

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Prof. Dr. Kristina Lorenz

**Das Adverse Outcome Pathway (AOP) – Konzept als Grundlage für die
Entwicklung mechanistischer tierversuchsfreier Ansätze: Eine Fallstudie über
Nephrotoxizität initiiert durch rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomalen
Overload**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Pia Reiser

aus Ulm

Würzburg, Oktober 2022



Referentin: Prof. Dr. Angela Mally

Korreferent/Korreferentin: Prof. Dr. Eva Klopocki

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juni 2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Lukas

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Bedeutung der Entwicklung alternativer Testmethoden für die Toxizitätsprüfung.....	1
1.2	Das Adverse Outcome Pathway Konzept.....	3
1.3	Die Niere als Zielorgan toxischer Wirkung: Anatomische und physiologische Grundlagen der Niere sowie Ursachen und Folgen von Nephrotoxizität.....	5
1.4	Anwendung des AOP-Konzepts: Nephrotoxizität initiiert durch rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomalen Overload	9
1.4.1	Mechanistische Grundlage des AOPs und Erläuterung der molekularen Prozesse bis hin zu den Auswirkungen auf Organebene	9
1.4.2	Definition und Funktion von Lysosomen und ihren molekularen Markern... ..	13
1.4.3	Chemikalien als Stressoren für den gewählten AOP.....	16
1.4.3.1	Polymyxine: Polymyxin B, Polymyxin B Nonapeptid und Colistin....	16
1.4.3.2	Aminoglykoside: Gentamicin.....	20
1.4.3.3	Glykopeptide: Vancomycin	22
1.4.3.4	Cadmium.....	23
1.5	Zielsetzung der Doktorarbeit.....	25
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Material	26
2.1.1	Technische Ausrüstung.....	26
2.1.2	Software	27
2.1.3	Chemikalien, Medikamente und Kits.....	27
2.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze.....	29
2.1.5	Lösungen und Ansätze	30
2.1.6	Zelllinien	31
2.1.7	Antikörper.....	31
2.2	Methoden	33
2.2.1	Arbeiten in der Zellkultur.....	33
2.2.1.1	Desinfektion und Sterilisation.....	33
2.2.1.2	Herstellung der Zellkulturmedien	33
2.2.1.2.1	RPTEC/TERT1 Zellkulturmedium.....	33

2.2.1.2.2	NRK-52E Zellkulturmedium	34
2.2.1.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	34
2.2.1.4	Kultivierung der Zellen	34
2.2.1.4.1	Kultivierung der RPTEC/TERT1 Zelllinie	35
2.2.1.4.2	Kultivierung der NRK-52E Zelllinie	36
2.2.2	CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest.....	38
2.2.2.1	Versuchsaufbau und Zellaussaat für den CellTiter-Glow® Lumineszenz-Zellviabilitätstest.....	38
2.2.2.2	Behandlung der Zellen für den CellTiter-Glow® Lumineszenz- Zellviabilitätstest.....	39
2.2.2.3	Durchführung und Auswertung des CellTiter-Glo® Lumineszenz- Zellviabilitätstests	41
2.2.3	Immunfluoreszenzfärbung	42
2.2.3.1	Versuchsaufbau und Zellaussaat für die Immunfluoreszenzfärbung	43
2.2.3.2	Behandlung der Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung	44
2.2.3.3	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung von CTSD und LAMP	44
2.2.3.4	Ergänzung einer Phalloidin färbung zur Darstellung des Aktin- Zytoskeletts	46
2.2.3.5	SP5 Konfokalmikroskopie und Bildaufnahme	46
2.2.3.6	Bildbearbeitung und Datenanalyse der Immunfluoreszenzfärbung	47
2.2.4	Datenanalyse und statistische Methodik	48
3	Ergebnisse	49
3.1	KE 3: Beeinflussung der Zellviabilität durch Polymyxine, Gentamicin, Vancomycin und Cadmiumchlorid im Zellkulturmodell	50
3.1.1	Zytotoxizität der Polymyxine, Vancomycin, Gentamicin und Cadmium in der Zelllinie RPTEC/TERT1 (KE 3)	50
3.1.2	Zytotoxizität der Polymyxine, Vancomycin, Gentamicin und Cadmium in der Zelllinie NRK-52E (KE 3)	53
3.1.3	Vergleich der toxischen Effekte der Polymyxine, Vancomycin, Gentamicin und Cadmium zwischen den Zelllinien RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen (KE 3).....	56
3.2	KE 2: Cathepsin D als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran ..	58
3.2.1	Messung der CTSD Signalintensität als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran in RPTEC/TERT1 Zellen (KE 2)	59
3.2.2	Messung der CTSD Signalintensität als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran in NRK-52E Zellen (KE 2).....	62

3.2.3	Vergleich der ermittelten Signalintensitäten für CTSD zwischen den Zelllinien RPTEC/TERT1 und NRK-52E (KE 2)	65
3.3	KE 1: Expression des lysosomal-assoziierten Membranproteins als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion	67
3.3.1	Messung der LAMP Signalintensität als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion in RPTEC/TERT1 Zellen (KE 1).....	67
3.3.2	Messung der LAMP Signalintensität als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion in NRK-52E Zellen (KE 1).....	70
3.3.3	Gegenüberstellung der ermittelten Signalintensitäten für LAMP2 in RPTEC/TERT1 Zellen und LAMP1 in NRK-52E Zellen (KE 1).....	73
3.4	Resümierende Darstellung der LAMP-Expression (KE 1), der CTSD Signalintensität (KE 2) und der Zytotoxizität (KE 3) unter Integration weiterer experimentell erhobener Daten der Arbeitsgruppe aufbauend auf der Methodik dieser Arbeit.....	75
4	Diskussion.....	78
4.1	Evaluierung der Methodik und Ergebnisse der gewählten Assays für die Schlüsselereignisse KE 3, KE 2 und KE 1	79
4.1.1	Evaluierung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Zellviabilität im Zellkulturmodell (KE 3).....	79
4.1.2	Bewertung der CTSD-Immunfluoreszenzfärbung als gewählte Methodik und Erörterung der Ergebnisse (KE 2).....	82
4.1.3	Beurteilung der Ergebnisse der LAMP-Immunfluoreszenzfärbung im Zellkulturmodell und Optimierungsmöglichkeiten der Methodik (KE 1).....	84
4.2	Charakteristika der verwendeten Zelllinien und Bewertung der Eignung für die entwickelte <i>in vitro</i> Methodik.....	86
4.3	Weiterführende Verwertung der Ergebnisse dieser Arbeit und Analysemethoden im Kontext des AOP-Konzepts.....	88
4.3.1	Response-Response-Analysen zur Herstellung quantitativer Beziehungen zwischen den Schlüsselereignissen des AOPs.....	88
4.3.2	Erstellung eines physiologisch basierten pharmakokinetischen (PBPK) Modells mittels Integration quantitativer <i>in vitro</i> zu <i>in vivo</i> -Extrapolation (QIVIVE).....	92
4.4	Bewertung des AOP-Konzepts als mechanistisches Instrument zur Reduzierung von Tierversuchen bei der Toxizitätsprüfung	93
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	95
5	Zusammenfassung	97

6	Literaturverzeichnis	98
----------	-----------------------------------	-----------

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Entwicklung alternativer Testmethoden für die Toxizitätsprüfung

Jeder Mensch ist im Laufe seines Lebens einer großen Menge an gesundheitsschädlichen Substanzen ausgesetzt. Zu vielen dieser Stoffe liegen bisher rudimentäre Informationen vor und es besteht ein hoher Bedarf der weiteren Erforschung und Testung (Prüss-Ustün et al., 2011). Da prognostiziert ist, dass die weltweite Chemikalienproduktion in den nächsten Jahren weiter steigen wird (Wilson und Schwarzman, 2009), spielt die *in vitro* Toxikologie eine wichtige Schlüsselrolle in der Prüfung und Risikobewertung von toxischen Substanzen für den Menschen (Vinken, 2013, OECD, 2012a). Die Herausforderung bei der Prüfung dieser Stoffe, wie beispielsweise von Chemikalien und Arzneistoffen, liegt vor allem darin neue Alternativen zu den regulatorisch geforderten Toxizitätstests zu finden, um einen gefahrlosen Umgang bei der Verwendung gewährleisten zu können (Hartung, 2011). Es gilt mehr Chemikalien mit weniger Ressourcen und Versuchstieren, aber trotz allem mit hoher Geschwindigkeit und Genauigkeit zu bewerten. Hierfür erstellt die Europäische Chemikalienagentur ECHA im Rahmen der Verordnung für die Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals [REACH]) ein immer weiterwachsendes Register von Chemikalien, die in ihren vielfältigen Wirkungen überprüft werden müssen (Ankley et al., 2010, European Chemicals Agency, 2021). Das zugrundeliegende Konzept von REACH beinhaltet die Sicherstellung der Herstellung, des Vertriebes und der Verwendung von Chemikalien in der gemeinsamen Verantwortung von Hersteller, Importeur und Anwender. Hierdurch soll das übergeordnete Ziel erreicht werden, die Umwelt und die menschliche Gesundheit vor schädlichen Einflüssen zu schützen (Lulei, 2008). Des Weiteren sind der Tierschutz und die Vermeidung von Tierversuchen ein wichtiges Ziel von REACH. Tierversuche sollen, sofern dies möglich ist, durch neue tierversuchsfreie Methoden ersetzt werden (Schulte et al., 2012).

Der Verantwortung zur Verbesserung und Vermeidung von Tierversuchen waren sich auch schon William Russell und Rex Burch bewusst. Sie veröffentlichten 1959 in ihrem Buch „The Principles of Humane Experimental Technique“ das ethische Prinzip der 3R: Replace, Reduce und Refine (Russell und Burch, 1959). Im Deutschen bedeuten diese

Begriffe Vermeiden, Verringern und Verbessern. Aus diesem Grund wird das Prinzip in Deutschland auch das 3V-Prinzip genannt. Diese ethische Richtlinie ist bis heute eine wichtige Grundlage bei der Planung und Genehmigung von Tierversuchen und ist in Deutschland im Tierschutzgesetz (TierSchG, BGBl. I S. 1206, 1313) und der Tierschutz-Versuchstierordnung (TierSchVersV, BGBl. I S. 3125, 3126) verankert (Lorz und Metzger, 2019). Dennoch beruht die Generierung vieler Toxizitätsdaten bis heute auf kostspieligen, aufwändigen und teilweise schwer auf den Menschen übertragbaren *in vivo* Versuchen an Tieren (Abbott, 2005, Barker-Treasure et al., 2015). Denn trotz allen Fortschritts sind Tierversuche zur Darstellung komplexer Mechanismen im lebendigen Organismus bis heute unerlässlich (Kohonen et al., 2014). Die für diese Art der Datenakquirierung notwendigen Ressourcen stehen jedoch im Widerspruch zu den heute bestehenden wachsenden Anforderungen (Ankley et al., 2010). Es besteht ein enormer Bedarf an kostengünstigen und effizienten Toxizitätstests (Tollefsen et al., 2014) um eine Reduktion von Tierversuchen beispielsweise durch den verstärkten Einsatz von *in silico* und *in vitro* Methoden zu erreichen (Bradbury et al., 2004).

Das optimale Vorhersagemodell einer Toxizität sollte das Prinzip des Akronyms ADME (**A**bsorption = Aufnahme, **D**istribution = Verteilung, **M**etabolism = Metabolisierung und **E**xcretion = Ausscheidung) beinhalten (Barker-Treasure et al., 2015). Die Darstellung dieser Teilprozesse der Verstoffwechselung einer Substanz im lebendigen Organismus ist eine große Herausforderung für alternative Testmethoden im Vergleich zum klassischen Tierversuch. Ein Ansatz zur Bewältigung dieses Problems ist es, mehrere *in vitro* Experimente aneinanderzureihen und mit anderen Methoden, wie zum Beispiel *in silico* Methoden der Computerwissenschaften, zu verknüpfen (Ankley et al., 2010, Barker-Treasure et al., 2015). Solche neuen tierversuchsfreien Ansätze können bereits integrierten Teststrategien hinzugefügt werden, die zur Reduzierung und zum Ersatz konventioneller *in vivo* Modelle beitragen (Vinken, 2013).

Ein zu diesem Zweck entworfener Ansatz einer effektiven Toxizitätstestung von Chemikalien ist das Konzept der integrierten Ansätze zur Prüfung und Bewertung (Integrated Approches to Testing and Assessment [IATA]) zusammen mit dem Wirkungskonzept des Adverse Outcome Pathway, kurz AOP genannt. Es bietet einen neuen mechanistischen Ansatz für die Verwertung und Verknüpfung neu generierter *in silico*, *in chemico* und *in vitro* Datensätze um Vorhersagen für die Auswirkungen *in vivo* zu treffen oder die erhobenen Daten mit bereits bestehenden *in vivo* Messungen vergleichen zu können (Tollefsen et al., 2014).

1.2 Das Adverse Outcome Pathway Konzept

Ein Adverse Outcome Pathway ist ein konzeptionelles Konstrukt, das auf der Basis bestehenden Wissens einen mechanistischen oder kausalen Zusammenhang zwischen einem initiierenden molekularen Ereignis (Molecular Initiating Event [MIE]) und einem adversen Effekt (Adverse Outcome [AO]) auf biologischer Ebene darstellt (Ankley et al., 2010). Es beschreibt auf diese Art und Weise zum Beispiel den Wirkmechanismus einer toxischen Substanz (Vinken, 2013). In ihrem Aufbau beinhalten AOPs eine sequentielle Reihe von Schlüsselereignissen (Key Events [KE]) auf mehreren Ebenen der biologischen Organisation (Ankley et al., 2010). Die Darstellung erfolgt in der Regel in Form eines Flussdiagramms, wie in Abbildung 1 dargestellt.

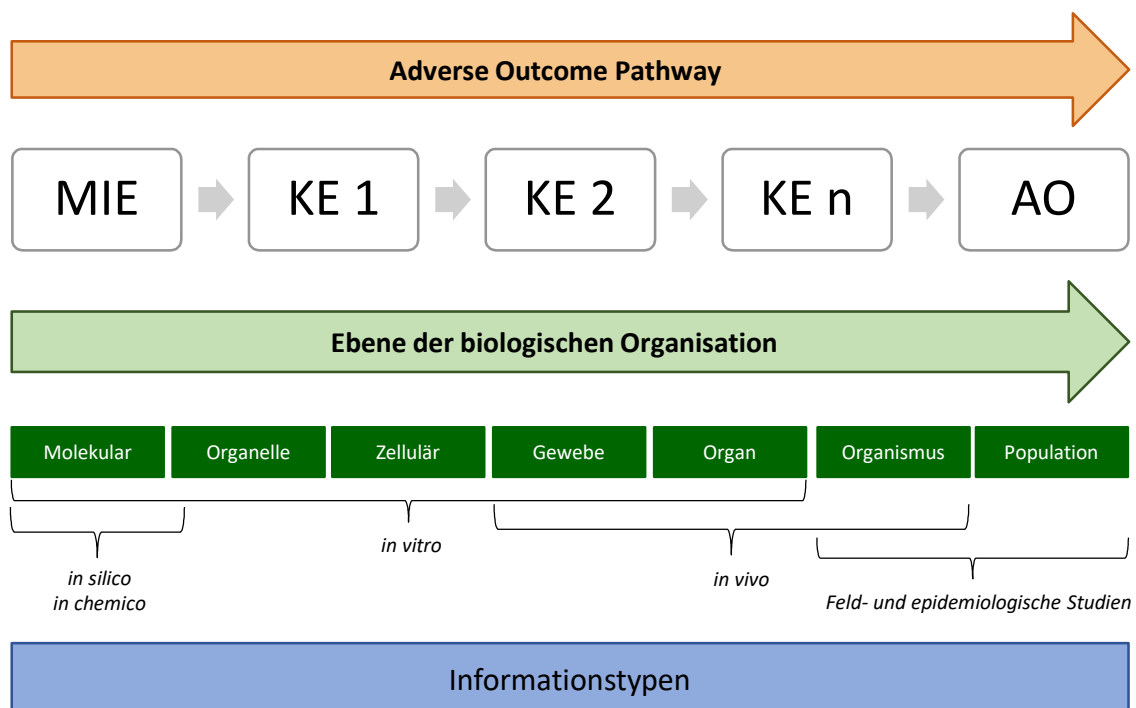


Abbildung 1: Aufbau und allgemeines Schema des AOP-Konzepts unter Integration der verschiedenen verwendbaren Informationstypen.

Ein AOP beginnt mit dem MIE. Diesem folgen beliebig viele KEs, welche in den AO münden. Das AOP-Konzept beschränkt sich hierbei nicht auf eine Ebene der biologischen Organisation. Es kann der gesamte Prozess von dem Beginn auf molekularer Ebene, bis zu den Auswirkungen auf eine gesamte Population betrachtet werden. Hierfür können verschiedene Informationstypen verwendet werden. Dazu gehören in erster Linie in silico, in chemico, in vitro und in vivo Methoden, sowie Feld- und epidemiologische Studien. Modifiziert nach (OECD, 2016). Abkürzungen: AO = Adverse Outcome (adverser Effekt), AOP = Adverse Outcome Pathway, KE = Key Event (Schlüsselereignis), MIE = Molecular Initiating Event (molekulares initiierendes Ereignis).

Dieses neue AOP-Konzept kann vielfältig genutzt werden, zum Beispiel für die Entwicklung und Verbesserung von *in vitro* Toxizitäts-Screeningtests. Die Darstellung, beispielsweise des Wirkmechanismus einer Substanz, beginnt mit der molekularen Interaktion auf der Zellebene und kann bis hin zu den Auswirkungen auf einzelne Organe, einen Organismus oder eine Bevölkerungsgruppe untersucht werden (Vinken, 2013).

Als Reaktion auf die zunehmende Verwendung des AOP-Konzepts hat die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Co-operation and Development [OECD]) einen Leitfaden erstellt, unter anderem um die Entwicklung und Bewertung der Vollständigkeit von AOPs zu fördern (OECD, 2012a). Dem Leitfaden der OECD folgend umfasst die AOP-Entwicklung drei aufeinanderfolgende Schritte bestehend aus der Festlegung der einzelnen Bestandteile des AOPs, mit folgender Datenerhebung und abschließender Evaluation und Bewertung (OECD, 2012a, Vinken, 2013). Der erste von drei Abschnitten eines AOPs ist das molekulare initiierende Ereignis. Diesem folgt eine Reihe von Schlüsselereignissen. Das Ende eines AOPs bildet der adverse Effekt (Vinken, 2013). Die Daten, die das MIE mit dem AO verbinden, können mithilfe diverser Methoden generiert werden, zum Beispiel über *in silico* Modelle, *in vitro* Tests oder aus schon bestehenden Daten konventioneller *in vivo* Experimente (Ankley et al., 2010). Das MIE beschreibt auf molekularer Ebene die erste relevante Interaktion einer Substanz mit einem biologischen System und ist von zentraler Bedeutung, da es durch den Anstoß einer Kaskade an KEs zu dem AO als Endpunkt führt. Im Gegensatz zum MIE kann der AO auf verschiedenen Ebenen der biologischen Organisation stattfinden, von der zellulären bis hin zur Populationsebene. Weiterhin kann es sich entweder auf einen akuten oder chronischen Verlauf sowie eine lokale oder systemische schädigende Wirkung beziehen. Ein wichtiger Schritt in jedem AOP ist die Bestimmung der Schlüsselereignisse. Diese KEs bilden relevante messbare Punkte in dem Wirkmechanismus einer untersuchten Substanz ab und können als Grundlage beispielsweise für die Etablierung von *in vitro* Toxizitäts-Screening-Tests dienen (Vinken, 2013).

1.3 Die Niere als Zielorgan toxischer Wirkung: Anatomische und physiologische Grundlagen der Niere sowie Ursachen und Folgen von Nephrotoxizität

Die beiden Nieren sind retroperitoneal gelegene Organe. Der makroskopische Aufbau gliedert sich in Nierenrinde (Cortex renalis), Nierenmark (Medulla renalis) und Nierenbecken mit sich anschließendem ableitendem Harnsystem (Sands und Verlander, 2005). In jeder menschlichen Niere befinden sich etwas 1 – 1,5 Millionen Nephrone, die kleinsten funktionellen Einheiten des Organs. Jedes Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und einem nachgeschalteten Tubulusapparat. In den Nierenkörperchen, bestehend aus Glomerulus und Bowman-Kapsel, werden pro Tag etwas 170 L Primärharn als Ultrafiltrat des Blutes gebildet (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012, Sands und Verlander, 2005). Während dieses Prozesses werden harnpflichtige Substanzen, aber auch exogen zugeführte Giftstoffe und Medikamente filtriert. Im nachgeschalteten Tubulussystem wird der Primärharn über verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel Resorption und Sekretion, modifiziert. Der Tubulusapparat ist eingeteilt in den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife und den distalen Tubulus (Abbildung 2) (Marquardt, 2013, Sands und Verlander, 2005). Die Flüssigkeit des Tubulussystems wird anschließend in den Sammelrohren zusammengefasst und über den Harnleiter (Ureter) in die Blase (Vesica urinaria) abgeleitet (Seegerer und Wanner, 2014). Eine weitere wichtige Aufgabe der Nieren sind neben ihrer Filtrations- und Entgiftungsfunktion auch die Kontrolle und die Regulierung des Wasserhaushaltes. Ebenfalls sind sie für die Biotransformation und Ausscheidung von Fremdstoffen verantwortlich. Im Rahmen ihrer endokrinen Funktion sind die Nieren zudem an der körpereigenen Hormonsynthese beteiligt (Sands und Verlander, 2005).

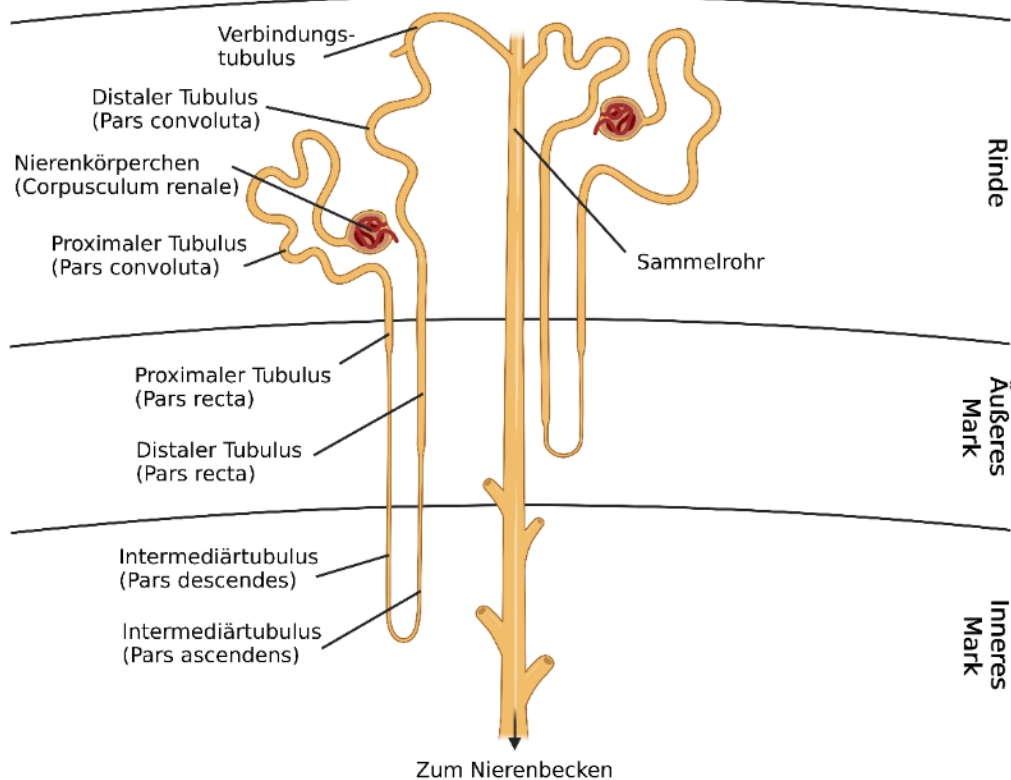


Abbildung 2: Aufbau des Tubulussystems der Niere.

Das Tubulussystem erstreckt sich vom Nierenmark bis in den Bereich der Nierenrinde. Der im Nierenkörperchen (Corpusculum renale) produzierte Harn wird in den proximalen Tubulus abgeleitet. Dem gewundenen Abschnitt (Pars convoluta) des proximalen Tubulus folgt der gerade Abschnitt (Pars recta). Dieser geht in den Intermediärtubulus mit zwei Anteilen über. Zunächst der absteigende Teil (Pars descendens) und diesem folgend ein aufsteigender Bereich (Pars ascendens). Es schließt sich der distale Tubulus an, ebenfalls mit einem geraden Abschnitt (Pars recta) und einem gewundenen Bereich (Pars convoluta). Die Flüssigkeit des Tubulussystems wird anschließend in den Sammelrohren zusammengefasst und über das Nierenbecken abgeleitet. Generiert mit BioRender.com (Lizenznummer: UE24AFK35B) und modifiziert nach (Sands und Verlander, 2005).

Viele Medikamente oder Chemikalien aus der Umwelt oder Industrie führen zu einer Nierenschädigung (Pfaller und Gstraunthaler, 1998). Die Niere stellt somit ein wichtiges Zielorgan für die Wirkung von toxischen Substanzen dar. Durch die Exposition gegenüber diesen Substanzen mit nierenschädigender Wirkung kann es beispielsweise zur Bildung von Nierentumoren oder zur Entwicklung einer Niereninsuffizienz kommen (Franchini et al., 2005, Pfaller und Gstraunthaler, 1998). Mit 25 % des Herzminutenvolumens gehört die Niere, neben dem Gehirn und der Lunge, zu den am besten durchbluteten Organen im menschlichen Körper (Dekant et al., 2005, Sands und Verlander, 2005). Dies macht sie auch besonders anfällig gegenüber Fremdstoffen aus dem Blutkreislauf. Durch diverse Konzentrationsvorgänge und Transportmechanismen,

wie zum Beispiel die Wiederaufnahme von filtrierten Substanzen aus dem Primärharn, kann es zur intrazellulären Akkumulation toxischer Substanzen in der Niere kommen (Hart und Kinter, 2005). Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf den Zellen des proximalen Tubulus. Die proximalen Tubuluszellen sind ein einschichtiges Epithel mit basaler Streifung und Mikrovilli in Form eines Bürstensaums. Der schematische Aufbau einer proximalen Tubulusepithelzelle ist in Abbildung 3 dargestellt. Diese Zellen sind im Tubulussystem für den Hauptanteil der Nierensekretion und Resorption gelöster Stoffe verantwortlich (Lepist und Ray, 2016) und verfügen über diverse Transporter und hohe Stoffwechselraten (Hall und Unwin, 2007).

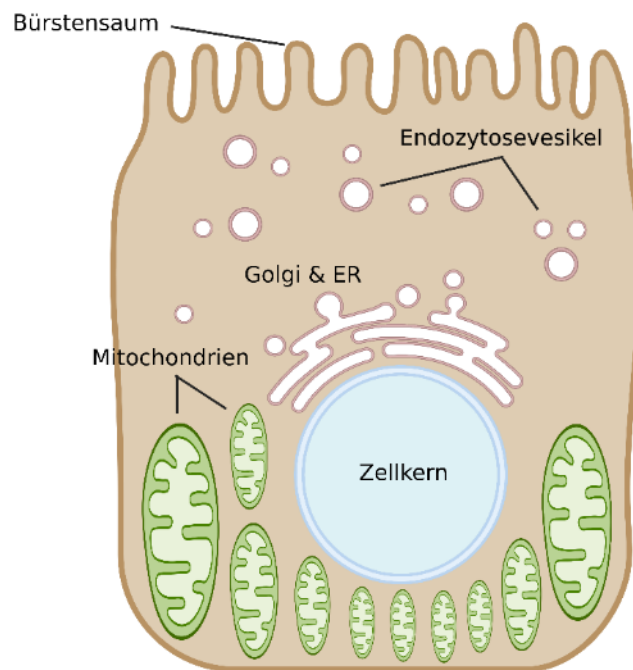


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer proximalen Tubulusepithelzelle inklusive relevanter Zellorganellen.

Die Epithelzellen des proximalen Nierentubulus besitzen einen stark ausgebildeten Bürstensaum. Am Apex der Zelle befinden sich Endozytosevesikel. Die länglichen Mitochondrien liegen zwischen den Einfaltungen der Basalmembran (hier nicht dargestellt) an der Basis im Zytosol der Zellen. Generiert mit BioRender.com (Lizenznummer: ZT24AFK9ZX) und modifiziert nach (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, Golgi = Golgi-Apparat.

Diese spezielle Zellmorphologie ermöglicht eine große Resorptionskapazität für Wasser, Ionen, Glukose, Aminosäuren und Proteine, aber auch für Fremdstoffe, wie Pharmaka (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012, Segerer und Wanner, 2014). Die Zellen verfügen über passive und aktive Transportmechanismen wie Carrier-Proteine oder Ionenkanäle sowie Mechanismen zur rezeptorvermittelten Endozytose. Diese über Endozytose

aufgenommenen Substanzen, wie beispielsweise Proteine, können dann bei intakter Funktion in den Lysosomen abgebaut werden (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012, Sands und Verlander, 2005). Aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität sind die proximalen Tubulusepithelzellen sehr empfindlich gegenüber toxischen Wirkungen, besitzen jedoch auch eine hohe Regenerationsfähigkeit (Marquardt, 2013).

1.4 Anwendung des AOP-Konzepts: Nephrotoxizität initiiert durch rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomalen Overload

Es erfolgte die Anwendung des AOP-Konzepts auf eine Fallstudie zu medikamentös induzierter Nephrotoxizität mit dem Titel „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“. Bestimmte Modellsubstanzen führen nach rezeptorvermittelter Endozytose über lysosomalen Overload zu einer Membranpermeabilisierung der Lysosomen. Die Freisetzung intralysosomalen Inhalts initiiert den Zelltod mit resultierender Nephrotoxizität und anschließendem Nierenversagen. Der vollständige AOP ist im AOPWiki mit der Nummer 257 zu finden (<https://aopwiki.org/aops/257>) (Mally, 2021).

1.4.1 Mechanistische Grundlage des AOPs und Erläuterung der molekularen Prozesse bis hin zu den Auswirkungen auf Organebene

Im Folgenden Abschnitt wird die mechanistische Grundlage dieses AOPs beschrieben. Eine Illustration des Prozesses zur detaillierten Veranschaulichung der molekularen Akteure sowie die schematische Darstellung mit der zugeordneten methodischen Ausarbeitung wurde in Abbildung 4 erstellt.

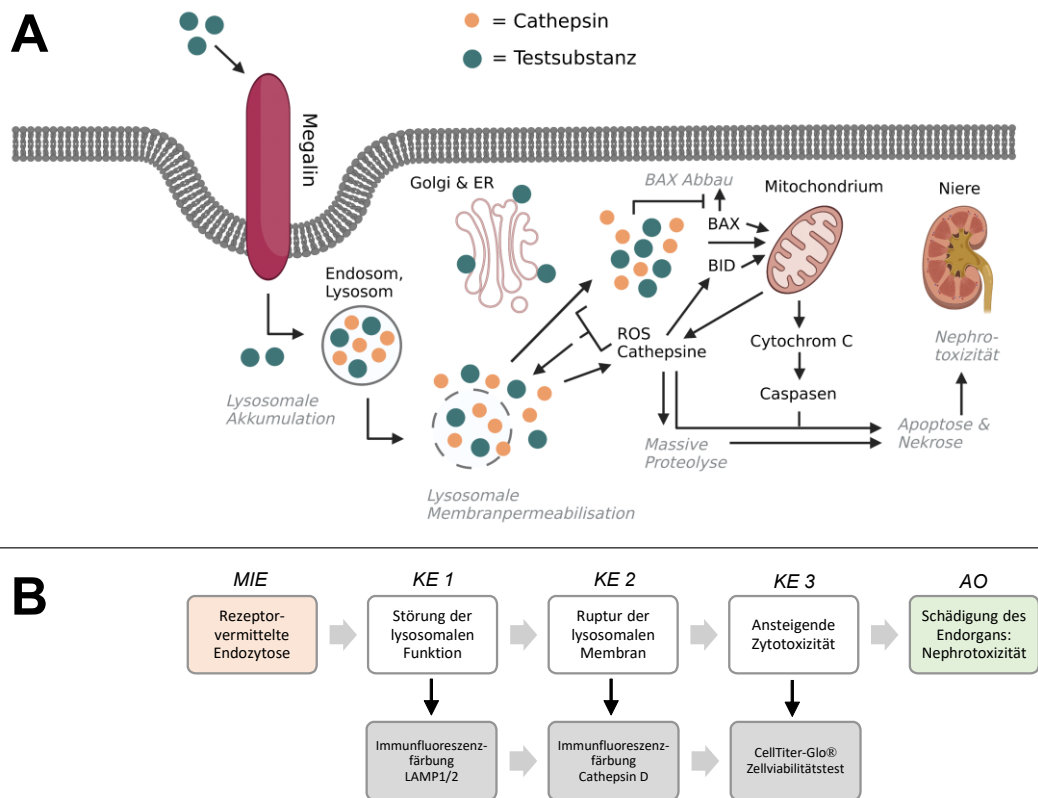


Abbildung 4: Darstellung der komplexen molekularen Mechanismen des AOPs „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“ in Kombination mit der gewählten Methodik für die einzelnen Schlüsselereignisse.

(A) Illustration der molekularen Mechanismen der einzelnen KEs des AOPs. Dieser Prozess findet am apikalen Bürstensaum der proximalen Nierentubuluszellen statt. Ein KE kann hierbei mehrere molekulare Prozesse vereinigen. (B) Aufbau des AOPs mit Beschreibung der einzelnen KEs im Zusammenhang mit der methodischen Umsetzung. (A,B) Hier ist das MIE als Bindung der Substanz an den Rezeptor Megalin und die anschließende Endozytose des Substanz-Rezeptor-Komplexes beschrieben. Die lysosomale Funktion wird durch die Akkumulation der Substanz intralysosomal beeinträchtigt (KE 1), bis das Lysosom rupturiert und der lysosomale Inhalt in das Zytosol der Zelle gelangt (KE 2). Dieser Mechanismus führt über verschiedene Wege, wie oxidativem Stress und Proteolyse zur Zytotoxizität und dem damit verbundenen Zelltod (KE 3). Der gesamte AOP mündet am Ende in eine Schädigung und einen Verlust des Nierengewebes, sodass die Toxizität der Substanzen auf der Organebene sichtbar wird (AO). Zur Untersuchung des KE 1 wurde die Immunfluoreszenzfärbung von LAMP1/2 gewählt. Für KE 2 wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Protease CTSD festgelegt. Zur Quantifizierung der Zytotoxizität (KE 3) wurden die Zellen mittels CellTiter-Glo® Zellviabilitätstest untersucht. Generiert mit BioRender.com (Lizenznummer: YZ24AFJT4Y) und modifiziert nach (Lopez-Novoa et al., 2011, Quiros et al., 2011). Abkürzungen: AO = Adverse Outcome (adverser Effekt), AOP = Adverse Outcome Pathway, BAX = Bcl-2-assoziiertes X Protein, Bcl-2 = B-cell lymphoma 2, BID = BH3-interacting domain death agonist, CTSD = Cathepsin D, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Golgi = Golgi-Apparat, KE = Key Event (Schlüsselereignis), LAMP = lysosomal-assoziiertes Membranprotein, MIE = Molecular Initiating Event (molekulares initiiendes Ereignis), ROS = Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies).

Jeder AOP beginnt mit dem MIE und startet in diesem Fall mit der Aufnahme der gewählten Modellschubstanzen (siehe Abschnitt 1.4.3) über Megalin (Moestrup et al., 1995, Schmitz et al., 2002, Suzuki et al., 2013). Megalin als Rezeptor befindet sich apikal

in der Membran der proximalen Nierentubuluszellen und kann über Liganden-vermittelte Endozytose zusammen mit der Substanz in die Zelle aufgenommen werden. Alle Serumproteine mit einer molekularen Masse unterhalb des Schwellenwertes der glomerulären Filtration von ca. 60 bis 80 kDa sind potentielle Liganden für Megalin (Motoyoshi et al., 2008). Beispiele für Megalin-Liganden sind Polymyxine wie Polymyxin B und Colistin, Glykopeptide wie Vancomycin und Aminoglykoside wie Gentamicin. Ebenso stellen im menschlichen Körper vorkommenden Proteinen, wie Albumin und Myoglobin, potentielle Bindungspartner dar (Hori et al., 2017, Moestrup et al., 1995, Suzuki et al., 2013).

Nach der Zellaufnahme befindet sich die Substanz in den Endosomen, welche mit den Lysosomen fusionieren. Durch die nun voranschreitende Akkumulation der toxischen Verbindung in den Lysosomen kann es zur Störung der lysosomalen Funktion (KE 1) und schlussendlich zur lysosomalen Membranpermeabilisierung (Lysosomal Membrane Permeabilization [LMP]) mit Freisetzung des lysosomalen Inhalts in das Zytosol der Zelle kommen (KE 2) (Dai et al., 2014). Durch die Ruptur der lysosomalen Membran werden proteolytische Enzyme, wie Cathepsine oder andere intralysosomale Substanzen, wie reaktive Sauerstoffspezies, in das Zytosol freigesetzt (Wang et al., 2018). Ist die Freisetzung der Cathepsine nur gering, wird von der Zelle über kontrollierte intrinsische und extrinsische Wege Apoptose initiiert (Vancompernelle et al., 1998, Wang et al., 2018). In Fällen der überschießenden Cathepsinfreisetzung beginnen die Proteasen, zytosolische Proteine abzubauen und führen durch Proteolyse zu einer unkontrollierten Zellnekrose (Kagedal et al., 2001, Li et al., 2000). Zudem wird die LMP auch durch Komponenten der intrinsischen Apoptose wie Caspasen, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Cathepsine weiter verstärkt, was in einen zur Apoptose führenden, sich selbst verstärkenden Circulus vitiosus mündet (Boya und Kroemer, 2008). Zusätzlich wird über die aus den Lysosomen freigesetzten Cathepsine, vor allem Cathepsin D (CTSD) und B (CTSB), proteolytisch das zytoplasmatische Protein BID (BH3-interacting domain death agonist) aktiviert. BID führt an Mitochondrien zu einer Freisetzung von Cytochrom C und verstärkt so den Mechanismus des Zelluntergangs (Kagedal et al., 2001). Auch die Aufnahme der toxischen Substanzen selbst in die Mitochondrien kann die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol auslösen und führt über die Aktivierung verschiedener Caspasen zur Apoptose (Kuwana et al., 2002). Des Weiteren können die toxischen Substanzen und Cathepsine aus den Lysosomen das pro-apoptotische Protein BAX (Bcl-2-associated X Protein) aktivieren (Bidere et al., 2003). Außerdem degradieren sie auch Mitglieder der anti-apoptotischen Kaskade wie Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), was zu

einer vermehrten Akkumulation von BAX führt (Stoka et al., 2001). Dies induziert die vermehrte Porenbildung durch einen Komplex aus den Proteinen BAX und BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer) in der äußeren Membran der Mitochondrien (Kagedal et al., 2005, Kuwana et al., 2002).

In einer Veröffentlichung von Green und Kroemer von 1998 argumentieren die Autoren, dass ein Hauptmechanismus der intrinsischen Apoptose in erster Linie über eine Membranpermeabilisierung der Mitochondrien abläuft, die durch verschiedene Mechanismen initiiert werden kann (Green und Kroemer, 1998). Neben der oben beschriebenen Permeabilisierung der Lysosomen spielt also ebenfalls die Membranruptur der Mitochondrien eine entscheidende Rolle in der Initiierung von Apoptose und Nekrose. Die Autoren Boya und Kroemer kamen in ihrer Veröffentlichung von 2008 zu dem Schluss, dass der lysosomalen Membranpermeabilisierung und dem anschließenden Zelltod sehr komplexe Mechanismen zugrunde liegen, bei denen die beteiligten molekularen Akteure sowohl zu LMP führen, als auch Folge der LMP sein können (Boya und Kroemer, 2008). Alle beschriebenen Schädigungsmechanismen führen über den Tod vieler einzelner Zellen (KE 3) zur Schädigung des Organs auf makroskopischer Ebene (definiert als AO).

Der beschriebene Mechanismus soll durch die Ausarbeitung in Form dieses AOPs als Grundlage für die Etablierung weiterer mechanistisch relevanter *in vitro* Endpunkte zur Prüfung auf Nephrotoxizität dienen. In Abbildung 4 B wurde eine schematische Darstellung der gewählten Indikatoren und der verwendeten Methodik in Gegenüberstellung mit den molekularen Mechanismen bis auf Organebene ausgearbeitet. Eine Erläuterung der Indikatoren sowie der Auswahl der Methodik ist in Abschnitt 2.2 zu finden.

1.4.2 Definition und Funktion von Lysosomen und ihren molekularen Markern

Erstmalig entdeckt wurden Lysosomen vor über 50 Jahren von Christian de Duve in einer Studie über die Verteilung intrazellulärer Enzyme (De Duve et al., 1955). Lysosomen sind von einer ca. 8 nm dicken Membran umschlossene Zellorganellen, die etwa 5 % des intrazellulären Volumens einnehmen und eine heterogene Größe und Morphologie aufweisen, abhängig von ihrer funktionellen Lage in der Zelle (Luzio et al., 2007, Wang et al., 2018). Die Funktionen der Lysosomen sind sehr vielfältig und beinhalten unter anderem den Abbau von über Endozytose und Phagozytose aufgenommenen Makromolekülen und Krankheitserregern (Johnson et al., 2016, Saftig und Klumperman, 2009). Neben der Degradierung und dem Recycling von extrazellulär aufgenommenen Substanzen, sind sie ebenfalls für den Abbau intrazellulärer Komponenten über Autophagie zuständig (Wang et al., 2018) sowie an der Einleitung der Apoptose beteiligt (Saftig und Klumperman, 2009). In der Niere gelangen Proteine mit niedrigem Molekulargewicht über den glomerulären Filter in das Tubulussystem und können hier von den Tubuluszellen rückresorbiert werden. Insbesondere die Zellen des proximalen Tubulus besitzen ein hohes Resorptionspotential (Segeer und Wanner, 2014). Wenn die aufgenommenen Proteine für die Zelle nicht weiter zu verwerten sind, werden sie in den Lysosomen abgebaut (Surendran et al., 2014). Ein Überblick der wichtigsten lysosomalen Funktionen ist in der folgenden Abbildung 5 dargestellt.

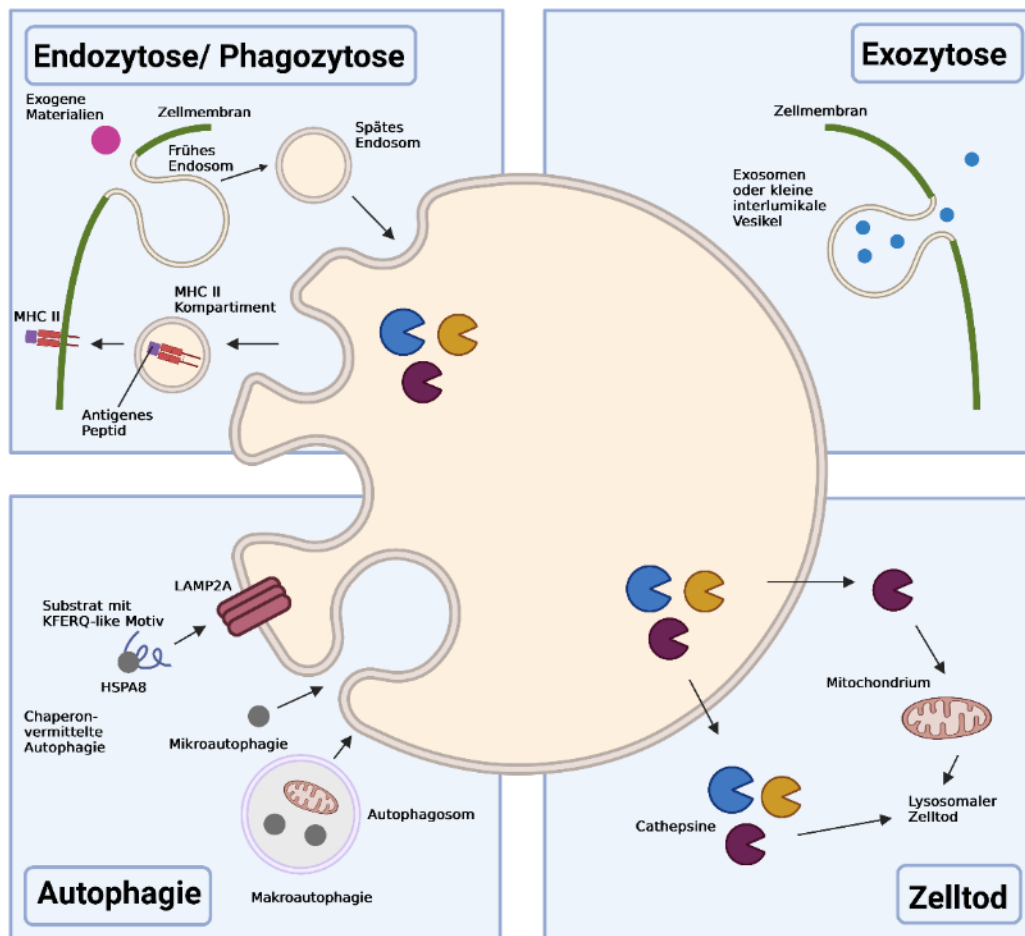


Abbildung 5: Überblick über die wichtigsten Funktionen eines Lysosoms.

Gezeigt sind wichtige lysosomale Funktionen wie Endo- und Exozytose, Autophagie und die Beteiligung an Mechanismen des Zelltods. Während einer lysosomalen Membranruptur können die Cathepsine, wie Cathepsin D, zum Tod der Zelle führen. LAMP ist Bestandteil des Autophagie-Prozesses und trägt zur Mobilität der Lysosomen bei. Generiert mit BioRender.com (Lizenznummer: WJ24AFJFRL) und modifiziert nach (Wang et al., 2018). Abkürzungen: HSPA8 = Heat shock 70 kDa protein 8, LAMP = lysosomal-assoziiertes Membranprotein, MHC = Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex).

Für eine ungestörte Funktion der Lysosomen sind verschiedene Proteine und Hydrolasen essentiell. Hierzu gehören die lysosomal-assoziierten Membranproteine (LAMP). Die LAMPs sind in der lysosomalen Membran vorkommende glykosylierte Transmembranproteine und für die Reifung der Phagosomen und die Bestimmung der Transportart der Vesikel essentiell (Saftig und Klumperman, 2009). Darüber hinaus geht man davon aus, dass sie die Lysosomen stabilisieren und vor dem Abbau durch ihre eigenen lysosomalen Enzyme schützen (Boya und Kroemer, 2008, Luzio et al., 2007). In einer Studie über die Autophagie in Lysosomen in menschlichen HK-2 Zellen des proximalen Nierentubulus von Liu et al. von 2015 wurde die Expression von LAMP nach der Behandlung der Zellen mit Substanzen, die eine LMP induzieren, untersucht. Hier

zeigte sich eine deutliche Zunahme der LAMP-Expression bei der Behandlung von Zellen mit LMP-induzierenden Substanzen, in diesem Fall glykierte Endprodukte (Liu et al., 2015). Aufgrund dessen kann man sich die Darstellung der LAMPs im Hinblick auf eine entstehende LMP zu Nutze machen.

Neben den beschriebenen Membranproteinen enthalten Lysosomen des Weiteren über 50 verschiedene Hydrolasen, wie zum Beispiel Cathepsine, die ein saures Milieu mit einem pH-Wert von 4-5 bevorzugen (Wang et al., 2018). Der intralysosomal niedrige pH wird über eine aktive ATPase aufrechterhalten (Mellman et al., 1986, Ohkuma et al., 1982). Die Cathepsine befinden sich im Inneren der Lysosomen. Die häufigsten Vertreter sind dabei die Endoproteasen Cathepsin D und Cathepsin B (Wang et al., 2018). Cathepsine spielen sowohl beim intrazellulären Proteinabbau und Energiestoffwechsel, als auch für die Signalübertragung in der Apoptose eine wichtige Rolle (Oberle et al., 2010). Insbesondere die Aspartylprotease Cathepsin D wurde mit der Apoptoseinduktion in Verbindung gebracht (Mrschik und Ryan, 2015) und wird in proximalen Tubuluszellen, einschließlich RPTEC/TERT1 Zellen, in mittleren bis hohen Mengen exprimiert (Wilmes et al., 2013). Wie die anderen lysosomalen Hydrolasen ist auch CTSD vor allem im sauren Milieu aktiv. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Protease auch außerhalb der Lysosomen bei neutralem pH-Wert aktiv sein kann (Boya et al., 2003, Schestkova et al., 2007). In der Zelle kann CTSD in intakten Lysosomen mittels Immunfluoreszenz visualisiert werden. Hierbei kann das Signal in Form von punktförmigen Strukturen aufgrund der Lokalisation in den Lysosomen mit intakter Membran detektiert werden. Nach der Membranruptur befinden sich die Cathepsine frei im Zytosol, was sich durch ein diffuses Signal im gesamten Zytoplasma zeigt (Boya et al., 2003, Kagedal et al., 2005, Park et al., 2006).

1.4.3 Chemikalien als Stressoren für den gewählten AOP

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanzen sind die Nierenschäden vorrangig auf den gemeinsamen Mechanismus der lysosomalen Schädigung zurückzuführen und der AOP wurde basierend auf diesem entwickelt. Bei den Substanzen handelt es sich um drei verschiedene Polymyxine (Polymyxin B, Colistin und Polymyxin B Nonapeptid), das Aminoglykosid Gentamicin, das Glykopeptid Vancomycin sowie Cadmiumchlorid. Eine Beschreibung der einzelnen Testsubstanzen einschließlich ihres Aufbaus, ihrer Verwendung sowie ihrer Wirkung auf die Niere erfolgt in diesem Abschnitt.

1.4.3.1 Polymyxine: Polymyxin B, Polymyxin B Nonapeptid und Colistin

Bei der 1947 erstmalig entdeckten Gruppe der Polymyxine handelt es sich um früher häufig verwendete Peptidantibiotika (Stansly und Schlosser, 1947). Polymyxine sind schnell wirksame bakterizide Substanzen, die mit den Lipopolysacchariden der äußeren Membran gramnegativer Bakterien interagieren und so eine erhöhte Permeabilität der bakteriellen Zellmembran bewirken. Diese Membranschädigung führt zur Lyse des Bakteriums (Zavascki et al., 2007). Lediglich Polymyxin B (PMB) und Colistin (COL), auch Polymyxin E genannt, sind derzeit im klinischen Gebrauch vorrangig als Reservesubstanzen im Einsatz (Vattimo et al., 2016). Ihre amphipathischen, kationischen Strukturen bestehen aus hydrophilen und hydrophoben Anteilen und unterscheiden sich nur geringfügig durch den Austausch einer Aminosäure. COL trägt in seiner Ringstruktur die Aminosäure D-Leucin, während es sich bei PMB an der vergleichbaren Stelle um D-Phenylalanin handelt (Velkov et al., 2010, Yun et al., 2015). In Abbildung 6 sind die chemischen Strukturen der beiden Polymyxin-Antibiotika dargestellt.

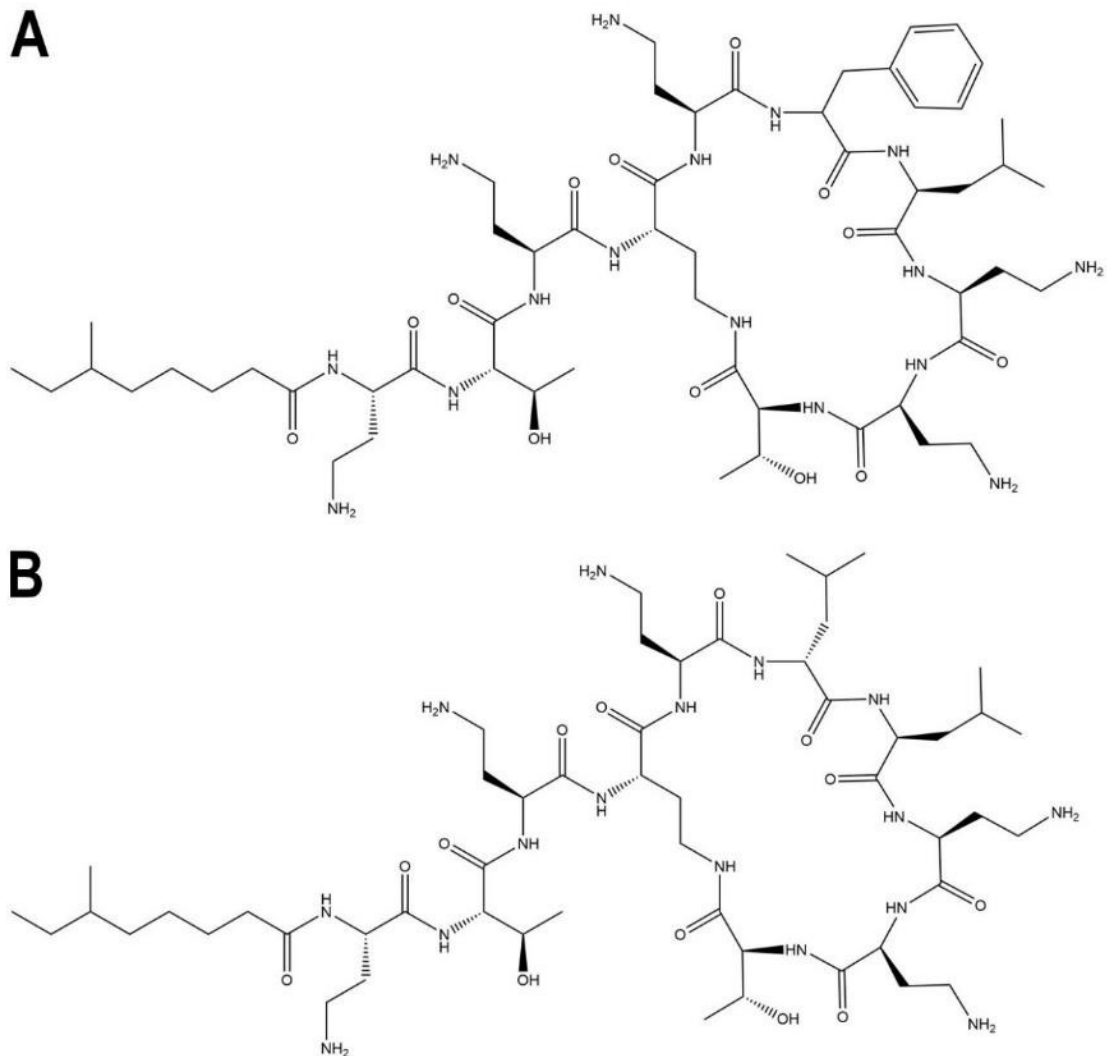


Abbildung 6: Chemische Struktur von Polymyxin B und Colistin.

Bei den Polymyxinen handelt es sich um polar aufgebaute, verzweigte, zyklische Dekapeptide aus zehn Peptiden. Eine 6-Methyl-Octansäure befindet sich am N-Terminus. Diese Fettsäure bildet den hydrophoben Teil des Moleküls. Ebenfalls verfügen Polymyxine über einen hydrophilen, Kationen-aktiven Bereich. (A) Strukturformel von Polymyxin B mit der Aminosäure D-Phenylalanin (B) Strukturformel von Colistin mit der Aminosäure D-Leucin. Modifiziert mit ChemDraw 19.0 nach (Yoshino et al., 2013).

Seit einigen Jahren werden die Polymyxine in streng regulierten Dosierungen als wirksame Reservemittel bei Infektionen durch multiresistente gramnegative Krankheitserreger, wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* oder *Klebsiella species*, eingesetzt (Falagas und Kasiakou, 2005). COL wird dabei deutlich häufiger im klinischen Alltag verwendet als PMB (Li et al., 2006). Die klinische Anwendung der Polymyxine war in den 1970er Jahren zuvor deutlich reduziert und fast vollständig eingestellt worden (Vaara, 2010). Der Rückgang der Verwendung erfolgte aufgrund der erheblichen neuro-

und nephrotoxischen Nebenwirkungen (Boucher et al., 2009, Falagas und Kasiakou, 2005).

Viele Medikamente verursachen Nierenschäden über renale Minderperfusion, tubulären Zellverlust, Entzündung und oxidativen Stress (Schetz et al., 2005). Bei den Polymyxinen sind die toxischen Effekte bedingt durch die Akkumulation der Substanzen im Nierengewebe der Patientinnen und Patienten und stellen bis heute den dosislimitierenden Faktor in der klinischen Verwendung dar (Vattimo et al., 2016). Nierenschäden kommen bei bis zu 60 % aller Personen, die mit einem Polymyxin behandelt werden vor (Hartzell et al., 2009, Kubin et al., 2012, Yun et al., 2015). Dabei sind diese bei Patientinnen und Patienten mit vorbestehenden Nierenschäden deutlich stärker ausgeprägt als bei normaler Nierenfunktion. Des Weiteren korreliert die Schwere der Nierenschädigung mit dem zunehmenden Alter der Patientinnen und Patienten (Vaara, 1992). PMB und COL wurden mehrfach in der Vergangenheit im Hinblick auf ihre nephrotoxische Wirkung getestet. Hierbei wurde beobachtet, dass sich PMB *in vitro* als toxischer im Vergleich zu COL herausstellte, während *in vivo* COL ein größeres toxisches Potential aufwies (Roberts et al., 2015, Zavascki und Nation, 2017). Aufgrund der ausgeprägten Nebenwirkungen wird derzeit intensiv an der Entwicklung weniger toxischer Derivate geforscht (Mingeot-Leclercq et al., 2012). Auch wenn es bereits umfassende Studien bezüglich der Wirkungsweise der Polymyxine gibt, sind sie auch weiterhin Teil aktueller Forschung. Der Großteil des glomerulär filtrierten PMB wird in den tubulären Epithelzellen rückresorbiert. Dies erklärt die massive Akkumulation der Substanz in den Zellen. Da der Abschnitt des proximalen Tubulus eine besonders hohe Stoffwechselaktivität besitzt, sind vor allem die Zellen in diesem Abschnitt des Tubulussystems betroffen (Kubin et al., 2012, Sandri et al., 2013, Yun et al., 2015, Zavascki et al., 2007). Die hier beschriebene nephrotoxische Wirkung der Polymyxine entspricht dem zugrundeliegenden Mechanismus des untersuchten AOPs im Rahmen dieser Arbeit. Azad et al. zeigten in einer Studie von 2015, dass Polymyxine *in vitro* in renalen Tubuluszellen zu oxidativem Stress, DNA-Schäden und morphologischen Veränderungen der Mitochondrien führen (Azad et al., 2015). Als Folge der ausgeprägten Schädigung wurde in den betroffenen Zellen Apoptose initiiert (Azad et al., 2013). Auf molekularer Ebene werden Polymyxine über Megalin-vermittelte Endozytose aus dem Harn in die Zellen der proximalen Tubuli aufgenommen. Da es sich um lipophile Basen handelt, gelten Polymyxine als lysosomotrop und akkumulieren in den Lysosomen (Manchandani et al., 2017, Moestrup et al., 1995, Pavelka und Roth, 2005). Für die folgende lysosomale Membranpermeabilisierung sind detergensähnliche

Effekte verantwortlich, welche die lysosomale Membran destabilisieren (Boya et al., 2003). Als Folge der lysosomalen Ruptur kommt es zur Zytotoxizität im Nierengewebe (Azad et al., 2013).

Polymyxin B Nonapeptid (PMBN) ist ein Derivat von PMB, das sich durch das Fehlen des Fettsäurerestes sowie eines Moleküls Diaminobuttersäure von PMB unterscheidet (Vaara, 1992). Seine chemische Struktur ist in Abbildung 7 dargestellt.

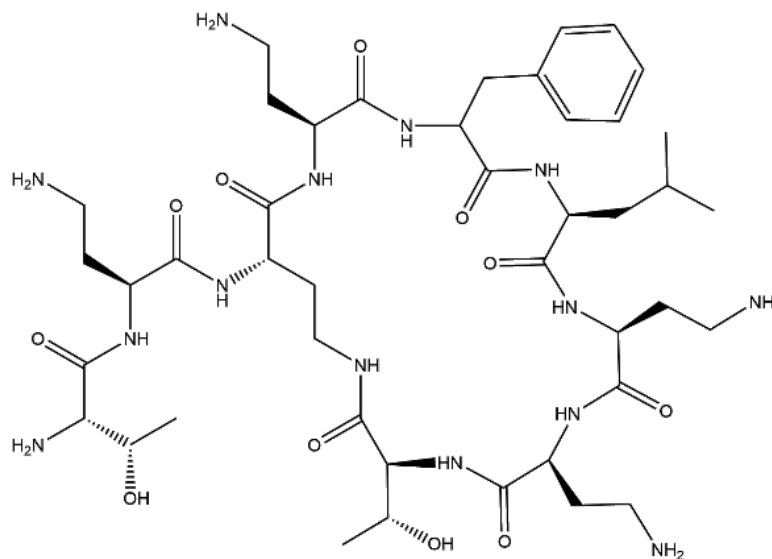


Abbildung 7: Chemische Struktur von Polymyxin B Nonapeptid.

Der Aufbau gleicht der chemischen Struktur von Polymyxin B, wie in Abbildung 6 (A) dargestellt, bis auf das Fehlen des Fettsäurerestes am N-Terminus sowie einer Diaminobuttersäure. Wie Polymyxin B verfügt Polymyxin B Nonapeptid über die Aminosäure D-Phenylalanin in seiner Ringstruktur. Modifiziert mit ChemDraw 19.0 nach (Yoshino et al., 2013).

Polymyxin-Derivate wie PMBN sind deutlich weniger potent als PMB gegen oben genannte Erreger. PMBN verfügt jedoch über die Fähigkeit die Außenmembran der Bakterien zu permeabilisieren und kann somit den Eintritt anderer Antibiotika erleichtern. Es wird aus diesem Grund auch Permeabilisator genannt (Vaara, 1992). Bisher wurde PMBN in mehreren *in vitro* Studien kurz nach seiner Entdeckung (Vaara, 1992), sowie nachfolgenden Untersuchungen zur Entwicklung von Antibiotika und Studien zur molekularen und zellulären Biologie von Bakterien verwendet. Diese Studien sind in einem Artikel von M. Vaara von 2019 aufgeführt (Vaara, 2019). Es wurde berichtet, dass das Fehlen des lipophilen Schwanzes nicht nur zu einer Verringerung der antibakteriellen Aktivität, sondern auch zu einer Abnahme der nephrotoxischen Wirkung führt. Diese Verringerung der Toxizität wurde beispielsweise in einer Studie von Keirstead et al. von 2014 nachgewiesen (Keirstead et al., 2014). Es wird vermutet, dass

die Toxizität von Polymyxinen vorrangig durch ihren D-Aminosäuregehalt und ihre Fettsäurekomponente zustande kommt. Dies legt nahe, dass die nachgewiesene Verringerung der toxischen Wirkung bei PMBN aus dem Fehlen des lipophilen Fettsäurerestes resultiert (Berg et al., 1996, Berg et al., 1998).

1.4.3.2 Aminoglykoside: Gentamicin

Gentamicin (GEN) wird der Klasse der Aminoglykosidantibiotika zugeordnet und vor allem für die Behandlung pulmonaler, okulärer und intestinaler Infektionen mit gramnegativen Bakterien verwendet (Chen und Kaye, 2009). Aminoglykoside besitzen aufgrund ihrer vielen Aminogruppen eine kationische Struktur. Dieser Aufbau ist maßgeblich an der Schädigung des Nieren- und Hörgewebes beteiligt, in welchem die Antibiotika akkumulieren (Moore et al., 1987). Trotz der unerwünschten Nephro- und Ototoxizität sind Aminoglykosidantibiotika oftmals die einzig wirksame Alternative bei multiresistenten Keimen (Lopez-Novoa et al., 2011). Vorteile der Aminoglykoside sind hierbei vor allem die schnelle bakterizide Wirkung, ihre chemische Stabilität, die geringe Resistenzlage und der niedrige Kostenaufwand (Edson und Terrell, 1999). Verwendete Wirkstoffe sind Gentamicin und Tobramycin sowie die halbsynthetischen Derivate Netilmicin und Amikacin (Laurent et al., 1990). GEN ist der bekannteste Vertreter der Aminoglykoside und wird trotz seiner ausgeprägten nephrotoxischen Wirkung häufig im klinischen Alltag verwendet (Lopez-Novoa et al., 2011). In Abbildung 8 ist die chemische Struktur von Gentamicin C dargestellt.

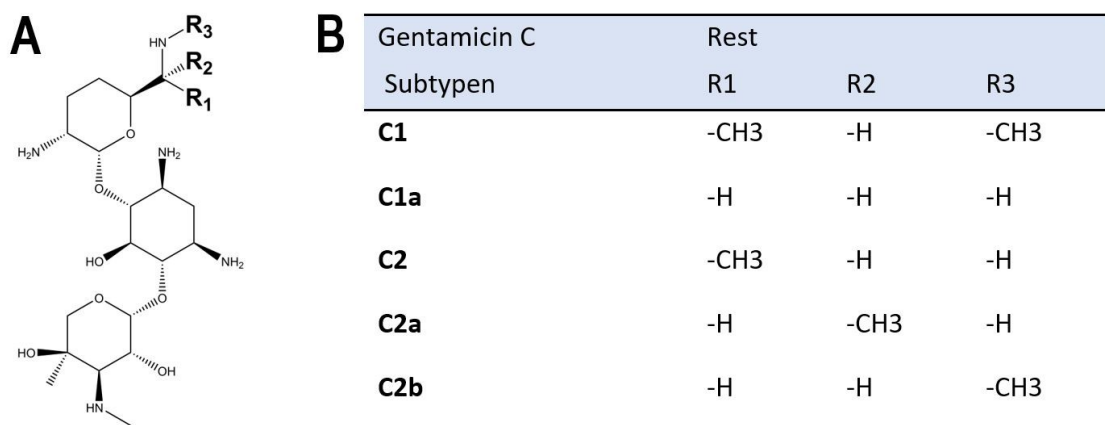


Abbildung 8: Chemische Struktur von Gentamicin Typ C.

Der pharmazeutisch genutzte Wirkstoff enthält fast ausschließlich Gentamicin vom Typ C. Dies stellt wiederum ein Gemisch der verschiedenen Unterformen C1, C1a, C2, C2a und C2b dar. **(A)** Chemische Struktur von Gentamicin mit Markierung der unterschiedlichen Reste. **(B)** Tabelle zur

Unterscheidung der einzelnen Subtypen von Gentamicin C mit Erläuterung der Reste 1, 2 und 3. Modifiziert mit ChemDraw 19.0 nach (Hermann, 2007).

Die durch GEN induzierte Nephrotoxizität manifestiert sich als nicht-oligurische Niereninsuffizienz und geht mit einem Anstieg des Serumkreatinins einher (Mingeot-Leclercq und Tulkens, 1999). Neben einer Störung der glomerulären Filtration und vaskulären Effekten ist der Hauptort der Schädigung durch GEN das Tubulussystem der Niere. Hier kommt es vor allem zur Akkumulation des Antibiotikums in den Epithelzellen des proximalen Tubulus, assoziiert mit einer entzündlichen Komponente (Lopez-Novoa et al., 2011). Diese Akkumulation der Substanz in Zellen des proximalen Nierentubulus konnte sowohl im Tierversuch (Pattyn et al., 1988) als auch im Menschen (Verpooten et al., 1989) nachgewiesen werden. Der Rezeptor Megalin ist an Endozytose-Mechanismen der Zelle beteiligt und kommt vor allem im proximalen Tubulus vor. Dieser Rezeptor führt zu einer Aufnahme von GEN mittels Endozytose. Zellen mit einer hohen Expression des Rezeptors Megalin weisen ebenfalls eine hohe intrazelluläre Konzentration von GEN auf (Schmitz et al., 2002). In der Zelle wandert der Endozytose-Komplex aus Megalin und GEN durch das endosomale Kompartiment und akkumuliert hauptsächlich in den Lysosomen, dem Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum (Silverblatt, 1982, Silverblatt und Kuehn, 1979). Sobald die Konzentration des Aminoglykosids in den Lysosomen eine unbestimmte Schwelle überschreitet, führt dies zur Ruptur der lysosomalen Membran. Hierbei wird deren Inhalt in das Zytosol freigesetzt (Ngaha und Ogunleye, 1983, Regec et al., 1989). Lysosomen enthalten hochaktive Proteasen, die Cathepsine, welche in der Lage sind über die Spaltung von Caspasen und die proteolytische Aktivierung von BID (BH3-interacting domain death agonist Protein) den Zelltod in Form der Apoptose einzuleiten (Chwieralski et al., 2006, Ngaha und Ogunleye, 1983, Yin, 2006). Sobald sich sehr große Mengen an Cathepsinen im Zytosol befinden, kann es neben dem geregelten Zelltod über Apoptose auch zu einer massiven Proteolyse im Zellinneren kommen, was wiederum zu einer Zellnekrose führt (Golstein und Kroemer, 2007). Des Weiteren wird die Einleitung der Apoptose durch die direkte und indirekte Wirkung des zyotosolischen GEN auf die Mitochondrien (Mather und Rottenberg, 2001) und die Entstehung von oxidativem Stress begünstigt (Walker und Shah, 1988).

1.4.3.3 Glykopeptide: Vancomycin

Vancomycin (VAN) ist ein Glykopeptidantibiotikum, das erstmals im Jahr 1952 aus dem Bodenbakterium *Amycolatopsis oerientalis* isoliert und 1958 von der United States Food and Drug Administration (FDA) für den Patientengebrauch zugelassen wurde (Anderson et al., 1961, Levine, 2006). Dennoch wurde das neue Antibiotikum zunächst sehr wenig verwendet, da es vorrangig durch Verunreinigungen zu vielen Nebenwirkungen wie Fieberreaktionen, Ototoxizität, Venenentzündungen und Nephrotoxizität kam (Geraci et al., 1962, Griffith, 1981). In den 1970er Jahren kam es durch das weltweit vermehrte Aufkommen von Methicillin-resistenten Staphylokokken und der mittlerweile erreichten hohen Reinheit der Substanz zu einer vermehrten Verwendung von VAN (Griffith, 1981, Moellering, 2006). Seit den 1980er Jahren wurde es als wirksame Alternative gegen nosokomiale Infektionen mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* oder *Enterokokken* und bei der antibiotikaassoziierten pseudomembranösen Enterokolitis eingesetzt (Geraci et al., 1956, Levine, 2006, Peacock et al., 1980). Das Wirkspektrum der Glykopeptide ist aufgrund ihrer Größe und hydrophilen Eigenschaften auf grampositive Bakterien beschränkt. Die chemische Struktur von VAN ist in Abbildung 9 dargestellt.

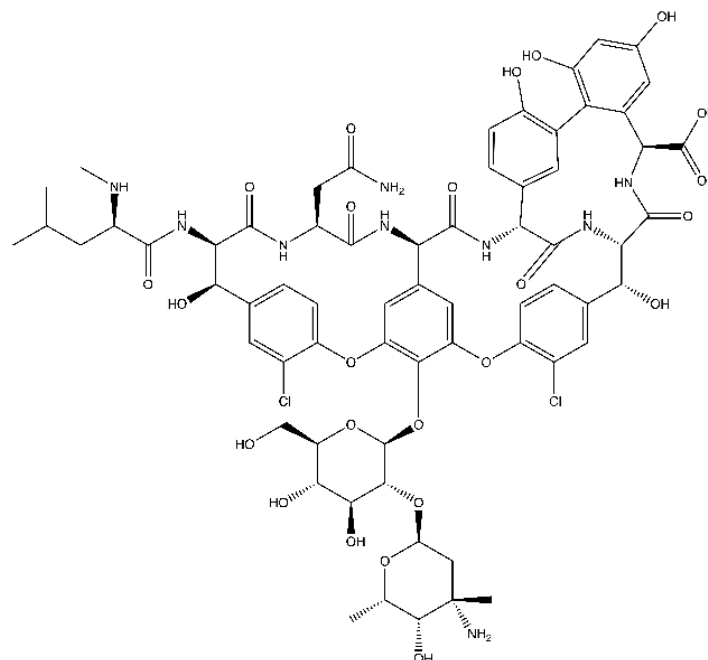


Abbildung 9: Chemische Struktur von Vancomycin. Vancomycin besteht aus drei Makrozyklen, zwei sechzehngliedrigen und einem zwölfgliedrigen Heterozyklus. Zudem enthält die Struktur von Vancomycin sieben Aminosäurebausteine. Modifiziert mit ChemDraw 19.0 nach (Freissmuth, 2020).

Seine bakterizide Wirkung beruht auf der Hemmung der Bildung von Quervernetzungen während des Aufbaus der Zellwand grampositiver Bakterien. Bei der Anwendung von VAN sind diverse Nebenwirkungen wie Ototoxizität, Phlebitis, Rötungen und Nephrotoxizität zu beachten (Freissmuth, 2020). Um die Entstehung der Nierenschädigung zu verstehen, ist es wichtig die genauen zellulären Auswirkungen von VAN in der Niere zu kennen. 1992 konnte erstmals die Lokalisation und Akkumulation von VAN in den Lysosomen von proximalen Nierenzellen visualisiert werden (Beauchamp et al., 1992). VAN wird durch rezeptorvermittelte Endozytose über Megalin mittels Endosomen in die Zellen aufgenommen. Die Endosomen fusionieren mit den Lysosomen. Als Folge kann es zu einer lysosomalen Membranruptur mit ausgeprägter Freisetzung von intralysosomalen Bestandteilen in das Zytosol kommen. Über diesen Mechanismus kann die Apoptose oder durch intrazelluläre Proteolyse die Nekrose eingeleitet werden (Boya und Kroemer, 2008, Pais et al., 2020). Eine Veröffentlichung von Fujiwara et al. von 2012 konnte bestätigen, dass VAN in der Niere neben den Zellen des distalen Tubulus und der Sammelrohre vor allem von den stoffwechselaktiven Epithelzellen des proximalen Tubulus aufgenommen wird und hier zu einer Schädigung führt. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte in mit VAN und GEN behandelten Ratten eine Kolokalisation der beiden Medikamente in den Lysosomen der Zellen des proximalen Tubulus nachgewiesen werden (Fujiwara et al., 2012). Die akute tubuläre Nekrose wird durch verschiedene Mechanismen ausgelöst. In den Zellen kommt es beispielsweise zu vermehrtem oxidativem Stress (Nishino et al., 2003, Pais et al., 2020). Die Mitochondrien setzen zudem Cytochrom C frei. Durch die Aktivierung von Caspasen wird Apoptose induziert (Arimura et al., 2012, Pais et al., 2020).

1.4.3.4 Cadmium

Cadmium ist ein weit verbreiteter toxischer Schadstoff, der vor allem über Zigarettenrauch, Lebensmittel, Wasser und Luftverschmutzung von Mensch und Tier aufgenommen wird (Rani et al., 2014). Cadmium bewirkt vielfältige toxische Effekte, darunter Kanzerogenität, Teratogenität und Nephrotoxizität (Jarup, 2002, Rani et al., 2014). Im Hinblick auf die Nephrotoxizität sind verschiedene schädigende Mechanismen durch Cadmium bekannt, wie die Bildung von oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Rani et al., 2014), die Störung von DNA-Reparaturmechanismen (Giaginis et al., 2006) und eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose (Achanzar et al., 2002). Sobald Cadmium in den Blutkreislauf des Körpers

gelangt ist, wird es zunächst zur Leber transportiert und induziert dort die Synthese von Metallothionein. Metallothionein bindet Cadmium und mildert somit seine toxische Wirkung etwas ab. Der Cadmiummetallothionein-Komplex wird anschließend erneut in den Blutkreislauf freigesetzt (Jin et al., 1998, Klaassen et al., 2009). In den Nieren wird er über die Glomeruli filtriert und kann anschließend über Megalin-vermittelte Endozytose von den Epithelzellen des proximalen Tubulus wieder aufgenommen werden (Klaassen et al., 2009). Somit erleichtert Cadmiummetallothionein die Aufnahme von Cadmiumionen in die Nierenzellen (Klaassen und Liu, 1997, Prozialeck und Edwards, 2012). Cadmiummetallothionein wird in den Lysosomen der Nierentubuluszellen abgebaut und Cadmiumionen werden freigesetzt. Diese werden, soweit möglich, an von den Tubuluszellen neu gebildetes Metallothionein gebunden (Nordberg et al., 1971). Sobald alle Metallothionein-Bindungsstellen gesättigt sind, können nicht mehr alle anfallenden Cadmiumionen in den Tubuluszellen gebunden werden, was zu einer Schädigung der Nierentubuli und einer Ausscheidung von Cadmium über den Urin führt (Goyer et al., 1989, Thévenod und Friedmann, 1999). Wichtig für den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten AOP ist der Mechanismus der Nephrotoxizität, verursacht durch lysosomale Schädigung. Hierzu wurde 2017 eine *in vitro* Studie von Lee et al. an NRK-52E Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass es bereits ab Konzentrationen von 10-25 μM von in fötalem Rinderserum gelösten Cadmiumionen zu einer Störung der lysosomalen Funktion und einer Schädigung dieser kam (Cherian, 1980, Jin et al., 1986, Lee et al., 2017). Zusammengefasst ist die nephrotoxische Wirkung von Cadmium bis heute noch unzureichend verstanden und setzt sich aus vielen verschiedenen Mechanismen und Aspekten zusammen.

1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Doktorarbeit ist es, einen Beitrag zur Entwicklung innovativer, tierversuchsfreier *in vitro* Testsysteme zur Prüfung der systemischen Toxizität im Rahmen der prädiktiven Toxikologie zu leisten. Die Arbeit konzentriert sich hierbei auf die schädigende Wirkung von ausgewählten Modellsubstanzen auf die proximalen Tubuluszellen der Niere, die ein wichtiges Hauptziel toxischer Wirkungen von Medikamenten und Chemikalien darstellen. Im Detail soll das bestehende Wissen darüber, wie rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload zu Nephrotoxizität führen, im Rahmen des AOP-Konzepts angewendet werden. Hierbei soll geprüft werden, ob es möglich ist Schlüsselereignisse im Mechanismus durch einzelne *in vitro* Assays abzubilden und ob diese für eine *in vitro* Prüfung sowie eine präzise Toxizitätsvorhersage geeignet sind. Durch die neu gewonnene Kenntnis aus dieser Fallstudie ist es das Ziel der Arbeit, zur Entwicklung neuer toxikologischer Prüfverfahren für unbekannte Chemikalien und damit zur Reduzierung von Tierversuchen beizutragen. Um dies zu erreichen, wurden die spezifischen strategischen Ziele dieser Dissertation wie folgt definiert:

1) Etablierung von *in vitro* Assays für die dem AOP zugrundeliegenden Schlüsselereignisse in kultivierten Nierenepithelzellen, insbesondere

a) Identifizierung eines geeigneten Endpunkts für die Störung der lysosomalen Funktion (KE 1) und darauf basierende Entwicklung und Etablierung eines *in vitro* Assays zur Visualisierung und Quantifizierung dieses Endpunktes.

b) Auswahl eines geeigneten Endpunkts zur Visualisierung und Quantifizierung der lysosomalen Membranpermeabilisierung (KE 2) zur Ausarbeitung eines *in vitro* Assays.

2) Evaluierung und Bewertung der etablierten *in vitro* Assays durch Modellstressoren für den untersuchten AOP und Generierung von Dosis-Wirkungs-Kurven.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Ausrüstung

Table 1: Liste der verwendeten technischen Ausrüstung in alphabetischer Reihenfolge mit Herstellerangabe.

Gerät	Hersteller
μ-Slide 8 Well (8-Well-Chamber Slide)	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
96-Well-OptiPlate	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
96-Well-Platten	Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Anfärbesystem Stain Tray (Feuchte Kammer)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Autoklav Typ 28	MELAG Medizintechnik, Berlin, Deutschland
Feinwaage AG245	Mettler, Giessen, Schweiz
Filterpapier Bögen	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland
Herdplatte mit Rührer IKA-Combimag Typ RCT	IKA – Werk, Staufen im Breisgau, Deutschland
Inkubator BB 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Konfokalmikroskop Leica TCS SP5, DEMI6000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Konfokalmikroskop Objektiv, Leica HCX PL APO lambda blue 63.Dx 1.40 OIL UV	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop TMS-F No. 300619 & Objektiv Nikon 0,3 A	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Luminometer Mithras LB 940	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Messpipetten (2 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikroskop Immersionsöl, 50101	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Multipipette (200 μL), Transferpette S-8	Brand, Wertheim, Deutschland
ph-Meter, pH 526	Wissenschaftlich – Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Pipette (10 μL)	Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (20 μL, 200 μL, 1000 μL)	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe Accu-jet	Brand, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Gerät	Hersteller
Sicherheitswerkbank Antair BSK 6	Dietmar Müller Labortechnik, Windhangen, Deutschland
Sterilfiltersystem SST2 (Porengröße 0,2 µm)	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland
Tisch-Zentrifuge Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Vortex-Schüttler L 46	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland
Wasserbad mit Schüttler, Julabo SW-20C/2	Edmund Bühler, Bodelshausen, Deutschland
Zellkulturfilter Filtrapur V50, 500 mL, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 25 cm ²)	Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge, Hettich Universal & K2S Laborfuge 400e	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.1.2 Software

Tabelle 2: Verwendete Software für die Datenauswertung und statistische Analyse mit Herstellerangabe in alphabetischer Reihenfolge.

Programm	Hersteller
BioRender® 2022	BioRender®, Toronto, USA
ChemDraw 19.0	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
GraphPad PRISM 5	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
ImageJ	Fiji, Open Source
Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel 2016	Microsoft Office, Redmond, USA
Microsoft Power Point 2016	Microsoft Office, Redmond, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Office, Redmond, USA
MikroWin 2000	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Medikamente und Kits

Tabelle 3: Liste der Verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge mit CAS-Nummer und Herstellerangabe.

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	9048-46-8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Substanz	CAS-Nummer	Hersteller
Doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	7732-18-5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (Eisessig) 100%	64-19-7	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (absolut)	64-17-5	ChemSolute, Renningen, Deutschland
Methanol (100%)	67-56-1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge 2N (NaOH)	1310-73-2	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (95%)	30525-89-4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phalloidin -Tetramethylrhodamine isothiocyanate	17466-45-4	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 37 % (HCl)	7647-01-0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	9002-93-1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypan Blau Lösung 0,4%	72-57-1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween® 20	9005-64-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vectashield® Mounting Medium mit DAPI	H-1200	VECTOR Laboratories INC, Burlingame CA, USA

Tabelle 4: Verwendete nephrotoxische Testsubstanzen für die Zellbehandlung in alphabetischer Reihenfolge mit CAS-Nummer, Katalognummer und Herstellerangabe.

Substanz	CAS-Nummer	Katalognummer	Hersteller
Cadmiumchlorid	10108-64-2	202908-10G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Colistin Sulfat Salz	1264-72-8	C4461-100MG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Gentamicin Sulfat Salz	1405-41-0	G1264-50MG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Polymyxin B Nonapeptid Hydrochlorid	86408-36-8	P2076-5MG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Substanz	CAS-Nummer	Katalognummer	Hersteller
Polymyxin B Sulfat Salz	1405-20-5	P4932-1MU	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vancomycin Hydrochlorid	1404-93-9	V2002-100MG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Kits mit Katalognummer und Herstellerangabe.

Name	Katalognummer	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	G7570	Promega, Mannheim, Deutschland

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 6: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur mit Katalognummer und Herstellerangabe in alphabetischer Reihenfolge.

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Dulbecco's modified eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/L Glukose und 1,5 g/L Natriumbikarbonat	P04-03500	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's modified eagle Medium (DMEM) ohne Glukose	11966-025	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered Saline (10x) (DPBS)	D1408-500ML	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor [EGF])	E9644-.2MG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (Fetal bovine serum [FBS])	S0615	Merck, Darmstadt, Deutschland
GlutaMAX™-I (100x)	35050-061	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Ham's F12 Medium	21765-029	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Hydrokortison (50 µM)	H0135-1MG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ITS (Insulin, Transferrin, Natriumselenit) (100x)	I1884-1VL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Minimum Essential Medium Non Essential Amino Acids Lösung (MEM NEAA) (100x)	11140-035	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Natriumpyruvat (100x)	11360070	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (100x)	P4333-100ML	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	T3924-100ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.5 Lösungen und Ansätze

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Ansätze für die Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung mit Beschreibung der Herstellung.

Alle Lösungen und Ansätze wurden für jedes Experiment frisch vorbereitet. Lediglich die BSA Blockierlösungen, die EGF-Lösung, der ITS-Zusatz und der Hydrocortison-Zusatz wurden aliquotiert, eingefroren und einmalig wieder für die Verwendung aufgetaut. Abkürzungen: BSA = Bovines Serum Albumin, DPBS = Dulbecco's phosphate buffered Saline, DPBST = Dulbecco's phosphate buffered Saline mit Tween, EGF = Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor), ITS = Insulin, Transferrin, Natriumselenit, PFA = Paraformaldehyd.

Lösungen und Ansätze	Zusammensetzung und Herstellung
0,095 µM Phalloidin-Tetramethylrhodamine B Isocyanat Lösung	Phalloidin-Tetramethylrhodamine isothiocyanate (0,1 mg/mL in Methanol) 1:6400 in 1x DPBS verdünnt
0,2 % Dulbecco's phosphate buffered Saline mit Tween (DPBST)	Für 25 mL: 50 µL Tween20® in 25 mL 1x DPBS gelöst und gut gemischt
0,2 % Triton™X-100 Permeabilisierungslösung	Für 12,5 mL: 12 µL Triton™X-100 in 12,5 mL 1x DPBS gelöst und gut gemischt
1 % BSA Blockierlösung	Für 10 mL: 2 mL 5% BSA Blockierlösung zu 8 mL 1x DPBS zugegeben
1x DPBS 1:10 4 % Paraformaldehydlösung	10x DPBS 1:10 in ddH ₂ O gelöst Für 25 mL: 1 g Paraformaldehyd (95%) in 25 mL 1x DPBS unter ständigem Rühren bei ca. 60°C gelöst, 1 N NaOH bis zum Aufklaren der Lösung zugegeben, Titration mit 1 M HCl bis ein pH = 7,4 (±0,5) erreicht war.
5 % BSA Blockierlösung EGF-Lösung	Für 28 mL: 1,4 g BSA in 28 mL 1x DPBS unter ständigem Rühren gelöst 0,2 mg EGF-Pulver in 5 mL 10 mM Essigsäure gelöst und gut gemischt

Lösungen und Ansätze	Zusammensetzung und Herstellung
Essigsäure (10 mM)	57,19 µL 1 M Essigsäure in 100 mL ddH ₂ O gelöst und 1:100 verdünnt, danach über einen Filter (Porengröße von 0,2 µm) filtriert
Hydrokortison-Zusatz (36 ng/mL)	181,25 µg Hydrokortison (50 µM) in 1 mL 100 % Ethanol gelöst und gemischt, 27 mL DPBS hinzugegeben
ITS-Zusatz (5 µg/mL Insulin, 5 µg/mL Transferrin, 5 µg/mL Natriumselenit)	0,5 mg ITS-Pulver in 5 mL 10 mM Essigsäure gelöst und gemischt, 45 mL ddH ₂ O hinzugefügt

2.1.6 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien mit Beschreibung des Ursprungs, Katalognummer und Herstellerangabe in alphabetischer Reihenfolge.

Zelllinie	Ursprung	Katalognummer	Hersteller
NRK-52E	Geklonte Mischkultur normaler Nierenzellen der Ratte mit epithelartigen Eigenschaften (De Larco und Todaro, 1978)	87012902	European Collection of Authenticated Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, England
RPTEC/TERT1	Immortalisierte humane renale proximale Tubulusepithelzellen mit Einfügung der TERT1-Expression in die RPTEC-Primärzelllinie (Wieser et al., 2008)	CHT-003-0002-12m	Evercyte GmbH, Wien, Österreich

2.1.7 Antikörper

Tabelle 9: Verwendete monoklonale Antikörper mit Beschreibung der Zielstruktur, Wirtsspezies, Katalognummer und Herstellerangabe in alphabetischer Reihenfolge.

Zielstruktur	Wirtsspezies	Katalognummer	Hersteller
Cathepsin D (4G2)	Maus	NBP1-04278	Novus Biologicals, Wiesbaden, Deutschland
Cathepsin D (D7)	Maus	sc-377299	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
LAMP1 (H4A3)	Maus	sc-20011	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

Zielstruktur	Wirtsspezies	Katalog- nummer	Hersteller
LAMP2 (H4B4)	Maus	sc-18822	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
m-IgG _K BP-CFL 488		sc-516176	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten in der Zellkultur

2.2.1.1 Desinfektion und Sterilisation

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden mit Handschuhen unter der Sterilbank durchgeführt, um das Auftreten von unerwünschten Keimen und Verunreinigungen in der Zellkultur zu vermeiden. Die Arbeitsfläche wurde vor und nach den Arbeiten 15 min mit UV-Licht bestrahlt und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Zur Reinigung der Gebrauchsmaterialien und Gebrauchslösungen wurden verschiedene Verfahren angewandt.

Tabelle 10: Verfahren zur Desinfektion und Sterilisation mit Beschreibung. Verwendete Materialien und Geräte sind in Tabelle 1 des Abschnitts 2.1.1 Technische Ausrüstung aufgelistet.

Verfahren	Beschreibung
Autoklavieren	Pipettenspitzen, Plastikgefäße und hitzestabile Puffer (z.B. DPBS) wurden im Autoklav sterilisiert. Die Behandlung erfolgte über 20 min bei hohem Druck (1,1 bar) und Temperaturen zwischen 110 °C und 140 °C
Sterilfiltration	Für hitzelabile Lösungen und Substanzen wurde die sterile Filtration mittels Sterilfiltersystem gewählt (Porengröße von 0,2 µm)
Sterilisierung von Glasgefäßen	Glasgefäße und Glaspipetten wurden 3 - 4 h bei 300 °C im Ofen erhitzt.

2.2.1.2 Herstellung der Zellkulturmedien

Alle Bestandteile der Zellkulturmedien und verwendeten Zusätze sind in Tabelle 6 des Abschnitts 2.1.4 aufgelistet und mit Katalognummer und Herstellerangabe spezifiziert.

2.2.1.2.1 RPTEC/TERT1 Zellkulturmedium

Das Zellkulturmedium für die Zelllinie RPTEC/TERT1 enthielt eine 1:1-Mischung aus DMEM ohne Glukose und Ham's F-12 Medium. Zusätzlich wurden 10 ng/mL EGF, 2 mM GlutaMAX™-I, 5 µg/mL Insulin, 5 µg/mL Transferrin und 5 µg/mL Natriumselenit (ITS-Zusatz), 0,36 µg/mL Hydrocortison sowie 100 U Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin

unter sterilen Bedingungen ergänzt. Außerdem wurde ein separat zubereitetes Stoppmedium benötigt, um die Trypsinierungsreaktion während des Passagierens der RPTEC/TERT1 Zellen zu stoppen. Das Stoppmedium bestand aus DMEM mit 4,5 g/L Glukose und 1,5 g/L Natriumbikarbonat, ergänzt mit 7 % FBS, 2 mM GlutaMAX™-I, 1 mM Natriumpyruvat, sowie 100 U Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin. Natriumpyruvat wurde zuvor in 100 % Essigsäure gelöst. Beide Medien wurden bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung in der Zellkultur im Wasserbad auf 37 °C Kulturtemperatur erwärmt.

2.2.1.2.2 NRK-52E Zellkulturmedium

Die Grundlage des Zellkulturmediums der Zelllinie NRK-52E bestand aus DMEM mit 4,5 g/L Glukose und 1,5 g/L Natriumbikarbonat. Zusätzlich wurden unter sterilen Bedingungen 5% FBS, 2 mM GlutaMAX™-I, 1x MEM NEAA und 100 U Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin hinzugegeben. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung in der Zellkultur im Wasserbad auf 37 °C Kulturtemperatur erwärmt.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff bei -196 °C kryokonservierten Zellen wurden für die Verwendung in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein mit 10 mL Medium gefülltes und auf 37 °C vorgewärmtes 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 mL vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator über Nacht kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um nicht adhärente Zellen zu entfernen.

2.2.1.4 Kultivierung der Zellen

In Abbildung 10 ist ein Überblick über den experimentellen Ablauf der Kultivierung und des Passagierens der beiden verwendeten Zelllinien dargestellt. Die NRK-52E Zellen wurden wöchentlich passagiert, während bei den RPTEC/TERT1 Zellen ein zweiwöchentlicher Rhythmus aufgrund der langsameren Wachstumsgeschwindigkeit gewählt wurde.

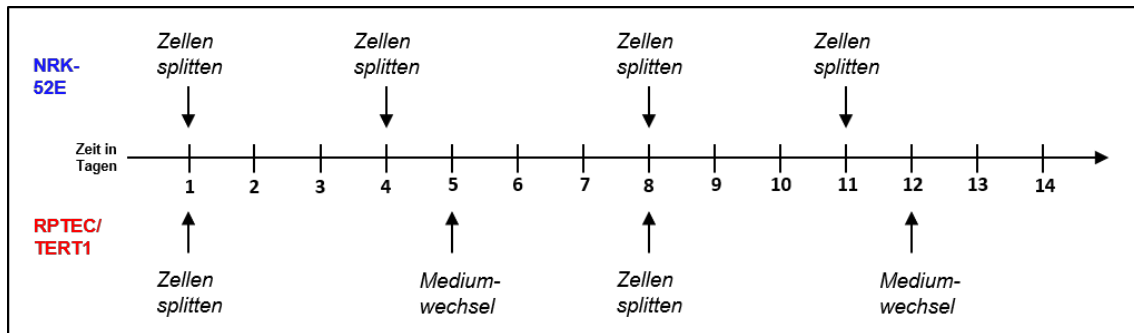


Abbildung 10: Experimenteller Ablauf der Kultivierung und des Passagierens der Zelllinien NRK-52E und RPTEC/TERT1.

Die NRK-52E Zellen wurden jeweils an Tag 1 und Tag 4, sowie Tag 8 und Tag 11, bei 90-100 % Konfluenz gesplittet und auf neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Die RPTEC/TERT1 Zellen wurden immer an Tag 1 und Tag 8, ebenfalls bei Erreichen von nahezu vollständiger Konfluenz, gesplittet. An Tag 5 und Tag 12 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.1.4.1 Kultivierung der RPTEC/TERT1 Zelllinie

Bei der verwendeten Zelllinie RPTEC/TERT1 handelt es sich um menschliche Nierenzellen des proximalen Tubulusepithels (Wieser et al., 2008). Die Kultivierung der Zellen auf Standard-Gewebekultur Platten führte zu einer Einzelschicht (Monolayer) differenzierter Zellen (Aschauer et al., 2015). Eine exemplarische Aufnahme der Zellen mittels Lichtmikroskop ist in Abbildung 11 dargestellt.

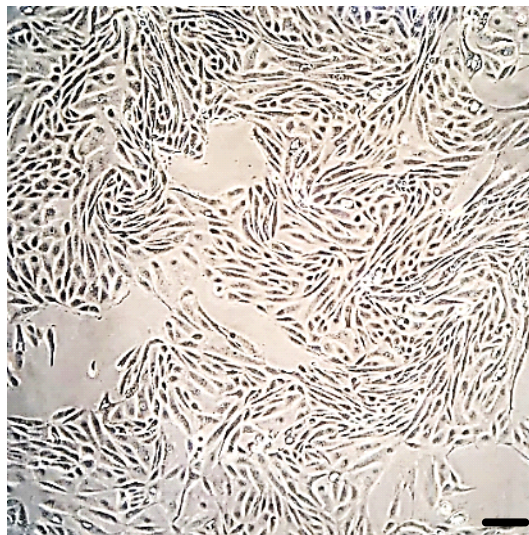


Abbildung 11: RPTEC/TERT1 Zellen, Fotoaufnahme mit dem Lichtmikroskop. Maßstab in schwarz dargestellt = 100µm. Objektivvergrößerung: 10x.

Die RPTEC/TERT1 Zellen wurden standardgemäß in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 12 mL Zellkulturmedium bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % im

Inkubator kultiviert. Sie wurden an Tag 1 und Tag 8 gesplittet und umgesetzt, an Tag 5 und Tag 12 wurde das Kulturmedium gewechselt. Für das Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 1,5 mL Trypsin/EDTA für etwa 10 min bei 37 °C behandelt. Nachdem die Zellen sich vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurden die Zellen in 10 mL Stoppmedium aufgenommen, um die Trypsinierung zu beenden. Die Zellsuspension wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 1200 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Quantifizierung der Zellen mithilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop wurden 20 µL Zellsuspension entnommen und mit 20 µL Trypan Blau versetzt. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Aussaatdichte von $4,98 \times 10^6$ Zellen pro 12 mL Gesamtvolumen in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche zur erneuten Kultivierung überführt.

2.2.1.4.2 Kultivierung der NRK-52E Zelllinie

Die renalen Zellen der Zelllinie NRK-52E (De Larco und Todaro, 1978) wurden aus der Europäische Sammlung authentifizierter Zellkulturen (European Collection of Authenticated Cell Cultures [ECACC]) bezogen. Bei den Zellen handelt es sich um Nierenzellen der Ratte mit den Eigenschaften des proximalen Tubulusepithels (Lash et al., 2002). Auch hier ist eine exemplarische Aufnahme der Zellen mit dem Lichtmikroskop erfolgt und in Abbildung 12 dargestellt.

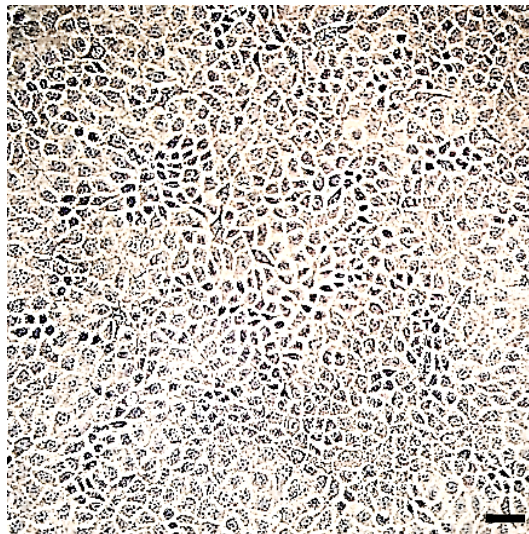


Abbildung 12: NRK-52E Zellen, Fotoaufnahme mit dem Lichtmikroskop.
Maßstab in schwarz dargestellt = 100µm. Objektivvergrößerung: 10x.

Die Zellen wurden ebenfalls in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 12 mL Zellkulturmedium bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % im Inkubator kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen bei 90-100 % Konfluenz im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Dazu wurden die Zellen einmal mit 5 mL erwärmtem, autoklaviertem 1x DPBS gewaschen und anschließend mit 1,5 mL Trypsin/EDTA für 5 bis 8 min bei 37 °C behandelt. Hatten sich die Zellen vollständig vom Boden gelöst, wurden sie durch wiederholtes Spülen in 10 mL Kulturmedium aufgenommen und in 50 mL Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 12 mL Zellkulturmedium vollständig resuspendiert. Nun wurden 10,8 mL Medium in einer neuen 75 cm²-Zellkulturflasche vorgelegt und 1,2 mL Zellsuspension appliziert, um die Zellen im Verhältnis von 1:10 umzusetzen.

2.2.2 CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest

Für den Nachweis der Zellviabilität wurde der CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest (Promega) verwendet. Es handelt sich um eine quantitative Methode zur Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Zellen aus einer Zellkultur mithilfe der Quantifizierung von ATP. ATP wird repräsentativ als Marker für metabolisch aktive Zellen verwendet, da die ATP-Menge direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen ist. Im CellTiter-Glo® Reagenz sind das Benzothiazol Luciferin und das Enzym Luciferase enthalten. In diesem Fall handelt es sich um eine spezielle thermostabile, rekombinante Luciferase, die ein stabiles Lumineszenz-Signal erzeugt. Das Lumineszenz-Signal wird durch eine von der Luciferase katalysierte Reaktion des ATPs mit Luciferin und molekularem Sauerstoff erzeugt. Das Luciferin wird dabei in Anwesenheit von Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) oxidativ zu Oxyluciferin decarboxyliert (Promega Corporation, 2015). Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 13 dargestellt.

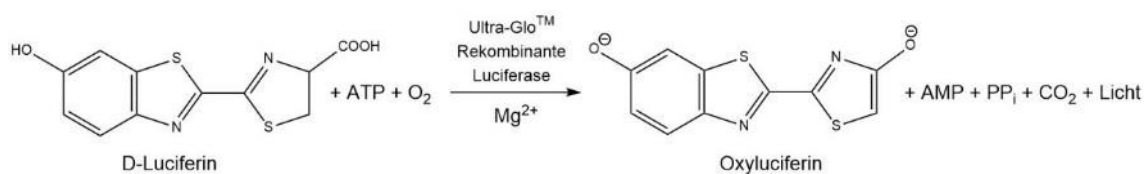


Abbildung 13: Reaktionsgleichung der katalytischen Reaktion mittels rekombinanter Luciferase von Beetle Luciferin mit ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin, AMP, PP_i, CO₂ und Licht.

Das in der CellTiter-Glo® Reagenz enthaltene D-Luciferin reagiert mit dem in den Zellen vorhandenen ATP und Luftsauerstoff. Die Reaktion wird in Anwesenheit von Mg^{2+} vom Luciferase-Enzym katalysiert. Dabei wird das Luciferin oxidativ zu Oxyluciferin decarboxyliert und es entstehen als weitere Produkte AMP, PP_i, CO₂ und Licht, welches als Lumineszenz messbar ist. Modifiziert mit ChemDraw 19.0 nach (Promega Corporation, 2015). Abkürzungen: AMP = Adenosinmonophosphat, ATP = Adenosintriphosphat, CO₂ = Kohlenstoffdioxid, Mg^{2+} = ionisches Magnesium, O₂ = molekularer Sauerstoff, PP_i = Pyrophosphat.

2.2.2.1 Versuchsaufbau und Zellaussaat für den CellTiter-Glow® Lumineszenz-Zellviabilitätstest

In Abbildung 14 ist eine Darstellung des experimentellen Ablaufs für die Zellviabilitätsmessung von der Aussaat der Zellen bis zum Zeitpunkt der Auswertung zu sehen.

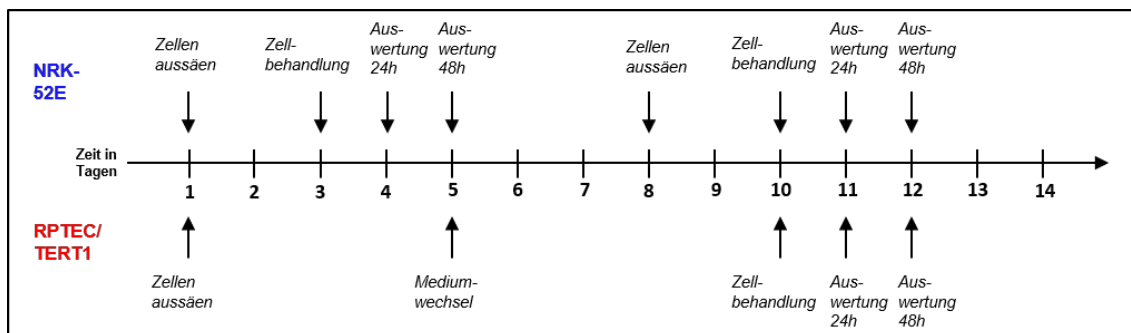


Abbildung 14: Experimenteller Ablauf der Zellaussaat und Zellbehandlung mit den Testsubstanzen und Durchführung der Auswertung mittels CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest nach 24 h bzw. 48 h.

Die Zellaussaat ist im folgenden Abschnitt beschrieben. Die Behandlung der Zellen ist in Abschnitt 2.2.2.2 zu finden. Die Auswertung erfolgte bei den NRK-52E Zellen an Tag 4 (24 h Behandlung) bzw. Tag 5 (48 h Behandlung) nach der Zellaussaat. Bei den RPTEC/TERT1 Zellen erfolgte die Auswertung (24 h Behandlung) an Tag 11 bzw. Tag 12 (48 h Behandlung) nach der Zellaussaat. Bei den RPTEC/TERT1 Zellen war ein längerer Inkubationszeitraum zum Erreichen von 90-100 % Konfluenz erforderlich.

Die NRK-52E und RPTEC/TERT1 Zellen wurden an Tag 1 auf 96-Well-Platten ausgesät. Es wurden pro Well 100 µL Zellsuspension mit 10000 Zellen verwendet. In die Rand-Wells wurde 100 µL 1x DPBS appliziert, da deren Inhalt im Inkubator leicht verdunstet und so die Ergebnisse der Versuche verfälschen könnte. Die Zellkulturplatten wurden anschließend für 2 Tage bei den NRK-52E Zellen bzw. 9 Tage bei den RPTEC/TERT1 Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-100 % im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei den RPTEC/TERT1 Zellen wurde an Tag 5 ein Mediumwechsel durchgeführt und das 1x DPBS in den Rand-Wells der 96-Well-Platten erneuert. Anschließend wurden die NRK-52E Zellen an Tag 3 und die RPTEC/TERT1 Zellen an Tag 10, mit der zu untersuchenden Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen behandelt.

2.2.2.2 Behandlung der Zellen für den CellTiter-Glow® Lumineszenz-Zellviabilitätstest

Für den CellTiter-Glow® Lumineszenz-Zellviabilitätstest (Promega) wurden die auf 96-Well-Platten ausgesäten Zellen beim Erreichen von 90-100 % Konfluenz jeweils an Tag 3 (NRK-52E) und an Tag 10 (RPTEC/TERT1) mit der zu untersuchenden Testsubstanz behandelt. Die ausgewählten Testsubstanzen hierfür waren Polymyxin B Sulfat, Colistin Sulfat, Polymyxin B Nonapeptid, Vancomycin, Gentamicin Sulfat und Cadmiumchlorid (Siehe Tabelle 4, Abschnitt 2.1.3). Bei allen Substanzen wurde die Behandlung jeweils für 24 h und 48 h durchgeführt.

Die Substanzen wurden mit einer Feinwaage abgewogen und zum Erreichen einer 2 mM konzentrierten Stammlösung in das jeweilige Zellkulturmedium überführt. Es wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2000 µM, 1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62,5 µM, 31,25 µM, 15,62 µM und 7,81 µM mit dem jeweiligen zelllinien-spezifischen Zellkulturmedium erstellt. Nachdem das Zellkulturmedium der Wells verworfen wurde, wurden in jedes Well 110 µL der jeweiligen Lösung der Verdünnungsreihe pipettiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit unbehandelten Zellen angelegt, wobei 110 µL reines Zellkulturmedium auf die Zellen appliziert wurde. Die Darstellung des Behandlungsschemas auf einer 96-Well-Platte für zwei Testsubstanzen ist exemplarisch in Abbildung 15 gezeigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS
B	1x DPBS	0 µM	7,81 µM	15,62 µM	31,25 µM	62,5 µM	125 µM	250 µM	500 µM	1000 µM	2000 µM	1x DPBS
C	1x DPBS	0 µM	7,81 µM	15,62 µM	31,25 µM	62,5 µM	125 µM	250 µM	500 µM	1000 µM	2000 µM	1x DPBS
D	1x DPBS	0 µM	7,81 µM	15,62 µM	31,25 µM	62,5 µM	125 µM	250 µM	500 µM	1000 µM	2000 µM	1x DPBS
E	1x DPBS	0 µM	7,81 µM	15,62 µM	31,25 µM	62,5 µM	125 µM	250 µM	500 µM	1000 µM	2000 µM	1x DPBS
F	1x DPBS	0 µM	7,81 µM	15,62 µM	31,25 µM	62,5 µM	125 µM	250 µM	500 µM	1000 µM	2000 µM	1x DPBS
G	1x DPBS	0 µM	7,81 µM	15,62 µM	31,25 µM	62,5 µM	125 µM	250 µM	500 µM	1000 µM	2000 µM	1x DPBS
H	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS	1x DPBS

Abbildung 15: Behandlungsschema der 96-Well-Platten für den CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest.

Substanz 1 wurde in den Reihen B, C und D aufgetragen, Substanz 2 in den Reihen E, F und G. Die Trennung der Behandlungsbereiche für die einzelnen Substanzen ist durch die rote Linie gekennzeichnet. Abkürzungen: 1x DPBS = 1x Dulbecco's phosphate buffered Saline. Pro 96-Well-Platte wurden 2 Substanzen in jeweils 3 technischen Replikaten getestet.

Alle Versuche wurden jeweils in drei technischen und drei biologischen Replikaten durchgeführt. Im Anschluss an die 24 h bzw. 48 h Behandlung erfolgte die Durchführung des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests.

2.2.2.3 Durchführung und Auswertung des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests

Die Durchführung des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests erfolgte bei den NRK-52E Zellen an Tag 4 nach der Zellaussaat für die 24 h Behandlung, und an Tag 5 für die 48 h Behandlung. Bei den RPTEC/TERT1 Zellen war ein längerer Inkubationszeitraum bis zum Erreichen der 90-100 % Konfluenz erforderlich. Aus diesem Grund fand hier die Durchführung an Tag 11 nach der Zellaussaat für die 24 h Behandlung und an Tag 12 für die 48 h Behandlung statt. Die in den 96-Well-Platten mit Testsubstanzen behandelten Zellen wurden zunächst unter dem Lichtmikroskop auf dosisabhängige Veränderungen in der Morphologie untersucht. Während der gesamten Durchführung des Zellviabilitätstests wurde darauf geachtet bei Dunkelheit zu arbeiten, um die lichtempfindlichen Reagenzien nicht zu beschädigen und das Lumineszenz-Signal zu stabilisieren. Alle Versuchsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Das CellTiter-Glo® Substrat wurde nach Anleitung des Herstellers vollständig im CellTiter-Glo® Puffer gelöst, woraus sich das CellTiter-Glo® Reagenz ergab. Es folgte die Zugabe von 100 µL CellTiter-Glo® Reagenz in jedes Well mit der in Zellkulturmedium gelösten Testsubstanz. Es konnte ein Farbumschlag nach gelb beobachtet werden. Um eine gute Verteilung der CellTiter-Glo® Reagenz zu gewährleisten, wurden die 96-Well-Platten 2 min auf den Kombischüttler mit einer Intensität von 400 gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden je 50 µL aus jedem Well auf eine weiße 96-Well-OptiPlate überführt und das Lumineszenzsignal mithilfe der Software MikroWin 2000 am Luminometer gemessen. Die Rohdaten der drei technischen Triplikate wurden mithilfe von Microsoft Excel in Relativwerte im Bezug zur Kontrolle umgerechnet und gemittelt. Die Mittelwerte der biologischen Triplikate wurden anschließend mithilfe der Software GraphPad PRISM gemittelt und Graphen mit Standardabweichungen für die Zellviabilität erstellt.

2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Es galt für den AOP „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“ für beide Zelllinien definierte Marker für die optimale Darstellung der beschriebenen Prozesse zu finden. Für KE 1 und KE 2 wurden hierbei lysosomale Marker gewählt. Für KE 1 wurde das lysosomal-assoziierte Membranprotein festgelegt, für KE 2 wurde die Protease Cathepsin D bestimmt.

LAMP-1/2 sind die am häufigsten vorkommenden Proteine der lysosomalen Membran, deren Aufgabe in einer Schutzfunktion beispielsweise durch Membranstabilisierung besteht (Fukuda, 1991, Luzio et al., 2007, Saftig und Klumperman, 2009). Es ist bekannt, dass sich Polymyxin-Antibiotika in Lysosomen anreichern (Manchandani et al., 2017, Moestrup et al., 1995). Diese Akkumulation in den Lysosomen führt zu einer Funktionsstörung einhergehend mit einer pH-Änderung und eine Vergrößerung der Lysosomen. Dieser Prozess kann ebenfalls mit einer gesteigerten LAMP-Expression einhergehen. Dies konnte bereits in durchgeführten *in vitro* Studien nach der Zellbehandlung mit lysosomotropen Medikamenten beobachtet werden (Chen et al., 2001, Ginet et al., 2009, Lu et al., 2017, Puyal et al., 2009). Nach Testversuchen von gegen LAMP gerichteten Antikörpern in den beiden Zelllinien wurden die am besten zu visualisierenden Antikörper für eine spezifische Darstellung gewählt. Für KE 1 für die NRK-52E Zellen aus der Ratte wurde aus diesem Grund LAMP1 festgelegt (Lee et al., 2017), während für die menschliche Zelllinie RPTEC/TERT1 LAMP2 verwendet wurde (Thul et al., 2017).

Für KE 2 des hier untersuchten AOPs wurde die Visualisierung und Quantifizierung der Aspartat-Endoprotease Cathepsin D in beiden Zelllinien als Marker für die LMP festgelegt (Barrett, 1970, Thul et al., 2017, Wilmes et al., 2013). In intakten Lysosomen kann CTSD mittels Immunfluoreszenz als punktförmige Strukturen aufgrund der Lage in den Lysosomen nachgewiesen werden, während Cathepsine nach lysosomaler Membranruptur frei im Zytosol verteilt sind und sich so ein diffuses Signal im gesamten Zytoplasma darstellen lässt (Boya et al., 2003, Kagedal et al., 2005, Park et al., 2006). Für den Nachweis von CTSD und LAMP wurde die indirekte Immunfluoreszenz gewählt. Dieser visuelle Ansatz ermöglicht die Bestimmung der räumlichen Signalverteilung und erlaubt die optische Verfolgung der konzentrationsabhängigen Vergrößerung und Ruptur der Lysosomen. Der Färbungsprozess erfolgte über zwei Tage und wurde für beide Zelllinien etabliert und identisch durchgeführt.

2.2.3.1 Versuchsaufbau und Zellaussaat für die Immunfluoreszenzfärbung

In Abbildung 16 ist der experimentelle Ablauf des gesamten Versuchsaufbaus für die Immunfluoreszenzfärbung von der Aussaat der Zellen bis zum Färbeprozess zu sehen. Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte bei den NRK-52E Zellen an Tag 4 und 5 nach der Zellaussaat für die 24 h Behandlung. Bei den RPTEC/TERT1 Zellen war ein längerer Inkubationszeitraum bis zum Erreichen der nötigen 90-100 % Konfluenz notwendig. Aus diesem Grund wurde der Färbeprozess hier an Tag 11 und 12 nach der Zellaussaat für die 24 h Behandlung durchgeführt.

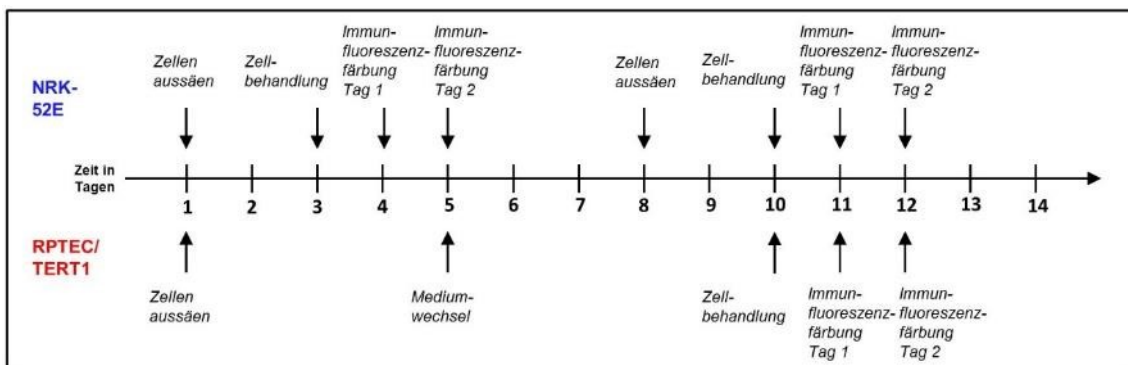


Abbildung 16: Experimenteller Ablauf der Zellaussaat, Zellbehandlung mit den Testsubstanzen und Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung nach 24 h.

Die Zellaussaat ist im folgenden Abschnitt beschrieben. Die Behandlung der Zellen in Abschnitt 2.2.3.2 erläutert. Hier wurde die Behandlung der Zellen für 24 h durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte bei den NRK-52E Zellen an Tag 4 und 5 nach der Zellaussaat. Bei den RPTEC/TERT1 Zellen erfolgte der Färbeprozess an Tag 11 und 12 nach der Zellaussaat, an Tag 5 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei den RPTEC/TERT1 Zellen war ein längerer Inkubationszeitraum zum Erreichen von 90-100% Konfluenz notwendig.

Die NRK-52E und RPTEC/TERT1 Zellen wurden an Tag 1 auf 8-Well-Chamber Slides ausgesät. Es wurden pro Well 300 μ L Zellsuspension mit 140 Zellen/ μ L verwendet. Die Zellkulturplatten wurden anschließend für 2 Tage bei den NRK-52E Zellen bzw. 9 Tage bei den RPTEC/TERT1 Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-100 % im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.3.2 Behandlung der Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung

Zur Etablierung der Methodik der Immunfluoreszenzfärbung wurde in beiden Zelllinien zunächst PMB verwendet. Sobald die Zellen in den 8-Well-Chamber Slides 90-100 % Konfluenz erreicht hatten, wurden die NRK-52E an Tag 3 und die RPTEC/TERT1 an Tag 10 mit den Testsubstanzen behandelt. Die Substanzen wurden mit einer Feinwaage abgewogen und zum Erreichen einer 1 mM konzentrierten Stammlösung in das jeweilige Zellkulturmedium überführt. Aus der Stammlösung wurden die Verdünnungen 1000 μM , 500 μM , 250 μM , 62,5 μM , 31,25 μM , 15,62 μM und 7,81 μM erstellt. Auch hier wurde zusätzlich eine Kontrolle mit unbehandelten Zellen angelegt. Zur Behandlung wurde das Zellkulturmedium der Wells verworfen und 300 μL pro Well der jeweiligen Konzentration vorsichtig auf die Zellen appliziert. Für die Kontrolle wurde 300 μL reines Zellkulturmedium verwendet. Eine exemplarische Darstellung des Behandlungsschemas ist in Abbildung 17 zu sehen.

	0 μM	7,81 μM	15,62 μM	31,25 μM	
	62,5 μM	250 μM	500 μM	1000 μM	

Abbildung 17: Behandlungsschema für die 8-Well-Chamber Slides für die Immunfluoreszenzfärbung.

Jede Substanz wurde in sieben verschiedenen Konzentrationen zusätzlich zur Kontrolle auf einem 8-Well-Chamber Slide getestet.

Die Zellen wurden für 24 h mit den verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Der Versuch wurde für alle getesteten Konzentrationen und die Kontrolle in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Nach der Zellbehandlung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung.

2.2.3.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung von CTSD und LAMP

Die Färbung wurde direkt in den 8-Well-Chamber Slides durchgeführt. Vor der Färbung wurden die behandelten Zellen unter dem Lichtmikroskop auf konzentrationsabhängige Veränderungen hinsichtlich ihrer Morphologie beobachtet.

Die folgenden Reagenzien wurden (falls nicht anders beschrieben) alle in einem Volumen von 150 µL pro Well auf die Zellen appliziert. Nach dem Entfernen der Testsubstanz wurden die Zellen mit auf 37 °C erwärmtem 1x DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehydlösung in 1x DPBS für 10 min bei RT fixiert. Alle folgenden Schritte wurden, falls nicht anders angegeben, unter ständigem Schütteln mit dem Kombischüttler bei einer Intensität von 200 und RT durchgeführt. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 1x DPBS für 10 min. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit einer 0,2% Triton™X-100 Permeabilisierungslösung behandelt, um eine Durchlässigkeit der Zellmembran für die Antikörper und Reagenzien zu ermöglichen. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 1x DPBS für je 10 min wurden die Zellen zur Verminderung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 5 % BSA Blockierlösung, bedeckt. Die Blockierlösung wurde verworfen und der primäre Antikörper in einer Konzentration von 1:100 in 1% BSA Blockierlösung mit einem Volumen von 100 µL pro Well auf die Zellen gegeben. Die 8-Well-Chamber Slides mit dem primären Antikörper wurden über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Eine Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper ist in Tabelle 11 abgebildet.

Tabelle 11: Auflistung der spezifischen verwendeten Antikörper für die Darstellung der intralysosomalen Protease CTSD und des LAMPs.
 Abkürzungen: CTSD = Cathepsin D, LAMP = lysosomal-assoziiertes Membranprotein. Es wurden passend zur Zelllinie Antikörper ausgewählt.

Zelllinie	RPTEC/TERT1		NRK-52E	
	Primär-antikörper	Sekundär-antikörper	Primär-antikörper	Sekundär-antikörper
CTSD-Färbung	Cathepsin D (4G2) - Antikörper	m-IgG _κ BP-CFL 488 - Antikörper	Cathepsin D (D7) - Antikörper	m-IgG _κ BP-CFL 488 - Antikörper
LAMP-Färbung	LAMP2 (H4B4) - Antikörper	m-IgG _κ BP-CFL 488 - Antikörper	LAMP1 (H4A3) - Antikörper	m-IgG _κ BP-CFL 488 - Antikörper

Am nächsten Tag wurden die 8-Well-Chamber Slides während des Färbungsprozesses zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals vor Licht geschützt. Die Zellen wurden 3 mal 15 min mit 0,2 % DPBST gewaschen, um ungebundenen und überschüssigen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden 100 µL pro Well des sekundären Antikörpers in einer Konzentration von 1:50 in 1 % BSA Blockierlösung appliziert und für 1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Um auch hier überschüssigen Antikörper zu entfernen, erfolgte erneutes dreimaliges Waschen für je 15 min mit 0,2 % DPBST. Abschließend

wurden die Proben einmalig mit ddH₂O gewaschen, um eine Salzkristallbildung in den Präparaten zu verhindern. Es folgte die Applikation von 100 µL Eindeckmedium (Vectashield® Mounting Medium mit DAPI) pro Well und anschließend die unmittelbare Untersuchung und Bildaufnahme am SP5 Konfokal Mikroskop (Abschnitt 2.2.3.5).

2.2.3.4 Ergänzung einer Phalloidinfärbung zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts

Zusätzlich zu der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung (Abschnitt 2.2.3.3) wurde exemplarisch für jeden Antikörper der mit PMB behandelten Zellen eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts mittels Phalloidin ergänzt. Das bicyclische Heptapeptid Phalloidin stammt aus dem grünen Knollenblätterpilz, auch *Amanita phalloides* genannt. Es bindet spezifisch an filamentäres Aktin (F-Aktin) (Chazotte, 2010). In diesem Fall wurde Phalloidin-Tetramethylrhodamine B Isocyanat verwendet und zunächst in Methanol gelöst, um eine Stammlösung von 0,1 mg/mL zu erreichen. Im Anschluss wurde die Stammlösung 1:800 mit 1 x DPBS verdünnt, um eine 0,095 µM Lösung herzustellen. Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurde analog zu Abschnitt 2.2.3.3 durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift der Färbung zur Entfernung überschüssigen Antikörpers und vor der Applikation des Vectashield® Mounting Medium mit DAPI wurde die Phalloidinfärbung durchgeführt. Auch während dieses Färbungsprozesses bei RT wurden die 8-Well-Chamber Slides vor Licht geschützt. Zunächst wurden pro Well 150 µL der 0,095 µM Phalloidin-Tetramethylrhodamine B Isocyanat Lösung appliziert und die 8-Well-Chamber Slides für 60 min auf dem Kombischüttler bei einer Intensität von 150 inkubiert. Danach wurden die Proben einmal 15 min mit 0,2 % DPBST gewaschen, in 100 µL Vectashield® Mounting Medium mit DAPI eingedeckt und anschließend am SP5 Konfokal Mikroskop analysiert (Abschnitt 2.2.3.5).

2.2.3.5 SP5 Konfokalmikroskopie und Bildaufnahme

Die Detektion des Fluoreszenzsignals und anschließende Bildaufnahme erfolgte mit einem SP5 Konfokalmikroskop unter Verwendung eines Leica HCXPL APO lambda blue 63.Dx 1,40 OIL UV-Objektivs und Ibbidi-Immersionöl speziell für die Chamber Slides. DAPI wurde mit einer 405-Diode angeregt, ein Argon-Laser wurde für die Anregung des Cruz-Fluorophors 488 (CFL-488) genutzt. Die Detektionsspannen wurden auf 420-480 nm für DAPI und 500-550 nm für CFL-488 eingestellt. Aus jedem Well der 8-Well-Chamber Slides wurden willkürlich 10 Zellen gewählt und standardisiert immer mit den gleichen Einstellungen abgebildet. Alle Bilder wurden in einem Format von 1024 × 1024

Pixel, einer Frequenz von 100 Hz und einem Frame-Durchschnitt von 4 aufgenommen. Im Fall der LAMP-Färbung wurde ein Zoomfaktor von 3,5 gewählt, bei der CTSD-Färbung wurde ein Wert von 5 festgelegt. Laserintensität und Detektionsempfindlichkeit wurden für jedes Experiment angepasst, aber während der Bildaufnahme desselben Experiments konstant gehalten. Um Ergebnisse verwertbarer statistischer Signifikanz zu garantieren, wurde jedes Experiment in mehreren Replikaten durchgeführt. Die genauen Parameter der Mikroskop- und Software-Einstellungen sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 des Abschnittes I im Appendix aufgelistet.

2.2.3.6 Bildbearbeitung und Datenanalyse der Immunfluoreszenzfärbung

Um Ergebnisse verwertbarer statistischer Signifikanz zu garantieren, wurde jedes Experiment in mehreren Replikaten durchgeführt. Jede untersuchte Substanz und Antikörperfärbung wurde in jeder Zelllinie in drei biologischen Replikaten getestet. Es wurden jeweils 10 Zellen pro Konzentration abgebildet und drei Proben pro Zelle quantitativ analysiert. Somit ergab sich eine Stichprobengröße von $n = 90$ pro Konzentration.

Die gesamte Auswertung der Bilder erfolgte randomisiert und verblindet. Die Entblindung erfolgte erst, nachdem die Datenerhebung mithilfe der Bilder abgeschlossen war. Für die Analyse und Bildbearbeitung wurde das Programm ImageJ verwendet. Zur besseren Beurteilung der Bilder wurden standardisiert für jede Zelllinie Helligkeit und Kontrast bei jedem Bild auf die gleiche Art und Weise optimiert. Für die CTSD-Färbung wurde in ImageJ der minimal angezeigte Wert auf 0 belassen und der maximal angezeigte Wert auf 130 eingestellt. Für die LAMP-Färbung wurde zur anschaulicheren Darstellung der minimal angezeigte Wert auf 0 belassen und der maximal angezeigte Wert auf 70 reguliert. Aus jeder aufgenommenen Zelle wurden aus dem Zytoplasma drei repräsentative Bereiche ausgewählt und quadratische Ausschnitte (Breite = 0,85, Höhe = 0,85; Fläche = 0,73) mit dem Rechteck-Werkzeug bestimmt. In diesen Bereichen wurden sowohl die Fläche, als auch die mittlere und maximale Intensität des Fluoreszenzsignals gemessen. Aus den Werten der drei Bereiche pro Zelle wurden Mittelwerte für jede Zelle bestimmt. Wiederum aus allen Mittelwerten der 10 Zellen pro Konzentration wurden erneut Mittelwerte berechnet und es ergaben sich schlussendlich für jede der 8 Testkonzentrationen ein Wert für die mittlere und die maximale Fluoreszenzsignalintensität. Zur besseren Illustration der Signalintensität und Verteilung des Immunfluoreszenzsignals sowie der quantitativen Ergebnisse bei der CTSD-

Färbung wurden exemplarisch für eine Zelle pro Konzentration Profile Plots mit einer standardisierten Länge erstellt. Die weiterführende Verwertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel zur Berechnung von relativen Fluoreszenzintensitätswerten bezogen auf die Kontrolle (Intensität der Fluoreszenz unbehandelter Zellen). Anschließend wurden diese Relativwerte der drei biologischen Replikate gemittelt und mithilfe der Software GraphPad PRISM erneut gemittelt und Graphen mit Standardabweichungen für die minimale und maximale Fluoreszenzsignalintensität erstellt.

2.2.4 Datenanalyse und statistische Methodik

Erstellung von Diagrammen, Kurvenanpassung und statistische Analyse wurden mit GraphPad PRISM und Excel durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die verwendeten Kurvenanpassungsmodelle in GraphPad PRISM waren nonlineare Regressionen mit $\log(\text{agonist})$ vs. response – variabel slope und „ $\log(\text{agonist})$ “ vs. response – find EC anything oder es wurde eine lineare Regression für die Analyse genutzt. Welche Analyseverfahren für welchen Graphen verwendet wurde ist in Tabelle 18 des Abschnittes I des Appendix aufgelistet. Die Darstellung der statistischen Signifikanz erfolgte über Asterisks farbcodiert in den Graphen. Zur Bestimmung des p-Wertes erfolgte ein One-Way-ANOVA gefolgt von einem Dunnett-Test. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ (95% Konfidenzintervalle) als gegeben angesehen und wurde für $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ abgebildet.

3 Ergebnisse

Um langfristig einen Beitrag zur Entwicklung tierversuchsfreier *in vitro* Testsysteme für die Risikobewertung von Chemikalien und toxischen Substanzen im Rahmen der prädiktiven Toxikologie zu leisten, wurde in dieser Arbeit der AOP mit dem Titel „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“ untersucht und weiterentwickelt. Bei der abgebildeten Kaskade der drei aufeinanderfolgenden Schlüsselereignisse dienen die Marker LAMP1 und LAMP2, CTSD und die Menge an ATP in den Zellen als Indikatoren für die *in vitro* Endpunkte für KE 1-3. Im folgenden Abschnitt ist eine Ausführung der qualitativen und quantitativen Ergebnisse des Effekts von Modellstressoren auf die drei Schlüsselereignisse, beginnend mit KE 3, dargestellt. Eine Übersichtsdarstellung der definierten Endpunkte der Schlüsselereignisse mit zugehöriger Methodik der entwickelten Assays ist in Abbildung 18 erfolgt.

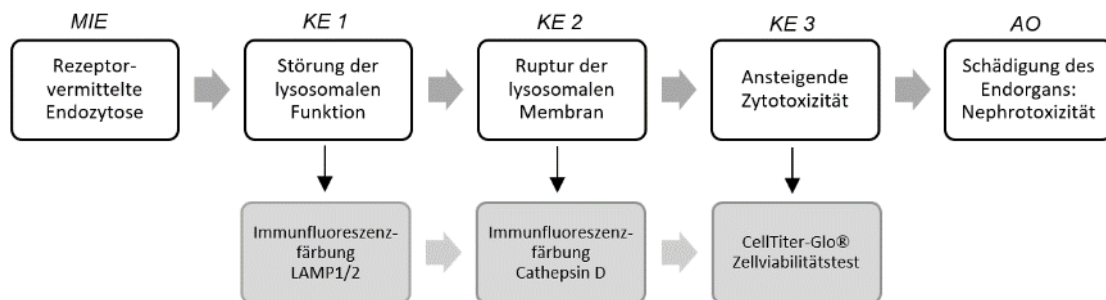


Abbildung 18: Der Adverse Outcome Pathway „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“.

Schema und Aufbau des AOPs mit Beschreibung der *in vitro* Endpunkte für KE 1-3. Abkürzungen: AO = Adverse Outcome (adverser Effekt), AOP = Adverse Outcome Pathway, KE = Key Event (Schlüsselereignis), LAMP = lysosomal-assoziiertes Membranprotein, MIE = Molecular Initiating Event (molekulares initiiierendes Ereignis).

3.1 KE 3: Beeinflussung der Zellviabilität durch Polymyxine, Gentamicin, Vancomycin und Cadmiumchlorid im Zellkulturmodell

In dem untersuchten AOP wird der Mechanismus beschrieben, bei dem die Ruptur von Lysosomen und die damit verbundene Freisetzung von Cathepsinen zum Zelltod der proximalen Tubuluszellen führt. Basierend auf dieser Beobachtung wurde das dritte Schlüsselereignis als eine Zunahme der Zytotoxizität definiert. Methodisch wurde hierbei der CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest gewählt. In diesem Versuch wurden die Auswirkungen von PMB, PMBN, COL, VAN, GEN und CdCl₂ auf die Zellviabilität in der menschlichen Zelllinie RPTEC/TERT1 und der Zelllinie aus der Ratte NRK-52E untersucht. Die Daten wurden nach 24 h und 48 h Behandlungsdauer und somit für zwei Zeitpunkte erhoben.

3.1.1 Zytotoxizität der Polymyxine, Vancomycin, Gentamicin und Cadmium in der Zelllinie RPTEC/TERT1 (KE 3)

Nach 24 h Zellbehandlung (Abbildung 19 (A) und Tabelle 12) zeigte sich durch die Bestimmung der EC₅₀-Werte, dass PMB etwa um das 3-fache toxischer für die Zellen war als COL. Bei einer Verlängerung des Behandlungszeitraumes auf 48 h (Abbildung 19 (B) und Tabelle 13) nahm die Toxizität bei beiden Substanzen geringfügig zu. Nach der Verdopplung des Behandlungszeitraumes konnte bei CdCl₂, im Gegensatz zu den Polymyxinen PMB und COL, eine deutliche Zunahme der toxischen Wirkung beobachtet werden. Für das Erreichen einer Zytotoxizität von 50 % war bei längerer Behandlungsdauer eine um 60 % niedrigere Konzentration CdCl₂ ausreichend. Die am wenigsten zellschädigende Substanz war GEN gefolgt von VAN und PMBN. Für PMBN und VAN konnte erst ab Konzentrationen von 1000 µM und deutlicher ab 2000 µM eine Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden. Bei GEN und VAN konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden zeitlichen Endpunkten der Behandlung festgestellt werden. Bei PMBN ergab sich, wie bei CdCl₂, eine deutliche Zunahme der Toxizität durch die Inkubationsverlängerung mit der Testsubstanz.

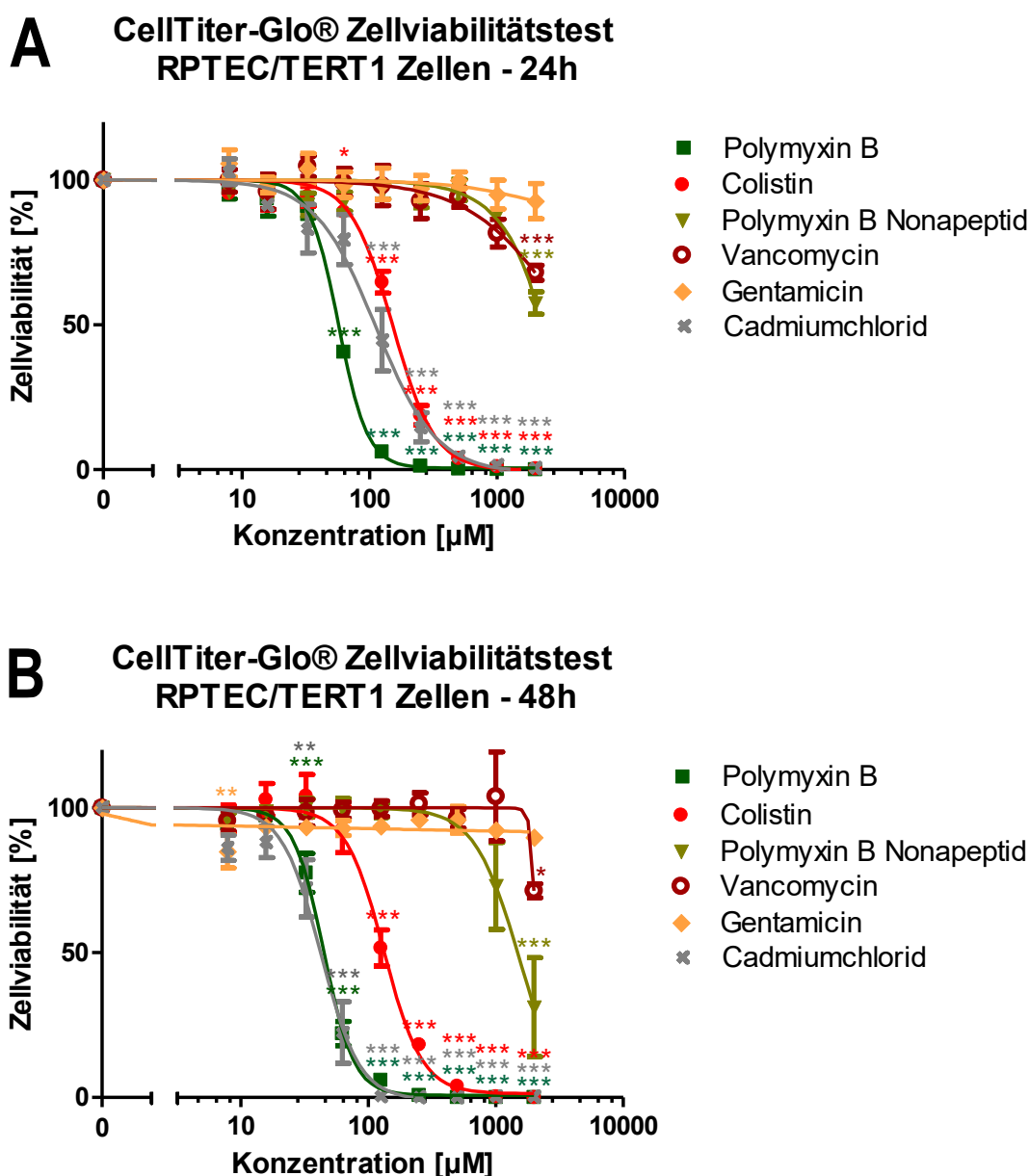


Abbildung 19: Zytotoxizität von Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid, Gentamicin, Vancomycin und Cadmiumchlorid in RPTEC/TERT1 Zellen.

(A) Zytotoxizitätsdaten in RPTEC/TERT1 Zellen nach 24 h und in (B) nach 48 h Behandlung mit den Testsubstanzen. (A, B) Nach 24 h und 48 h Behandlung wiesen PMB, CdCl₂ und COL in den RPTEC/TERT1 Zellen die stärkste Toxizität auf. Für GEN konnte im Gegensatz dazu keine signifikante Toxizität nachgewiesen werden. Für PMBN und VAN konnte in sehr hohen Konzentrationen eine geringe Toxizität beobachtet werden. Bei Zunahme der Behandlungszeit verstärkte sich vorrangig der toxische Effekt von CdCl₂ und PMBN. Methodik: Die Daten wurden mithilfe des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests generiert. Es wurden die Mittelwerte in Relation zum Kontrollmittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen abgebildet: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Die Asterisks sind farbkodiert und über den Werten mit Standardabweichung angegeben. Daten aus (A) wurden in Zusammenarbeit mit Sebastian Jarzina erhoben. Abkürzungen: CdCl₂ = Cadmiumchlorid, COL = Colistin, GEN = Gentamicin, PMB = Polymyxin B, PMBN = Polymyxin B Nonapeptid, VAN = Vancomycin.

Tabelle 12: EC_{50} - und EC_{10} -Werte des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests in RPTEC/TERT1 Zellen der Substanzen PMB, COL, PMBN, VAN, GEN und $CdCl_2$ nach 24 h Zellbehandlung mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen.

Für die Substanzen PMBN, VAN und GEN konnten aufgrund der geringen Zytotoxizität keine EC -Werte berechnet werden. Die EC_{10} -Werte für PMBN und VAN wurden graphisch ermittelt. Abkürzungen: $CdCl_2$ = Cadmiumchlorid, COL = Colistin, EC = Effective Concentration (Effektive Konzentration), GEN = Gentamicin, PMB = Polymyxin B, PMBN = Polymyxin B Nonapeptid, VAN = Vancomycin.

RPTEC/TERT1 24h	EC_{50} [μ M]	EC_{50} 95% Konfidenzintervall	EC_{10} [μ M]	EC_{10} 95% Konfidenzintervall
PMB	57,6	54,3 – 61,2	33,4	28,1 – 39,7
COL	156,7	145,2 – 169,2	74,9	64,4 – 87,2
PMBN	>2000	-	832	-
VAN	>2000	-	549	-
GEN	>2000	-	>2000	-
$CdCl_2$	114,7	92,1 – 142,8	37,6	23,5 – 60,2

Tabelle 13: EC_{50} - und EC_{10} -Werte des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests in RPTEC/TERT1 Zellen für die Substanzen PMB, COL, PMBN, VAN, GEN und $CdCl_2$ nach 48 h Zellbehandlung mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen.

Für die Substanzen VAN und GEN konnten aufgrund der geringen Zytotoxizität keine EC -Werte berechnet werden. Der EC_{10} -Wert für VAN wurden graphisch ermittelt. Abkürzungen: $CdCl_2$ = Cadmiumchlorid, COL = Colistin, EC = Effective Concentration (Effektive Konzentration), GEN = Gentamicin, PMB = Polymyxin B, PMBN = Polymyxin B Nonapeptid, VAN = Vancomycin.

RPTEC/TERT1 48h	EC_{50} [μ M]	EC_{50} 95% Konfidenzintervall	EC_{10} [μ M]	EC_{10} 95% Konfidenzintervall
PMB	44,7	41,6 – 47,9	24,6	21,5 – 28,2
COL	130,5	114,3 – 149,1	59,6	44,5 – 79,7
PMBN	1375	318,0 – 5945	643,1	418,4 – 988,4
VAN	>2000	-	1819	-
GEN	>2000	-	>2000	-
$CdCl_2$	45,9	38,8 – 51,9	23,7	17,7 – 31,7

Diese Entwicklungen spiegelten sich auch in der Zellmorphologie bei der Beobachtung mit dem Lichtmikroskop wider. Unter normalen Bedingungen bildeten die Epithelzellen der RPTEC/TERT1-Zelllinie ein konfluierendes kopfsteinpflasterartiges Relief. Ab einer Konzentration von 31,25 μ M für PMB und $CdCl_2$ und 250 μ M für COL begann das Zytoplasma der Zellen zu kondensieren und die Zellen begannen sich abgerundet vom Boden der Wells abzulösen. Bei GEN war die Zellmorphologie auch in hohen Konzentrationen nahezu unverändert, während bei PMBN und Vancomycin lediglich bei der höchsten Konzentration von 2000 μ M eine leichte Veränderung in Form von Zellabrundung und Ablösung von der Wachstumsfläche zu beobachten war.

3.1.2 Zytotoxizität der Polymyxine, Vancomycin, Gentamicin und Cadmium in der Zelllinie NRK-52E (KE 3)

Nach 24 h Behandlung der Zellen (Abbildung 20 (A) und Tabelle 14) konnte ausgelöst durch CdCl_2 in den NRK-52E Zellen der stärkste toxische Effekt nachgewiesen werden. Bei einer Verdopplung der Behandlungsdauer auf 48 h (Abbildung 20 (B) und Tabelle 15) war bereits bei einer etwa 10-fach geringeren Konzentration eine Zellviabilität von 50 % nachzuweisen. PMB zeigte schwächer ausgeprägte toxische Auswirkungen als CdCl_2 mit einer etwa 12-fach höheren EC_{50} -Konzentration im Vergleich zu CdCl_2 . Der toxische Effekt von PMB verstärkte sich nach 48 h Behandlung vorrangig in hohen Konzentrationen ab 500 μM . Bei VAN und COL war erst ab Konzentrationen von 1000 μM , deutlicher ab 2000 μM eine Abnahme der Zellviabilität zu beobachten, mit einer etwas stärker toxischen Wirkung von VAN. Der toxische Effekt von COL nahm insbesondere in hohen Konzentrationen vergleichbar mit PMB zu. Bei den am geringsten toxisch wirkenden Substanzen GEN, gefolgt von PMBN und VAN konnten generell sehr geringe zellschädigende Effekte und keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden zeitlichen Endpunkten ausgemacht werden.

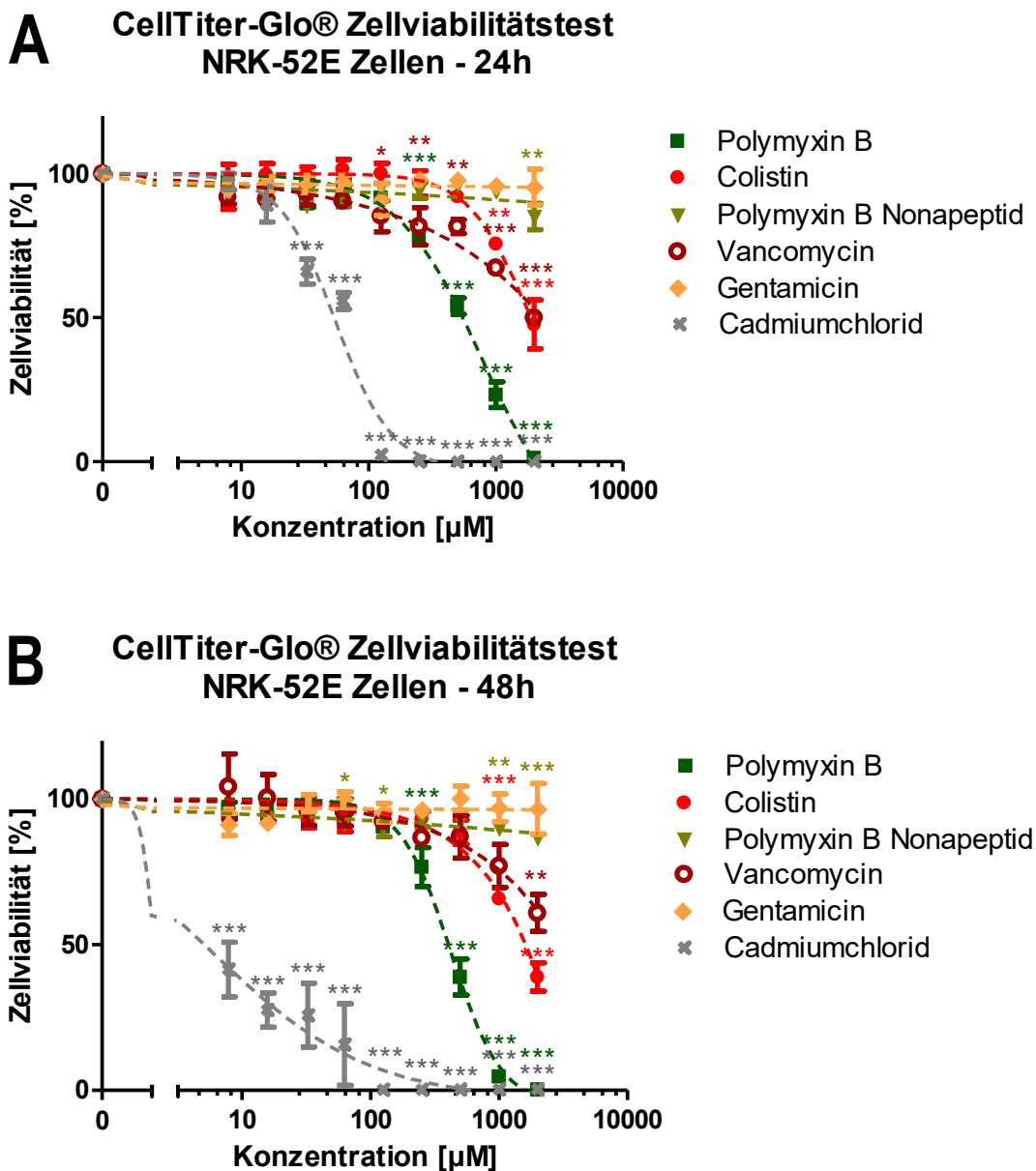


Abbildung 20: Zytotoxizität von Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid, Gentamicin, Vancomycin und Cadmiumchlorid in NRK-52E Zellen.

(A) Zytotoxizitätsdaten in NRK-52E Zellen nach 24 h und in (B) nach 48 h Behandlung mit den Testsubstanzen. (A, B) Nach 24 h und 48 h Behandlung waren CdCl_2 und PMB die Substanzen mit der am stärksten ausgeprägten Toxizität. COL und VAN wiesen in sehr hohen Konzentrationen toxische Effekte auf. Für GEN und PMBN konnte in NRK-52E Zellen keine signifikante Abnahme der Zellviabilität nachgewiesen werden. Der toxische Effekt von CdCl_2 nahm mit einer Verlängerung des Behandlungszeitraums deutlich zu. Methodik: Die Daten für den Graphen wurden mithilfe des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests generiert. Es wurden die Mittelwerte in Relation zum Kontrollmittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen abgebildet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Asterisks sind farbkodiert und über den Werten mit Standardabweichung angegeben. Daten aus (A) wurden in Zusammenarbeit mit Sebastian Jarzina erhoben. Abkürzungen: CdCl_2 = Cadmiumchlorid, COL = Colistin, GEN = Gentamicin, PMB = Polymyxin B, PMBN = Polymyxin B Nonapeptid, VAN = Vancomycin.

Tabelle 14: EC_{50} - und EC_{10} -Werte des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests in NRK-52E Zellen für die Substanzen PMB, COL, PMBN, VAN, GEN und $CdCl_2$ nach 24 h Zellbehandlung mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen.

Für die Substanzen PMBN, VAN und GEN konnten aufgrund der geringen Zytotoxizität keine EC -Werte berechnet werden. Der EC_{10} -Wert für VAN wurden graphisch ermittelt. Abkürzungen: $CdCl_2$ = Cadmiumchlorid, COL = Colistin, EC = Effective Concentration (Effektive Konzentration), GEN = Gentamicin, PMB = Polymyxin B, PMBN = Polymyxin B Nonapeptid, VAN = Vancomycin.

NRK-52E 24h	EC_{50} [μ M]	EC_{50} 95% Konfidenzintervall	EC_{10} [μ M]	EC_{10} 95% Konfidenzintervall
PMB	677,1	530,7 – 863,9	176	142,3 – 217,8
COL	1545	288,8 – 8266	531,6	287,6 – 982,5
PMBN	>2000	-	>2000	-
VAN	>2000	-	68	-
GEN	>2000	-	>2000	-
$CdCl_2$	57,1	47,7 – 68,3	19,8	13,6 – 29,7

Tabelle 15: EC_{50} - und EC_{10} -Werte des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests in NRK-52E Zellen für die Substanzen PMB, COL, PMBN, VAN, GEN und $CdCl_2$ nach 48 h Zellbehandlung mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen.

Für die Substanzen PMBN, VAN und GEN konnten aufgrund der geringen Zytotoxizität keine EC -Werte berechnet werden. Der EC_{10} -Wert für VAN wurden graphisch ermittelt. Abkürzungen: $CdCl_2$ = Cadmiumchlorid, COL = Colistin, EC = Effective Concentration (Effektive Konzentration), GEN = Gentamicin, PMB = Polymyxin B, PMBN = Polymyxin B Nonapeptid, VAN = Vancomycin.

NRK-52E 48h	EC_{50} [μ M]	EC_{50} 95% Konfidenzintervall	EC_{10} [μ M]	EC_{10} 95% Konfidenzintervall
PMB	433,5	385,8 – 487	180,9	146,9 – 222,6
COL	1076	804,1 – 1440	518	388,4 – 690,8
PMBN	>2000	-	>2000	-
VAN	>2000	-	263	-
GEN	>2000	-	>2000	-
$CdCl_2$	5,6	2,7 – 11,9	0,3	0,1 – 4

Auch bei den NRK-52E konnten vergleichbare Veränderungen wie bei der menschlichen Zelllinie in der Zellmorphologie bei der Beobachtung mit dem Lichtmikroskop festgestellt werden. Gesunde NRK-52E Epithelzellen wiesen ein prismenartiges, konfluentes Wachstumsverhalten auf. Ab Konzentrationen von 500 μ M für PMB und 1000 μ M für COL und VAN begann sich die Zellmorphologie in Form von kondensiertem Zytoplasma, Abrundung der Zellen und Ablösung vom Boden der Wells zu verändern. Bei sehr geringer Zellviabilität im Zytotoxizitätstest, wie beispielsweise bei hohen applizierten Konzentrationen von $CdCl_2$ erfolgte eine starke Abrundung und Ablösung der Zellen mit Aufhebung der Konfluenz. Bei GEN und PMBN konnten keine Veränderungen, auch bei der Verwendung der höchsten Konzentration, beobachtet werden.

3.1.3 Vergleich der toxischen Effekte der Polymyxine, Vancomycin, Gentamicin und Cadmium zwischen den Zelllinien RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen (KE 3)

In Abbildung 21 ist die Zytotoxizität in den untersuchten Zelllinien im direkten Vergleich für die einzelnen Testsubstanzen abgebildet.

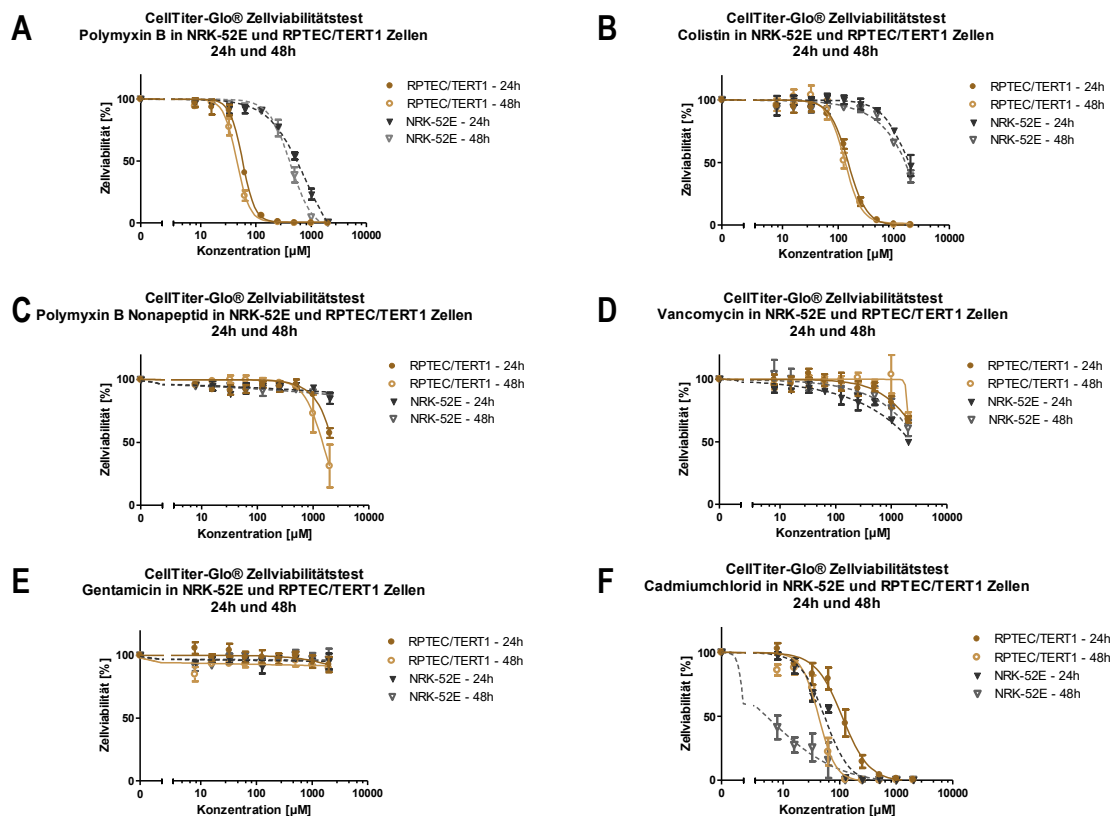


Abbildung 21: Zytotoxizität von Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid, Vancomycin, Gentamicin und Cadmiumchlorid in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen nach 24 h und 48 h im Vergleich.

Zellviabilitäts-Graphen aus Abbildung 19 und Abbildung 20 im direkten Vergleich für die Behandlung der Zellen mit (A) Polymyxin B, (B) Colistin, (C) Polymyxin B Nonapeptid, (D) Vancomycin, (E) Gentamicin und (F) Cadmiumchlorid. (A,B,C,D,E,F) Die Toxizität der Polymyxine (PMB, PMBN, COL) war in den RPTEC/TERT1 Zellen stärker ausgeprägt, als in den NRK-52E Zellen. CdCl_2 war in NRK-52E deutlich toxischer als in RPTEC/TERT1 Zellen. VAN und GEN verursachten in beiden Zelllinien nur eine sehr geringe bzw. keine Zellschädigung. Methodik: Datenerhebung, Auswertung und Darstellungskriterien sind in Abbildung 19 und Abbildung 20 beschrieben. Auf die Darstellung der Asterisks wurde in dieser Übersichtsdarstellung verzichtet. Sie sind den Graphen in Abbildung 19 und Abbildung 20 zu entnehmen.

Für die Polymyxine PMB und COL zeigte sich bei gleich gewählten Konzentrationen eine deutlich stärker ausgeprägte Abnahme der Zellviabilität in den menschlichen Zellen als im Zellmodell der Ratte. Für PMB war beispielsweise nach einer 24 h Behandlung eine fast 12-fach höhere Konzentration in den Rattenzellen im Vergleich zu den menschlichen Zellen nötig, um einen Abfall der Zellviabilität auf 50% zu verursachen. Auch bei der Verdopplung der Inkubationszeit waren für die Rattenzellen, im Vergleich zu den Menschenzellen deutlich höhere Konzentrationen für die Verursachung gleicher Effekte notwendig. Die mit COL behandelten Zellen verhielten sich ähnlich, jedoch mit insgesamt etwas geringer ausfallenden toxischen Effekten als bei einer Behandlung mit PMB.

Für PMBN konnte sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h in den NRK-52E Zellen kaum ein toxischer Effekt beobachtet werden. Bei den RPTEC/TERT1 Zellen konnte sowohl nach 24 h, stärker jedoch nach 48 h Behandlung mit sehr hohen Konzentrationen von PMBN eine signifikante Zytotoxizität nachgewiesen werden. CdCl₂ zeigte in beiden Zelllinien deutlich ausgeprägte toxische Effekte. Hier konnte eine größere Sensibilität der Rattenzelllinie gegenüber den menschlichen Zellen beobachtet werden. Bei VAN konnte in sehr hohen Konzentrationen in den NRK-52E Zellen eine etwas stärkere Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden, im Vergleich zu den RPTEC/TERT1 Zellen. Bei GEN hingegen konnte in beiden Zelllinien keine signifikante Toxizität nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ließ sich beobachten, dass die Toxizität der Polymyxine (PMB, PMBN, COL) im menschlichen Zellkulturmodell ausgeprägter war, als in dem der Rattenzelllinie. Im Gegensatz zu den Polymyxinen war CdCl₂ in NRK-52E deutlich toxischer als in RPTEC/TERT1 Zellen. VAN und GEN verursachten in beiden Zelllinien nur eine sehr geringe bzw. keine Zellschädigung, aufgrund dessen wurden sie nicht mehr als Testsubstanzen für KE 2 und KE 1 verwendet.

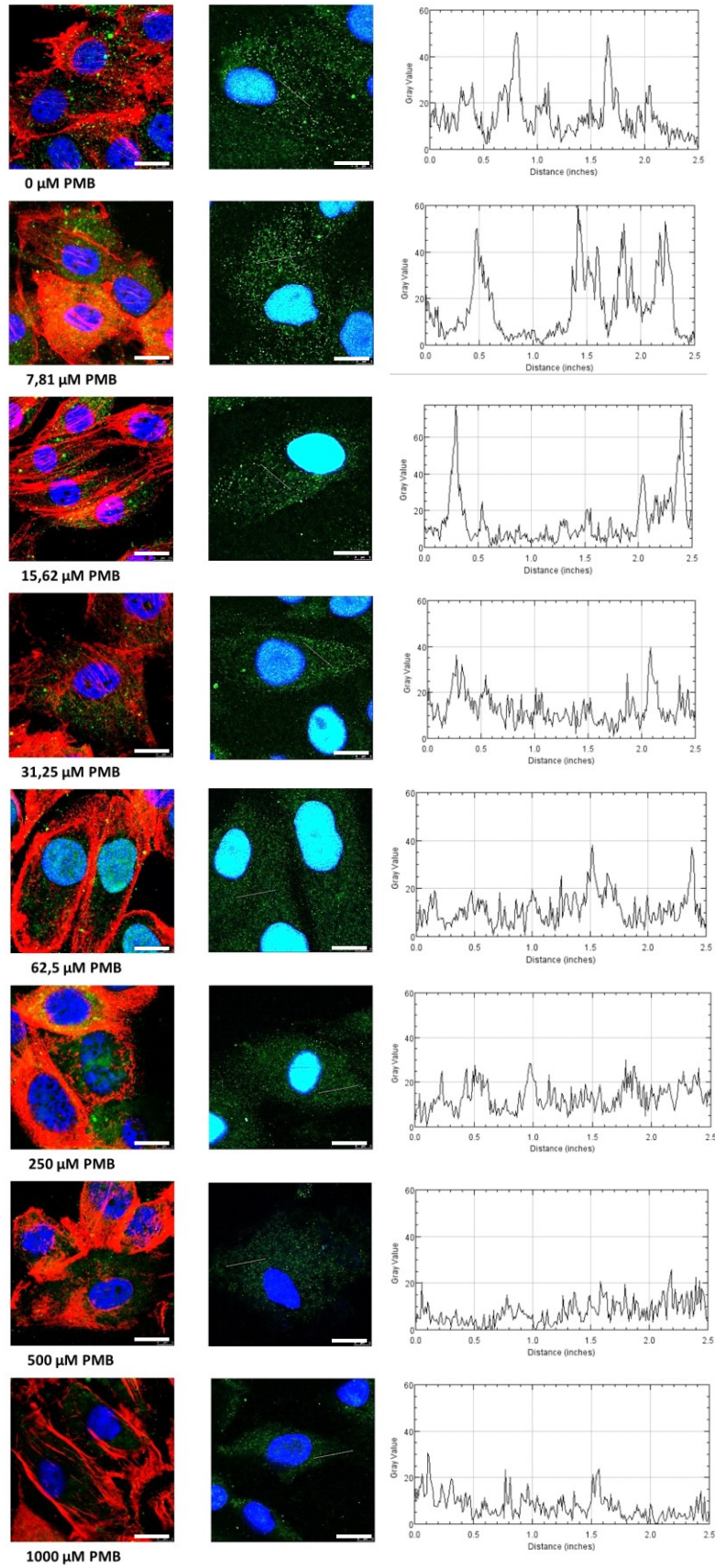
3.2 KE 2: Cathepsin D als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran

Das zweite Schlüsselereignis des hier untersuchten AOPs beschreibt die Freisetzung lysosomaler Inhalte in das Zytosol durch die Permeabilisierung der lysosomalen Membran (LMP). Wie in Abschnitt 1.4.2 beschrieben führt die Störung der lysosomalen Funktion und die anschließende Ruptur der lysosomalen Membran zur Freisetzung intralysosomaler Komponenten in das Zytoplasma und wurde als wichtiger Schritt bei der Initiierung des Zelltods identifiziert. Daher wurde die Freisetzung von CTSD als potentieller *in vitro* Endpunkt betrachtet, der KE 2 widerspiegelt. Methodisch wurde die Immunfluoreszenzfärbung der Protease CSTD gewählt, um deren intralysosomale und, in Folge der lysosomalen Membranpermeabilisierung, zytoplasmatische Verteilung sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Nach der Erhebung der Toxizitätsdaten von PMB in KE 3 für beide Zelllinien wurde mit der Etablierung einer Methodik für den Assay für KE 2 begonnen. PMB erwies sich hierbei als geeignet, da sich in den gewählten Konzentrationen von 7,81 μM bis 2000 μM eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität zeigte. Für die technische Entwicklung des Assays wurde zunächst exemplarisch PMB in den beiden verwendeten Zelllinien RPTEC/TERT1 und NRK-52E verwendet. Das Ziel war es, neben einer Darstellung der molekularen Prozesse über die Aufnahme von Immunfluoreszenzbildern auch eine quantitative Auswertung des Markers CTSD zu erreichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt. Es konnte in der Immunfluoreszenzfärbung bei beiden Zelllinien eine Veränderung der Verteilung von CTSD in der Zelle nach der Behandlung mit PMB beobachtet werden. Zunächst lag CTSD akkumuliert in den Lysosomen vor und stellte sich als punktuell intensives Signal dar. Durch die Behandlung mit PMB induzierte LMP fand eine Umverteilung von CTSD auf das wesentlich größere Volumen des Zytosols statt und es resultierte eine diffuse, schwächer ausgeprägte Intensität des Immunfluoreszenzsignals. Dies entsprach einer Abnahme der gemessenen mittleren und maximalen CTSD-Intensität mit zunehmender LMP.

3.2.1 Messung der CTSD Signalintensität als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran in RPTEC/TERT1 Zellen (KE 2)

In den Profile Plots (Abbildung 22 (A)) zeigt sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Signalintensität. Die Profile Plots visualisieren die Verteilung des CTSD-Signals in der Zelle. Bei niedrigen Substanzkonzentrationen konnten mehrere hohe Amplitudenmaxima, die die punktuell sehr helle Signalintensität innerhalb der Zelle abbilden, beobachtet werden. Dieses starke punktuelle Fluoreszenzsignal deutet auf intakte Lysosomen mit der Protease CTSD in ihrem Lumen hin. Auch hier zeigte sich ab Konzentrationen von 15,62 μM PMB eine Abflachung der Amplitudenmaxima des CTSD Immunfluoreszenzsignals in den Profile Plots. Diese Beobachtung deutet auf eine Ruptur der Lysosomen und die damit einhergehende diffuse Verteilung der Protease CTSD im Zytosol der Zelle hin. Bei sehr hohen Konzentrationen von 500 μM oder 1000 μM PMB waren nahezu keine Signal-Akkumulationen und die damit verbundenen hohen Amplituden in den Profile Plots mehr nachzuweisen, was auf die Ruptur des Großteils der Lysosomen hindeutet.

A



B RPTEC/TERT1 Zellen behandelt mit Polymyxin B (24h)

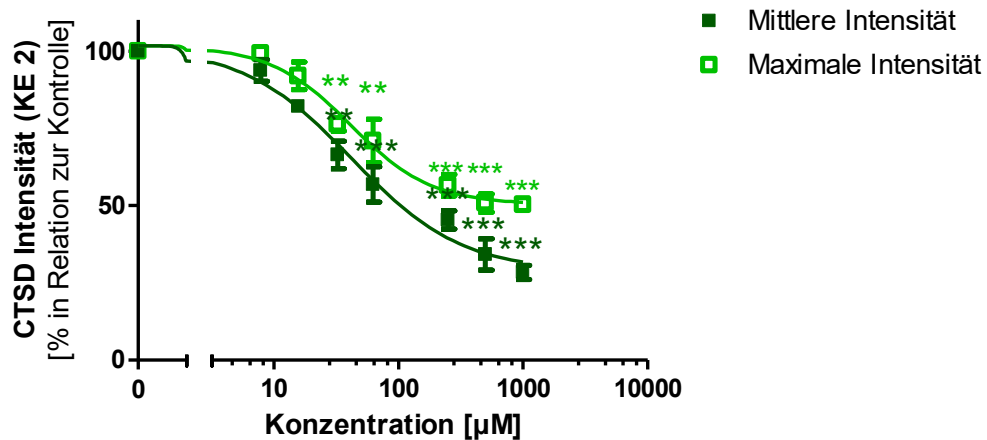


Abbildung 22: Cathepsin D als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran in RPTEC/TERT1 Zellen induziert durch 24 h Behandlung mit Polymyxin B.

(A) Exemplarische Immunfluoreszenzbilder von CTSD in RPTEC/TERT1 Zellen (von links nach rechts: Phalloidin- und CTSD Färbung, CTSD Färbung, Profile Plot von gelber Messlinie) mit Angabe der Konzentration von PMB für 24 h. Maßstab in weiß dargestellt = 10 µm. In den Immunfluoreszenzaufnahmen der RPTEC/TERT1 Zellen zeigt sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Signalintensität des Fluoreszenzsignals von CTSD. In den Profile Plots zeigt sich eine Abflachung der Amplitudenmaxima mit Zunahme der PMB Konzentration. (B) Mittelwerte (n = 3) mit Standardabweichung der mittleren und maximalen Signalintensität von CTSD in RPTEC/TERT1 nach 24 h Behandlung mit PMB. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen abgebildet: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Die Asterisks wurden farbkodiert über den Werten mit Standardabweichung dargestellt. Es zeigt sich eine Abnahme der mittleren und maximalen Intensität des Immunfluoreszenzsignals der CTSD-Färbung mit zunehmender Behandlungskonzentration von PMB in RPTEC/TERT1 Zellen. (A,B) Methodik: Nach 24 h Behandlung mit PMB wurde CTSD in den Lysosomen der RPTEC/TERT1 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie dargestellt. Zur besseren Lokalisierung der CTSD Färbung (grün) und zur Bestätigung der Spezifität des CTSD-Antikörpers wurde eine Phalloidinfärbung zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts (rot) der Zellen durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) angefärbt. Die Bilder wurden verwendet, um beispielhafte Profile Plots zu erstellen. Die Messlinien sind in Gelb zu erkennen. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit ImageJ ausgewertet. Die Auswertung der Bilder erfolgte randomisiert und verblindet. Abkürzungen: CTSD = Cathepsin D, KE = Key Event (Schlüsselereignis), PMB = Polymyxin B.

In Graph (B) in Abbildung 22 sieht man eine deutliche Abnahme der mittleren und maximalen Intensität des Immunfluoreszenzsignals der CTSD-Färbung mit zunehmender Behandlungskonzentration von PMB. Dies deutet auf eine konzentrationsabhängige Induktion von LMP durch PMB in RPTEC/TERT1 Zellen hin. Diese Signalabnahme steht im Einklang mit der abnehmenden Zellviabilität (KE 3). Schon ab einer Konzentration von 15,62 µM zeigten sich erste Effekte in Form einer geringfügigen Abnahme der mittleren (auf ca. 80%) und maximalen Signalintensität (auf

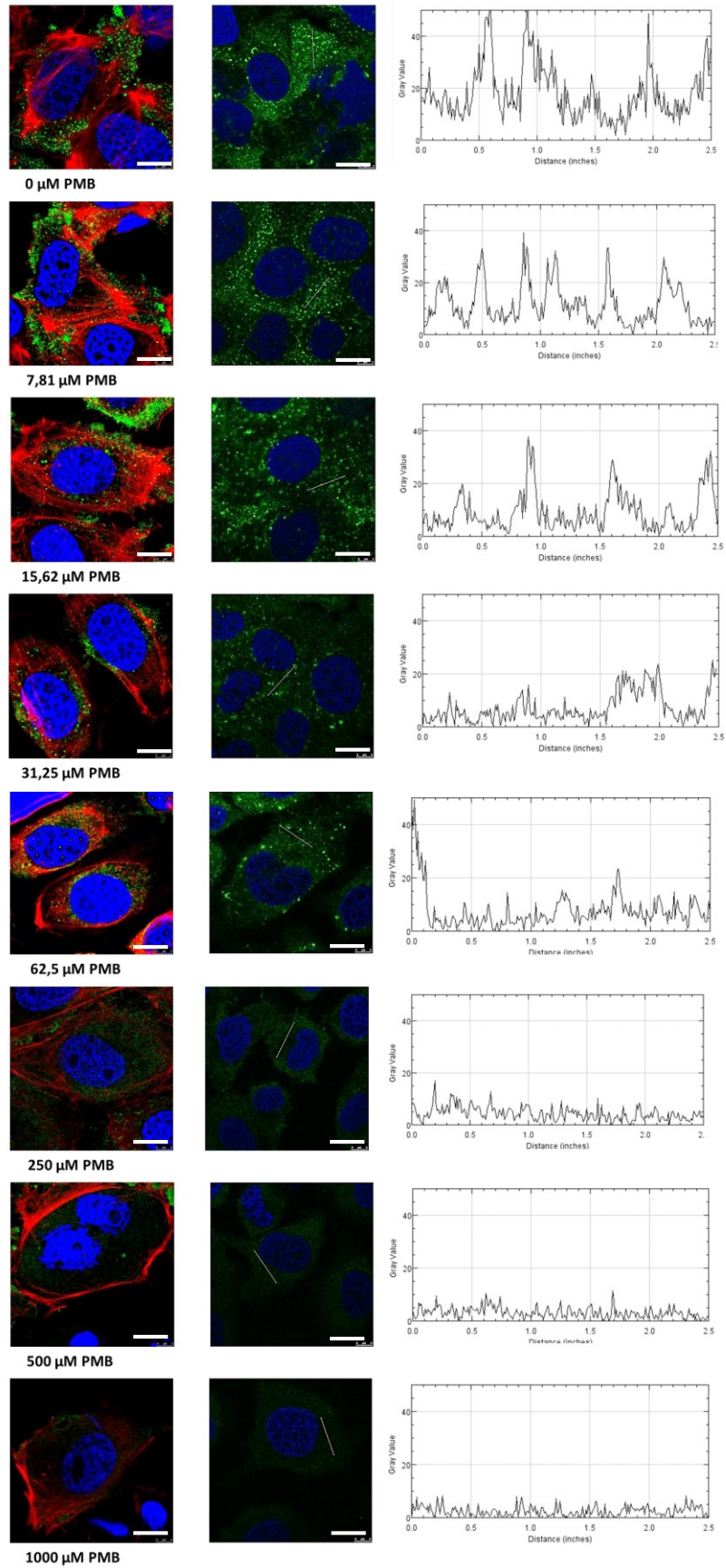
ca. 90%) von CTSD. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000 μM war die maximale Intensität von CTSD auf etwa 50 % des Ausgangswertes abgefallen.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus KE 3 zeigt sich, dass mit zunehmenden Konzentrationen von PMB eine Zunahme der Zytotoxizität (KE 3) sowie eine Abnahme der Intensität des Immunfluoreszenzsignals der Protease CTSD (KE 2) resultiert. Diese Beobachtung bestätigt einen mechanistischen Zusammenhang zwischen der zunehmenden lysosomalen Membranpermeabilisierung und der Abnahme der Zellviabilität.

3.2.2 Messung der CTSD Signalintensität als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran in NRK-52E Zellen (KE 2)

In den exemplarisch dargestellten Immunfluoreszenzaufnahmen (siehe Abbildung 23 (A)) kann eine Abnahme der punktuellen Signal-Akkumulation der Protease CTSD ab Konzentrationen von 15,62 μM PMB in den NRK-52E Zellen beobachtet werden. Ferner zeigt sich in den Profile Plots eine Abnahme der Amplitudenmaxima bei einer Steigerung der Konzentration. Auch hier lassen die Beobachtungen auf eine konzentrationsabhängige Ruptur der Lysosomen und die damit einhergehende diffuse Verteilung der Protease CTSD in das Zytosol der Zelle schließen.

A



B NRK-52E Zellen behandelt mit Polymyxin B (24h)

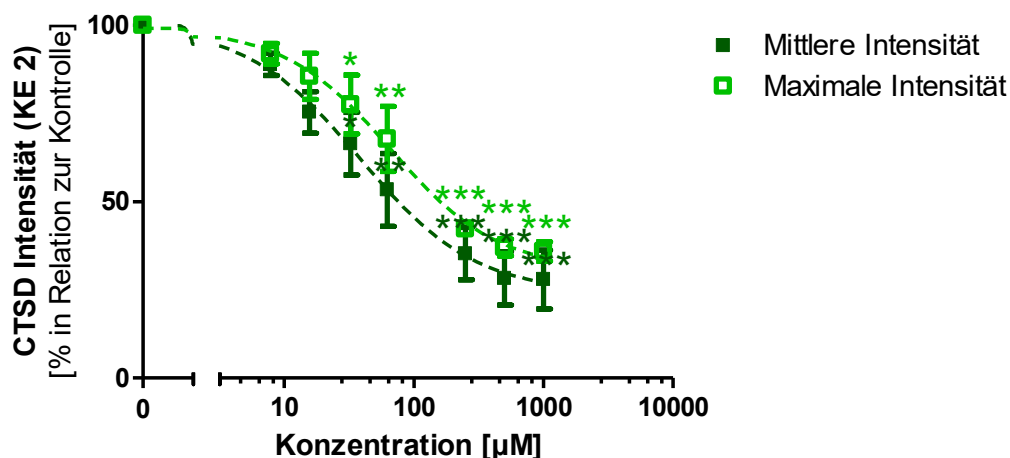


Abbildung 23: Cathepsin D als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran in NRK-52E Zellen induziert durch 24 h Behandlung mit Polymyxin B.

(A) Exemplarische Immunfluoreszenzbilder von CTSD in NRK-25E Zellen (von links nach rechts: Phalloidin- und CTSD Färbung, CTSD Färbung, Profile Plot von gelber Messlinie) mit Angabe der Konzentration von PMB für 24 h. Maßstab in weiß dargestellt = 10 µm. In den Immunfluoreszenzaufnahmen der NRK-52E Zellen zeigt sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Signalintensität des Fluoreszenzsignals von CTSD. In den Profile Plots zeigt sich eine Abflachung der Amplitudenmaxima mit Zunahme der PMB Konzentration. (B) Mittelwerte ($n = 3$) mit Standardabweichung der mittleren und maximalen Signalintensität von CTSD in NRK-52E nach 24h Behandlung mit PMB. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen abgebildet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Asterisks wurden farbkodiert über den Werten mit Standardabweichung dargestellt. Es zeigt sich eine Abnahme der mittleren und maximalen Intensität des Immunfluoreszenzsignals der CTSD-Färbung mit zunehmender Behandlungskonzentration von PMB in NRK-52E Zellen. (A,B) Methodik: Nach 24 h Behandlung mit PMB wurde CTSD in den Lysosomen der NRK-52E Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie dargestellt. Zur besseren Lokalisierung der CTSD Färbung (grün) und zur Bestätigung der Spezifität des CTSD-Antikörpers wurde eine Phalloidinfärbung zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts (rot) der Zellen durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) angefärbt. Die Bilder wurden verwendet um beispielhafte Profile Plots zu erstellen. Die Messlinien sind in Gelb zu erkennen. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit ImageJ ausgewertet. Die Auswertung der Bilder erfolgte randomisiert und verblindet. Abkürzungen: CTSD = Cathepsin D, KE = Key Event (Schlüsselereignis), PMB = Polymyxin B.

Auch in den mit PMB behandelten NRK-52E Zellen konnte, wie bereits bei den humanen Zellen, eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme der mittleren und maximalen Intensität des Immunfluoreszenzsignals von CTSD beobachtet werden (Abbildung 23 (B)). Dies deutet auch bei der Zelllinie aus der Ratte auf eine Induktion einer LMP durch PMB hin. Wie bei den RPTEC/TERT1 Zellen konnte auch hier ab einer Konzentration von 15,62 µM eine beginnende Abnahme der mittleren (auf ca. 75%) und maximalen (auf ca. 85%) Signalintensität von CTSD beobachtet werden. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000 µM waren sowohl die maximale als auch die mittlere

Intensität des Immunfluoreszenzsignals von CTSD auf etwa 30 % des Ausgangswertes abgefallen. Auch für die NRK-52E Zelllinie der Ratte kann bei der Betrachtung der Ergebnisse in Zusammenhang mit den Ergebnissen von KE 3 davon ausgegangen werden, dass mit zunehmenden Konzentrationen von PMB eine Zunahme der Zytotoxizität (KE 3) und eine Abnahme der Intensität des Immunfluoreszenzsignals der Protease CTSD (KE 2) resultiert. Auch hier kann ein mechanistischer Zusammenhang zwischen steigender Zytotoxizität bei der Behandlung der Zellen mit PMB und der Ruptur der lysosomalen Membranen, verdeutlicht durch die Umverteilung des CTSD Fluoreszenzsignals, bestätigt werden.

3.2.3 Vergleich der ermittelten Signalintensitäten für CTSD zwischen den Zelllinien RPTEC/TERT1 und NRK-52E (KE 2)

In Abbildung 24 ist ein Vergleich der erhobenen mittleren und maximalen Intensität des Immunfluoreszenzsignals von CTSD beider Zelllinien für die 24 h Behandlung mit PMB dargestellt.

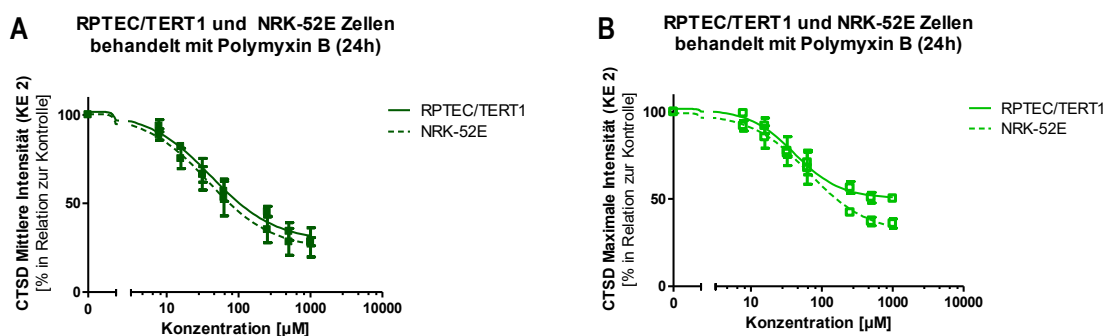


Abbildung 24: Vergleichender Effekt von PMB auf die Signalintensität von CTSD in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen nach 24 h Behandlung.

(A) Vergleich der mittleren Signalintensität in NRK-52E und RPTEC/TERT1 Zellen abhängig von der PMB Konzentration. **(B)** Vergleich der maximalen Signalintensität in NRK-52E und RPTEC/TERT1 Zellen abhängig von der PMB Konzentration. **(A,B)** In der Abnahme der mittleren und maximalen CTSD-Signalintensität mit zunehmender PMB-Konzentration zeigt sich ein fast deckungsgleicher Kurvenverlauf ohne die im Zytotoxizitätstest festgestellten Unterschiede der Empfindlichkeit der unterschiedlichen Spezies auf die Substanz PMB. Methodik: Datenerhebung, Auswertung und Darstellungskriterien sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 beschrieben. Auf die Darstellung der Asterisks wurde in dieser Übersichtsdarstellung verzichtet. Sie sind den Graphen in Abbildung 22 und Abbildung 23 zu entnehmen. Abkürzungen: CTSD = Cathepsin D, KE = Key Event (Schlüsselereignis), PMB = Polymyxin B.

Im Gegensatz zu den ausgeprägten Unterschieden in der Zytotoxizität von PMB in den NRK-52E Zellen im Vergleich zu den RPTEC/TERT1 Zellen kann man hier nahezu

3 Ergebnisse

deckungsgleiche Kurvenverläufe beobachten. Die in dem Zytotoxizitätstest (KE 3) festgestellten Unterschiede in der Empfindlichkeit der Spezies auf das Polymyxin konnten hier somit nicht bestätigt werden.

3.3 KE 1: Expression des lysosomal-assoziierten Membranproteins als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion

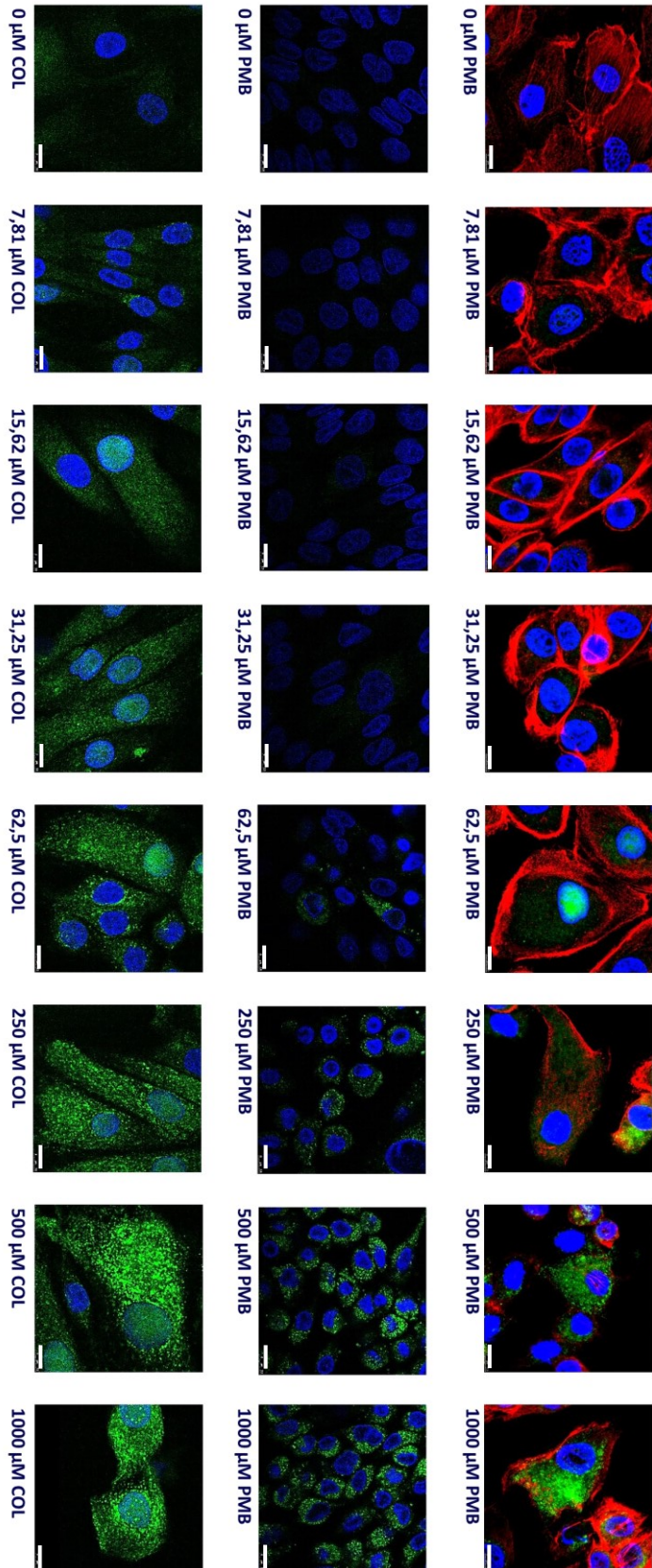
Das erste Schlüsselereignis des untersuchten AOPs folgt direkt im Anschluss an das MIE und beschreibt die funktionelle Störung und Schwellung der Lysosomen. Diese wird hervorgerufen durch die Akkumulation der toxischen Substanzen in den Lysosomen der Zelle. In Folge dessen kommt es zu einer verstärkten Expression von LAMPs zur Stabilisierung der Lysosomen, um eine LMP zu verhindern.

Für eine ungestörte Funktion der Lysosomen sind die lysosomal-assoziierten Membranproteine von großer Bedeutung. LAMP1 und LAMP2 sind die am häufigsten vorkommenden Proteine der lysosomalen Membran und spielen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der funktionellen und strukturellen Integrität der Lysosomen (Hua et al., 1998). Da die Expression von LAMP1 und 2 bei zunehmender lysosomaler Dysfunktion ansteigt (Liu et al., 2015) wurden sie als potentieller *in vitro* Endpunkt für KE 1 betrachtet. Methodisch wurde wie für KE 2 eine Immunfluoreszenzfärbung gewählt und ein Assay zur Visualisierung von LAMP entwickelt. In RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen wurde die konzentrationsabhängige LAMP-Expression nach einer 24 h Behandlung mit PMB untersucht. Da zukünftig eine Durchführung des Assays für die anderen Modellsubstanzen ergänzt werden soll, konnte das Experiment bereits in den RPTEC/TERT1 Zellen für COL wiederholt werden. Es konnte eine deutliche Zunahme der Intensität des LAMP-Immunfluoreszenzsignals, induziert durch PMB und COL beobachtet werden.

3.3.1 Messung der LAMP Signalintensität als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion in RPTEC/TERT1 Zellen (KE 1)

In RPTEC/TERT1 Zellen wurde zur Visualisierung ein monoklonaler Antikörper gegen das lysosomal-assoziierte Membranprotein 2 gewählt. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, induzierte sowohl PMB als auch COL nach 24 h Behandlung eine deutliche Zunahme des grünen LAMP2-Fluoreszenzsignals in RPTEC/TERT1 Zellen.

A



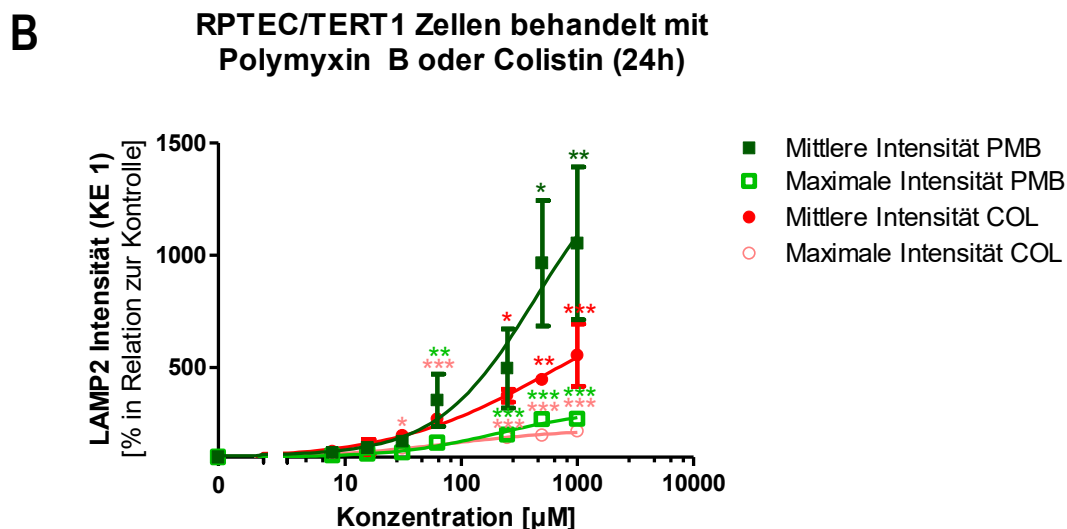


Abbildung 25: LAMP-Expression als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion nach der Behandlung mit Polymyxin B bzw. Colistin in RPTEC/TERT1 Zellen.

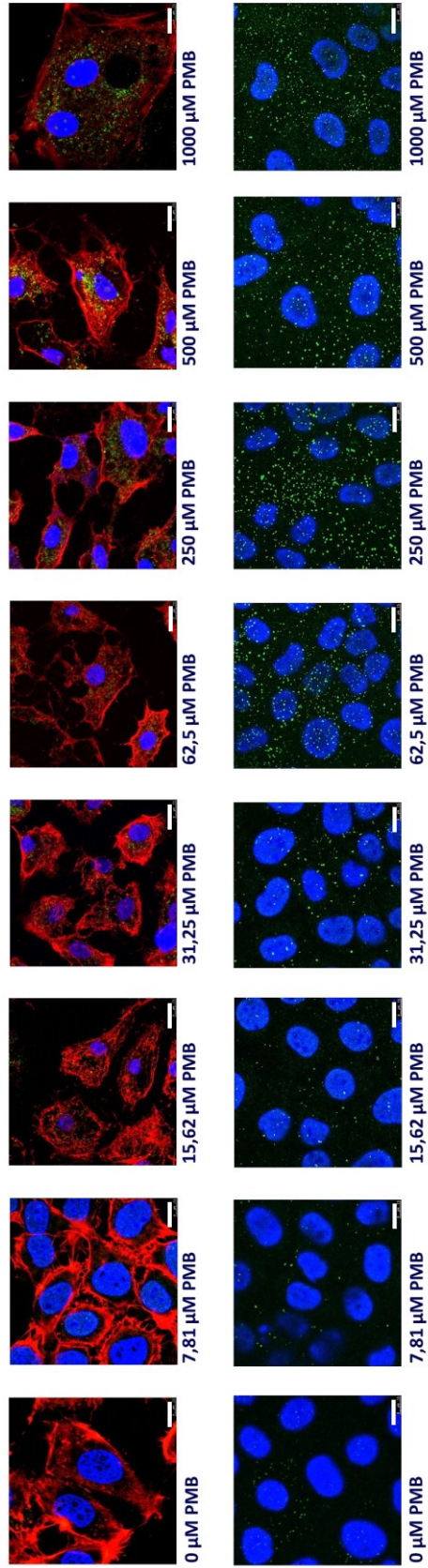
(A) Exemplarische Immunfluoreszenzbilder von LAMP2 in RPTEC/TERT1 Zellen nach 24 h Behandlung (von oben nach unten: Phalloidin und LAMP-2 Färbung nach PMB Behandlung, LAMP2 Färbung nach PMB Behandlung, LAMP2 Färbung nach COL Behandlung). Maßstab in weiß dargestellt = 10 µm. (B) Mittelwerte ($n = 3$) mit Standardabweichung der mittleren und maximalen Signalintensität von LAMP2 in RPTEC/TERT1 nach 24 h Behandlung mit PMB bzw. COL. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen abgebildet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Asterisks wurden farbkodiert über den Werten mit Standardabweichung dargestellt. (A,B) PMB und COL induzierten nach 24 h Behandlung eine deutliche Zunahme des grünen LAMP2-Fluoreszenzsignals in RPTEC/TERT1 Zellen. Die Zunahme der Signalintensität war durch PMB stärker ausgeprägt als durch COL. Methodik: Nach 24 h Behandlung mit PMB bzw. COL wurde LAMP2 (grün) in den Lysosomen der RPTEC/TERT1 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie dargestellt. Zur besseren Lokalisierung der LAMP2 Färbung und zur Bestätigung der Spezifität des LAMP2-Antikörpers wurde eine Phalloidinfärbung (rot) zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts der Zellen durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) angefärbt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit ImageJ ausgewertet und die dargestellten Graphen generiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte randomisiert und verblindet. Abkürzungen: PMB = Polymyxin B, COL = Colistin, KE = Key Event (Schlüsselereignis), LAMP2 = lysosomal-assoziiertes Membranprotein 2.

In (A) der Abbildung 25 kann man eine deutliche Zunahme der grünen LAMP2-Färbung bei Erhöhung der Konzentration sowohl für PMB, als auch für COL in den RPTEC/TERT1 Zellen nach einem Behandlungszeitraum von 24 h beobachten. In Abbildung 25 (B) zeigt sich nach 24 h Behandlung mit PMB eine massive Erhöhung der mittleren LAMP2-Signalintensität von 100 % bei der Kontrolle auf über 1000 %. Auch die maximale Intensität zeigte einen deutlichen Anstieg der Signalintensität. Bei einer PMB-Konzentration von 500 µM kam es zu einer Zunahme der maximalen Signalintensität auf über 250 %. Bei der COL Behandlung war der Anstieg der Fluoreszenzsignalintensität etwas geringer ausgeprägt als für PMB. Hier kam es bei Konzentrationen von 1000 µM bei der mittleren Intensität zu einem Anstieg auf 500 %, während das Signal der maximalen Signalintensität ähnlich wie bei PMB auf über 200 % zunahm.

PMB erwies sich im Zytotoxizitätstest (KE 3) in der menschlichen Zellkultur mit einer niedrigeren EC_{50} -Konzentration als deutlich toxischer für die Zellen als COL. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen der LAMP2-Färbung, da auch hier eine deutlich stärkere Zunahme der Signalintensität nach der Behandlung mit PMB im Vergleich zu den mit COL behandelten Zellen zu beobachten war. In diesem Experiment verdeutlichen die hohen Balken der Standardabweichung, vor allem für die sehr hohen Konzentrationen wie 500 μ M, eine große Streuung der Einzelwerte. Dies deutet auf eine breite Verteilung der Daten der einzelnen Experimente, meist bei höheren Konzentrationen, hin. In niedrigeren Konzentrationen konnten genauere Werte erhoben werden.

3.3.2 Messung der LAMP Signalintensität als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion in NRK-52E Zellen (KE 1)

In NRK-52E Zellen wurde zur Visualisierung ein monoklonaler Antikörper gegen das lysosomal-assoziierte Membranprotein 1 gewählt. Nach Testversuchen von gegen LAMP gerichteten Antikörpern in der Zelllinie, wurde der optimale Antikörper für eine spezifische Darstellung gewählt. In diesem Fall führte die Anfärbung von LAMP1 zu besseren qualitativen und quantitativen Ergebnissen als von LAMP2 wie in der humanen Zelllinie. Wie in Abbildung 26 zu sehen, induzierte die 24 h Behandlung mit PMB in den NRK-52E Zellen eine deutliche Zunahme des grünen LAMP1-Fluoreszenzsignals.



A

B NRK-52E Zellen behandelt mit Polymyxin B (24h)

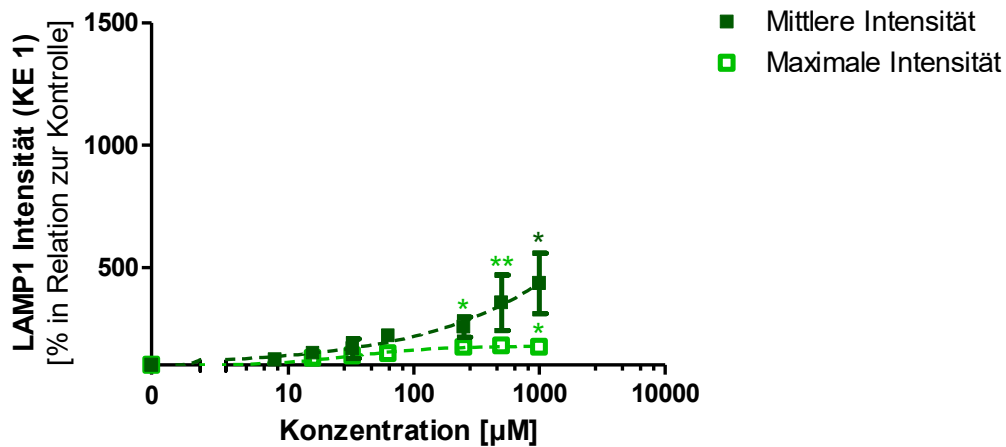


Abbildung 26: LAMP-Expression als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion nach der Behandlung mit Polymyxin B in NRK-52E Zellen.

(A) Exemplarische Immunfluoreszenzbilder von LAMP1 in NRK-52E Zellen (oben: Phalloidin- und LAMP1 Färbung, unten: LAMP1 Färbung) nach 24 h Behandlung mit PMB. Maßstab in weiß dargestellt = 10 µm. (B) Mittelwerte ($n=3$) mit Standardabweichung der mittleren und maximalen Signalintensität von LAMP1 in NRK-52E nach 24 h Behandlung mit PMB. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen abgebildet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Asterisks wurden farbkodiert über den Werten mit Standardabweichung dargestellt. (A,B) PMB induzierte nach 24 h Behandlung eine deutliche Zunahme des grünen LAMP1-Fluoreszenzsignals in NRK-52E Zellen. Methodik: Nach 24 h Behandlung mit PMB wurde das LAMP1 (grün) der Lysosomen der NRK-52E Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie dargestellt. Zur besseren Lokalisierung der LAMP1 Färbung und zur Bestätigung der Spezifität des LAMP1-Antikörpers wurde eine Phalloidin-färbung (rot) zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts der Zellen durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) angefärbt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mittels ImageJ ausgewertet und die dargestellten Graphen generiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte randomisiert und verblindet. Abkürzungen: PMB = Polymyxin B, KE = Key Event (Schlüsselereignis), LAMP1 = lysosomal-assoziiertes Membranprotein 1.

In Abbildung 26 (A) kann man eine deutliche Zunahme der grünen LAMP1-Färbung bei Erhöhung der Konzentration von PMB in NRK-52E Zellen beobachten. Wie in dem Graphen in Abbildung 26 (B) zu sehen ist, konnte hier nach einer 24 h Behandlung der NRK-52E Zellen mit PMB eine deutliche Erhöhung der mittleren Signalintensität von LAMP1 auf über 400 % beobachtet werden. Auch die maximale Signalintensität wies eine deutliche Zunahme auf. Ab einer Konzentration von 500 µM kam es zu einem Anstieg der maximalen Signalintensität auf über 170 % im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier verdeutlichen die hohen Balken der Standardabweichung, vor allem ab sehr hohen Konzentrationen wie 500 µM, eine große Streuung der Einzelwerte. Für niedrigere Konzentrationen konnten auch hier genauere Werte erhoben werden.

3.3.3 Gegenüberstellung der ermittelten Signalintensitäten für LAMP2 in RPTEC/TERT1 Zellen und LAMP1 in NRK-52E Zellen (KE 1)

Abbildung 27 zeigt eine Gegenüberstellung der LAMP-Färbungen der beiden Zelllinien nach einer 24 h Behandlung mit PMB. Graph (A) zeigt die Zunahme der mittleren Signalintensitäten von LAMP2 in RPTEC/TERT1 und von LAMP1 in NRK-52E Zellen. In Graph (B) sieht man die Gegenüberstellung der äquivalenten maximalen LAMP-Intensitäten.

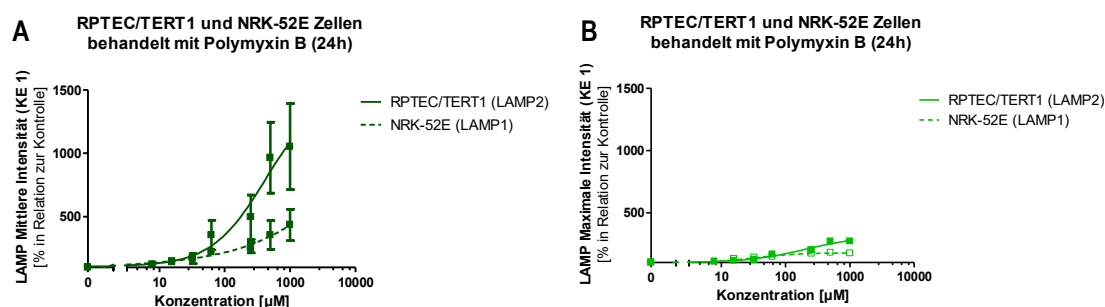


Abbildung 27: Gegenüberstellung der mittleren und maximalen Signalintensität der Immunfluoreszenzfärbung von LAMP2 in den RPTEC/TERT1 und LAMP1 in den NRK-52E Zellen nach 24 h Zellbehandlung mit Polymyxin B.

(A) Darstellung der mittleren Signalintensität von LAMP1 in NRK-52E und LAMP2 in RPTEC/TERT1 Zellen abhängig von der PMB Konzentration. (B) Darstellung der maximalen Signalintensität von LAMP1 in NRK-52E und LAMP2 in RPTEC/TERT1 Zellen abhängig von der PMB Konzentration. (A,B) Die Expression von LAMP2 in der RPTEC/TERT1 Zelllinien steigt deutlich stärker an, als die LAMP1 Expression in der NRK-52E Zelllinie bei vergleichbaren PMB Konzentrationen. Methodik: Datenerhebung, Auswertung und Darstellungskriterien sind in den Beschriftungen von Abbildung 25 und Abbildung 26 zu finden. Auf die Darstellung der Asterisks wurde in dieser Übersichtsdarstellung verzichtet. Sie sind den Graphen in Abbildung 25 und Abbildung 26 zu entnehmen. Abkürzungen: LAMP = lysosomal-assoziiertes Membranprotein, PMB = Polymyxin B.

In der Gegenüberstellung der Signalintensität von LAMP2 in den RPTEC/TERT1 Zellen und der Signalintensität von LAMP1 in den NRK-52E Zellen fällt auf, dass die Expression von LAMP2 in der menschlichen Zelllinie deutlich stärker ansteigt, als die LAMP1 Expression in der Zelllinie aus der Ratte bei vergleichbaren PMB Konzentrationen. Dies könnte die höhere Empfindlichkeit der RPTEC/TERT1 Zellen gegenüber der toxischen Substanz PMB, die sich bereits in den Ergebnissen des Zellviabilitätstest (KE 3) nach 24 h Zellbehandlung zeigte, bestätigen. Bei Betrachtung der Zellviabilität war in RPTEC/TERT1 Zellen bei einer 24 h Behandlung eine Konzentration von 57,62 µM notwendig, um eine Abnahme der Viabilität um 50 % zu erreichen. Bei den NRK-52E wiederum verursachte erst eine Konzentration von 677,1 µM PMB eine vergleichbare Abnahme der Zellviabilität. Es war somit bei NRK-52E Zellen eine fast 12-fach höhere

Konzentration PMB zum Erzielen eines vergleichbaren Effektes notwendig. Auch die Zunahme der LAMP-Intensität war in der menschlichen Zelllinie RPTEC/TERT1 im Vergleich zu der NRK-52E Zelllinie aus der Ratte deutlicher ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 1000 μM PMB für 24 h kam es in den RPTEC/TERT1 Zellen zu einem sehr starken Anstieg der mittleren LAMP2-Signalintensität, während der Anstieg der LAMP1-Intensität bei den NRK-52E deutlich geringer ausfiel. Hierbei sollte man allerdings kritisch hinterfragen, inwieweit eine Gegenüberstellung der beiden LAMPs sinnvoll ist. Da der Antikörper in der menschlichen Zelllinie gegen LAMP2 und der Antikörper in den NRK-52E Zellen gegen LAMP1 gerichtet ist.

Diese Gegenüberstellung zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme der LAMP-Expression (KE 1) bei Zunahme der Toxizität (KE 3) nach der Behandlung mit PMB. Ebenfalls deuten die Ergebnisse hier auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Zellkulturmodelle, wie bereits für KE 3 bestätigt, hin. Da auch hier in KE 1 die menschliche RPTEC/TERT1 Zelllinie mit einem deutlich ausgeprägteren LAMP-Signalanstieg auf die Behandlung mit PMB reagierte als die NRK-52E Zellen aus der Ratte, kann eine höhere Sensibilität der RPTEC/TERT1 Zellen vermutet werden. Dies muss jedoch aufgrund der Verwendung der unterschiedlichen LAMPs kritisch betrachtet werden.

3.4 Resümierende Darstellung der LAMP-Expression (KE 1), der CTSD Signalintensität (KE 2) und der Zytotoxizität (KE 3) unter Integration weiterer experimentell erhobener Daten der Arbeitsgruppe aufbauend auf der Methodik dieser Arbeit

Ein Ziel des AOP-Konzepts ist eine mechanistische Darstellung komplexer biologischer Prozesse, um die Prüfung und Bewertung von Chemikalien und Arzneistoffen durch die Entwicklung dieser neuen Alternative als Ergänzung zu den regulatorisch geforderten Toxizitätstests zu erleichtern (Hartung, 2011). Der AOP bietet den Rahmen, um das MIE eines definierten Mechanismus über beliebig viele KEs mit dem AO zu verbinden und die generierten Daten von *in silico*, *in vitro* sowie bestehender *in vivo* Assays zu integrieren und zu verknüpfen (Ankley et al., 2010). Abbildung 28 bietet einen Überblick über die Ergebnisse der etablierten Versuche der drei KEs des AOPs zur Darstellung des Mechanismus des lysosomalen Overloads mit folgender Membranpermeabilisierung und daraus resultierender Nierenschädigung. Hierbei erfolgte ebenfalls die Einarbeitung von weiterführenden Daten. Diese Daten wurden von Sabrina Frank und Markus Glaser der Arbeitsgruppe mithilfe der Methodik dieser Arbeit erhoben und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

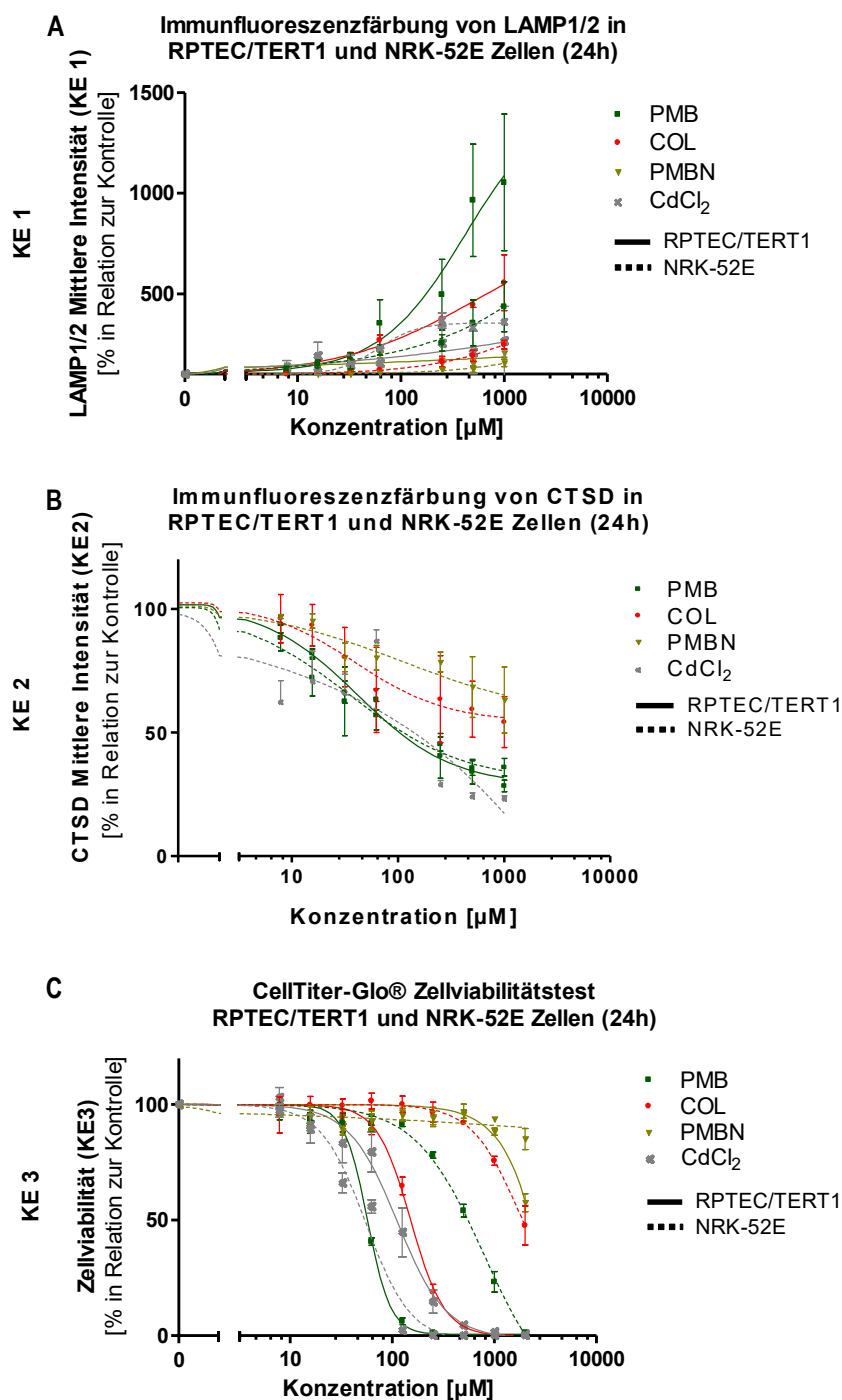


Abbildung 28: LAMP-Expression (KE 1), CTSD Signalintensität (KE 2), Zytotoxizität (KE 3) für Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid und Cadmiumchlorid in den RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen.

(A) KE 1: LAMP-Immunfluoreszenzfärbung in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen unter Zusammenführung der Daten aus Abbildung 25 und Abbildung 26. (B) KE 2: CTSD-Immunfluoreszenzfärbung in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen unter Zusammenführung der Graphen aus Abbildung 22 und Abbildung 23 (C) KE 3: Zytotoxizität in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen unter Zusammenführung der Daten aus Abbildung 19 und Abbildung 20. (A,B,C) In der konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität nach 24 h PMB-Behandlung waren die RPTEC/TERT1-Zellen empfindlicher als die NRK-52E-Zellen gegenüber der Zytotoxizität von PMB. Dies zeigte sich auch in der Analyse der LAMP-1/2 Färbung. In der CTSD-Analyse konnte

kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien beobachtet werden. Ähnliche Veränderungen konnten bei den Strukturanaloga COL und PMBN verzeichnet werden. Die Rangfolge der Auswirkungen der drei Polymyxin-Derivate war über die drei KEs hinweg konsistent (PMB > COL > PMBN). CdCl₂ war in NRK-52E-Zellen im Vergleich zu RPETC-TERT1-Zellen toxischer (KE 3) hatte aber nur geringe Auswirkungen auf die LAMP1/2-Expression (KE 1). Methodik und Auswertung sind den Beschriftungen der einzelnen Abbildungen zu entnehmen. Auf die Darstellung der Asterisks wurde in dieser Übersichtsdarstellung verzichtet. Sie sind den Graphen der einzelnen benannten Abbildungen zu entnehmen. Zusätzliche Integration von experimentell erhobenen Daten, basierend auf der in dieser Arbeit verwendeten Methodik, für KE 1 und KE 2 für die Testsubstanzen COL, PMBN und CdCl₂. durch Marcus Glaser und Sabrina Frank der Universität Würzburg in der Fakultät für Pharmakologie und Toxikologie. Die Daten wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Abkürzungen: CdCl₂ = Cadmiumchlorid, COL = Colistin, CTSD = Cathepsin D, KE = Key Event (Schlüsselereignis), LAMP = lysosomal-assoziiertes Membranprotein, PMB = Polymyxin B, PMBN = Polymyxin Nonapeptid.

In dieser Darstellung wurden die Auswirkungen der chemischen Stressoren PMB, COL, PMBN und CdCl₂ auf die LAMP-Expression (KE 1), die CTSD Signalintensität (KE 2) und die Zytotoxizität (KE 3) in den Zelllinien RPTEC/TERT1 und NRK-52E veranschaulicht. Aufgrund methodischer Probleme konnten für KE 2 nur vollständige Datensätze für die NRK-52E Zelllinie erhoben werden. Für die RPTEC/TERT1 Zelllinien liegen lediglich die Daten für die mit PMB behandelten Zellen vor. Bei beiden Zellmodellen wurde nach 24 h Behandlung mit PMB eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität beobachtet, wobei sich die RPTEC/TERT1-Zellen im Vergleich zu den NRK-52E-Zellen als deutlich empfindlicher gegenüber der Zytotoxizität von PMB erwiesen. Die erhöhte Empfindlichkeit der RPTEC/TERT1-Zellen gegenüber PMB zeigte sich auch in der Analyse der LAMP-1/2 Färbung, während jedoch in der CTSD-Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien zu verzeichnen war. Im Wesentlichen wurden die gleichen Veränderungen bei den mit den Strukturanaloga von PMB (COL und PMBN) behandelten Zellen festgestellt. Hierbei war die Rangfolge der Auswirkungen der drei Polymyxin-Derivate über alle KEs hinweg konsistent, wobei PMB am aktivsten war und PMBN die geringsten Auswirkungen zeigte. Im Gegensatz zu den Polymyxin-Derivaten erwies sich CdCl₂ in NRK-52E-Zellen im Vergleich zu RPETC-TERT1-Zellen als toxischer. Wichtig ist, dass CdCl₂ trotz signifikanter Zytotoxizität (KE 3) nur geringe Auswirkungen auf die LAMP1/2-Expression (KE 1) hatte.

4 Diskussion

Um der jeden Tag weiter wachsenden Menge an potentiell gesundheitsschädlichen Chemikalien (Wilson und Schwarzman, 2009) und dem damit verbundenen Mangel an effektiven und kostengünstigen Testverfahren gerecht zu werden, war es übergeordnetes Ziel dieser Arbeit neue Alternativen in Form von *in vitro* Prüfmethode mit mechanistisch relevanten Endpunkten zu finden, um einen Beitrag zur Verbesserung der Prüfung und Risikobewertung von Chemikalien und Arzneimitteln zu leisten (Hartung, 2011). In dieser Arbeit wurde der AOP über den Mechanismus, wie lysosomaler Overload mit folgender Membranpermeabilisierung zu Nierenschäden führt (Mally und Jarzina, 2022), als Fallstudie verwendet, um einen Machbarkeitsnachweis für die Anwendung des AOP-Konzepts auf die Bewertung der *in vitro* Nephrotoxizität zu erbringen. Hierbei wurden Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid, Vancomycin, Gentamicin und Cadmiumchlorid als chemische Stressoren verwendet. Für die Testung wurde eine Methodik für jedes der drei Schlüsselereignisse des AOPs etabliert. Allen diesen Substanzen ist gemeinsam, dass sie von den Zellen des proximalen Nierentubulus über den gleichen Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose mittels Megalin aufgenommen werden und über lysosomalen Overload und die damit verbundene lysosomale Membranruptur zum Zelltod führen. Als *in vitro* Modell wurden menschliche Zellen des proximalen Nierentubulus (RPTEC/TERT1) und eine Zelllinie aus der Ratte (NRK-52E) verwendet. Bei der Etablierung der Assays für den AOP wurde mit der Untersuchung der Zytotoxizität der Testsubstanzen (KE 3) in den beiden Zelllinien begonnen, um zu klären in welchem Konzentrationsbereich die Substanzen biologische Effekte auslösen. Darauf folgend wurde ein Verfahren zur Messung und Darstellung der CTSD Signalintensität als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran (KE 2) entwickelt. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung eines Assays zur Veranschaulichung der Störung der lysosomalen Funktion in Form einer Immunfluoreszenzfärbung der LAMP-Expression der Zellen (KE 1). In diesen drei Assays wurden die Polymyxine PMB, COL und PMBN und CdCl₂ getestet. Bei allen Schlüsselereignissen waren konzentrationsabhängige Wirkungen der untersuchten Substanzen zu beobachten, wobei die biologischen Reaktionen auf die drei Polymyxin-Analoga in einer konsistenten Rangfolge auftraten.

4.1 Evaluierung der Methodik und Ergebnisse der gewählten Assays für die Schlüsselereignisse KE 3, KE 2 und KE 1

4.1.1 Evaluierung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Zellviabilität im Zellkulturmodell (KE 3)

Sowohl die Gruppe der Polymyxine als auch Gentamicin, Vancomycin und Cadmium sind für ihre nephrotoxischen Wirkungen hinreichend bekannt (Beauchamp et al., 1992, Fujiwara et al., 2012, Jarup, 2002, Lopez-Novoa et al., 2011, Schetz et al., 2005). Im CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest nach 24 h und 48 h (siehe Abschnitt 3.1) wiesen PMB, CdCl₂ und COL in den menschlichen RPTEC/TERT1 Zellen die stärkste Toxizität auf. Für GEN konnte im Gegensatz dazu keine signifikante Toxizität nachgewiesen werden. Für PMBN und VAN konnte lediglich in sehr hohen Konzentrationen eine geringe Toxizität beobachtet werden. In den NRK-52E-Zellen aus der Ratte zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Zu beiden Zeitpunkten waren CdCl₂ und PMB die Substanzen mit der am stärksten ausgeprägten Toxizität. Während bei den menschlichen Zellen PMB am schädlichsten war, zeigte hier CdCl₂ die stärkste Zytotoxizität. COL und VAN wiesen lediglich in sehr hohen Konzentrationen toxische Effekte auf. Für GEN und PMBN konnte in den Zellen aus der Ratte keine signifikante Abnahme der Zellviabilität nachgewiesen werden.

Die zuvor vermutete zytotoxische Potenz der Polymyxine konnte durch die erhobenen Daten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Bei bisherigen Studien über die nierenschädigende Wirkung der Polymyxine erwies sich PMB *in vitro* als toxischer als COL (Roberts et al., 2015, Zavascki und Nation, 2017). Das Polymyxin-Derivat mit dem geringsten toxischen Potential war PMBN (Chihara et al., 1973, Vaara, 2010). Diese Rangfolge konnte auch in den hier erhobenen Toxizitätsdaten aufgezeigt werden. Beide Zelllinien zeigten die erwartete Abstufung der Toxizität und eignen sich somit gut als *in vitro* Modell für die Darstellung der toxischen Effekte der Polymyxine. Der direkte Vergleich zwischen den Zelllinien für jede Verbindung zeigte jedoch eine höhere Empfindlichkeit der RPTEC/TERT1 Zellen gegenüber der Gruppe der Polymyxine, im Vergleich zu den NRK-52E Zellen. Um zu prüfen, ob diese Unterschiede in der Wirksamkeit der Polymyxin-Derivate sowie die Unterschiede in der Zytotoxizität bei der menschlichen und der Ratten-Zelllinie auf die unterschiedliche Aufnahme in proximale Tubuluszellen zurückzuführen sind, wurde in der Arbeitsgruppe die intrazelluläre

Konzentration von PMB und COL nach der Behandlung von RPTEC/TERT1- und NRK-52E Zellen mittels LC-MS/MS bestimmt (Jarzina et al., 2022). Bei beiden Zelllinien war ein kontinuierlicher Anstieg der intrazellulären Konzentration von PMB und COL innerhalb des 24-Stunden-Behandlungszeitraums zu beobachten. Die Akkumulation von PMB und COL war in NRK-52E Zellen signifikant geringer als in RPTEC/TERT1 Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Unterschiede in der Zytotoxizität mit Unterschieden in der Substanzaufnahme zwischen den beiden Zelllinien zusammenhängen könnten. Ebenfalls wurden in beiden Zellmodellen niedrigere intrazelluläre Konzentrationen von COL im Vergleich zu dem toxischeren PMB gefunden (Jarzina et al., 2022). Um die Grundlage für die Unterschiede in der Aufnahme von Polymyxinen zwischen den beiden Zelllinien zu verstehen, könnte man vermuten, dass sich die beiden Zellmodelle hinsichtlich der Endozytose-Rezeptor-Expression und/oder der endozytotischen Aktivität unterscheiden. Ein Ansatz zur Klärung dieser Vermutung lieferte ein Versuch mit Alexa-488-markiertem Aprotinin, das als Ligand für den Megalin-Rezeptor fungiert. Hier konnte eine erhöhte Aufnahme von Alexa-488-markiertem Aprotinin in RPTEC/TERT1 Zellen im Vergleich zu NRK-52E-Zellen nachgewiesen werden, was auf eine höhere endozytotische Aktivität der menschlichen Zelllinie hinweist (Jarzina et al., 2022).

Das Glykopeptidantibiotikum Vancomycin und das Aminoglykosid Gentamicin wurden sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* im Hinblick auf seine nephrotoxische Wirkung eingehend untersucht. Eine signifikante Nierenschädigung mit einhergehendem Kreatininanstieg im Serum (Goetz und Sayers, 1993) bzw. im Urin (Fauconneau et al., 1992, Fauconneau et al., 1997) in Menschen und Tieren konnte in vielen Studien mit unterschiedlichen Testkonzentrationen der Substanzen nachgewiesen werden. Bei den hier getesteten Konzentrationen von maximal 2000 μM konnte lediglich eine gering ausgeprägte Toxizität für VAN beobachtet werden. Das Aminoglykosid GEN zeigte, entgegen der Erwartungen, keine Toxizität in dem hier gewählten *in vitro* Zellkulturmodell. In einer Publikation von Secker et al. von 2019 konnte in RPTEC/TERT1 Zellen nach 24 h erst bei GEN-Konzentrationen ab 10000 μM eine Toxizität beobachtet werden. Secker et al. führte die Zellbehandlung für 14 Tage durch. Hier konnte schon bei niedrigeren Konzentrationen ($\geq 1000 \mu\text{M}$) eine deutliche Zytotoxizität beobachtet werden (Secker et al., 2019). In einer 2020 erschienenen Publikation über die zytotoxische Wirkung von GEN in NRK-52E Zellen beschreibt Yao et al. den Abfall der ATP-Konzentration und die damit verbundene Schädigung der NRK-52E Zellen, die für 48 h mit 3000 μM GEN inkubiert wurden (Yao et al., 2020). In dieser Arbeit lag die höchste Konzentration bei

2000 µM und die Zellen wurden nach 24 h und 48 h Behandlung untersucht. Im Vergleich zu der deutlich höher gewählten Konzentration bzw. bei der längeren Behandlungsdauer bei Yao et al. 2020 war in dieser Arbeit eine geringer ausgeprägte Toxizität zu erwarten. Auch hier wäre eine intrazelluläre Messung der Konzentration von VAN und GEN, wie sie für PMB und COL erfolgt ist, sinnvoll. Mithilfe dieser Ergänzung könnte die Frage geklärt werden, wie hoch die intrazelluläre Wirkkonzentration der beiden Substanzen bei dieser gering ausgeprägten Toxizität ausfällt, bzw. ob evtl. eine Resistenz der Zellen gegenüber den beiden Antibiotika bestehen könnte.

Im Gegensatz zu GEN konnten bei CdCl₂ in beiden Zellmodellen ausgeprägte toxische Effekte beobachtet werden. Wie in Abschnitt 1.4.3.4 beschrieben, induziert Cadmium *in vivo* nach der Aufnahme in den Blutkreislauf die Synthese von Metallothionein in der Leber, welches Cadmium bindet und somit seine toxische Wirkung abmildert. Der Cadmiummetallothionein-Komplex wird anschließend erneut in den Blutkreislauf freigesetzt und erreicht nach glomerulärer Filtration und anschließender rezeptorvermittelter Endozytose die proximalen Epithelzellen der Niere (Jin et al., 1998, Klaassen et al., 2009, Prozialeck und Edwards, 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass es sich bei der Ursache der gravierenden Schädigung der Epithelzellen hauptsächlich um aus Cadmiummetallothionein freigesetztes ionisches Cadmium handelt (Goyer et al., 1989, Klaassen et al., 2009). Dieses gelangt zusätzlich über verschiedene Kanäle und Transporter für andere Ionen wie Eisen oder Kalzium in die Zellen (Bridges und Zalups, 2005, He et al., 2009), wo es aufgrund seiner hohen Affinität zu Sulfhydrylgruppen funktionelle Veränderungen einer Reihe von Proteinen verursachen kann. Dies wiederum führt zu einer Störung der Zellsignalisierung und Homöostase (Dorian et al., 1992). Der Mechanismus der Cadmium-Toxizität weicht also von diesem AOP ab, da die Störung der lysosomalen Funktion und die lysosomale Ruptur offenbar nur einen geringen Anteil an der gesamten toxischen Reaktion ausmachen, bei der mehrere AOPs eine Rolle spielen können. Dies spiegelt sich ebenfalls in den Ergebnissen in der Beobachtung der Dysfunktion der Lysosomen (KE 1) wider, da hier der Anstieg der LAMP-Expression im Verhältnis zu der ausgeprägten Toxizität von Cadmium (KE 3) eher gering ausfällt.

Zusammenfassend betrachtet ließ sich der CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest als Nachweis für die Zytotoxizität der Testsubstanzen einsetzen (KE 3), um die Konzentrationsbereiche in denen die Substanzen biologische Effekte

auslösen zu ermitteln. Die Ergebnisse müssen selbstverständlich unter Berücksichtigung der Limitationen, wie kurze Dauer der Behandlung, unzureichende Kenntnis bezüglich der intrazellulären Substanzkonzentration und eine evtl. bestehende Resistenz der Zellen gegen die Chemikalien kritisch betrachtet werden. Demnach wäre die Ermittlung der intrazellulären Substanzkonzentration sinnvoll, um eine mögliche Resistenz der Zellen und damit einhergehende niedrige Wirkungskonzentration der Substanzen im Inneren der Zellen aufdecken zu können. Ebenfalls für weitere Analysen, wie beispielsweise die Erstellung physiologisch basierter pharmakokinetischer Modelle (Abschnitt 4.3.2), ist die Kenntnis der intrazellulären Konzentration von großer Bedeutung.

4.1.2 Bewertung der CTSD-Immunfluoreszenzfärbung als gewählte Methodik und Erörterung der Ergebnisse (KE 2)

Als Methodik für das vorangeschaltete zweite Schlüsselereignis wurde die Darstellung und Messung der CTSD-Signalintensität verwendet. KE 2 beschreibt die Ruptur der lysosomalen Membran und die Verteilung der intralysosomalen Bestandteile im Zytosol der Zellen. Für die Etablierung der Methodik für KE 2 wurde die Testsubstanz Polymyxin B eingesetzt. PMB erwies sich hierbei als geeignet, da in den gewählten Konzentrationen von 7,81 μM bis 2000 μM eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität (KE 3) nachgewiesen werden konnte. Im Anschluss wurden ebenfalls COL, PMBN und CdCl_2 getestet. Auf die Testung von GEN und VAN wurde aufgrund der geringen Toxizität in KE 3 verzichtet. Bei den getesteten Konzentrationen von maximal 2000 μM konnte eine gering ausgeprägte Toxizität für VAN beobachtet werden, während GEN keine Toxizität in dem hier gewählten *in vitro* Zellkulturmodell aufwies. Da in der Literatur von einer ausgeprägten Nephrotoxizität der beiden Substanzen (Fauconneau et al., 1992, Fauconneau et al., 1997, Goetz und Sayers, 1993) berichtet wird, die bei der Testung im Rahmen des hier gewählten Zellkulturmodells und der Methodik jedoch nicht bestätigt werden konnte, erschien eine weitere Testung nicht als repräsentativ und sinnvoll.

Die Daten für das zweite Schlüsselereignis, dargestellt durch die Immunfluoreszenzfärbung der Protease CTSD in den mit PMB behandelten Zellen, lieferten ähnliche Ergebnisse für beide Zelllinien. In RPTEC/TERT1 Zellen konnte ein Rückgang des Markersignals für CTSD beobachtet werden. Dieses Ergebnis verhält sich kongruent zu anderen bisher erhobenen Daten in der Literatur (Boya et al., 2003,

Kagedal et al., 2005). Auch in NRK-52E Zellen konnte dieser Effekt nachgewiesen werden. Obwohl die Induktion der LMP in beiden Zelllinien deutlich zu erkennen war, konnten keine signifikanten Unterschiede in den Auswirkungen von PMB in den beiden verwendeten Zelllinien beobachtet werden. In KE 3 zeigte sich eine stärkere Abnahme der Zellviabilität in RPTEC/TERT1 Zellen nach Behandlung mit PMB im Vergleich zu NRK-52E Zellen. In KE 2 konnten diese Unterschiede nicht bestätigt werden. Hier war eher eine minimal stärkere Abnahme der Signalintensität von CTSD in der Zelllinie der Ratte zu beobachten. Es ist also fraglich, in wie weit sich die Immunfluoreszenzfärbung von CTSD als Methodik für die Quantifizierung dieses Prozesses eignet. Man muss kritisch beurteilen, inwiefern es möglich ist, die Membranruptur der Lysosomen auf diese Weise zu quantifizieren. In dieser Arbeit erfolgte eine Datenerhebung nach 24-stündiger Behandlung. Um den Rupturmechanismus der lysosomalen Membran weiter zu untersuchen und die genauen molekularen und zeitlichen Abläufe zu kennen und mögliche beeinflussende Faktoren auszumachen, wären weitere zeitliche Endpunkte zu ergänzen. Hierbei sollte der Fokus insbesondere auf frühen zellulären Veränderungen vor dem hier gewählten Endpunkt liegen. Eine Möglichkeit der lückenlosen Beobachtung wäre hierfür das Live Cell Imaging mit Zeitraffermikroskopie, um die Dynamik intrazellulärer Prozesse besser zu verstehen. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit bietet sich in der quantitativen Auswertung. Zur Bestimmung der mittleren und maximalen Signalintensität wurde in ImageJ das Rechteck-Werkzeug (siehe Abschnitt 2.2.3.5) verwendet. Auf diese Weise wurden drei repräsentative Bereiche des Zytosols ausgewählt. Ein weiterer Schritt zur Verbesserung der Methode wäre es, das gesamte Zytosol der Zelle mit anschließender Standardisierung eines Messbereiches zur Erhebung der Intensitätsdaten miteinzubeziehen. Dies würde jedoch eine Färbung der Zellmembran erfordern.

Mit diesem Assay konnte die Induktion einer LMP durch PMB, COL, PMBN und CdCl₂ bestätigt werden, da eine Umverteilung der intralysosomalen Bestandteile aus den Lysosomen in das Zytosol durch die Anfärbung der Protease CTSD sichtbar gemacht werden konnte. Fraglich ist jedoch, inwiefern die Färbung von CTSD sich im Rahmen dieses AOPs zur Quantifizierung der LMP eignet, da die aus KE 1 und KE 3 zu erwartenden Unterschiede bezüglich der Testsubstanzen hier nicht bestätigt werden konnten. Lediglich der generelle Trend der Substanzen eine LMP zu induzieren konnte aufgezeigt werden.

4.1.3 Beurteilung der Ergebnisse der LAMP-Immunfluoreszenzfärbung im Zellkulturmodell und Optimierungsmöglichkeiten der Methodik (KE 1)

Das erste Schlüsselereignis in der Kaskade des hier untersuchten AOPs beschreibt die Störung der lysosomalen Funktion und die damit verbundene Schwellung der Lysosomen durch die Akkumulation der toxischen Substanzen. Um diesen Mechanismus zu visualisieren, wurde wie bei KE 2 eine Immunfluoreszenzfärbung angewendet. In diesem Fall wurde das lysosomal-assoziierte Membranprotein in beiden Zelllinien angefärbt und nach einem Behandlungszeitraum von 24 h mit den Substanzen PMB, COL, PMBN und CdCl₂ untersucht. Wie schon in KE 3 zu sehen war, zeigte sich auch hier ein stärkerer Effekt in der menschlichen RPTEC/TERT1 Zelllinie im Vergleich zu den NRK-52E Zellen. Für beide Zelllinien zeigte sich der erwartete konzentrationsabhängige Anstieg des LAMP-Signals nach der Behandlung mit den Polymyxinen sowohl in den Beispielaufnahmen, als auch in den quantitativ erhobenen Daten. Auch hier war die Rangfolge der Auswirkungen der drei Polymyxin-Derivate konsistent, wobei bei den mit PMB behandelten Zellen die ausgeprägteste LAMP-Expression nachgewiesen werden konnte und bei Polymyxin B Nonapeptid die geringste. In der Literatur ist beschrieben, dass es nach der Aufnahme und folgenden Akkumulation von PMB und COL in den Lysosomen einer Zelle zu einer Erhöhung des pH-Wertes und somit zur Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion kommt (Wang et al., 2018). Die Zellen versuchen, durch eine Überexpression von LAMP eine Stabilisierung der Lysosomen zu erreichen und sich vor einer Apoptose bzw. Nekrose durch lysosomale Prozesse zu schützen (Saftig und Klumperman, 2009). Diese Beobachtungen konnten mit dem gewählten Assay mit LAMP als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion für das erste Schlüsselereignis bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Polymyxin-Derivaten hatte CdCl₂ trotz signifikanter Zytotoxizität (KE 3) nur geringe Auswirkungen auf die LAMP1/2-Expression (KE 1). Hierbei waren die Effekte auch etwas stärker in den NRK-52E Zellen ausgeprägt. Cadmium liegt in der Zelle unter anderem an Metallothionein gebunden vor. In dieser Form wird es über Endozytose in die Lysosomen aufgenommen und verfügt somit über das gleiche MIE wie die anderen gewählten Testsubstanzen des AOPs (Wolff et al., 2006). Die Zellschädigung durch Cadmium kommt unter anderem durch den intralysosomalen Abbau von Metallothionein und die folgende Freisetzung toxischer Cadmiumionen zustande (Dorian et al., 1992). Des Weiteren kann Cadmium zudem durch die Bildung

von oxidativem Stress durch ROS (Rani et al., 2014) und die Störung von DNA-Reparaturmechanismen zellschädigend wirken (Giaginis et al., 2006). In KE 3 wird der Endpunkt der Kaskade in Form der zytotoxischen Wirkung der Substanzen auf die Zellen untersucht. Hierbei werden die unterschiedlichen Mechanismen, die der toxischen Wirkung der Substanz zugrunde liegen, vernachlässigt. In KE 1 wird wiederum ausschließlich die schädigende Wirkung der Modellsubstanzen über den lysosomalen Mechanismus betrachtet. Unter der Berücksichtigung dieser Grundlagen sind die geringeren Auswirkungen in KE 1 im Vergleich zu KE 3 durch Cadmium erklärbar (Jarzina et al., 2022). Hierdurch wird deutlich, dass ein einzelner AOP lediglich einen Abschnitt komplexer toxischer Wirkungen abbildet.

Wie bereits die gewählte Methodik für KE 2, würde ebenfalls die Untersuchung von LAMP als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion (KE 1) von einer Weiterentwicklung profitieren. Da es sich bei der Methodik des ersten Schlüsselereignisses ebenfalls, wie bei KE 2 um eine Immunfluoreszenzfärbung handelt, könnte auch hier das Live Cell Imaging mit Zeitraffermikroskopie Aufschluss über die detaillierte Dynamik der intrazellulären Prozesse bieten. Die Beurteilung des gesamten Zytoplasmas, im Gegensatz zu repräsentativen Ausschnitten, könnte ebenfalls zur weiteren Verbesserung der Methodik beitragen.

4.2 Charakteristika der verwendeten Zelllinien und Bewertung der Eignung für die entwickelte *in vitro* Methodik

Die Epithelzellen des proximalen Nierentubulus sind im Tubulussystem für den Hauptanteil der Nierensekretion und Resorption gelöster Stoffe verantwortlich (Lepist und Ray, 2016) und verfügen über hohe Transportkapazitäten und Stoffwechselraten (Hall und Unwin, 2007). Dies macht sie besonders anfällig für toxische Wirkungen von Chemikalien und Medikamenten. Auch bei den für diese Arbeit gewählten Testsubstanzen ist eine ausgeprägte toxische Wirkung auf die Zellen des proximalen Nierentubulus beschrieben, weshalb *in vitro* Modelle der proximalen Nierentubuluszellen gewählt wurden.

Bei der RPTEC/TERT1 Zelllinie handelt es sich um humane Nierenzellen des proximalen Tubulusepithels (Wieser et al., 2008). Bei den NRK-52E Zellen liegen Nierenzellen mit den Eigenschaften des proximalen Tubulusepithels aus der Ratte vor (De Larco und Todaro, 1978, Lash et al., 2002). Leider ist bis heute keine proximale Nierentubulus-Zelllinie mit vollständig erhaltener Kapazität für xenobiotischen und metabolischen Transport verfügbar (Tiong et al., 2014), was die Eignung eines solchen Zellkulturmodells für den Nachweis von Nephrotoxizität limitiert. Beispielsweise wurde bei der menschlichen Zelllinie HK-2, eine der häufigsten verwendeten humanen tubulären Epithelzelllinie für die *in vitro* Untersuchung, die fehlende Ausprägung einiger Schlüsseltransporter, wie die organischen Anionentransporter OAT1, OAT3 und der organische Kationentransporter OCT2, nachgewiesen (Jenkinson et al., 2012). Da im Gegensatz zu HK-2 Zellen bei später entwickelten Zelllinien, wie den RPTEC/TERT1, über den Erhalt vieler wichtiger funktioneller Parameter berichtet wurde, wurden sie in dieser Arbeit als Zellkulturmodell verwendet (Aschauer et al., 2015, Wilmes et al., 2014). Ein wichtiger Transporter für die Untersuchung des AOPs dieser Arbeit ist der Megalin-Rezeptor. Dieser ist verantwortlich für die rezeptorvermittelte Endozytose der Testsubstanzen und sein Vorhandensein wird in RPTEC/TERT1 Zellen angenommen (Wieser et al., 2008).

Für den Vergleich wurden die bekannten NRK-52E Zellen aus dem proximalen Nierentubulus der Ratte ausgewählt (De Larco und Todaro, 1978). Die Zelllinie NRK-52E gehört zu den meist verwendeten Rattenzelllinien und es existiert bereits umfassende Literatur zu deren Verwendung. NRK-52E Zellen weisen eine typische

Struktur epithelialer Zellen auf. Sie wachsen am Boden der Inkubationsgefäße an und bilden eine Einzelzellschicht (Monolayer) aus. Die apikale Zellmembran besteht aus Mikrovilli (Boogaard et al., 1990). NRK-52E Zellen synthetisieren eine Vielzahl spezifischer Nierenenzyme sowohl in ihrem Bürstensaum, als auch in den Lysosomen bzw. im Zytosol (Lash et al., 2002, Thomasina Barron et al., 1990). Zudem besitzen sie in der basolateralen Membran verschiedene organische Anionentransporter (Boogaard et al., 1990). Des Weiteren konnte in den NRK-52E der Transporter Megalin mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Zhang et al., 2019).

Für die Etablierung und Durchführung der Assays wurden zwei verschiedene Zelllinien ausgewählt, um zelllinienspezifische Unterschiede, beispielsweise in Bezug auf die Substanzaufnahme und -weiterverwertung, ausschließen zu können. Wie bereits im Abschnitt 4.1.1 evaluiert wurde, konnte im direkten Vergleich zwischen den Zelllinien in Bezug auf die Abnahme der Zellviabilität (KE 3) eine höhere Empfindlichkeit der RPTEC/TERT1 Zellen gegenüber der Gruppe der Polymyxine, im Vergleich zu NRK-52E Zellen festgestellt werden. Die unterschiedlich hohen intrazellulären Konzentrationen der Testsubstanzen in beiden Zellsystemen legen nahe, dass sich die beiden Zellmodelle hinsichtlich ihrer endozytotischen Aktivität unterscheiden (Jarzina et al., 2022). Es lässt vermuten, dass die menschlichen Zelllinie ein höheres Potential an Endozytoseaktivität aufweist, als die Zelllinie aus der Ratte. Es besteht in jedem Fall weiterführend Bedarf in der Analyse der Transportmechanismen der verwendeten Zelllinien. Diesbezüglich wurden in der Arbeitsgruppe bereits weitere Analysen im Hinblick auf die mRNA- und Proteinexpression von Megalin/Cubilin durchgeführt (Jarzina et al., 2022). In diesen Untersuchungen konnten sowohl auf Proteinebene, als auch auf mRNA-Ebene keine eindeutigen Hinweise auf eine Expression von Megalin und Cubilin in den Zelllinien gefunden werden. Es konnte jedoch durch die Fluoreszenzfärbung von Aprotinin, (Ligand für den Megalin-Rezeptor) eine erhöhte Aufnahme von Aprotinin der humanen Zelllinie im Vergleich zu NRK-52E-Zellen der Ratte nachgewiesen werden. Diese Untersuchung unterstützt die Vermutung der höheren endozytotischen Aktivität der RPTEC/TERT1 Zelllinie (Jarzina et al., 2022).

4.3 Weiterführende Verwertung der Ergebnisse dieser Arbeit und Analysemethoden im Kontext des AOP-Konzepts

Im Anschluss an die umfassende Datengenerierung dieser Arbeit im Rahmen des AOP-Konzepts ist es möglich, die in den nächsten beiden Abschnitten folgenden Analysen durchzuführen. Diese Analysen wurden in der Arbeitsgruppe und von Projektpartnern erstellt und hier kurz dargestellt und erläutert. Im ersten Abschnitt 4.3.1 wird die Herstellung quantitativer Beziehungen der einzelnen Schlüsselereignisse in Form von Response-Response-Analysen beschrieben. Hierbei wird geprüft, ob es möglich ist, die Ergebnisse nachgeschalteter KEs mittels Daten der vorgeschalteten KEs zu berechnen und somit vorherzusagen (Jarzina et al., 2022). In Abschnitt 4.3.2 wird ein physiologisch basiertes, pharmakokinetisches (PBPK) Modell mittels der Integration quantitativer *in vitro* zu *in vivo* Extrapolation (QIVIVE) vorgestellt. Hierbei geht es um die Erstellung einer *in vivo* Simulation der Konzentration der Polymyxin Antibiotika in menschlichem Gewebe sowie in dem der Ratte auf Basis der erhobenen *in vitro* Daten (Jarzina et al., 2022, Kramer et al., 2018).

4.3.1 Response-Response-Analysen zur Herstellung quantitativer Beziehungen zwischen den Schlüsselereignissen des AOPs

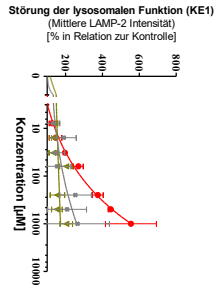
Die Response-Response-Analysen stellen mithilfe mathematischer Gleichungen eine quantitative Beziehung zwischen aufeinanderfolgenden KEs eines AOPs her (Conolly et al., 2017, Spinu et al., 2020). Die unter anderem im Rahmen dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Daten der KEs wurden hierfür verwendet. Sie dienen der Überprüfung, ob eine Berechnung und somit die Vorhersage nachgeschalteter KEs auf der Grundlage der Daten eines früheren KEs möglich ist. Die Response-Response-Analysen zu diesem AOP wurden von Sebastian Jarzina erstellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Jarzina et al., 2022).

Da zuverlässige *in vitro* Daten für KE 3 für den Vergleich erhoben werden konnten, wurde exemplarisch die Vorhersage dieses Schlüsselereignisses mittels Response-Response-Analysen geprüft. In einem ersten Schritt wurden die Funktionen der quantitativen Response-Response-Analysen aus den experimentell erhobenen *in vitro* Daten aus KE 1 (LAMP), KE 2 (CTSD) und KE 3 (Zellviabilität) nach der Behandlung der zwei Zelllinien mit den Modellsubstanzen erarbeitet. Die mathematischen Grundlagen

und die genaue Erstellung der Response-Response-Analysen für die RPTEC/TERT1 und die NRK-52E Zelllinie ist in Jarzina et al. von 2022 erläutert (Jarzina et al., 2022). Diese Funktionen der quantitativen Beziehungen (qKER1 und qKER2) zwischen den Schlüsselereignissen wurden anschließend verwendet, um die Zytotoxizität (KE 3) von COL, PMBN und CdCl₂ auf der Grundlage der experimentellen KE 1-Daten (Auswirkungen auf die LAMP-1/2 Intensität) zu modellieren (Abbildung 29) (Jarzina et al., 2022).

A RPTEC/TERT1

Experimentell erhobene Daten



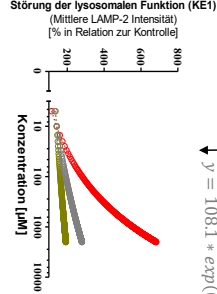
Berechnete Vorhersage

$$y = 71.79 * \exp(0.6824 * x)$$

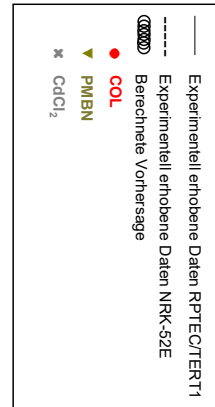
$$y = 125 * \exp(0.1304 * x)$$

$$y = 108.1 * \exp(0.2881 * x)$$

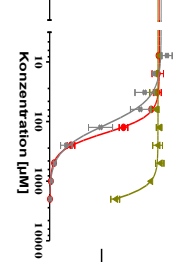
Berechnete Vorhersage



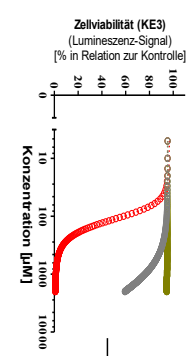
$f(x)$



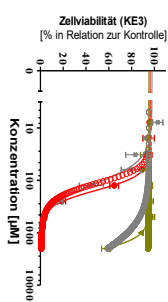
Experimentell erhobene Daten



Berechnete Vorhersage

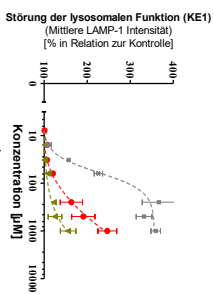


$g(x)$



B NRK-52E

Experimentell erhobene Daten



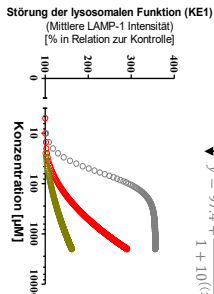
Berechnete Vorhersage

$$y = 159.4 + (-97.86 * x) + (41.69 * x^2)$$

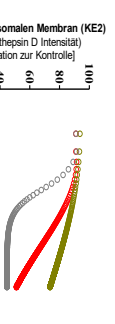
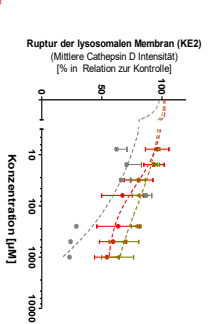
$$y = 100 + (-12.87 * x) + (9.567 * x^2)$$

$$y = 97.4 + \frac{258.7}{1 + 10^{(1.777 - x) * 2.227}}$$

Berechnete Vorhersage



$f(x)$



$g(x)$

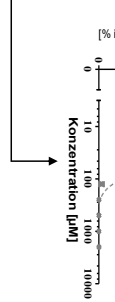
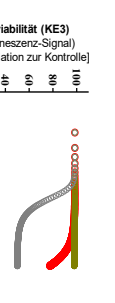
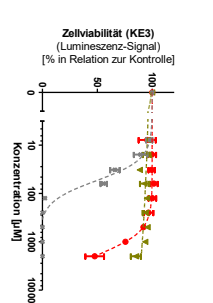


Abbildung 29: Vorhersage der Zytotoxizität von COL, PMBN und CdCl₂ unter Verwendung der Response-Response-Analysen basierend auf experimentell generierten Daten für PMB der einzelnen KEs in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen.

(A) Vorhersage der Zytotoxizität von COL, PMBN, CdCl₂ unter Verwendung der Response-Response-Analysen für RPTEC/TERT1 Zellen und (B) für NRK-52E Zellen. (A,B) Experimentell ermittelte KE 1-Daten, die nach der Behandlung der Zellen mit Colistin (rot), PMBN (grün) und CdCl₂ (grau) erhalten wurden, dargestellt durch durchgezogene Linien (RPTEC/TERT1) und gestrichelte Linien (NRK-52E), wurden zur Berechnung zusätzlicher Datenpunkte (Linien aus Kreisen) aus den erhaltenen mathematischen Gleichungen für KE 1 (Störung der lysosomalen Funktion) verwendet. Die berechneten KE 1-Daten wurden dann zur Vorhersage von KE 2 (Linien aus Kreisen) unter Verwendung von qKER1 ($f(x)$) aus den Polymyxin-B-Daten verwendet. In einem letzten Schritt wurden die vorhergesagten KE 2-Daten unter Verwendung von qKER2 ($g(x)$) aus den Polymyxin-B-Daten verwendet, um KE 3 vorherzusagen (Linien aus Kreisen). Zum besseren Vergleich wurden die experimentell ermittelte Zytotoxizität (durchgezogene Linien = RPTEC/TERT1, gestrichelte Linien = NRK-52E) und die vorhergesagte Zytotoxizität (Linien aus Kreisen) zu einem einzigen Diagramm zusammengefügt. Die Erstellung der Response-Response-Analysen erfolgte durch Sebastian Jarzina an der Universität Würzburg in der Fakultät für Pharmakologie und Toxikologie und wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Jarzina et al., 2022). Abkürzungen: CdCl₂ = Cadmiumchlorid, COL = Colistin, KE = Key Event (Schlüsselereignis), LAMP = lysosomal-assoziiertes Membranprotein, PMB = Polymyxin B, PMBN = Polymyxin B Nonapeptid, qKER = quantitative Key Event Relationship (quantitative Beziehung zwischen den Schlüsselereignissen).

In Abbildung 29 wurden die experimentell ermittelte Zytotoxizität und die vorhergesagte Zytotoxizität mithilfe der Response-Response-Analysen von Sebastina Jarzina zum Vergleich in einem gemeinsamen Diagramm abgebildet. Der Vergleich mit den experimentell erhobenen Daten zeigt, dass sowohl in RPTEC/TERT1 als auch in NRK-52E Zellen eine relativ gute Vorhersage der Zytotoxizität von COL und PMBN möglich ist. Bei CdCl₂ war die berechnete Zytotoxizität aus vorgelagerten Daten der KEs deutlich geringer als die experimentell gemessene Zytotoxizität in KE 3. Es konnte somit gezeigt werden, dass bei Verbindungen, die sich strukturell ähneln und über den gleichen Mechanismus wirken, eine relativ gute Vorhersage biologischer Reaktionen möglich ist. Obwohl CdCl₂ ebenfalls über das in diesem AOP untersuchte MIE die Zelle schädigt, konnte hierfür keine zuverlässige Vorhersage getroffen werden (Jarzina et al., 2022). Bei der toxischen Wirkung von CdCl₂ müssen weitere zellschädigende Mechanismen der Substanz, wie eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose (Achanzar et al., 2002), die Störung von Reparaturmechanismen der DNA (Giaginis et al., 2006) sowie die Induktion von oxidativem Stress (Rani et al., 2014), berücksichtigt werden. Anhand der verwendeten Substanz CdCl₂ wird der Bedarf der Erstellung weiterer AOPs für diese Prozesse als Ergänzung deutlich aufgezeigt.

4.3.2 Erstellung eines physiologisch basierten pharmakokinetischen (PBPK) Modells mittels Integration quantitativer *in vitro* zu *in vivo*-Extrapolation (QIVIVE)

Zur Vorhersage der *in vivo* analogen Pharmakokinetik von Polymyxin B wurde von unseren Projektpartnern an der Universität Utrecht ein physiologisch basiertes pharmakokinetisches (PBPK) Modell erstellt (Kramer et al., 2018). Das Ziel dieses Modells ist es, unter Verwendung von *in vitro* Daten eine *in vivo* Simulation der Konzentration der Polymyxin Antibiotika in Gewebe des Menschen und der Ratte zu erreichen. Für diese Arbeit sind insbesondere die Zellen des proximalen Nierentubulus von Interesse. Der Aufbau des Modells besteht aus zwölf Gewebekompartimenten (Lunge, Gehirn, Herz, Haut, Muskeln, Fettgewebe, Leber, Milz, Magen-Darm-Trakt, Nieren, Blase, Rest des Körpers) verbunden über einen simulierten Blutkreislauf. Bei der Untersuchung der Niere wird hierbei weiterführend in das Tubuluslumen, die Zellen des proximalen Nierentubulus und das restliche Gewebe eingeteilt (Bouchene et al., 2018, Kramer et al., 2018, Viel et al., 2018).

Für die PBPK-Modellierung wurden die Daten der *in vitro* Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für PMB des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest der RPTEC/TERT1 Zellen (KE 3) verwendet, um die Extrapolation der *in vitro* Daten für KE 1 und KE 3 auf *in vivo* Dosen durchzuführen (Kramer et al., 2018). Hierbei zeigte sich, dass die berechneten *in vivo* Dosen von PMB für das erste und dritte Schlüsselereignis niedriger waren, als die aktuell in der Praxis verwendeten PMB-Dosen. Diese aktuell genutzte Dosierung liegt ca. im Bereich von 1 mg/kg Körpergewicht (Cai et al., 2020, Falagas und Kasiakou, 2006, Gupta et al., 2009, Kassamali et al., 2015). Zur Gegenüberstellung erfolgte daraufhin die QIVIVE basierend auf den intrazellulären Konzentrationen der Behandlungssubstanz. Die berechneten *in vivo* Dosen von PMB lagen hierbei deutlich näher an dem in der Praxis verwendeten Zielbereich (Jarzina et al., 2022, Kramer et al., 2018). Hier konnte festgestellt werden, dass die intrazelluläre Konzentration einer Substanz als Ausgangspunkt für QIVIVE deutlich besser geeignet ist und eher verwendet werden sollte (Groothuis et al., 2015). Mit dieser Modellierung, unter Verwendung der Daten des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten AOPs, konnte grundlegend erwiesen werden, dass die Vorhersage einer akuten Nierenschädigung beim Menschen ohne *in vivo* Studien möglich ist (Omwenga et al., 2021, Punt et al., 2021).

4.4 Bewertung des AOP-Konzepts als mechanistisches Instrument zur Reduzierung von Tierversuchen bei der Toxizitätsprüfung

Das AOP-Konzept wurde entwickelt, um die weltweiten Bemühungen zur Reduzierung von Tierversuchen bei Toxizitätstests zu unterstützen. Das AOP-Konzept ist ein wichtiger Ansatz zum Aufbau einer Wissensbasis für toxische Mechanismen mit einer einheitlichen Nomenklatur für die einzelnen MIEs, KEs und AOs (Leist et al., 2017). Bei den mechanistisch geprägten AOPs muss eine veränderte Biokinetik im Vergleich zum Organismus *in vivo*, die für die Risikobewertung relevant ist, berücksichtigt werden. Für eine strukturelle Herangehensweise bei der komplexen Konstruktion eines AOPs ist es von Vorteil zunächst die Verbindung zwischen dem MIE und AO herzustellen. Vor allem bei der Verwendung von *in vitro* Modellen ist es wichtig das MIE zu analysieren. Auf der Grundlage dieser Verbindung kann der AOP dann durch das Hinzufügen relevanter KEs erweitert und ausgebaut werden (Patlewicz et al., 2015, Simon et al., 2014). Durch die Identifizierung und Festlegung von KEs und durch die Etablierung geeigneter Assays für diese ist es möglich geworden, komplexe biologische Mechanismen abzubilden mit dem Ziel, langfristig ein Netzwerk einzelner miteinander in Verbindung stehender AOPs aufzubauen. Da für ein AOP mit seinen KEs generell ein Konzeptnachweis erforderlich ist, zeigt sich hier ebenfalls eine Problematik des AOP-Konzepts. Es ergeben sich zeitaufwändige Evaluierungsprozesse und hohe Kosten. Durch den zunehmenden Umfang und die Komplexität der AOPs erhöht sich ebenfalls die Komplexität der Response-Response-Analysen auf Basis der quantitativen Schlüsselereignisbeziehungen. Dies macht die Vorhersage einzelner Schlüsselereignisse mittels dieser Berechnungen zu einer mathematischen Herausforderung. Hierfür werden Expertengruppen sowie künstliche Intelligenz eingesetzt.

Für die zukünftigen Weiterentwicklungen der toxikologischen Prüfung hin zu einem stärker mechanistischen Ansatz und dem Bestreben, tierversuchsfreie Untersuchungsmethoden zu etablieren, erweist sich das AOP-Konzept als sehr hilfreiches Instrument. Allerdings steht man vor der Herausforderung der schnell wachsenden Komplexität der AOPs. Wichtig hierbei zu nennen ist, dass experimentelle Daten aus den AOPs nur eine Momentaufnahme der Wirkungen für einen bestimmten Zeitpunkt liefern, wie beispielsweise hier einen 24 Stunden Rahmen für den Zellviabilitätstest (KE 3). Wirkungen in vorgelagerten KEs können auch nach einer viel

kürzeren Zeit auftreten und gemessen werden. Dies macht die Notwendigkeit verschiedener zeitlicher Endpunkte zusätzlich zu dosisabhängigen Veränderungen deutlich. Weiterhin ist zu klären wie bei unterschiedlichen AOPs die zum gleichen AO führen oder bei verzweigten KEs zu verfahren ist.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung mechanistischer *in vitro* Tests im Rahmen des AOP-Konzepts zur Toxizitätsprüfung. Der AOP „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“, über den die verwendeten Modellsubstanzen zu Zytotoxizität im proximalen Nierentubulus führen, wurde gewählt. Im Rahmen dieses AOPs erfolgte die Etablierung und Durchführung geeigneter *in vitro* Tests für die RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zelllinie proximaler Nierentubulusepithelzellen.

Ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung von AOPs ist die klare Strukturierung toxikologischer Mechanismen und die Integration der bereits vorhandenen sowie neu gewonnenen Daten. Zu Beginn galt es die Herausforderung einer Ausarbeitung und Etablierung von *in vitro* Tests für jedes der Schlüsselereignisse in dem hier vorgestellten AOP zu bewältigen. Mit Hilfe der Assays konnten vollständige Dosis-Wirkungs-Diagramme erstellt werden. Diese wurden weiterführend für die Ausarbeitung darauf aufbauender Response-Response-Analysen in der Arbeitsgruppe als Konzeptnachweis verwendet. Hierbei ging es um die Überprüfung, inwieweit die *in vitro* Tests in der Lage dazu sind die Schlüsselereignisse abzubilden und toxikologische Vorhersagen zu modellieren. Basierend auf den experimentell erhobenen Ergebnissen konnten mithilfe dieser mathematischen Analysen recht genaue Toxizitätsvorhersagen getroffen werden. Es konnte aufgezeigt werden, dass Vorhersagen von nachgeschalteten Schlüsselereignissen, zumindest in einem linearen AOP, über die Herstellung von Response-Response-Analysen zwischen Schlüsselereignissen möglich sind (Jarzina et al., 2022). Toxikologische Pfade stellen sich in der Realität jedoch oft verzweigt und komplex dar, was die Vorhersage über Response-Response-Analysen zu einer mathematischen Herausforderung macht (Knapen et al., 2018, Spinu et al., 2019). Dies zeigt auch gewisse Grenzen des AOP-Konzepts auf, da sich die Frage stellt, in wieweit das Modell für die Nachbildung komplexer toxikologischer Effekte verwendbar ist.

Auch müssen eventuelle Unterschiede in der Expression von Transportern zwischen den Zelllinien und zwischen der *in vitro* und *in vivo* Situation beachtet werden, wie sie beispielsweise an Polymyxin B aufgezeigt werden konnten. Um auch unbekannte Testsubstanzen überprüfen zu können, müssen diese Unterschiede identifiziert und mit Hilfe geeigneter *in silico* Modelle überbrückt werden. Dies wird relevant, wenn aus den modellierten *in vitro* Ergebnissen *in vivo* Äquivalenzdosen extrapoliert werden sollen.

Dies erfolgte bereits durch Projektpartner basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit im Rahmen des PBPK-Modells und QIVIVE (Jarzina et al., 2022, Kramer et al., 2018). Tierversuche langfristig durch *in vitro* Hochdurchsatzmethoden in Zellmodellen zu ersetzen ist ein langwieriger Prozess. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es aufgrund der Einschränkungen von *in vitro* Systemen nicht möglich toxikologische Testungen an Tieren vollständig zu vermeiden. Dennoch konnte hiermit eine neue Art der Teststrategie, kombiniert aus zuverlässigen *in vitro* Assays, neuen *in silico* Methoden in Verbindung mit weiterführenden Analysen, wie PBPK-Modellierung und QIVIVE, eingeführt werden.

5 Zusammenfassung

Zur Verbesserung der Prüfung und Risikobewertung der zunehmenden Menge von Chemikalien und Arzneimitteln, gilt es neue Alternativen in Form von *in vitro* Prüfmethode mit mechanistisch relevanten Endpunkten zu finden. Einen solchen Rahmen bietet das konzeptionelle Konstrukt des Adverse Outcome Pathway (AOP)-Konzepts. Es erzeugt auf der Basis bestehenden Wissens einen mechanistischen und kausalen Zusammenhang mit Hilfe von mehreren Schlüsselereignissen (Key Event [KE]) zwischen einem initierenden molekularen Ereignis (Molecular Initiating Event [MIE]) und einem adversen Effekt (Adverse Outcome [AO]) auf biologischer Ebene. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der AOP „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“ am Zellkulturmodell proximaler Nierentubuluszellen weiterentwickelt. Es wurden *in vitro* Assays für die Zelllinien RPTEC/TERT1 (Mensch) und NRK-52 E (Ratte) für jedes KE etabliert. In dem AOP wird die Initiierung der Schädigung des Nierengewebes durch rezeptorvermittelte Endozytose der Substanzen (MIE) mit folgendem lysosomalem Overload (KE 1) und der lysosomalen Membranruptur (KE 2) beschrieben. Es kommt zur Zellschädigung (KE 3) und endet mit einem Schaden auf Organebene (AO). Für KE 1 erfolgte die Visualisierung des lysosomal-assoziierten Membranproteins (lysosomal-associated Membranprotein [LAMP]) und in KE 2 die Darstellung der Protease Cathepsin D (CTSD) mittels Immunfluoreszenz. Für KE 3 wurden spezifische Toxizitätsdaten der Testsubstanzen mit dem CellTiter-Glo[®] Lumineszenz-Zellviabilitätstest generiert. Gewählte Stressoren für den AOP war die Gruppe der Polymyxin-Antibiotika (Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid), das Aminoglykosid Gentamicin, das Glykopeptid Vancomycin sowie Cadmiumchlorid. In Zusammenschau der Ergebnisse der drei KEs war die Rangfolge der Auswirkungen der drei Polymyxin-Derivate über alle KEs konsistent. Polymyxin B erwies sich als aktivste Substanz, während Polymyxin B Nonapeptid die geringsten Auswirkungen zeigte. Als Ausblick in weiterführenden Analysen der Arbeitsgruppe konnten bei Cadmiumchlorid trotz einer signifikanten Zytotoxizität (KE 3) nur geringe Auswirkungen in der LAMP-Expression (KE 1) aufgezeigt werden. Des Weiteren erfolgte die Erstellung von Response-Response-Analysen, um mittels vorgeschalteter Schlüsselereignisse nachfolgende Effekte vorhersagen zu können. Projektpartner der Universität Utrecht entwickelten darüber hinaus eine quantitative *in vitro in vivo* Extrapolation (QIVIVE) mittels eines physiologisch basierten pharmakokinetischen (PBPK) Modells.

6 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, A. 2005. Animal testing: more than a cosmetic change. *Nature*, 438, 144-6.
- ACHANZAR, W. E., WEBBER, M. M. & WAALKES, M. P. 2002. Altered apoptotic gene expression and acquired apoptotic resistance in cadmium-transformed human prostate epithelial cells. *Prostate*, 52, 236-44.
- ANDERSON, R., HIGGINS JR, H. & PETTINGA, C. 1961. Symposium: how a drug is born. *Cincinnati Journal of Medicine*, 42, 49-60.
- ANKLEY, G. T., BENNETT, R. S., ERICKSON, R. J., HOFF, D. J., HORNUNG, M. W., JOHNSON, R. D., MOUNT, D. R., NICHOLS, J. W., RUSSOM, C. L., SCHMIEDER, P. K., SERRRANO, J. A., TIETGE, J. E. & VILLENEUVE, D. L. 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem*, 29, 730-41.
- ARIMURA, Y., YANO, T., HIRANO, M., SAKAMOTO, Y., EGASHIRA, N. & OISHI, R. 2012. Mitochondrial superoxide production contributes to vancomycin-induced renal tubular cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 52, 1865-73.
- ASCHAUER, L., CARTA, G., VOGELSANG, N., SCHLATTER, E. & JENNINGS, P. 2015. Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1. *Toxicol In Vitro*, 30, 95-105.
- AZAD, M. A., AKTER, J., ROGERS, K. L., NATION, R. L., VELKOV, T. & LI, J. 2015. Major pathways of polymyxin-induced apoptosis in rat kidney proximal tubular cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 2136-43.
- AZAD, M. A., FINNIN, B. A., POUDYAL, A., DAVIS, K., LI, J., HILL, P. A., NATION, R. L., VELKOV, T. & LI, J. 2013. Polymyxin B Induces Apoptosis in Kidney Proximal Tubular Cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 4329-4335.
- BARKER-TREASURE, C., COLL, K., BELOT, N., LONGMORE, C., BYGRAVE, K., AVEY, S. & CLOTHIER, R. 2015. Non-animal Replacements for Acute Toxicity Testing. *Altern Lab Anim*, 43, 199-203.
- BARRETT, A. J. 1970. Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochemical Journal*, 117, 601-607.
- BEAUCHAMP, D., GOURDE, P., SIMARD, M. & BERGERON, M. G. 1992. Subcellular localization of tobramycin and vancomycin given alone and in combination in proximal tubular cells, determined by immunogold labeling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 2204-2210.
- BERG, J. R., SPILKER, C. M. & LEWIS, S. A. 1996. Effects of polymyxin B on mammalian urinary bladder. *J Membr Biol*, 154, 119-30.

- BERG, J. R., SPILKER, C. M. & LEWIS, S. A. 1998. Modulation of polymyxin B effects on mammalian urinary bladder. *Am J Physiol*, 275, F204-15.
- BIDERE, N., LORENZO, H. K., CARMONA, S., LAFORGE, M., HARPER, F., DUMONT, C. & SENIK, A. 2003. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem*, 278, 31401-11.
- BOOGAARD, P. J., NAGELKERKE, J. F. & MULDER, G. J. 1990. Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. *Chem Biol Interact*, 76, 251-91.
- BOUCHENE, S., MARCHAND, S., COUET, W., FRIBERG, L. E., GOBIN, P., LAMARCHE, I., GRÉGOIRE, N., BJÖRKMAN, S. & KARLSSON, M. O. 2018. A Whole-Body Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Colistin and Colistin Methanesulfonate in Rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 123, 407-422.
- BOUCHER, H. W., TALBOT, G. H., BRADLEY, J. S., EDWARDS, J. E., GILBERT, D., RICE, L. B., SCHELD, M., SPELLBERG, B. & BARTLETT, J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 48, 1-12.
- BOYA, P., ANDREAU, K., PONCET, D., ZAMZAMI, N., PERFETTINI, J. L., METIVIER, D., OJCIUS, D. M., JAATTELA, M. & KROEMER, G. 2003. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med*, 197, 1323-34.
- BOYA, P. & KROEMER, G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27, 6434-51.
- BRADBURY, S. P., FEIJTEL, T. C. & VAN LEEUWEN, C. J. 2004. Meeting the scientific needs of ecological risk assessment in a regulatory context. *Environ Sci Technol*, 38, 463a-470a.
- BRIDGES, C. C. & ZALUPS, R. K. 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204, 274-308.
- CAI, Y., LECK, H., TAN, R. W., TEO, J. Q., LIM, T. P., LEE, W., CHLEBICKI, M. P. & KWA, A. L. 2020. Clinical Experience with High-Dose Polymyxin B against Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections-A Cohort Study. *Antibiotics (Basel)*, 9.
- CHAZOTTE, B. 2010. Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, pdb.prot4947.
- CHEN, J. W., MADAMANCHI, N., MADAMANCHI, N. R., TRIER, T. T. & KEHERLY, M. J. 2001. Lamp-1 Is Upregulated in Human Glioblastoma Cell Lines Induced to Undergo Apoptosis. *Journal of Biomedical Science*, 8, 365-374.

- CHEN, L. F. & KAYE, D. 2009. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Infect Dis Clin North Am*, 23, 1053-75, x.
- CHERIAN, M. G. 1980. The synthesis of metallothionein and cellular adaptation to metal toxicity in primary rat kidney epithelial cell cultures. *Toxicology*, 17, 225-31.
- CHIHARA, S., TOBITA, T., YAHATA, M., ITO, A. & KOYAMA, Y. 1973. Enzymatic Degradation of Colistin Isolation and Identification of α -N-Acyl α,γ -Diaminobutyric Acid and Colistin Nonapeptide. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37, 2455-2463.
- CHWIERALSKI, C. E., WELTE, T. & BÜHLING, F. 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*, 11, 143-149.
- CONOLLY, R. B., ANKLEY, G. T., CHENG, W., MAYO, M. L., MILLER, D. H., PERKINS, E. J., VILLENEUVE, D. L. & WATANABE, K. H. 2017. Quantitative Adverse Outcome Pathways and Their Application to Predictive Toxicology. *Environ Sci Technol*, 51, 4661-4672.
- DAI, C., LI, J., TANG, S., LI, J. & XIAO, X. 2014. Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 4075-85.
- DE DUVE, C., PRESSMAN, B. C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. & APPELMANS, F. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*, 60, 604-17.
- DE LARCO, J. E. & TODARO, G. J. 1978. Epithelioid and Fibroblastic Rat Kidney Cell Clones: Epidermal Growth Factor (EGF) Receptors and the Effect of Mouse Sarcoma Virus Transformation. *Journal of Cellular Physiology* 94, 335-342.
- DEKANT, W., POPA-HENNING, H. & VAMVAKAS, S. 2005. *Toxikologie: eine Einführung für Chemiker, Biologen und Pharmazeuten*, Elsevier-Spektrum Akademischer Verlag.
- DORIAN, C., GATTONE, V. H., 2ND & KLAASSEN, C. D. 1992. Accumulation and degradation of the protein moiety of cadmium-metallothionein (CdMT) in the mouse kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*, 117, 242-8.
- EDSON, R. S. & TERRELL, C. L. 1999. The Aminoglycosides. *Mayo Clinic Proceedings*, 74, 519-528.
- EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. 2021. *REACH verstehen* [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/de/regulations/reach/understanding-reach> [Accessed].
- FALAGAS, M. E. & KASIAKOU, S. K. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*, 40, 1333-41.

- FALAGAS, M. E. & KASIAKOU, S. K. 2006. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*, 10, R27.
- FAUCONNEAU, B., DE LEMOS, E., PARIAT, C., BOUQUET, S., COURTOIS, P. & PIRIOU, A. 1992. Chrononephrotoxicity in rat of a vancomycin and gentamicin combination. *Pharmacol Toxicol*, 71, 31-6.
- FAUCONNEAU, B., FAVRELIÈRE, S., PARIAT, C., GÉNÉVRIER, A., COURTOIS, P., PIRIOU, A. & BOUQUET, S. 1997. Nephrotoxicity of gentamicin and vancomycin given alone and in combination as determined by enzymuria and cortical antibiotic levels in rats. *Ren Fail*, 19, 15-22.
- FRANCHINI, I., ALINOVI, R., BERGAMASCHI, E. & MUTTI, A. 2005. Contribution of studies on renal effects of heavy metals and selected organic compounds to our understanding of the progression of chronic nephropathies towards renal failure. *Acta Biomed*, 76 Suppl 2, 58-67.
- FREISSMUTH, M. 2020. Antibakterielle Chemotherapie. *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer.
- FUJIWARA, K., YOSHIKAWA, Y., SHIN, M., MIYAZAKI, T., SAITA, T. & NAGATA, S. 2012. Immunocytochemistry for vancomycin using a monoclonal antibody that reveals accumulation of the drug in rat kidney and liver. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 5883-91.
- FUKUDA, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem*, 266, 21327-30.
- GERACI, J. E., HEILMAN, F. R., NICHOLS, D. R., WELLMAN, E. W. & ROSS, G. T. 1956. Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin. *Antibiot Annu*, 90-106.
- GERACI, J. E., NICHOLS, D. R. & WELLMAN, W. E. 1962. Vancomycin in serious staphylococcal infections. *Arch Intern Med*, 109, 507-15.
- GIAGINIS, C., GATZIDOU, E. & THEOCHARIS, S. 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 213, 282-90.
- GINET, V., PUYAL, J., CLARKE, P. G. & TRUTTMANN, A. C. 2009. Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *Am J Pathol*, 175, 1962-74.
- GOETZ, M. B. & SAYERS, J. 1993. Nephrotoxicity of vancomycin and aminoglycoside therapy separately and in combination. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 32, 325-334.
- GOLSTEIN, P. & KROEMER, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32, 37-43.

- GOYER, R. A., MILLER, C. R., ZHU, S. Y. & VICTERY, W. 1989. Non-metallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 101, 232-44.
- GREEN, D. & KROEMER, G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol*, 8, 267-71.
- GRIFFITH, R. S. 1981. Introduction to vancomycin. *Rev Infect Dis*, 3 suppl, S200-4.
- GROOTHUIS, F. A., HERINGA, M. B., NICOL, B., HERMENS, J. L., BLAAUBOER, B. J. & KRAMER, N. I. 2015. Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations. *Toxicology*, 332, 30-40.
- GUPTA, S., GOVIL, D., KAKAR, P. N., PRAKASH, O., ARORA, D., DAS, S., GOVIL, P. & MALHOTRA, A. 2009. Colistin and polymyxin B: a re-emergence. *Indian J Crit Care Med*, 13, 49-53.
- HALL, A. M. & UNWIN, R. J. 2007. The not so 'mighty chondrion': emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron Physiol*, 105, p1-10.
- HART, S. & KINTER, L. 2005. Assessing renal effects of toxicants in vivo. *Toxicology of the Kidney (JB Tarloff and LH Lash, Eds.)*, 81-147.
- HARTUNG, T. 2011. From alternative methods to a new toxicology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77, 338-349.
- HARTZELL, J. D., NEFF, R., AKE, J., HOWARD, R., OLSON, S., PAOLINO, K., VISHNEPOLSKY, M., WEINTROB, A. & WORTMANN, G. 2009. Nephrotoxicity associated with intravenous colistin (colistimethate sodium) treatment at a tertiary care medical center. *Clin Infect Dis*, 48, 1724-8.
- HE, L., WANG, B., HAY, E. B. & NEBERT, D. W. 2009. Discovery of ZIP transporters that participate in cadmium damage to testis and kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238, 250-7.
- HERMANN, T. 2007. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1841-1852.
- HORI, Y., AOKI, N., KUWAHARA, S., HOSAJIMA, M., KASEDA, R., GOTO, S., IIDA, T., DE, S., KABASAWA, H., KANEKO, R., AOKI, H., TANABE, Y., KAGAMU, H., NARITA, I., KIKUCHI, T. & SAITO, A. 2017. Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*, 28, 1783-1791.
- HUA, C. T., HOPWOOD, J. J., CARLSSON, S. R., HARRIS, R. J. & MEIKLE, P. J. 1998. Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clin Chem*, 44, 2094-102.
- JARUP, L. 2002. Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant*, 17 Suppl 2, 35-9.

- JARZINA, S., DI FIORE, S., ELLINGER, B., REISER, P., FRANK, S., GLASER, M., WU, J., TAVERNE, F. J., KRAMER, N. I. & MALLY, A. 2022. Application of the Adverse Outcome Pathway Concept to In Vitro Nephrotoxicity Assessment: Kidney Injury due to Receptor-Mediated Endocytosis and Lysosomal Overload as a Case Study. *Front Toxicol*, 4, 864441.
- JENKINSON, S. E., CHUNG, G. W., VAN LOON, E., BAKAR, N. S., DALZELL, A. M. & BROWN, C. D. 2012. The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflugers Arch*, 464, 601-11.
- JIN, T., LU, J. & NORDBERG, M. 1998. Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicology*, 19, 529-35.
- JIN, T., NORDBERG, G. F. & NORDBERG, M. 1986. Uptake of cadmium in isolated kidney cells--influence of binding form and in vivo pretreatment. *J Appl Toxicol*, 6, 397-400.
- JOHNSON, D. E., OSTROWSKI, P., JAUMOUILLE, V. & GRINSTEIN, S. 2016. The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J Cell Biol*, 212, 677-92.
- KAGEDAL, K., JOHANSSON, A. C., JOHANSSON, U., HEIMLICH, G., ROBERG, K., WANG, N. S., JURGENSMEIER, J. M. & OLLINGER, K. 2005. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis--involvement of Bax? *Int J Exp Pathol*, 86, 309-21.
- KAGEDAL, K., JOHANSSON, U. & OLLINGER, K. 2001. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *Faseb j*, 15, 1592-4.
- KASSAMALI, Z., JAIN, R. & DANZIGER, L. H. 2015. An update on the arsenal for multidrug-resistant Acinetobacter infections: polymyxin antibiotics. *Int J Infect Dis*, 30, 125-32.
- KEIRSTEAD, N. D., WAGONER, M. P., BENTLEY, P., BLAIS, M., BROWN, C., CHEATHAM, L., CIACCIO, P., DRAGAN, Y., FERGUSON, D., FIKES, J., GALVIN, M., GUPTA, A., HALE, M., JOHNSON, N., LUO, W., MCGRATH, F., PIETRAS, M., PRICE, S., SATHE, A. G., SASAKI, J. C., SNOW, D., WALSKY, R. L. & KERN, G. 2014. Early prediction of polymyxin-induced nephrotoxicity with next-generation urinary kidney injury biomarkers. *Toxicol Sci*, 137, 278-91.
- KLAASSEN, C. D. & LIU, J. 1997. Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug Metab Rev*, 29, 79-102.
- KLAASSEN, C. D., LIU, J. & DIWAN, B. A. 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 238, 215-220.

- KNAPEN, D., ANGRISH, M. M., FORTIN, M. C., KATSIADAKI, I., LEONARD, M., MARGIOTTA-CASALUCI, L., MUNN, S., O'BRIEN, J. M., POLLESCH, N., SMITH, L. C., ZHANG, X. & VILLENEUVE, D. L. 2018. Adverse outcome pathway networks I: Development and applications. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37, 1723-1733.
- KOHONEN, P., CEDER, R., SMIT, I., HONGISTO, V., MYATT, G., HARDY, B., SPJUTH, O. & GRAFSTROM, R. 2014. Cancer biology, toxicology and alternative methods development go hand-in-hand. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 115, 50-8.
- KRAMER, N., TAVERNE, F., MALLY, A., JARZINA, S., BIRK, B., DIFIORE, S., ELLINGER, B. & GEHRING, R. 2018. In vitro kinetics and quantitative in vitro-in vivo extrapolation of nephrotoxicants P08-15. *Toxicology Letters*, 295, S137.
- KUBIN, C. J., ELLMAN, T. M., PHADKE, V., HAYNES, L. J., CALFEE, D. P. & YIN, M. T. 2012. Incidence and predictors of acute kidney injury associated with intravenous polymyxin B therapy. *J Infect*, 65, 80-7.
- KUWANA, T., MACKEY, M. R., PERKINS, G., ELLISMAN, M. H., LATTERICH, M., SCHNEITER, R., GREEN, D. R. & NEWMAYER, D. D. 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111, 331-42.
- LASH, L. H., PUTT, D. A., HUENI, S. E., CAO, W., XU, F., KULIDJIAN, S. J. & HORWITZ, J. P. 2002. Cellular energetics and glutathione status in NRK-52E cells: toxicological implications. *Biochemical pharmacology*, 64, 1533-1546.
- LAURENT, G., KISHORE, B. K. & TULKENS, P. M. 1990. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*, 40, 2383-92.
- LEE, W. K., PROBST, S., SANTOYO-SANCHEZ, M. P., AL-HAMDANI, W., DIEBELS, I., VON SIVERS, J. K., KEREK, E., PRENNER, E. J. & THEVENOD, F. 2017. Initial autophagic protection switches to disruption of autophagic flux by lysosomal instability during cadmium stress accrual in renal NRK-52E cells. *Arch Toxicol*, 91, 3225-3245.
- LEIST, M., GHALLAB, A., GRAEPEL, R., MARCHAN, R., HASSAN, R., BENNEKOU, S. H., LIMONCIEL, A., VINKEN, M., SCHILDKNECHT, S., WALDMANN, T., DANEN, E., VAN RAVENZWAAY, B., KAMP, H., GARDNER, I., GODOY, P., BOIS, F. Y., BRAEUNING, A., REIF, R., OESCH, F., DRASDO, D., HÖHME, S., SCHWARZ, M., HARTUNG, T., BRAUNBECK, T., BELTMAN, J., VRIELING, H., SANZ, F., FORSBY, A., GADALETA, D., FISHER, C., KELM, J., FLURI, D., ECKER, G., ZDRAZIL, B., TERRON, A., JENNINGS, P., VAN DER BURG, B., DOOLEY, S., MEIJER, A. H., WILLIGHAGEN, E., MARTENS, M., EVELO, C., MOMBELLI, E., TABOUREAU, O., MANTOVANI, A., HARDY, B., KOCH, B., ESCHER, S., VAN THRIEL, C., CADENAS, C., KROESE, D., VAN DE WATER, B. &

- HENGSTLER, J. G. 2017. Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions. *Arch Toxicol*, 91, 3477-3505.
- LEPIST, E. I. & RAY, A. S. 2016. Renal Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions: Are They Clinically Relevant? *J Clin Pharmacol*, 56 Suppl 7, S73-81.
- LEVINE, D. P. 2006. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis*, 42 Suppl 1, S5-12.
- LI, J., NATION, R. L., TURNIDGE, J. D., MILNE, R. W., COULTHARD, K., RAYNER, C. R. & PATERSON, D. L. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*, 6, 589-601.
- LI, W., YUAN, X., NORDGREN, G., DALEN, H., DUBOWCHIK, G. M., FIRESTONE, R. A. & BRUNK, U. T. 2000. Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett*, 470, 35-9.
- LIU, W. J., SHEN, T. T., CHEN, R. H., WU, H. L., WANG, Y. J., DENG, J. K., CHEN, Q. H., PAN, Q., HUANG FU, C. M., TAO, J. L., LIANG, D. & LIU, H. F. 2015. Autophagy-Lysosome Pathway in Renal Tubular Epithelial Cells Is Disrupted by Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *J Biol Chem*, 290, 20499-510.
- LOPEZ-NOVOA, J. M., QUIROS, Y., VICENTE, L., MORALES, A. I. & LOPEZ-HERNANDEZ, F. J. 2011. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int*, 79, 33-45.
- LORZ, A. & METZGER, E. 2019. *Tierschutzgesetz : mit Allgemeiner Verwaltungsvorschrift, Art. 20a GG sowie zugehörigen Gesetzen, Rechtsverordnungen und Rechtsakten der Europäischen Union : Kommentar*, München, C.H. Beck.
- LU, S., SUNG, T., LIN, N., ABRAHAM, R. T. & JESSEN, B. A. 2017. Lysosomal adaptation: How cells respond to lysosomotropic compounds. *PLoS One*, 12, e0173771.
- LULEI, M. 2008. REACH: the guidance documents of the European Chemicals Agency (ECHA). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 51, 1444-52.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & PAULSEN, F. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*. 2012. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- LUZIO, J. P., PRYOR, P. R. & BRIGHT, N. A. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 622-32.
- MALLY, A. 2021. *AOP: 257* [Online]. Available: <https://aopwiki.org/aops/257> [Accessed 06.06.2021].

- MALLY, A. & JARZINA, S. 2022. Mapping Adverse Outcome Pathways for Kidney Injury as a Basis for the Development of Mechanism-Based Animal-Sparing Approaches to Assessment of Nephrotoxicity. *Front Toxicol*, 4, 863643.
- MANCHANDANI, P., ZHOU, J., BABIC, J. T., LEDESMA, K. R., TRUONG, L. D. & TAM, V. H. 2017. Role of Renal Drug Exposure in Polymyxin B-Induced Nephrotoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61, e02391-16.
- MARQUARDT, H. 2013. *Toxikologie: mit 378 Tabellen*, Wiss. Verlag-Ges.
- MATHER, M. & ROTTENBERG, H. 2001. Polycations induce the release of soluble intermembrane mitochondrial proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1503, 357-68.
- MELLMAN, I., FUCHS, R. & HELENIUS, A. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem*, 55, 663-700.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P. & TULKENS, P. M. 1999. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 1003-12.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P., TULKENS, P. M., DENAMUR, S., VAARA, T. & VAARA, M. 2012. Novel polymyxin derivatives are less cytotoxic than polymyxin B to renal proximal tubular cells. *Peptides*, 35, 248-52.
- MOELLERING, R. C., JR. 2006. Vancomycin: a 50-year reassessment. *Clin Infect Dis*, 42 Suppl 1, S3-4.
- MOESTRUP, S. K., CUI, S., VORUM, H., BREGENGÅRD, C., BJØRN, S. E., NORRIS, K., GLIEMANN, J. & CHRISTENSEN, E. I. 1995. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest*, 96, 1404-13.
- MOORE, R. D., LIETMAN, P. S. & SMITH, C. R. 1987. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J Infect Dis*, 155, 93-9.
- MOTOYOSHI, Y., MATSUSAKA, T., SAITO, A., PASTAN, I., WILLNOW, T. E., MIZUTANI, S. & ICHIKAWA, I. 2008. Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney Int*, 74, 1262-9.
- MRSCHTIK, M. & RYAN, K. M. 2015. Lysosomal proteins in cell death and autophagy. *The FEBS Journal*, 282, 1858-1870.
- NGAHA, E. O. & OGUNLEYE, I. O. 1983. Studies on gentamicin-induced labilization of rat kidney lysosomes in vitro. Possible protection by selenium. *Biochem Pharmacol*, 32, 2659-64.
- NISHINO, Y., TAKEMURA, S., MINAMIYAMA, Y., HIROHASHI, K., OGINO, T., INOUE, M., OKADA, S. & KINOSHITA, H. 2003. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Free Radic Res*, 37, 373-9.

- NORDBERG, G. F., PISCATOR, M. & LIND, B. 1971. Distribution of cadmium among protein fractions of mouse liver. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 29, 456-70.
- OBERLE, C., HUAI, J., REINHECKEL, T., TACKE, M., RASSNER, M., EKERT, P. G., BUELLESBACH, J. & BORNER, C. 2010. Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ*, 17, 1167-78.
- OECD 2012a. Proposal for a template, and guidance on developing and assessing the completeness of adverse outcome pathways.
- OECD. 2016. *Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)* [Online]. Available: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm> [Accessed 07.05.2020].
- OHKUMA, S., MORIYAMA, Y. & TAKANO, T. 1982. Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 2758-62.
- OMWENGA, I., ZHAO, S., KANJA, L., MOL, H., RIETJENS, I. & LOUISSE, J. 2021. Prediction of dose-dependent in vivo acetylcholinesterase inhibition by profenofos in rats and humans using physiologically based kinetic (PBK) modeling-facilitated reverse dosimetry. *Arch Toxicol*, 95, 1287-1301.
- PAIS, G. M., LIU, J., ZEPKAN, S., AVEDISSIAN, S. N., RHODES, N. J., DOWNES, K. J., MOORTHY, G. S. & SCHEETZ, M. H. 2020. Vancomycin-Induced Kidney Injury: Animal Models of Toxicodynamics, Mechanisms of Injury, Human Translation, and Potential Strategies for Prevention. *Pharmacotherapy*.
- PARK, M. A., PEJOVIC, V., KERISIT, K. G., JUNIUS, S. & THOENE, J. G. 2006. Increased apoptosis in cystinotic fibroblasts and renal proximal tubule epithelial cells results from cysteinylolation of protein kinase Cdelta. *J Am Soc Nephrol*, 17, 3167-75.
- PATLEWICZ, G., SIMON, T. W., ROWLANDS, J. C., BUDINSKY, R. A. & BECKER, R. A. 2015. Proposing a scientific confidence framework to help support the application of adverse outcome pathways for regulatory purposes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71, 463-477.
- PATTYN, V. M., VERPOOTEN, G. A., GIULIANO, R. A., ZHENG, F. & DE BROE, M. E. 1988. Effect of hyperfiltration, proteinuria and diabetes mellitus on the uptake kinetics of gentamicin in the kidney cortex of rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 244, 694.
- PAVELKA, M. & ROTH, J. 2005. Proximale Tubuli der Niere: Modifikation des Primärharns. *Funktionelle Ultrastruktur: Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben*. Vienna: Springer Vienna.

- PEACOCK, J. E., JR., MARSIK, F. J. & WENZEL, R. P. 1980. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction and spread within a hospital. *Ann Intern Med*, 93, 526-32.
- PFALLER, W. & GSTRAUNTHALER, G. 1998. Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 2, 559-69.
- PROMEGA CORPORATION 2015. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.
- PROZIALECK, W. C. & EDWARDS, J. R. 2012. Mechanisms of cadmium-induced proximal tubule injury: new insights with implications for biomonitoring and therapeutic interventions. *J Pharmacol Exp Ther*, 343, 2-12.
- PRÜSS-USTÜN, A., VICKERS, C., HAEFLIGER, P. & BERTOLLINI, R. 2011. Knowns and unknowns on burden of disease due to chemicals: a systematic review. *Environ Health*, 10, 9.
- PUNT, A., PINCKAERS, N., PEIJNENBURG, A. & LOUISSE, J. 2021. Development of a Web-Based Toolbox to Support Quantitative In-Vitro-to-In-Vivo Extrapolations (QIVIVE) within Nonanimal Testing Strategies. *Chemical Research in Toxicology*, 34, 460-472.
- PUYAL, J., VASLIN, A., MOTTIER, V. & CLARKE, P. G. 2009. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol*, 66, 378-89.
- QUIROS, Y., VICENTE-VICENTE, L., MORALES, A. I., LÓPEZ-NOVOA, J. M. & LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J. 2011. An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. *Toxicological Sciences*, 119, 245-256.
- RANI, A., KUMAR, A., LAL, A. & PANT, M. 2014. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res*, 24, 378-99.
- REGEC, A. L., TRUMP, B. F. & TRIFILLIS, A. L. 1989. Effect of gentamicin on the lysosomal system of cultured human proximal tubular cells. Endocytotic activity, lysosomal pH and membrane fragility. *Biochem Pharmacol*, 38, 2527-34.
- ROBERTS, K. D., AZAD, M. A., WANG, J., HORNE, A. S., THOMPSON, P. E., NATION, R. L., VELKOV, T. & LI, J. 2015. Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide Components of Polymyxin B and Colistin: Last-line Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-negative Bacteria. *ACS Infect Dis*, 1, 568-575.
- RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L. 1959. *The principles of humane experimental technique*, Methuen.

- SAFTIG, P. & KLUMPERMAN, J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 623-35.
- SANDRI, A. M., LANDERSDORFER, C. B., JACOB, J., BONIATTI, M. M., DALAROSA, M. G., FALCI, D. R., BEHLE, T. F., BORDINHAO, R. C., WANG, J., FORREST, A., NATION, R. L., LI, J. & ZAVASCKI, A. P. 2013. Population pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients: implications for selection of dosage regimens. *Clin Infect Dis*, 57, 524-31.
- SANDS, J. & VERLANDER, J. 2005. Anatomy and physiology of the kidneys. *Toxicology of the kidney. 3rd edition. Boca Raton, FL: CRC Press*, 3-56.
- SCHESTKOWA, O., GEISEL, D., JACOB, R. & HASILIK, A. 2007. The catalytically inactive precursor of cathepsin D induces apoptosis in human fibroblasts and HeLa cells. *J Cell Biochem*, 101, 1558-66.
- SCHETZ, M., DASTA, J., GOLDSTEIN, S. & GOLPER, T. 2005. Drug-induced acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*, 11, 555-65.
- SCHMITZ, C., HILPERT, J., JACOBSEN, C., BOENSCH, C., CHRISTENSEN, E. I., LUFT, F. C. & WILLNOW, T. E. 2002. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *J Biol Chem*, 277, 618-22.
- SCHULTE, C., TIETJEN, L., BAMBBAUER, A. & FLEISCHER, A. 2012. Five years REACH – lessons learned and first experiences. I. an authorities' view. *Environmental Sciences Europe*, 24, 31.
- SECKER, P. F., SCHLICHENMAIER, N., BEILMANN, M., DESCHL, U. & DIETRICH, D. R. 2019. Functional transepithelial transport measurements to detect nephrotoxicity in vitro using the RPTEC/TERT1 cell line. *Arch Toxicol*, 93, 1965-1978.
- SEGERER, K. & WANNER, C. 2014. *Niere und ableitende Harnwege*, Springer-Verlag.
- SILVERBLATT, F. 1982. Pathogenesis of nephrotoxicity of cephalosporins and aminoglycosides: a review of current concepts. *Rev Infect Dis*, 4 Suppl, S360-5.
- SILVERBLATT, F. J. & KUEHN, C. 1979. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int*, 15, 335-45.
- SIMON, T. W., SIMONS, S. S., PRESTON, R. J., BOOBIS, A. R., COHEN, S. M., DOERRER, N. G., FENNER-CRISP, P. A., MCMULLIN, T. S., MCQUEEN, C. A. & ROWLANDS, J. C. 2014. The use of mode of action information in risk assessment: Quantitative key events/dose-response framework for modeling the dose-response for key events. *Critical Reviews in Toxicology*, 44, 17-43.
- SPINU, N., BAL-PRICE, A., CRONIN, M. T. D., ENOCH, S. J., MADDEN, J. C. & WORTH, A. P. 2019. Development and analysis of an adverse outcome pathway network for human neurotoxicity. *Archives of Toxicology*, 93, 2759-2772.

- SPINU, N., CRONIN, M. T. D., ENOCH, S. J., MADDEN, J. C. & WORTH, A. P. 2020. Quantitative adverse outcome pathway (qAOP) models for toxicity prediction. *Arch Toxicol*, 94, 1497-1510.
- STANSLY, P. G. & SCHLOSSER, M. E. 1947. Studies on Polymyxin: Isolation and Identification of *Bacillus polymyxa* and Differentiation of Polymyxin from Certain Known Antibiotics. *J Bacteriol*, 54, 549-56.
- STOKA, V., TURK, B., SCHENDEL, S. L., KIM, T. H., CIRMAN, T., SNIPAS, S. J., ELLERBY, L. M., BREDESEN, D., FREEZE, H., ABRAHAMSON, M., BROMME, D., KRAJEWSKI, S., REED, J. C., YIN, X. M., TURK, V. & SALVESEN, G. S. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem*, 276, 3149-57.
- SURENDRAN, K., VITIELLO, S. P. & PEARCE, D. A. 2014. Lysosome dysfunction in the pathogenesis of kidney diseases. *Pediatr Nephrol*, 29, 2253-61.
- SUZUKI, T., YAMAGUCHI, H., OGURA, J., KOBAYASHI, M., YAMADA, T. & ISEKI, K. 2013. Megalin contributes to kidney accumulation and nephrotoxicity of colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57, 6319-6324.
- THÉVENOD, F. & FRIEDMANN, J. M. 1999. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺/K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *The FASEB Journal*, 13, 1751-1761.
- THOMASINA BARRON, E., O'BRIEN, A. & RYAN, M. 1990. Primary cultures of rat and rabbit renal proximal epithelium as models for nephrotoxicity investigations. *Toxicology letters*, 53, 161-165.
- THUL, P. J., AKESSON, L., WIKING, M., MAHDESSIAN, D., GELADAKI, A., AIT BLAL, H., ALM, T., ASPLUND, A., BJORK, L., BRECKELS, L. M., BACKSTROM, A., DANIELSSON, F., FAGERBERG, L., FALL, J., GATTO, L., GNANN, C., HOBER, S., HJELMARE, M., JOHANSSON, F., LEE, S., LINDSKOG, C., MULDER, J., MULVEY, C. M., NILSSON, P., OKSVOLD, P., ROCKBERG, J., SCHUTTEN, R., SCHWENK, J. M., SIVERTSSON, A., SJOSTEDT, E., SKOGS, M., STADLER, C., SULLIVAN, D. P., TEGEL, H., WINSNES, C., ZHANG, C., ZWAHLEN, M., MARDINOGLU, A., PONTEN, F., VON FEILITZEN, K., LILLEY, K. S., UHLEN, M. & LUNDBERG, E. 2017. A subcellular map of the human proteome. *Science*, 356.
- TIONG, H. Y., HUANG, P., XIONG, S., LI, Y., VATHSALA, A. & ZINK, D. 2014. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. *Mol Pharm*, 11, 1933-48.
- TOLLEFSEN, K. E., SCHOLZ, S., CRONIN, M. T., EDWARDS, S. W., DE KNECHT, J., CROFTON, K., GARCIA-REYERO, N., HARTUNG, T., WORTH, A. & PATLEWICZ, G. 2014. Applying Adverse Outcome Pathways (AOPs) to support

- Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). *Regul Toxicol Pharmacol*, 70, 629-40.
- VAARA, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev*, 56, 395-411.
- VAARA, M. 2010. Polymyxins and their novel derivatives. *Curr Opin Microbiol*, 13, 574-81.
- VAARA, M. 2019. Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics. *Molecules*, 24.
- VANCOMPERNOLLE, K., VAN HERREWEGHE, F., PYNAERT, G., VAN DE CRAEN, M., DE VOS, K., TOTTY, N., STERLING, A., FIERS, W., VANDENABEELE, P. & GROOTEN, J. 1998. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett*, 438, 150-8.
- VATTIMO, M. D. F. F., WATANABE, M., DA FONSECA, C. D., NEIVA, L. B. D. M., PESSOA, E. A. & BORGES, F. T. 2016. Polymyxin B Nephrotoxicity: From Organ to Cell Damage. *PloS one* [Online], 11. [Accessed 2016].
- VELKOV, T., THOMPSON, P. E., NATION, R. L. & LI, J. 2010. Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics. *J Med Chem*, 53, 1898-916.
- VERPOOTEN, G. A., GIULIANO, R. A., VERBIST, L., EESTERMANS, G. & DE BROE, M. E. 1989. Once-daily dosing decreases renal accumulation of gentamicin and netilmicin. *Clin Pharmacol Ther*, 45, 22-7.
- VIEL, A., HENRI, J., BOUCHÈNE, S., LAROCHE, J., ROLLAND, J. G., MANCEAU, J., LAURENTIE, M., COUET, W. & GRÉGOIRE, N. 2018. A Population WB-PBPK Model of Colistin and its Prodrug CMS in Pigs: Focus on the Renal Distribution and Excretion. *Pharm Res*, 35, 92.
- VINKEN, M. 2013. The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology. *Toxicology*, 312, 158-165.
- WALKER, P. D. & SHAH, S. V. 1988. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest*, 81, 334-41.
- WANG, F., GOMEZ-SINTES, R. & BOYA, P. 2018. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*, 19, 918-931.
- WIESER, M., STADLER, G., JENNINGS, P., STREUBEL, B., PFALLER, W., AMBROS, P., RIEDL, C., KATINGER, H., GRILLARI, J. & GRILLARI-VOGLAUER, R. 2008. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, F1365-75.

- WILMES, A., ASCHAUER, L., LIMONCIEL, A., PFALLER, W. & JENNINGS, P. 2014. Evidence for a role of claudin 2 as a proximal tubular stress responsive paracellular water channel. *Toxicol Appl Pharmacol*, 279, 163-72.
- WILMES, A., LIMONCIEL, A., ASCHAUER, L., MOENKS, K., BIELOW, C., LEONARD, M. O., HAMON, J., CARPI, D., RUZEK, S., HANDLER, A., SCHMAL, O., HERRGEN, K., BELLWON, P., BUREK, C., TRUISI, G. L., HEWITT, P., DI CONSIGLIO, E., TESTAI, E., BLAAUBOER, B. J., GUILLOU, C., HUBER, C. G., LUKAS, A., PFALLER, W., MUELLER, S. O., BOIS, F. Y., DEKANT, W. & JENNINGS, P. 2013. Application of integrated transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling for the delineation of mechanisms of drug induced cell stress. *J Proteomics*, 79, 180-94.
- WILSON, M. P. & SCHWARZMAN, M. R. 2009. Toward a new U.S. chemicals policy: rebuilding the foundation to advance new science, green chemistry, and environmental health. *Environ Health Perspect*, 117, 1202-9.
- WOLFF, N. A., ABOUHAMED, M., VERRON, P. J. & THÉVENOD, F. 2006. Megalin-dependent internalization of cadmium-metallothionein and cytotoxicity in cultured renal proximal tubule cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 782-91.
- YAO, L., ZHANG, J. W., CHEN, B., CAI, M. M., FENG, D., WANG, Q. Z., WANG, X. Y., SUN, J. G., ZHENG, Y. W., WANG, G. J. & ZHOU, F. 2020. Mechanisms and pharmacokinetic/pharmacodynamic profiles underlying the low nephrotoxicity and ototoxicity of etimicin. *Acta Pharmacol Sin*.
- YIN, X. M. 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, 369, 7-19.
- YOSHINO, N., ENDO, M., KANNO, H., MATSUKAWA, N., TSUTSUMI, R., TAKESHITA, R. & SATO, S. 2013. Polymyxins as novel and safe mucosal adjuvants to induce humoral immune responses in mice. *PloS one*, 8, e61643-e61643.
- YUN, B., AZAD, M. A. K., NOWELL, C. J., NATION, R. L., THOMPSON, P. E., ROBERTS, K. D., VELKOV, T. & LI, J. 2015. Cellular Uptake and Localization of Polymyxins in Renal Tubular Cells Using Rationally Designed Fluorescent Probes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59, 7489-7496.
- ZAVASCKI, A. P., GOLDANI, L. Z., LI, J. & NATION, R. L. 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 60, 1206-15.
- ZAVASCKI, A. P. & NATION, R. L. 2017. Nephrotoxicity of Polymyxins: Is There Any Difference between Colistimethate and Polymyxin B? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e02319-16.
- ZHANG, Y., YANG, S., CUI, X., YANG, J., ZHENG, M., JIA, J., HAN, F., YANG, X., WANG, J., GUO, Z., CHANG, B. & CHANG, B. 2019. Hyperinsulinemia Can

Cause Kidney Disease in the IGT Stage of OLETF Rats via the INS/IRS-1/PI3-K/Akt Signaling Pathway. *J Diabetes Res*, 2019, 4709715.

Appendix

I Appendix Methodik und Statistik

I.I Einstellungen des SP5 Konfokalmikroskop und der LAS AF-Software für die Bildaufnahme

Tabelle 16: Einstellungen der LAS AF-Software des SP5 Konfokalmikroskop für die Bildaufnahme der Immunfluoreszenzfärbung.

Parameter der Scanner-Einstellungen	Wert
ScanMode	xyz
Pinhole	95,5µm
Pinhole (airy)	1,00
Frame-Accumulation	1
Frame-Average	4
Parameter der Hardware-Einstellungen	Wert
Laser (Argon, visible) (Stärke)	30%

Tabelle 17: Laser Einstellungen für die unterschiedlichen Immunfluoreszenzfärbungen. Abkürzungen: CFL = Cruz-Fluorophors, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, HyD = Hybrid-Detektor, PMT = Photomultiplier Tubes.

Einstellungen für CFL 488 mit dem Argon Laser		Einstellungen für DAPI mit dem Diode 405 Laser	
Nummer der sequenziellen Einstellung	1	Nummer der sequenziellen Einstellung	2
Laserintensität	7,0-15,00%	Laserintensität	5,00%
Detektor	HyD	Detektor	PMT1
Detector Range	500-550 nm	Detector Range	420-470 nm
Detector Gain	100	Detector Gain	750
Detector Offset	0	Detector Offset	-1

I.II Gewählte Analyseverfahren der Graphen mit GraphPad PRISM

Tabelle 18: Abgebildete Graphen dieser Arbeit mit der zugehörigen gewählten Analyseverfahren in GraphPad PRISM.

Graphen	Analyseverfahren
CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest 24 h RPTEC/TERT1	
Polymyxin B	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variabel slope
Polymyxin B Nonapeptid	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope

Graphen	Analysemethode
Colistin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Vancomycin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Gentamicin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Cadmiumchlorid	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest 48 h RPTEC/TERT1	
Polymyxin B	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Polymyxin B Nonapeptid	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Colistin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Vancomycin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Gentamicin	lineare Regression
Cadmiumchlorid	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest 24 h NRK-52E	
Polymyxin B	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Polymyxin B Nonapeptid	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Colistin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Vancomycin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Gentamicin	lineare Regression
Cadmiumchlorid	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest 48 h NRK-52E	
Polymyxin B	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Polymyxin B Nonapeptid	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Colistin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Vancomycin	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
Gentamicin	lineare Regression
Cadmiumchlorid	nonlineare Regression mit log(agonist) vs. response – variable slope
CTSD-Färbung RPTEC/TERT1	
Mittlere Intensität Polymyxin B	log(agonist) vs. response – find ECanything

Graphen	Analysemethode
Maximale Intensität Polymyxin B	log(agonist) vs. response – find ECanything
CTSD-Färbung RPTEC/TERT1	
Mittlere Intensität Polymyxin B	log(agonist) vs. response – find ECanything
Maximale Intensität Polymyxin B	log(agonist) vs. response – find ECanything
LAMP2-Färbung RPTEC/TERT1	
Mittlere Intensität Polymyxin B	log(agonist) vs. response – find ECanything
Maximale Intensität Polymyxin B	log(agonist) vs. response – find ECanything
Mittlere Intensität Colistin	log(agonist) vs. response – find ECanything
Maximale Intensität Colistin	log(agonist) vs. response – find ECanything
LAMP1-Färbung NRK-52E	
Mittlere Intensität Polymyxin B	log(agonist) vs. response – find ECanything
Maximale Intensität Polymyxin B	log(agonist) vs. response – find ECanything

II Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 19: Verwendete Abkürzungen mit den zugehörigen Beschreibungen in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion = Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung, Ausscheidung
AMP	Adenosinmonophosphat
AO	Adverse Outcome = adverser Effekt
AOP	Adverse Outcome Pathway
ATP	Adenosintriphosphat
BAK Protein	Bcl-2 homologous antagonist/killer Protein
bar	Bar
BAX Protein	Bcl-2-associated X Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BID Protein	BH3-interacting domain death agonist Protein
BP	Binding Protein = bindendes Protein
BSA	Bovine serum albumin = Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Ionisches Kalzium
CAS-Nummer	Chemical Abstracts Service-Nummer
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
CFL-488	Cruz-Fluorophor-488
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL	Colistin
CTSB	Cathepsin B
CTSD	Cathepsin D
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered Saline
DPBST	Dulbecco's phosphate buffered Saline mit Tween
EC	Effect concentration = Effekt-Konzentration
EC ₅₀	Half maximal effect concentration = Halbmaximale Effekt-Konzentration

Abkürzung	Bedeutung
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures = Europäische Sammlung Authentifizierter Zellkulturen
ECHA	European Chemicals Agency = Europäische Chemikalienagentur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor = Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FBS	Fetal bovine serum = Fetales Kälberserum
FDA	United States Food and Drug Administration = US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel
g	Gramm
GEN	Gentamicin
Golgi	Golgi-Apparat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HSPA8	Heat shock 70 kDa protein 8
Hz	Hertz
IATA	Integrated Approches to Testing and Assessment = Integrierte Ansätze zur Prüfung und Bewertung
ITS	Insulin, Transferrin, Natriumselenit
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KE	Key Event = Schlüsselereignis
L	Liter
LAMP	Lysosomal-associated Membrane Protein = lysosomal-assoziiertes Membranprotein
LMP	Lysosomal Membrane Permeabilization = Lysosomale Membranpermeabilisierung
log	Logarithmus
M	Molar
MEM NEAA	Minimum Essential Medium Non Essential Amino Acids
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium Ion
MHC	Major Histocompatibility Complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
MIE	Molecular Initiating Event = molekulares initiierendes Ereignis
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
N	Normal
n	Stichprobengröße

Abkürzung	Bedeutung
nm	Nanometer
O ₂	Molekularer Sauerstoff
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development = Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PBPK	physiologisch basiert pharmakokinetisch
PMB	Polymyxin B
PMBN	Polymyxin B Nonapeptid
PP _i	Pyrophosphat
QIVIVE	Quantitative In-vitro-zu-in-vivo-Extrapolation
qKER	quantitative Key Event Relationship = quantitative Beziehung zwischen den Schlüsselereignissen
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals = Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe
ROS	Reactive Oxygen Species = Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
U	Units
UV	Ultraviolettstrahlung
VAN	Vancomycin
vs.	Gegen
z.B.	Zum Beispiel

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und allgemeines Schema des AOP-Konzepts unter Integration der verschiedenen verwendbaren Informationstypen.	3
Abbildung 2: Aufbau des Tubulussystems der Niere.	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer proximalen Tubulusepithelzelle inklusive relevanter Zellorganellen.	7
Abbildung 4: Darstellung der komplexen molekularen Mechanismen des AOPs „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“ in Kombination mit der gewählten Methodik für die einzelnen Schlüsselereignisse.	10
Abbildung 5: Überblick über die wichtigsten Funktionen eines Lysosoms.	14
Abbildung 6: Chemische Struktur von Polymyxin B und Colistin.	17
Abbildung 7: Chemische Struktur von Polymyxin B Nonapeptid.	19
Abbildung 8: Chemische Struktur von Gentamicin Typ C.	20
Abbildung 9: Chemische Struktur von Vancomycin.	22
Abbildung 10: Experimenteller Ablauf der Kultivierung und des Passagierens der Zelllinien NRK-52E und RPTEC/TERT1.	35
Abbildung 11: RPTEC/TERT1 Zellen, Fotoaufnahme mit dem Lichtmikroskop.	35
Abbildung 12: NRK-52E Zellen, Fotoaufnahme mit dem Lichtmikroskop.	36
Abbildung 13: Reaktionsgleichung der katalytischen Reaktion mittels rekombinanter Luciferase von Beetle Luciferin mit ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin, AMP, PP _i , CO ₂ und Licht.	38
Abbildung 14: Experimenteller Ablauf der Zellaussaat und Zellbehandlung mit den Testsubstanzen und Durchführung der Auswertung mittels CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest nach 24 h bzw. 48 h.	39
Abbildung 15: Behandlungsschema der 96-Well-Platten für den CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstest.	40
Abbildung 16: Experimenteller Ablauf der Zellaussaat, Zellbehandlung mit den Testsubstanzen und Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung nach 24 h.	43
Abbildung 17: Behandlungsschema für die 8-Well-Chamber Slides für die Immunfluoreszenzfärbung.	44
Abbildung 18: Der Adverse Outcome Pathway „Rezeptorvermittelte Endozytose und lysosomaler Overload führen zu Nephrotoxizität“	49

Abbildung 19: Zytotoxizität von Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid, Gentamicin, Vancomycin und Cadmiumchlorid in RPTEC/TERT1 Zellen.....	51
Abbildung 20: Zytotoxizität von Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid, Gentamicin, Vancomycin und Cadmiumchlorid in NRK-52E Zellen.....	54
Abbildung 21: Zytotoxizität von Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid, Vancomycin, Gentamicin und Cadmiumchlorid in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen nach 24 h und 48 h im Vergleich.....	56
Abbildung 22: Cathepsin D als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran in RPTEC/TERT1 Zellen induziert durch 24 h Behandlung mit Polymyxin B.....	61
Abbildung 23: Cathepsin D als Indikator für die Ruptur der lysosomalen Membran in NRK-52E Zellen induziert durch 24 h Behandlung mit Polymyxin B.....	64
Abbildung 24: Vergleichender Effekt von PMB auf die Signalintensität von CTSD in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen nach 24 h Behandlung.....	65
Abbildung 25: LAMP-Expression als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion nach der Behandlung mit Polymyxin B bzw. Colistin in RPTEC/TERT1 Zellen.....	69
Abbildung 26: LAMP-Expression als Indikator für die Störung der lysosomalen Funktion nach der Behandlung mit Polymyxin B in NRK-52E Zellen.....	72
Abbildung 27: Gegenüberstellung der mittleren und maximalen Signalintensität der Immunfluoreszenzfärbung von LAMP2 in den RPTEC/TERT1 und LAMP1 in den NRK-52E Zellen nach 24 h Zellbehandlung mit Polymyxin B.....	73
Abbildung 28: LAMP-Expression (KE 1), CTSD Signalintensität (KE 2), Zytotoxizität (KE 3) für Polymyxin B, Colistin, Polymyxin B Nonapeptid und Cadmiumchlorid in den RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen.....	76
Abbildung 29: Vorhersage der Zytotoxizität von COL, PMBN und CdCl ₂ unter Verwendung der Response-Response-Analysen basierend auf experimentell generierten Daten für PMB der einzelnen KEs in RPTEC/TERT1 und NRK-52E Zellen.	91

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten technischen Ausrüstung in alphabetischer Reihenfolge mit Herstellerangabe.....	26
Tabelle 2: Verwendete Software für die Datenauswertung und statistische Analyse mit Herstellerangabe in alphabetischer Reihenfolge.....	27
Tabelle 3: Liste der Verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge mit CAS-Nummer und Herstellerangabe.....	27
Tabelle 4: Verwendete nephrotoxische Testsubstanzen für die Zellbehandlung in alphabetischer Reihenfolge mit CAS-Nummer, Katalognummer und Herstellerangabe.....	28
Tabelle 5: Verwendete Kits mit Katalognummer und Herstellerangabe.....	29
Tabelle 6: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur mit Katalognummer und Herstellerangabe in alphabetischer Reihenfolge.....	29
Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Ansätze für die Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung mit Beschreibung der Herstellung.....	30
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien mit Beschreibung des Ursprungs, Katalognummer und Herstellerangabe in alphabetischer Reihenfolge.....	31
Tabelle 9: Verwendete monoklonale Antikörper mit Beschreibung der Zielstruktur, Wirtsspezies, Katalognummer und Herstellerangabe in alphabetischer Reihenfolge. .	31
Tabelle 10: Verfahren zur Desinfektion und Sterilisation mit Beschreibung. Verwendete Materialien und Geräte sind in Tabelle 1 des Abschnitts 2.1.1 Technische Ausrüstung aufgelistet.....	33
Tabelle 11: Auflistung der spezifischen verwendeten Antikörper für die Darstellung der intralysosomalen Protease CTSD und des LAMPs.....	45
Tabelle 12: EC ₅₀ - und EC ₁₀ -Werte des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests in RPTEC/TERT1 Zellen der Substanzen PMB, COL, PMBN, VAN, GEN und CdCl ₂ nach 24 h Zellbehandlung mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen.....	52
Tabelle 13: EC ₅₀ - und EC ₁₀ -Werte des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests in RPTEC/TERT1 Zellen für die Substanzen PMB, COL, PMBN, VAN, GEN und CdCl ₂ nach 48 h Zellbehandlung mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen.....	52
Tabelle 14: EC ₅₀ - und EC ₁₀ -Werte des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests in NRK-52E Zellen für die Substanzen PMB, COL, PMBN, VAN, GEN und CdCl ₂ nach 24 h Zellbehandlung mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen.....	55

Tabelle 15: EC ₅₀ - und EC ₁₀ -Werte des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Zellviabilitätstests in NRK-52E Zellen für die Substanzen PMB, COL, PMBN, VAN, GEN und CdCl ₂ nach 48 h Zellbehandlung mit den zugehörigen 95% Konfidenzintervallen.....	55
Tabelle 16: Einstellungen der LAS AF-Software des SP5 Konfokalmikroskop für die Bildaufnahme der Immunfluoreszenzfärbung.....	115
Tabelle 17: Laser Einstellungen für die unterschiedlichen Immunfluoreszenzfärbungen.	115
Tabelle 18: Abgebildete Graphen dieser Arbeit mit der zugehörigen gewählten Analysemethode in GraphPad PRISM.....	115
Tabelle 19: Verwendete Abkürzungen mit den zugehörigen Beschreibungen in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.	119

V Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Angela Mally, die mich als medizinische Doktorandin in ihre Arbeitsgruppe aufnahm und mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte. Ich möchte mich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Des Weiteren würde ich mich gerne bei Frau Prof. Dr. Klopocki als Zweitbeurteilerin meiner Doktorarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Mally und Herrn Prof. Dr. Dekant für die freundliche Unterstützung und das gute Arbeitsklima über die gesamte Zeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Sebastian Jarzina für die kompetente Betreuung, die Hilfe bei fachspezifischen Fragen und die wertvollen Ratschläge sowohl bei den experimentellen Arbeiten, als auch bei der Ausarbeitung meiner schriftlichen Dissertation. Auch möchte ich mich hier ganz herzlich bei Frau Heike Keim-Heusler bedanken, die mir bei den Laborarbeiten und darüber hinaus stets eine große Hilfe war. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Hannelore Popa-Henning und Frau Nataly Bittner für die tatkräftige Unterstützung.

Einen besonderen Dank möchte ich hiermit an meine Familie richten. Vor allem möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern danken, die mich auf meinem Weg hierhin über die Jahre immer in allen Belangen unterstützt und begleitet haben.

Ebenfalls meinen Freunden gilt ein großes Dankeschön, für die wunderbare gemeinsame Studienzeit und die einzigartigen Erinnerungen.

Von Herzen möchte ich mich bei meinem Freund Lukas Großhans bedanken. Danke für deine Motivation, deine Unterstützung und deine Liebe. Ich danke dir, dass du immer an meiner Seite bist und ich mich immer bedingungslos auf dich verlassen kann.

VII Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Publikationen

- Jarzina S, Di Fiore S, Ellinger B, **Reiser P**, Frank S, Glaser M, Wu J, Taverne FJ, Kramer NI, Mally A. „Application of the Adverse Outcome Pathway Concept to In Vitro Nephrotoxicity Assessment: Kidney Injury due to Receptor-Mediated Endocytosis and Lysosomal Overload as a Case Study.“ Front Toxicol. 2022 Apr 19;4:864441. doi: 10.3389/ftox.2022.864441. PMID: 35516525; PMCID: PMC9061999.

Konferenzbeiträge

- Angela Mally, Sebastian Jarzina, **Pia Reiser**, Femke Taverne, Barbara Birk, Stefano DiFiore, Bernhard Ellinger, Nynke Kramer (UW, UU, FH-IME), Poster presentation at the 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, TX, March 11-15, 2018. Poster title "Mapping Adverse Outcome Pathways for kidney injury: Opportunities for the development of mechanism-based animal-sparing approaches to assessment of nephrotoxicity".
- S. Jarzina, **P. Reiser**, J. Scherer, S. DiFiore, B. Ellinger, A. Mally (UW, FH-IME), Poster presentation at EUROTOX 2018, Brussels, BE, 02 – 05.09.2018. Poster title "The Adverse Outcome Pathway (AOP) concept as a basis for the development of mechanism-based animal sparing approaches: Kidney toxicity due to lysosomal overload and inhibition of mtDNA polymerase- γ as case studies".
- S. Jarzina, **P. Reiser**, J. Scherer, B. Ellinger, S. DiFiore, A. Mally (UW, FH-IME), Poster presentation at the 20th International Congress on In Vitro Toxicology (ESTIV2018), Berlin, DE, 15 – 18.10.2018 . Poster title "Application of the Adverse outcome pathways (AOP) concept to systemic toxicity assessment in vitro: Kidney injury due to lysosomal overload and inhibition of mtDNA polymerase- γ as case studies".
- A. Mally, B. Birk, S. Di Fiore, B. Ellinger, S. Jarzina, **P. Reiser**, F. Taverne, N. Kramer (UW, BASF, FH-IME, UU). Poster presentation at EUROTOX 2019, Helsinki, FI, 8 – 11.09.2019. Poster title: "Application of adverse outcome pathways and quantitative in vitro-in vivo extrapolation (QIVIVE) modelling for risk assessment based on in vitro data"