

5. Zusammenfassung

Um sich vor oxidativem Stress und den durch ihn verursachten Schäden zu schützen, haben aerob lebende Organismen effiziente antioxidative Systeme entwickelt. Zu den enzymatischen Antioxidantien gehören die Peroxiredoxine. Ein charakteristisches Merkmal dieser Enzymfamilie ist ein konservierter Cysteinrest innerhalb ihrer Aminosäuresequenz, der an der Reduktion von Hydroperoxiden beteiligt ist. Es gibt zunehmend Hinweise, dass den Peroxiredoxinen neben einer Funktion als Antioxidantien auch Funktionen in grundlegenden Zellprozessen wie Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose zukommen.

Zur Vertiefung des Verständnisses der Funktionen der Peroxiredoxine sollte am Beispiel des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* eine Charakterisierung der Peroxiredoxine und ihrer physiologischen Bedeutung in Nematoden vorgenommen werden.

Mit Hilfe von Datenbankanalysen wurden in *C. elegans* drei potentielle Peroxiredoxingene, *ceprx1*, *ceprx2* und *ceprx3*, identifiziert. Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenzen konnten das CePrx1 und CePrx2 den typischen 2-Cys Peroxiredoxinen und das CePrx3 den 1-Cys Peroxiredoxinen zugeordnet werden. Das CePrx1 ist außerdem Träger einer putativen mitochondrialen Signalsequenz. Induktionsstudien zeigten, dass sowohl die *ceprx1*- als auch die *ceprx2*-Expression durch *tert*-Butylhydroperoxid induziert werden.

Um die Funktion des CePrx1 aufzuklären, wurden mittels RNA Interferenz (RNAi) *C. elegans* Kulturen mit einem CePrx1-Knockdown erzeugt. Die Nematoden zeigten keine morphologischen Veränderungen, und auch die Lebensdauer und die Anzahl der Nachkommen waren im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Der CePrx1-Knockdown hatte jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit der Tiere gegenüber H₂O₂ und, in geringem Maße, auch gegenüber Paraquat zur Folge. Untersuchungen an einem rekombinant hergestellten CePrx1 zeigten, dass das Protein in einem

Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System als terminale Peroxidase fungieren und so H_2O_2 reduzieren kann. Mittels *gfp*-Reportergenexpression wurde das CePrx1 in den späten Embryonalstadien der Eier, in der Hypodermis und im Intestinaltrakt der adulten Tiere lokalisiert. Es zeigte sich, dass die Expression des *ceprx1* im Laufe der Entwicklung vom 1. Larvalstadium bis zum adulten Tier zunimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die putative mitochondriale Lokalisierung deuten auf eine Funktion des CePrx1 beim Schutz der Mitochondrien vor oxidativem Stress hin.

Neben den durch RNAi erzeugten CePrx2-Knockdown Kulturen stand eine *C. elegans* Mutante mit einem genomischen Knockout des *ceprx2*-Gens zur Verfügung. Knockdown und Knockout-Mutanten zeigten den gleichen, gegenüber dem Wildtyp stark veränderten Phänotyp. Die Größe der Nematoden war um ca. 25% reduziert und aufgrund einer verringerten Eiproduktion sank die Anzahl ihrer Nachkommen um 70%. Dieser Effekt wird vermutlich nicht durch verminderte Nahrungsaufnahme oder -verwertung verursacht, da weder Veränderungen des Pharynxpumpens noch der Defäkation auftraten. Die Lebensdauer der Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp unverändert und es wurde keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber reaktiven Sauerstoff- (ROS) oder Stickstoffverbindungen (RNS) oder Hitze festgestellt. Durch rekombinante Expression wurde gezeigt, dass das CePrx2 sowohl eine Thiol- als auch eine Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität besitzt, wobei das Enzym neben H_2O_2 auch Alkylhydroperoxide reduzieren kann. Außerdem ist das CePrx2 in der Lage, reaktive Stickoxidverbindungen (NO_x) zu reduzieren. Lokalisationsstudien mittels *gfp*-Reportergenexpression ergaben eine Lokalisierung des CePrx2 in lediglich zwei Neuronentypen des Pharynx (I2, I4).

Die enzymatischen Fähigkeiten des CePrx2 weisen es eindeutig als antioxidantisches Enzym aus. Die Charakterisierung der Knockout-Mutanten und die Lokalisationsstudien zeigen jedoch, dass die Funktion des CePrx2 nicht allein in der Abwehr von oxidativem Stress liegt, sondern ihm auch wichtige Funktionen in anderen physiologischen Bereichen zukommen. Dabei könnte es im Rahmen der durch Peroxide oder Stickstoffmonoxid vermittelten Signalkaskaden regulatorische Funktionen ausüben.

Um die Funktionen des CePrx3 *in vivo* zu untersuchen, wurde mit Hilfe von RNAi ein Knockdown erzeugt. Die Nematoden zeigten keine morphologischen Veränderungen. Der CePrx3-Knockdown hatte weder Einfluss auf die Entwicklung noch auf die Lebensdauer der Nematoden. In pharmakologischen Untersuchungen wurde jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber t-BOOH, Paraquat und Hitze (37°C) festgestellt. Ein rekombinant hergestelltes CePrx3 zeigte Thioredoxin-Peroxidase-Aktivität und war außerdem in der Lage, Stickoxidverbindungen zu reduzieren. Eine *gfp*-Reportergenexpression zeigte, dass das *ceprx3* in allen Entwicklungsstadien in drei spezifischen Neuronentypen des Pharynx (I2, I3 und I4) und im Intestinaltrakt exprimiert wird. In den adulten Hermaphroditen wurde das CePrx3 außerdem in Teilen des Uterus lokalisiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das CePrx3 nicht an Entwicklungs- oder Alterungsprozessen beteiligt ist. Die enzymatischen Fähigkeiten deuten auf eine Funktion bei der Abwehr von ROS und RNS hin.