoptosis by *Escherichia coli* K1 is accompanied by increased expression of BclXL and blockade of mitochondrial cytochrome c release in macrophages. In: *Infect Immun* 72(10), S. 6012-6022.
- Sunden-Cullberg, J.; Norrby-Teglund, A.; Treutiger, C. J. (2006): The role of high mobility group box-1 protein in severe sepsis. In: *Curr Opin Infect Dis* 19(3), S. 231-236.
- Svensson, M.; Stockinger, B.; Wick, M. J. (1997): Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. In: *J Immunol* 158(9), S. 4229-4236.
- Takatori, H.; Kanno, Y.; Watford, W. T.; Tato, C. M.; Weiss, G.; Ivanov, Ii; Littman, D. R.; O'shea, J. J. (2009): Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. In: *J Exp Med* 206(1), S. 35-41.
- Tanahashi, N.; Yokota, K.; Ahn, J. Y.; Chung, C. H.; Fujiwara, T.; Takahashi, E.; Demartino, G. N.; Slaughter, C. A.; Toyonaga, T.; Yamamura, K.; Shimbara, N.; Tanaka, K. (1997): Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma-interferon regulation. In: *Genes Cells* 2(3), S. 195-211.
- Tanaka, K. (1994): Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. In: *J Leukoc Biol* 56(5), S. 571-575.
- Taneja, R.; Parodo, J.; Jia, S. H.; Kapus, A.; Rotstein, O. D.; Marshall, J. C. (2004): Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. In: *Crit Care Med* 32(7), S. 1460-1469.
- Tao, W.; Filippi, M. D.; Bailey, J. R.; Atkinson, S. J.; Connors, B.; Evan, A.; Williams, D. A. (2002): The TRQQKRP motif located near the C-terminus of Rac2 is essential for Rac2 biologic functions and intracellular localization. In: *Blood* 100(5), S. 1679-1688.
- Toes, R. E.; Nussbaum, A. K.; Degermann, S.; Schirle, M.; Emmerich, N. P.; Kraft, M.; Laplace, C.; Zwinderman, A.; Dick, T. P.; Muller, J.; Schonfisch, B.; Schmid, C.; Fehling, H. J.; Stevanovic, S.; Rammensee, H. G.; Schild, H. (2001): Discrete cleavage motifs of constitutive and

- immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. In: *J Exp Med* 194(1), S. 1-12.
- Tsuda, Y.; Takahashi, H.; Kobayashi, M.; Hanafusa, T.; Herndon, D. N.; Suzuki, F. (2004): Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Immunity* 21(2), S. 215-226.
- Tu, L.; Moriya, C.; Imai, T.; Ishida, H.; Tetsutani, K.; Duan, X.; Murata, S.; Tanaka, K.; Shimokawa, C.; Hisaeda, H.; Himeno, K. (2009): Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. In: *Eur J Immunol* 39(12), S. 3385-3394.
- Umbro, I.; Gentile, G.; Tinti, F.; Muiesan, P.; Mitterhofer, A. P. (2016): Recent advances in pathophysiology and biomarkers of sepsis-induced acute kidney injury. In: *J Infect* 72(2), S. 131-142.
- Unno, M.; Mizushima, T.; Morimoto, Y.; Tomisugi, Y.; Tanaka, K.; Yasuoka, N.; Tsukihara, T. (2002): The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. In: *Structure* 10(5), S. 609-618.
- Van De Veerdonk, F. L.; Kullberg, B. J.; Verschueren, I. C.; Hendriks, T.; Van Der Meer, J. W.; Joosten, L. A.; Netea, M. G. (2010): Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. In: *Shock* 34(4), S. 407-411.
- Van Den Berg, S.; Laman, J. D.; Boon, L.; Ten Kate, M. T.; De Knecht, G. J.; Verdijk, R. M.; Verbrugh, H. A.; Nouwen, J. L.; Bakker-Woudenberg, I. A. (2013): Distinctive cytokines as biomarkers predicting fatal outcome of severe *Staphylococcus aureus* bacteremia in mice. In: *PLoS One* 8(3), S. e59107.
- Van Der Poll, T.; Opal, S. M. (2008): Host-pathogen interactions in sepsis. In: *Lancet Infect Dis* 8(1), S. 32-43.
- Van Kaer, L.; Ashton-Rickardt, P. G.; Eichelberger, M.; Gaczynska, M.; Nagashima, K.; Rock, K. L.; Goldberg, A. L.; Doherty, P. C.; Tonegawa, S. (1994): Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. In: *Immunity* 1(7), S. 533-541.
- Vigneron, N.; Van Den Eynde, B. J. (2012): Proteasome subtypes and the processing of tumor antigens: increasing antigenic diversity. In: *Curr Opin Immunol* 24(1), S. 84-91.
- Vincent, J. L.; Brealey, D.; Libert, N.; Abidi, N. E.; O'dwyer, M.; Zacharowski, K.; Mikaszewska-Sokolewicz, M.; Schrenzel, J.; Simon, F.; Wilks, M.; Picard-Maureau, M.; Chalfin, D. B.; Ecker, D. J.; Sampath, R.; Singer, M. (2015): Rapid Diagnosis of Infection in the Critically Ill, a Multicenter Study of Molecular Detection in Bloodstream Infections, Pneumonia, and Sterile Site Infections. In: *Crit Care Med* 43(11), S. 2283-2291.
- Vincent, J. L.; De Mendonca, A.; Cantraine, F.; Moreno, R.; Takala, J.; Suter, P. M.; Sprung, C. L.; Colardyn, F.; Blecher, S. (1998): Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. In: *Crit Care Med* 26(11), S. 1793-1800.
- Vincent, J. L.; Marshall, J. C.; Namendys-Silva, S. A.; Francois, B.; Martin-Loeches, I.; Lipman, J.; Reinhart, K.; Antonelli, M.; Pickkers, P.; Njimi, H.; Jimenez, E.; Sakr, Y. (2014): Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. In: *Lancet Respir Med* 2(5), S. 380-386.
- Vincent, J. L.; Opal, S. M.; Marshall, J. C.; Tracey, K. J. (2013): Sepsis definitions: time for change. In: *Lancet* 381(9868), S. 774-775.
- Vincent, J. L.; Sakr, Y.; Sprung, C. L.; Ranieri, V. M.; Reinhart, K.; Gerlach, H.; Moreno, R.; Carlet, J.; Le Gall, J. R.; Payen, D. (2006): Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. In: *Crit Care Med* 34(2), S. 344-353.
- Visekruna, A.; Joeris, T.; Seidel, D.; Kroesen, A.; Loddenkemper, C.; Zeitz, M.; Kaufmann, S. H.; Schmidt-Ullrich, R.; Steinhoff, U. (2006): Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. In: *J Clin Invest* 116(12), S. 3195-3203.
- Wallner, G.; Amann, R.; Beisker, W. (1993): Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. In: *Cytometry* 14(2), S. 136-143.
- Wang, H.; Ma, S. (2008): The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. In: *Am J Emerg Med* 26(6), S. 711-715.

- Wang, J.; Qiao, W. H. (2006): [Study on vascular endothelial injuries and inflammation related cytokines in patients with multiple organ dysfunction syndrome]. In: *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 18(2), S. 82-84.
- Wang, S.; Iring, A.; Strilic, B.; Albarran Juarez, J.; Kaur, H.; Troidl, K.; Tonack, S.; Burbiel, J. C.; Muller, C. E.; Fleming, I.; Lundberg, J. O.; Wettschureck, N.; Offermanns, S. (2015): P2Y(2) and Gq/G(1)(1) control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. In: *J Clin Invest* 125(8), S. 3077-3086.
- Ward, N. S.; Casserly, B.; Ayala, A. (2008): The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. In: *Clin Chest Med* 29(4), S. 617-625, viii.
- Wedemeyer, H.; Hofmann, W. P.; Lueth, S.; Malinski, P.; Thimme, R.; Tacke, F.; Wiegand, J. (2010): [ALT screening for chronic liver diseases: scrutinizing the evidence]. In: *Z Gastroenterol* 48(1), S. 46-55.
- Wiersinga, W. J.; Leopold, S. J.; Cranendonk, D. R.; Van Der Poll, T. (2014): Host innate immune responses to sepsis. In: *Virulence* 5(1), S. 36-44.
- Wiles, T. J.; Dhakal, B. K.; Eto, D. S.; Mulvey, M. A. (2008): Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. In: *Mol Biol Cell* 19(4), S. 1427-1438.
- Witowski, J.; Pawlaczyk, K.; Breborowicz, A.; Scheuren, A.; Kuzlan-Pawlaczyk, M.; Wisniewska, J.; Polubinska, A.; Friess, H.; Gahl, G. M.; Frei, U.; Jorres, A. (2000): IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. In: *J Immunol* 165(10), S. 5814-5821.
- Witt, E.; Zantopf, D.; Schmidt, M.; Kraft, R.; Kloetzel, P. M.; Kruger, E. (2000): Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. In: *J Mol Biol* 301(1), S. 1-9.
- Wojcik, C.; Tanaka, K.; Paweletz, N.; Naab, U.; Wilk, S. (1998): Proteasome activator (PA28) subunits, alpha, beta and gamma (Ki antigen) in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells. In: *Eur J Cell Biol* 77(2), S. 151-160.
- Xiao, Z.; Wilson, C.; Robertson, H. L.; Roberts, D. J.; Ball, C. G.; Jenne, C. N.; Kirkpatrick, A. W. (2015): Inflammatory mediators in intra-abdominal sepsis or injury - a scoping review. In: *Crit Care* 19, S. 373.
- Xu, J.; Zhang, X.; Pelayo, R.; Monestier, M.; Ammollo, C. T.; Semeraro, F.; Taylor, F. B.; Esmon, N. L.; Lupu, F.; Esmon, C. T. (2009): Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. In: *Nat Med* 15(11), S. 1318-1321.
- Yang, C.; Schmidt, M. (2014): Cutting through complexity: the proteolytic properties of alternate immunoproteasome complexes. In: *Chem Biol* 21(4), S. 435-436.
- Yrlid, U.; Svensson, M.; Johansson, C.; Wick, M. J. (2000): Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. In: *FEMS Immunol Med Microbiol* 27(4), S. 313-320.
- Yuseff, M. I.; Pierobon, P.; Reversat, A.; Lennon-Dumenil, A. M. (2013): How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. In: *Nat Rev Immunol* 13(7), S. 475-486.
- Zaiss, D. M.; De Graaf, N.; Sijts, A. J. (2008): The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. In: *Infect Immun* 76(3), S. 1207-1213.
- Zein, Joe G.; Lee, Gregory L.; Tawk, Maroun; Dabaja, Mohammed; Kinasewitz, Gary T. (2004): Prognostic significance of elevated serum lactate dehydrogenase (ldh) in patients with severe sepsis. In: *Chest* 126(4_MeetingAbstracts), S. 873S-873S.
- Zhang, N.; Bevan, M. J. (2011): CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. In: *Immunity* 35(2), S. 161-168.
- Zhang, Q.; Raoof, M.; Chen, Y.; Sumi, Y.; Sursal, T.; Junger, W.; Brohi, K.; Itagaki, K.; Hauser, C. J. (2010): Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. In: *Nature* 464(7285), S. 104-107.
- Zhang, Y.; Li, J.; Lou, J.; Zhou, Y.; Bo, L.; Zhu, J.; Zhu, K.; Wan, X.; Cai, Z.; Deng, X. (2011): Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. In: *Crit Care* 15(1), S. R70.
- Zhang, Y.; Zhou, Y.; Lou, J.; Li, J.; Bo, L.; Zhu, K.; Wan, X.; Deng, X.; Cai, Z. (2010): PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. In: *Crit Care* 14(6), S. R220.

- Zhao, S.; Zhang, B. (2015): A comprehensive evaluation of ensembl, RefSeq, and UCSC annotations in the context of RNA-seq read mapping and gene quantification. In: *BMC Genomics* 16, S. 97.
- Zhou, H. J.; Aujay, M. A.; Bennett, M. K.; Dajee, M.; Demo, S. D.; Fang, Y.; Ho, M. N.; Jiang, J.; Kirk, C. J.; Laidig, G. J.; Lewis, E. R.; Lu, Y.; Muchamuel, T.; Parlati, F.; Ring, E.; Shenk, K. D.; Shields, J.; Shwonek, P. J.; Stanton, T.; Sun, C. M.; Sylvain, C.; Woo, T. M.; Yang, J. (2009): Design and synthesis of an orally bioavailable and selective peptide epoxyketone proteasome inhibitor (PR-047). In: *J Med Chem* 52(9), S. 3028-3038.
- Zhou, L.; Chong, M. M.; Littman, D. R. (2009): Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. In: *Immunity* 30(5), S. 646-655.
- Zhou, Y.; Tanzie, C.; Yan, Z.; Chen, S.; Duncan, M.; Gaudenz, K.; Li, H.; Seidel, C.; Lewis, B.; Moran, A.; Libby, R. T.; Kiernan, A. E.; Xie, T. (2013): Notch2 regulates BMP signaling and epithelial morphogenesis in the ciliary body of the mouse eye. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(22), S. 8966-8971.
- Zhu, W.; Bao, R.; Fan, X.; Tao, T.; Zhu, J.; Wang, J.; Li, J.; Bo, L.; Deng, X. (2013): PD-L1 blockade attenuated sepsis-induced liver injury in a mouse cecal ligation and puncture model. In: *Mediators Inflamm* 2013, S. 361501.

8 Anhang

8.1 Publikationen

Gutbier, B.*; Fischer, K.*; Doehn, J. M.; **Von Lachner, C.**; Herr, C.; Klaile, E.; Frischmann, U.; Singer, B. B.; Riesbeck, K.; Zimmermann, W.; Suttorp, N.; Bachmann, S.; Bals, R.; Witzentrath, M.; Slevogt, H. (2015): **Moraxella catarrhalis induces an immune response in the murine lung that is independent of human CEACAM5 expression and long-term smoke exposure.** In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309(3), S. L250-261.
(*contributed equally)

Anja E. Schauer, Tilman E. Klassert, **Carolin von Lachner**, Diana Riebold, Anne Schneeweiß, Magdalena Stock, Mario M. Müller, Sven Hammerschmidt, Philip Bufler, Ulrike Seifert, Kristina Dietert, Charles A. Dinarello, Marcel F. Nold, Achim D. Gruber, Claudia A. Nold-Petry, Hortense Slevogt: **IL37 Causes Excessive Inflammation and Tissue Damage in Murine Pneumococcal Pneumonia.** In: *J Innate Immun* 9 (4), 403-418. 2017 Jun 10.

Kristina Dietert, Birgitt Gutbier, Sandra-Maria Wienhold, Katrin Reppe, Xiaohui Jiang, Ling Yao, Catherine Chaput, Jan Naujoks, Markus Brack, Alexandra Kupke, Christin Peteranderl, Stephan Becker, **Carolin von Lachner**, Nelli Baal, Hortense Slevogt, Andreas C. Hocke, Martin Witzentrath, Bastian Opitz, Susanne Herold, Holger Hackstein, Leif E. Sander, Norbert Suttorp, Achim D. Gruber: **Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia.** In: *PLOS ONE*, accepted 06. Nov. 2017, PONE-D-17-27356R1

Abstrakt:

Assmann, Cora; **Lachner, Carolin von**; Markwart, Robby; Seifert, Ulrike; Slevogt, Hortense **The impact of the immunoproteasome in *E. coli* induced sepsis in macrophages**
In: *Infection: a journal of infectious disease; an official publication of the German Society for Infectious Diseases, the Italian Society of Infectious and Tropical Diseases, the Paul Ehrlich Society for Chemotherapy and the German Sepsis Society.* - Berlin: Springer; Bd. 43.2015, Suppl. 1, Abs. 054, S. S14

Poster und Vorträge:

JSMC Symposium 2013, October 15-16, 2013, Rosensäle, Jena

Präsentation: **Carolin Klippstein**, Hortense Slevogt

The role of *Escherichia coli* induced alterations of the Ubiquitin-Proteasome-System for the Innate Immune Response

JSMC Symposium 2014, September 2nd-3rd, 2014, Lecture Hall Erbertstraße, Jena

Präsentation: **Carolin Klippstein**, Ulrike Seifert, Hortense Slevogt

The Role of the Immunoproteasome in *Escherichia coli* induced sepsis

JSMC – Retreat 2015, November 26th - 27th, 2015, Bad Sulza

Poster: **Carolin von Lachner**, Cora Assmann, Ulrike Seifert and Hortense Slevogt

Susceptibility and Progression of *E. coli* induced Sepsis in LMP7/MECL-1/PA28 α -knock-out mice

8.2 Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Hortense Slevogt für die Betreuung und Unterstützung während meiner Promotion am ZIK Septomics in Jena. Durch ihr Vertrauen in meine Arbeit bereitete sie mir als Veterinärmedizinerin den Zugang in die biomedizinische Grundlagenforschung und förderte maßgeblich meine fachliche und methodische Entwicklung in diesem Arbeitsfeld. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Lothar Wieler für die Erstellung des ersten Gutachtens meiner Doktorarbeit. Für die finanzielle Unterstützung und externe Betreuung des Projektes sowie einer immerwährenden Möglichkeit des fachlichen Austausches möchte ich meiner Graduiertenschule *Jena School for Microbial Communications* (JSMC) und besonders meiner Betreuerin PD Dr. Kerstin Voigt danken. Ebenso sei Prof. Dr. Ulrike Seifert als externe Betreuerin bezüglich aller fachlichen Ratschläge das Proteasom betreffend genannt. Den essentiellen Beitrag zum Gelingen dieses Projektes trägt jedoch die gesamte Host Septomics Forschungsgruppe, unter der Leitung von Prof. Dr. Hortense Slevogt, welche sich neben einer freundschaftlichen und motivationsorientierten Arbeitsatmosphäre durch ein breites Spektrum an wissenschaftlichen Methoden und entsprechender Fachkompetenz auszeichnet. Besonderer Dank gilt Cora Assmann für die beständige Kommunikation und Weiterentwicklung von Hypothesen und Ideen, sowie einer kollegialen Zusammenarbeit aus der eine enge Freundschaft erwachsen ist. Für eine exzellente Einarbeitung in tierexperimentelle Untersuchungen und fortwährende Unterstützung danke ich Katja Fischer für die vielen gemeinsam überwundenen Hürden. Der intensiven Arbeitszeit geprägt durch enge nächtliche Zusammenarbeit verdanke ich außerdem eine intensive Freundschaft zu Anja Hanisch. Für anregende Diskussionen und immer offenen Ohren danke ich allen Post-Docs der Arbeitsgruppe Host Septomics. Hervorzuheben sind hier Dr. Esther Klaile und Dr. Mario Müller, die mir stets in allen Fragen der Proteinbiochemie zur Seite standen und Dr. Ursula Frischmann für die Verfassung des Tierversuchantrags und die behördliche Kommunikation. Für die motivierende und positive Stimmung in der Arbeitsgruppe sorgend, danke ich besonders Dr. Tilman Klassert, der auf dem Feld der Genetik und besonders durch die Umsetzung des Next-Generation-Sequencings diese Arbeit maßgeblich unterstützt hat. Die bioinformatische Bearbeitung der umfangreichen Daten des Next-Generation-Sequencings verdanke ich Dr. Magdalena Stock und für die Lösung aller Computerprobleme und den Austausch von Thesen und Ideen danke ich Dr. Roland Lehmann. Die fachkompetente technische und methodische Unterstützung sowie die Organisation reibungsloser Arbeitsabläufe im Labor verdanke ich ganz besonders Simone Tänzer und Moira Walters. Neben all meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Host Septomics möchte ich mich zusätzlich bei PhD Kristina Dietert, der AG Gruber des Institutes für Tierpathologie, für die histologische Aufarbeitung und Bewertung der Lungen, des Thymus und der mediastinalen Lymphknoten, sowie den kompetenten fachlichen Austausch danken. Ebenfalls gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von PD Dr. Annette Moter für die Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Außerdem verdanke ich Prof. Dr. Ilse Jacobsen einen freundschaftlichen Meinungs-austausch über die Belange eines Tierarztes in der Forschung. Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, denn ohne ihre Bestätigung und den starken Rückhalt hätte ich meine Interessen und Ziele nicht so zielstrebig umsetzen können. Allen voran danke ich meinem Mann für die optimistische und bedingungslose Unterstützung und das Vertrauen in unsere gemeinsame Zukunft.

8.3 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere außerdem, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 05.12.2017

Carolin von Lachner



mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-876-4