

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Patrick Meybohm**

**Untersuchungen zur Aufklärung der adversen Effekte von HES auf Zellen (HK-2) des
proximalen Nierentubulus**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Florian Stein
aus Würzburg**

Würzburg, Januar 2022

Referent: Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. Winfried Neuhaus

Korreferent: Prof. Dr. med. Christoph Wanner

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2022

Der Promovend ist Arzt

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht	1
1.2	Infusionstherapie.....	1
1.3	Überblick über Infusionslösungen.....	2
1.3.1	Kristalloide und Kolloide	2
1.3.2	Kolloidosmotischer Druck und das Kolloid-Paradigma	2
1.3.3	Historische Entwicklung der kolloidalen Infusionslösungen	3
1.3.4	Momentan verfügbare kolloidale Infusionslösungen	3
1.4	Hydroxyethylstärke	8
1.5	Hydroxyethylstärke und Akutes Nierenversagen.....	12
1.5.1	Entwicklungen der HES-Debatte in den letzten Jahren.....	12
1.5.2	Akutes Nierenversagen.....	13
1.6	Autophagie	15
1.6.1	Funktion	15
1.6.2	Mechanismus.....	16
1.6.3	Regulierung.....	18
1.6.4	Medikamentöse Angriffspunkte	22
1.7	Hinführung zur Fragestellung.....	25
1.8	Fragestellung	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Proximale Nierentubuluszellen (HK-2-Zellen)	27
2.1.2	Zellkulturmaterialien	28

2.1.3	Versuchslösungen.....	28
2.1.4	Substanzen.....	28
2.1.5	Antikörper.....	29
2.1.6	Messgeräte	29
2.1.7	Viabilitätsassays.....	29
2.1.8	Herstellung von Proteinextrakten	29
2.1.9	Proteinkonzentrationsbestimmungen	30
2.1.10	Gelelektrophorese	30
2.1.11	Übertragung der Proteine auf PVDF-Membranen (Western Blotting)	31
2.1.12	Detektion der Proteine mit Antikörpern	32
2.1.13	Software	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Zellkultur.....	33
2.2.2	Aussaat der HK-2-Zellen für Viabilitätsassays	33
2.2.3	Versuchslösungen.....	33
2.2.4	pH-Wert-Einstellung	34
2.2.5	EZ4U-Versuche.....	35
2.2.6	PrestoBlue-Versuche	36
2.2.7	Western-Blot-Versuche	38
2.2.8	Statistische Analyse	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Auswirkungen von HES auf die Zellviabilität.....	43
3.1.1	HES reduziert die Zellviabilität konzentrationsabhängig im EZ4U-Test	43
3.2	PrestoBlue-Test	46
3.2.1	Validierung des PrestoBlue-Tests.....	46

3.2.2 HES reduziert die Zellviabilität im PrestoBlue-Test konzentrationsabhängig	49
3.3 Einfluss von Everolimus auf die Zellviabilität unter HES	52
3.3.1 Die Viabilitätsreduktion durch HES lässt sich durch Everolimus partiell aufheben.....	52
3.3.2 Zeitabhängigkeit des Everolimus-Effektes.....	53
3.3.3 Everolimus-Effekt im PrestoBlue-Test.....	55
3.4 Untersuchung der potentiellen Reversibilität im PrestoBlue-Test	57
3.5 Einfluss von HES auf zentrale Proteine der Autophagie im zeitlichen Verlauf	59
3.6 Einfluss verschiedener die Autophagie regulierender Substanzen auf die Zellviabilität	67
3.6.1 Rapamycin schwächt die Viabilitätsreduktion durch HES ab	68
3.6.2 U0126 blockt den Effekt von Everolimus	69
3.6.3 Chloroquin führt zu einer geringgradigen Viabilitätserhöhung	71
3.6.4 Perifosin reduziert die Zellviabilität konzentrationsabhängig.....	72
3.6.5 3-Methyladenin erhöht die Zellviabilität unabhängig von HES konzentrationsabhängig	75
3.6.6 Resveratrol führt zu einer geringfügigen Viabilitätsreduktion.....	77
3.7 Auswirkungen von Modulatoren auf die Expression zentraler Autophagieproteine unter Koinkubation mit HES	79
4 Diskussion	87
4.1 HES reduziert die Zellviabilität <i>in vitro</i> in zwei unabhängigen Assays	89
4.1.1 HES reduziert die Zellviabilität konzentrationsabhängig im EZ4U-Test	89
4.1.2 Der Prestoblue-Test ist geeignet für die Viabilitätsbestimmung von HK- 2-Zellen nach Inkubation mit HES.....	89

4.1.3 HES reduziert auch im PrestoBlue-Test die Zellviabilität konzentrationsabhängig	90
4.1.4 Der HES-Effekt ist auch im PrestoBlue-Test über die Inkubation hinaus messbar.....	91
4.2 Die HES-vermittelte Viabilitätsreduktion lässt sich im EZ4U-Test partiell durch eine Autophagieinduktion aufheben	91
4.3 Im PrestoBlue-Test führt die medikamentöse Autophagieinduktion zu einer weiteren Viabilitätsreduktion	92
4.4 Einfluss von HES auf zentrale Proteine der Autophagie im zeitlichen Verlauf.....	94
4.5 Auswirkungen von Autophagiemodulatoren auf die Zellviabilität im EZ4U- Test unter Koinkubation von HES.....	95
4.6 Auswirkungen von Autophagiemodulatoren auf Proteinebene unter Koinkubation von HES	100
4.7 Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen wissenschaftlichen Diskurs und offene Fragen.....	103
5 Zusammenfassung	108
6 Literaturverzeichnis	112
Appendix	
I Abbildungsverzeichnis	
II Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Übersicht

In dieser Einleitung soll zunächst ein kurzer Überblick über die zur Verfügung stehenden Typen von Infusionslösungen gegeben werden. Im Weiteren wird näher auf das kolloidale Plasmaersatzmittel Hydroxyethylstärke eingegangen, dessen Effekte zentraler Bestandteil dieser Arbeit sind. Unter Einbezug neuerer Studienergebnisse und Entwicklungen der letzten Jahre wird daraufhin eine in den Fokus gerückte spezifische Nebenwirkung der Hydroxyethylstärke, das akute Nierenversagen, erläutert. Der zugrunde liegende Pathomechanismus ist bis zum heutigen Tag unklar und Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Forschung. In diesem Zusammenhang mehren sich die Hinweise, dass der universelle zelluläre Mechanismus der Autophagie eine zentrale Rolle zu spielen scheint. Auf diesen soll genauer eingegangen und abschließend erläutert werden, aus welchem Grund dessen Untersuchung im Mittelpunkt dieser Arbeit steht.

1.2 Infusionstherapie

Weltweit kommt insbesondere die Infusionstherapie mit intravenösen Infusionslösungen in der medizinischen Notfallversorgung von Patienten flächendeckend zur Anwendung. Auch im perioperativen und intensivmedizinischen Management sind Infusionslösungen ein fester Bestandteil und bilden das Fundament für die Aufrechterhaltung der Herz-Kreislauf-Funktion und damit der Organperfusion. Dabei spielen insbesondere bei größeren Blut- oder Plasmaverlusten, schwerer Exsikkose oder hypovolämisch-hämorrhagischem Schock kolloidale Infusionslösungen als effektivste Volumenersatzmittel eine große Rolle (Thiel and Roewer 2021).

1.3 Überblick über Infusionslösungen

1.3.1 Kristalloide und Kolloide

Zur Volumenersatztherapie stehen primär zwei unterschiedliche Arten von Infusionslösungen zur Verfügung: Kristalloide und Kolloide.

Bei Kristalloiden handelt es sich um Infusionslösungen, die als gelöste Substanzen Elektrolyte und/oder Glukose enthalten, jedoch definitionsgemäß keine Makromoleküle (Adams 2007). Kristalloide werden nach ihrem Natriumgehalt weiter unterteilt in Voll-, Zweidrittel-, Halb-, Eindrittel- sowie elektrolytfreie Lösungen. Dazu zählen unter anderem physiologische Kochsalzlösung, Ringer-Lösungen sowie balancierte Vollelektrolytlösungen (Rehm, Paptistella *et al.* 2012).

Kolloide sind streng genommen unechte Lösungen, da sie aus Makromolekülen bestehen, welche sich in einem Dispersionsmedium verteilen. Bei den im Folgenden dargestellten Hydrokolloiden handelt es sich um Makromoleküle, welche aufgrund ihrer großen Oberfläche zahlreiche polare Gruppen tragen und dadurch sehr gut Wasser als Dispersionsmedium binden können (Thiel and Roewer 2021). Dieses kolloidale Dispersionsystem besitzt die Eigenschaft, einen onkotischen Druck auszuüben, worauf im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden soll. Kolloide werden weiter in natürliche Kolloide (Humanalbumin) und synthetische Kolloide (Hydroxyethylstärke, Gelatine, Dextrane) unterteilt.

1.3.2 Kolloidosmotischer Druck und das Kolloid-Paradigma

Der onkotische Druck (synonym kolloidosmotischer Druck = KOD) ist der Anteil am osmotischen Druck, der durch die Kolloide einer Lösung bewirkt wird. Diese können aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes die Endothelbarriere nur langsam passieren im Gegensatz zu den niedermolekularen Plasmabestandteilen wie Elektrolyte, für welche beim Gesunden die Gefäßwand permeabel ist und die dem hydrostatischen Druck frei nach extravasal folgen. Somit ist nach gängiger Lehrmeinung der durch Kolloide erzeugte onkotische Druck für die längerfristige Aufrechterhaltung des Plasmavolumens essentiell und führt zu einer guten Volumenwirksamkeit sowie – im Vergleich zu Kristalloiden – zu einer langen intravasalen Verweildauer. Dieses als

1 Einleitung

„Kolloid-Paradigma“ beziehungsweise Starling-Modell bekannte Konzept geht auf Überlegungen von Starling und Bayliss zurück, wurde von Bayliss 1920 im Rahmen seiner Erfahrungen mit Gummi arabicum aufgestellt (Bayliss 1920) und war bis vor einigen Jahren weitgehend akzeptiert. Insbesondere diente es als gewichtiges Argument für den Einsatz von Hydrokolloiden, da demnach Kristalloide nicht zur dauerhaften hämodynamischen Stabilisierung geeignet seien. Nach dieser Theorie kommt es stattdessen aufgrund der kurzen intravasalen Verweildauer im Rahmen der Stabilisierung zu einer „Überinfusion“ mit Kristalloiden, die sich rasch im Extravasalraum verteilen und zu einer Überwässerung des Patienten führen.

1.3.3 Historische Entwicklung der kolloidalen Infusionslösungen

Aufgrund ihres im Vergleich zu Kristalloiden verlängerten Volumeneffektes eignen sich nach gängiger Lehrmeinung Kolloide wesentlich besser für den akuten Volumenersatz insbesondere bei Blut- und Plasmaverlusten. Kamen in den Anfängen zunächst Kristalloide zum Einsatz, wurde aufgrund des zunehmend akzeptierten Kolloid-Paradigmas von Bayliss und Starling die Suche nach kolloidalen Infusionslösungen intensiviert. Das von Bayliss eingesetzte Gummi arabicum trat wegen seiner hohen Toxizität und Antigenität schnell wieder in den Hintergrund (Le Gal 1975). Das vom deutschen Militär im zweiten Weltkrieg entwickelte Polyvinylpyrrolidon (PVP) wurde aufgrund seiner renalen Akkumulation und Toxizität – bekannt unter dem Namen „Kolloidniere“ (Heinlein and Hubner 1958) – in den darauf folgenden Jahren durch die besser verträglichen Kolloide Humanalbumin, Gelatine und verschiedene Dextrane verdrängt. Schließlich wurde in den 1970er Jahren die erste Generation der Hydroxyethylstärke eingeführt.

1.3.4 Momentan verfügbare kolloidale Infusionslösungen

Im folgenden Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die heute zur Verfügung stehenden kolloidalen Infusionslösungen gegeben und ausführlicher auf die in dieser Arbeit verwendete Hydroxyethylstärke eingegangen werden.

Nach einer Metaanalyse einer Studie aus dem Jahr 2007 (Finfer, Liu *et al.* 2010) variierte die Verbreitung der unterschiedlichen Kolloidtypen sehr stark von Land zu

1 Einleitung

Land. Danach wurden in Europa zumeist Kolloide in der Volumenersatztherapie favorisiert, wogegen in den USA und Neuseeland primär Kristalloide zum Einsatz kamen (Abbildung 1-1).

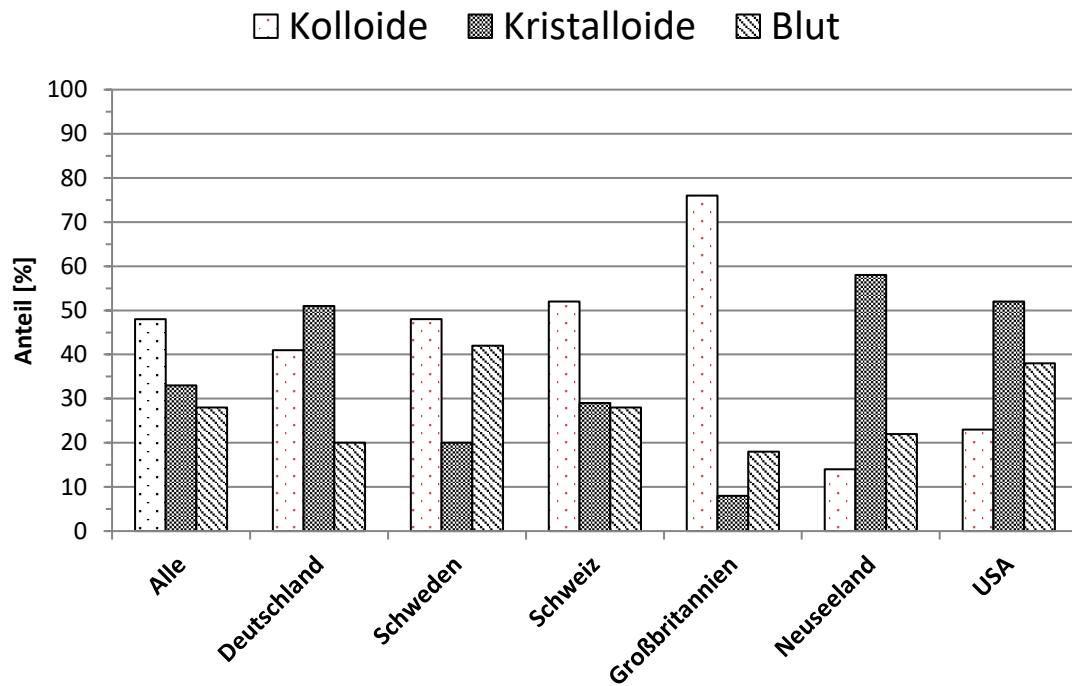


Abbildung 1-1: Übersicht über den weltweiten Einsatz von Infusionslösungen nach Land im Jahr 2007. Auswahl von Daten aus insgesamt 25 Ländern (= Alle) nach (Finfer, Liu *et al.* 2010), Erlaubnis vorliegend (CC BY 2.0)

Auch innerhalb der Kolloide fanden sich höchst unterschiedliche Verteilungen. So wurde in Großbritannien und Australien vermehrt auf Gelatine zurückgegriffen, während in zentraleuropäischen Ländern Hydroxyethylstärke dominierte (Abbildung 1-2).

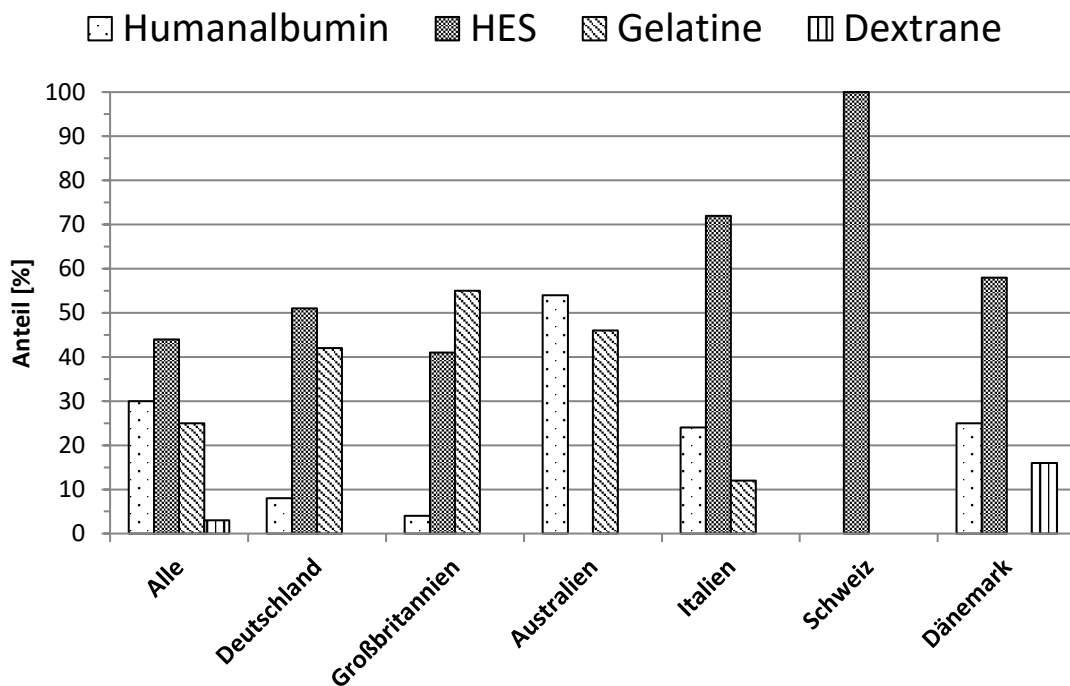


Abbildung 1-2: Übersicht über den weltweiten Einsatz von Kolloiden nach Land im Jahr 2007. Auswahl von Daten aus insgesamt 25 Ländern (= Alle) nach (Finfer, Liu *et al.* 2010), Erlaubnis vorliegend (CC BY 2.0)

Eine im Jahr 2017 veröffentlichte Arbeit, welche neuere Daten einer Querschnittsstudie aus dem 2014 mit der oben genannten Studie aus dem Jahr 2010 verglich, konnte einen klaren Trend weg von Kolloiden und insbesondere Hydroxyethylstärke hin zu Kristalloiden feststellen (Hammond, Taylor *et al.* 2017). Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich, dass sich in der Zwischenzeit vermehrt Hinweise auf renale Nebenwirkungen von HES ergaben, welche zu Marktrestriktionen durch die europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) führten, wie weiter unten im Abschnitt 1.5 erläutert.

1.3.4.1 Humanalbumin

Humanalbumin ist ein ausschließlich in der Leber synthetisiertes Protein, welches aus 584 Aminosäuren aufgebaut ist. Es ist ein Blutprodukt und gilt als „natürliches“ Kolloid, da es aus gepooltem Plasma gesunder Spender durch Alkoholfällung gewonnen und mit großem Aufwand aufbereitet wird, um das Risiko von Infektionsübertragungen zu minimieren. Dabei muss der Reinheitsgrad eines Präparates (Anteil an Albuminmonomeren) mindestens 95% betragen. Dadurch ist es im Vergleich zu den

1 Einleitung

anderen Kolloiden mit Abstand das teuerste Präparat (Bundesärztekammer 2014, Thiel and Roewer 2021).

Das mittlere Molekulargewicht beträgt etwa 66,55 kDa, die reguläre Serumkonzentration beläuft sich auf 35 - 55 g/L. Damit beträgt sein Anteil 55 - 67% aller Plasmaproteine und stellt unter physiologischen Bedingungen ungefähr 80% des kolloidosmotischen Druckes. Darüber hinaus transportiert Humanalbumin hydrophobe endo- und exogene Substanzen. Zu bedenken ist, dass durch Humanalbumin die körpereigene hepatische Albuminsynthese gehemmt wird (de Jonge and Levi 2001). Außerdem kann Humanalbumin bedingt durch den Herstellungsprozess bis zu 200 µg/L Aluminium enthalten, was dem als toxisch festgesetzten Grenzwert entspricht (Thiel and Roewer 2021).

Albumin besitzt eine intravasale Verweildauer von zirka vier Stunden bei physiologischer Kapillarpermeabilität sowie eine *in vivo* Halbwertszeit von zirka 18 - 21 Tagen im Menschen durch die tubuläre Rückresorption nach glomerulärer Filtration bei intakter Nierenfunktion (Executive Committee of the German Medical Association on the Recommendation of the Scientific Advisory 2016). Nach Erlöschen der biologischen Funktionsfähigkeit wird es in der Leber degradiert. Humanalbumin liegt in einer Konzentration von meist 5% für eine Infusionstherapie sowie von 20 - 25% zur gezielten Albuminsubstitution vor (Vincent and Gottin 2011).

Weltweit wird Humanalbumin verschieden eingesetzt beziehungsweise bewertet. In den USA ist es teilweise der favorisierte Plasmaexpander bei Hypovolämie (Finfer, McEvoy *et al.* 2011). In Deutschland kam es unter anderem aufgrund des aufgedeckten gravierenden wissenschaftlichen Fehlverhaltens des Autors Prof. Dr. J. Boldt 2014 zu einer Überarbeitung und Neubewertung der Querschnittsleitlinie zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten (Bundesärztekammer 2011, Bundesärztekammer 2014). Demnach wird eine eindeutige Empfehlung für die Gabe von Humanalbumin lediglich bei Hypoalbuminämie im Rahmen einer Leberzirrhose, beim hepatorenalen Syndrom sowie nach Parazentese ausgesprochen. Neuere Metaanalysen kommen jedoch überwiegend zu dem Schluss, dass die Gabe von

1 Einleitung

Albumin im Vergleich zu anderen Infusionslösungen bei Sepsis-Patienten in Zusammenhang stehen könnte mit einer verringerten Mortalität (Delaney, Dan *et al.* 2011, Wiedermann and Joannidis 2014).

1.3.4.2 Gelatine

Die als Plasmaexpander erhältliche Gelatine ist ein künstliches Kolloid und wird in Deutschland als Abbauprodukt aus Rinderkollagen gewonnen, welches im Gegensatz zu Hydroxyethylstärke und Dextran ein Polypeptid ist. Die hieraus extrahierte Substanz ist ein heterogenes Gemisch, deren Moleküle unterschiedliche Molmassen zwischen 1 kDa und mehreren 100 kDa aufweisen. Dabei besitzt diese Grundsubstanz durch die höhermolekularen Fraktionen bei Raumtemperatur eine gelartige Viskosität. Um diese Fraktionen zu reduzieren und den Schmelzpunkt zu senken, werden diese Polypeptide durch Succinylierung, Peroxidierung oder Harnstoffvernetzung hydrolytisch gespalten und anschließend neu vernetzt (Thiel and Roewer 2021).

Dadurch weist Gelatine eine mittlere Molmasse von lediglich etwa 30 kDa auf und wird sehr schnell renal eliminiert. Nur ein geringer Teil wird vorher im retikuloendothelialen System durch Peptidasen fragmentiert. Als Nebenwirkung werden teils schwere allergische Reaktionen beschrieben, aufgrund dessen die Indikation von Gelatine aktuell als sehr eingeschränkt bewertet wird beziehungsweise in den USA nicht mehr besteht (Harper, Dixon *et al.* 2009, Farooque, Kenny *et al.* 2019).

1.3.4.3 Dextrane

Dextrane sind verzweigte Polysaccharide, welche aus bis zu mehreren Tausend Einheiten Glukose aufgebaut sind. Diese sind vorwiegend über α -1,6-, selten über α -1,4- und α -1,3-glykosidische Bindungen verknüpft und enthalten keine Hydroxyethylgruppen. Sie werden aus bakterieller Synthese (*Leuconostoc mesenteroides*) gewonnen und sind bereits in ihrer Rohform wasserlöslich, werden jedoch noch weiter aufgespalten, um therapeutisch anwendbar zu sein. Dabei beträgt die mittlere Molmasse 40 bis 60 kDa. Aufgrund der hohen Rate an anaphylaktischen Reaktionen ist die Verwendung von Dextranen obsolet (Perel, Roberts *et al.* 2013).

1.4 Hydroxyethylstärke

Hydroxyethylstärke (= HES beziehungsweise HAES) ist ein aus pflanzlicher Stärke (Wachsmais oder Kartoffeln) gewonnenes Polysaccharid. Stärke besteht aus Amylose und Amylopektin, welche in Kartoffeln im Verhältnis von zirka 1:4, in Wachsmais sogar im Verhältnis 1:99 vorliegen. Beide Moleküle bauen sich aus D-Glukose-Einheiten auf. Amylose ist dabei rein α -1,4-glykosidisch verknüpft, Amylopektin weist zusätzlich ungefähr alle 25 Moleküle eine α -1,6-glykosidische Bindung auf. Da native Stärke Moleküle bis zu einer Größe von bis zu 100 Mio. Dalton enthält und wasserunlöslich ist, wird HES durch chemische oder enzymatische Spaltung und den partiellen Ersatz von Hydroxyl- durch Hydroxyethylgruppen wasserlöslich gemacht (siehe Abbildung 1-3) (Rehm, Paptistella *et al.* 2012). Dies schützt es außerdem vor dem raschen Abbau durch die im Serum enthaltene α -Amylase (Adams 2007).

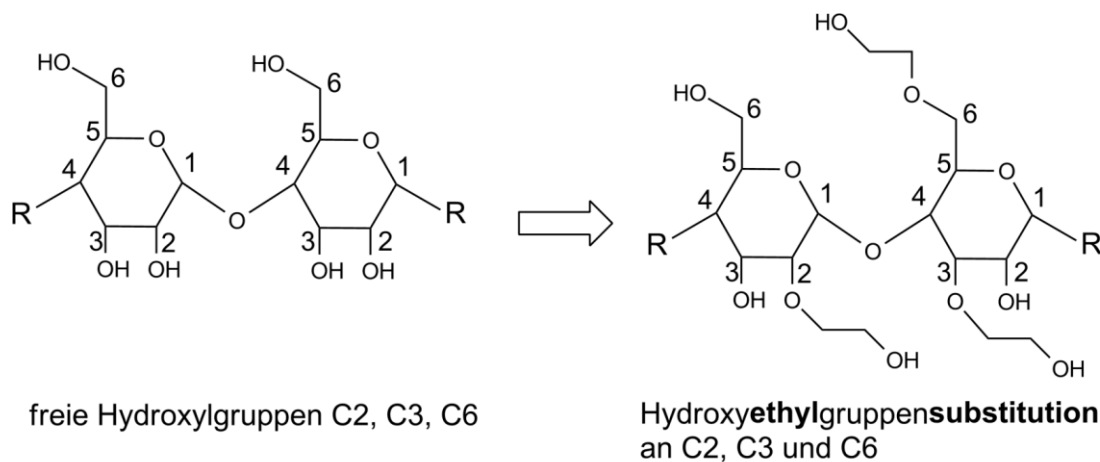


Abbildung 1-3: Schema der Umwandlung von Stärke in HES durch Substitution von Hydroxylgruppen mit C2, C3 und C6 von Amylose, Erlaubnis vorliegend

HES steht in einer Vielzahl von Präparaten zur Verfügung. Dabei werden diese neben der Konzentration und der mittleren Molmasse durch zwei Substitutionsparameter, welche von großer Bedeutung für die Pharmakokinetik sind, weiter charakterisiert:

1. Substitutionsgrad
2. Substitutionsmuster

1 Einleitung

Substitutionsgrad: Der Substitutionsgrad beschreibt das Ausmaß der Hydroxyethylierung. Er kann in zwei Formen angegeben werden, als molare Substitution (MS) oder als eigentlicher Substitutionsgrad (= degree of substitution, DS). Unter der molaren Substitution (MS) versteht man das Verhältnis der Anzahl der Hydroxyethylgruppen zur Gesamtzahl der Glukosebausteine. Dieses kann größer als 1 sein, wenn einzelne Glukosemoleküle mehr als eine Hydroxyethylgruppe enthalten. Im Unterschied dazu stellt der Substitutionsgrad (DS) das Verhältnis der Anzahl hydroxyethylierter Glukoseeinheiten zur Gesamtzahl der verfügbaren Glukosebausteine dar. Daher kann der Substitutionsgrad (DS) höchstens 1 betragen, auch wenn ein Glukosebaustein mehrfach substituiert ist. Praxisüblich ist die Angabe der molaren Substitution (MS). Bei den derzeit handelsüblichen Präparaten unterscheiden sich die Werte für die molare Substitution und den Substitutionsgrad so geringfügig, dass die Differenz nicht relevant ist.

Substitutionsmuster: Das C2/6-Verhältnis: Verfahrensbedingt resultiert eine Hydroxyethylierung am häufigsten am C2-Atom. Die Reaktivität sinkt dabei vom C2-Atom über das C3-Atom bis zum C6-Atom. Die Hydroxyethylierung am C2-Atom ist am relevantesten, weil sie HES deutlich widerstandsfähiger gegen eine Degradation durch die α -Amylase macht. Liegen daher mehr C2-Atome in hydroxyethylierter Form vor, verlängert dies die intravasale Wirkung, da der Abbau durch die α -Amylase an dieser Position mehr Zeit benötigt. Die Relation der am C2-Atom hydroxyethylierten zu den am C6-Atom hydroxyethylierten Glukosebausteine wird vereinfacht als Substitutionsmuster bezeichnet. Dieses kann gaschromatographisch quantitativ nach vollständiger Hydrolyse des HES bestimmt werden (von Roten, Madjdpour *et al.* 2006).

Elimination: HES-Moleküle, welche eine geringere Molmasse als 50 kDa aufweisen, werden rasch über die Nieren eliminiert (Dickenmann, Oettl *et al.* 2008). Größere HES-Moleküle werden durch das retikuloendotheliale System aufgenommen. Der Mechanismus ist erforderlich, da die α -Amylase nicht imstande ist, die im HES vorhandenen α -1,6-Bindungen aufzuschlüsseln. Diese können nur intrazellulär gespalten werden. Die sich anschließende Speicherung innerhalb von Lysosomen ist

1 Einleitung

auch für andere Kolloide bekannt. Im Vergleich zu diesen scheint sie jedoch bei HES ausgeprägt zu sein und lange anzuhalten, so dass es zu einem Pruritus und einer Hepatosplenomegalie kommen kann (Thiel and Roewer 2021).

Die Bezeichnung eines HES-Präparates setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Dies soll kurz an einem Beispiel verdeutlicht werden:

6% HES 130 / 0,4

6% beschreibt den prozentualen Anteil des Gewichts am Gesamtvolumen (6% enthalten demnach 60 g HES pro Liter)

HES steht für Hydroxyethylstärke

130 steht für die mittlere Molmasse in kDa

0,4 steht für den Substitutionsgrad

Das heutzutage verwendete HES 130 / 0,4 oder HES 130 / 0,42 wird oft als HES der 3. Generation bezeichnet. Dieses besitzt laut der pharmazeutischen Industrie den bestmöglichen Volumeneffekt und die längstmögliche Verweildauer bei gleichzeitig minimiertem Risikoprofil (Boldt 2009).

Historie: Auf der Suche nach einem synthetischen Kolloid mit möglichst geringer Antigenität wurde HES nach der erstmaligen Synthese 1934 durch W. Ziese in den folgenden Jahren zunächst in Tierversuchen und anschließend in präklinischen und klinischen Studien erprobt (Ziese 1934). Während des Vietnam-Krieges kam HES vermehrt zur Behandlung verwundeter US-Soldaten zum Einsatz (Ertmer, Rehberg *et al.* 2009) und galt seitdem über 40 Jahre lang in Europa als das am häufigsten verwendete Kolloid.

So wurde es als akuter Volumenersatz bei Blut- oder Plasmaverlust, schwerer Exsikkose oder dem hypovolämisch-hämorrhagischen Schock eingesetzt. Es soll darüber hinaus die Plasmaviskosität reduzieren und dadurch die Mikrozirkulation verbessern. Daher wurde es unter anderem bei der peripheren arteriellen

1 Einleitung

Verschlusskrankheit, dem ischämischen Apoplex und dem Hörsturz eingesetzt (Thiel and Roewer 2021).

Nebenwirkungen: Es sind für HES unterschiedliche Nebenwirkungen bekannt, wobei deren Inzidenz und Relevanz teils kontrovers diskutiert werden. Als typische unerwünschte Arzneimittelwirkungen gelten auch bei den Präparaten der 3. Generation eine Beeinträchtigung der Gerinnungsfunktion sowie eine Ablagerung in verschiedenen Geweben, die unter anderem – wie bereits oben erwähnt – zu einem teils lang anhaltenden Pruritus und einer Hepatosplenomegalie führen kann. Des Weiteren können anaphylaktische Reaktionen auftreten sowie die im Folgenden diskutierte Nierenfunktionseinschränkung.

1.5 Hydroxyethylstärke und Akutes Nierenversagen

1.5.1 Entwicklungen der HES-Debatte in den letzten Jahren

Dass HES renale Komplikationen verursachen kann, wurde erstmals 1992 von Legendre durch seine Studien bei Nierentransplantationen beobachtet (Legendre, Thervet *et al.* 1993). Es dauerte jedoch weitere 16 Jahre, bis diese Problematik in den klinischen Fokus rückte. 2008 musste die VISEP-Studie (Intensive Insulin Therapy and Pentastarch Resuscitation in Severe Sepsis) aus Sicherheitsbedenken vorzeitig abgebrochen werden. Brunkhorst *et al.* konnten im Rahmen dieser Studie bei Sepsis-Patienten nachweisen, dass HES der 2. Generation (10% HES 200 / 0,5) im Vergleich mit Ringer-Laktat zu einer signifikant höheren Inzidenz von Nierenversagen und einer notwendigen Nierenersatztherapie führt (Brunkhorst, Engel *et al.* 2008). Zwar wurde die Studie stark kritisiert, da unter anderem die Ergebnisse nicht auf HES der 3. Generation übertragbar seien, aber zwei im Jahr 2013 publizierte Studien (6S-Studie und CHEST-Studie) konnten eine signifikant höhere Rate an Nierenfunktionsstörungen auch für Präparate der 3. Generation bestätigen (Myburgh, Finfer *et al.* 2012, Perner, Haase *et al.* 2012). Die im selben Jahr veröffentlichte CRISTAL-Studie konnte im Gegensatz dazu keinen Unterschied in den einzelnen Gruppen für eine renale Funktionsstörung nachweisen, wurde jedoch berechtigterweise aufgrund des mangelhaften Studiendesigns kritisch diskutiert (Adamik and Yozova 2018).

Die Zweifel an der Unbedenklichkeit von HES wurden verstärkt, als Joachim Boldt, einer der in Deutschland größten „HES-Befürworter“, 2011 zehn seiner Publikationen zurückziehen musste, da ihm gravierende Mängel und teils Fälschungen nachgewiesen werden konnten (Hackenbroch 01/2011, Ärzteblatt 08/2012). Daraufhin konnte Zarychanski in einer weiteren Metaanalyse nach Exklusion der Studien Boldts den Trend der 6S- und CHEST-Studie bestätigen (Zarychanski, Abou-Setta *et al.* 2013). Untermuert wurde dieser Trend durch eine unabhängige Re-Analyse der CHEST-Studie durch das Duke Clinical Research Institute, welche 2016 durch den Sponsor der CHEST-Studie in Auftrag gegeben wurde (Patel, Pieper *et al.* 2017).

1 Einleitung

Der Pharmakovigilanzausschuss für Risikobewertung (PRAC) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) setzte bereits im Juni 2013 die Zulassung für HES zeitweilig aus (EMA 2013). Da jedoch HES-Lösungen weiterhin flächendeckend verwendet wurden (EMA 2017) und in Anbetracht der mittlerweile eindeutigen Datenlage beschloss die europäische Kommission letztendlich im August 2018, ein kontrolliertes Abgabesystem einzuführen (EMA 2018).

1.5.2 Akutes Nierenversagen

Das akute Nierenversagen spielt insbesondere in der Intensivmedizin eine wichtige Rolle. So sind schätzungsweise 35% aller Intensivpatienten davon betroffen (Ostermann and Chang 2007). Wie bereits erläutert, scheint nach aktueller Studienlage die Anwendung von HES zu einer akuten Nierenfunktionseinschränkung beizutragen. Der genaue Pathomechanismus ist jedoch bis heute nicht geklärt.

Bekannt ist, dass sich HES nach intravenöser Applikation in vielen verschiedenen Geweben anreichert, unter anderem in der Kutis, der Duodenalmukosa, der Leber, im Peritoneum, der Dura mater, in Aszites und der Niere (Rehm 2013). Hiervon sind HES-Präparate der 3. Generation mindestens in gleicher Weise betroffen (Bellmann, Feistritzer *et al.* 2012). Eine renale Anreicherung findet bevorzugt in den proximalen Tubuluszellen statt. Histopathologisch zeigen sich große Mengen intrazellulärer Vesikel, welche im Zytoplasma lokalisiert sind und zu einer Zellschwellung führen (Schick, Isbary *et al.* 2010). Dieser Effekt wird auch als osmotische Nephrose bezeichnet und als prinzipiell reversibel erachtet. Eine Reihe anderer Substanzen führen zu einem ähnlichen Bild. So konnte dies auch für Mannitol, niedermolekulare Dextrane und iodhaltige Kontrastmittel gezeigt werden (Dickenmann, Oettl *et al.* 2008). Der zelluläre Abbau findet im Allgemeinen über das lysosomale System statt, der exakte Mechanismus ist jedoch für die einzelnen Substanzen bisher nicht geklärt. So stellt sich die Frage, inwieweit die zytoplasmatische Akkumulation von HES eine Zellfunktionseinschränkung oder sogar einen Funktionsverlust bedingt.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass HES *in vitro* zu einer mengenabhängigen Viabilitätsreduktion proximaler Nierentubuluszellen (HK-2-Zellen)

1 Einleitung

führt, welche unabhängig von der Molekülgröße, dem pH und der Osmolalität ist (Bruno, Neuhaus *et al.* 2014). Des Weiteren wurde das histologische Korrelat der osmotischen Nephrose in einem Sepsis-Maus-Modell mit HES der 3. Generation nachgewiesen (Schick, Isbary *et al.* 2010). Eine Gruppe um Liu *et al.* konnte mit der auch in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie (HK-2-Zellen) bereits nachweisen, dass der Mechanismus der Autophagie eine wichtige Rolle für die Funktion proximaler Nierentubuluszellen spielt. Hierbei wurden statt HES Urinproteine verwendet, welche von Patienten mit einer Minimal-Change-Glomerulonephritis gewonnen wurden (Liu, Luo *et al.* 2014). Diese Proteine führten zu einer Viabilitätsreduktion, welche jedoch durch den Autophagieinduktor Rapamycin aufgehoben werden konnte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Urinproteine selbst zu einer Induktion der Autophagie führten. Somit stellt sich die Frage, ob der universelle zelluläre Mechanismus der Autophagie nicht auch eine Rolle bei der Reaktion auf HES spielt. Im nächsten Abschnitt soll daher ein Überblick über den grundlegenden Aufbau des Autophagienetzwerkes in einer Zelle gegeben werden.

1.6 Autophagie

Autophagie ist ein evolutionär in allen Eukaryonten konservierter stress-induzierter kataboler Prozess, der der zellulären Homöostase und energieeffizienten Selbstreinigung dient (Klionsky 2005). Dabei werden defekte zelluläre Makromoleküle wie Proteine, Lipide sowie teils ganze Zellorganelle durch Lysosomen in ihre Grundbestandteile zerlegt und der Zelle als Bausteine wieder zur Verfügung gestellt. Dieser ubiquitäre Mechanismus findet auf einem basalen Niveau in jeder Zelle statt.

Der Begriff der Autophagie („Selbstverdauung“) wurde erstmals 1963 von dem belgischen Biochemiker Christian de Duve verwendet, der als Entdecker der Lysosomen und Peroxisomen gilt, wofür er 1974 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielt (Klionsky 2008). In den folgenden Jahrzehnten wurden neue Erkenntnisse mittels morphologischer Analysen gewonnen. Erst in den 1990er Jahren wurde es möglich, mittels genetischer Screening-Methoden die zugrunde liegenden molekularen Kontrollmechanismen des Autophagiesystems in der Hefepilzkultur *Saccharomyces cerevisiae* aufzuschlüsseln (Matsuura, Tsukada *et al.* 1997). Hierbei wurden insgesamt 36 Autophagy-related (ATG) Gene in Hefekulturen identifiziert (Yang and Klionsky 2010, Sureshbabu, Ryter *et al.* 2015). Bahnbrechende Arbeiten durch Ohsumi und seine Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Morphologie der Autophagie in Hefekulturen der in Säugetieren ähnelt (Takeshige, Baba *et al.* 1992), wofür ihm 2016 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen wurde (Levine and Klionsky 2017). Mittels genetischer Analysen konnten mittlerweile Homologe für die meisten ATG-Gene in Säugetierzellen gefunden werden (Feng, He *et al.* 2014, Harnett, Pineda *et al.* 2017).

1.6.1 Funktion

Die Forschung führte zu der Erkenntnis, dass es sich bei der Autophagie um ein stark reguliertes hochkomplexes Netzwerk handelt, welches eine zentrale Rolle im Energiehaushalt, der Homöostase, der Entwicklung und der Immunantwort einer Zelle spielt (Mizushima, Levine *et al.* 2008, Behrends, Sowa *et al.* 2010). Unter Stressbedingungen wie Hunger, Hypoxie, oxidativem Stress, Infektion durch

1 Einleitung

Pathogene, Strahlung oder Chemotherapeutika kann die Autophagie drastisch verstärkt werden und eine zytoprotektive Wirkung ausüben. Eine Dysregulation beziehungsweise -funktion des Netzwerkes führt jedoch zum Zelltod und spielt eine wichtige Rolle zum Beispiel bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Tumorerkrankungen, Myopathien, Hepatopathien sowie im Alterungsprozess (Schneider and Cuervo 2014). Dabei besteht ein hoher Vernetzungsgrad zwischen dem Autophagie- und dem Apoptosenetzwerk (Rubinstein and Kimchi 2012).

1.6.2 Mechanismus

Nach aktuellem Wissensstand werden beruhend auf der Art der Materialzuführung drei Formen der Autophagie unterschieden (siehe Abbildung 1-4):

1. Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA)
2. Mikroautophagie
3. Makroautophagie

Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA) erkennen Chaperone wie das Heat shock cognate 70 (Hsc70) ein exponiertes Pentapeptid-Motiv (KFERQ) von Proteinen (Cuervo and Wong 2014). Der gemeinsame Komplex wird an die Oberfläche von Lysosomen transportiert. Hier löst er die Multimerisierung des Oberflächen-exponierten Transmembranproteins Lysosome-associated membrane protein 2a (LAMP2a) aus. Dieses fungiert dann als Translokationskomplex für die Fracht von Hsc70, welche anschließend in das Lumen des Lysosoms überbracht und hier komplett abgebaut wird (Sureshbabu, Ryter *et al.* 2015).

Bei der Mikroautophagie werden zytosolische Komponenten mittels Invagination der lysosomalen Oberflächenmembran in das Lysosom inkorporiert. Dabei wird eine autophagische Röhre gebildet, welche in einem ATP-abhängigen Prozess das zu degradierende zytosolische Material umschließt (Li, Li *et al.* 2012).

1 Einleitung

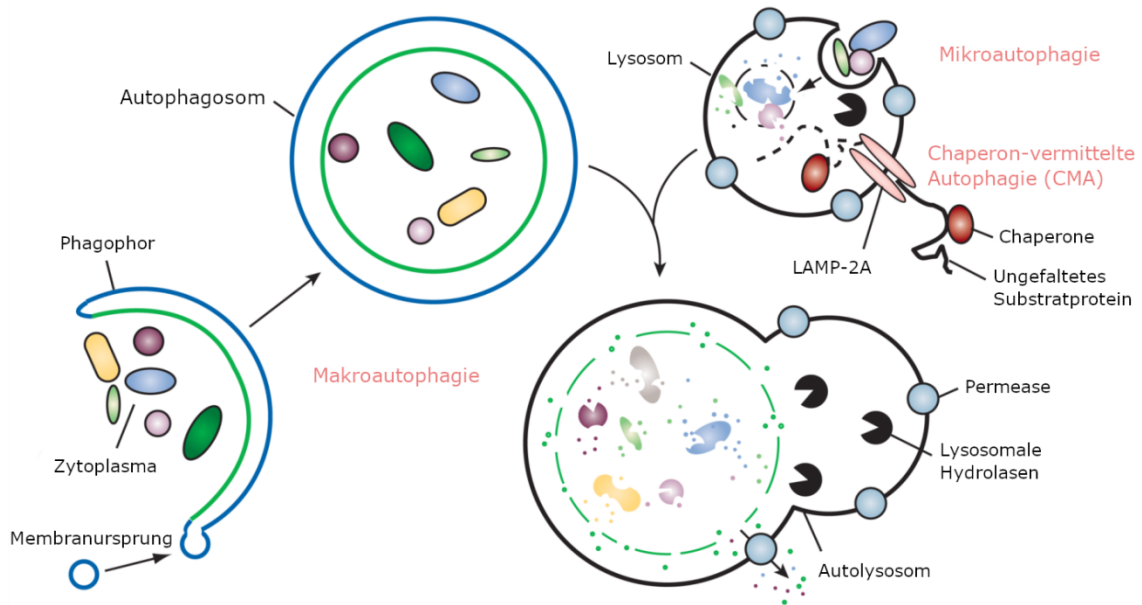


Abbildung 1-4: Formen der Autophagie adaptiert nach (Mizushima, Levine *et al.* 2008), Erlaubnis vorliegend

Bei der Makroautophagie bildet sich zunächst eine Doppelmembran, das Phagophor beziehungsweise PAS (Phagophore Assembly Site). Als Ursprung dieser Membran werden dabei die Mitochondrien, der Golgi-Apparat, die Plasmamembran und das endoplasmatische Retikulum vermutet (Reggiori and Ungermann 2017). Im weiteren Verlauf der Autophagie wird dieses kurze Stück Doppelmembran um das abzubauen Material herum verlängert. An den Phagophoren finden sich zentrale Regulatorproteine sowie Proteinkomplexe, die eine entscheidende Rolle für die Initiierung als auch für die sich anschließende Kaskade spielen und welche im nächsten Abschnitt erläutert werden (Abbildung 1-5). Letztendlich kommt es zum Schluss der Doppelmembran – dem Phagophor – um das abzubauen Material und es bildet sich ein Autophagosom. Das Autophagosom fusioniert anschließend mit einem Lysosom, wobei seine äußere Membran mit der Membran des Lysosoms verschmilzt. Seine innere Membran verbleibt ebenso wie das umschlossene Material im Lysosom, wo beides mittels lysosomaler Enzyme degradiert wird. Es resultieren Abbauprodukte wie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Lipide und Nucleoside. Diese gelangen über Membranpermeasen zurück in das Zytosol und können so erneut als Grundbausteine für andere zelluläre Prozesse verwendet werden (Mizushima, Levine *et al.* 2008).

1 Einleitung

Die Makroautophagie ist neben dem proteasomalen Abbau zellulärer Proteine der dominierende Prozess bei der Degradation biologischer Makromoleküle und Organellen und wird im Folgenden vereinfacht als Autophagie bezeichnet.

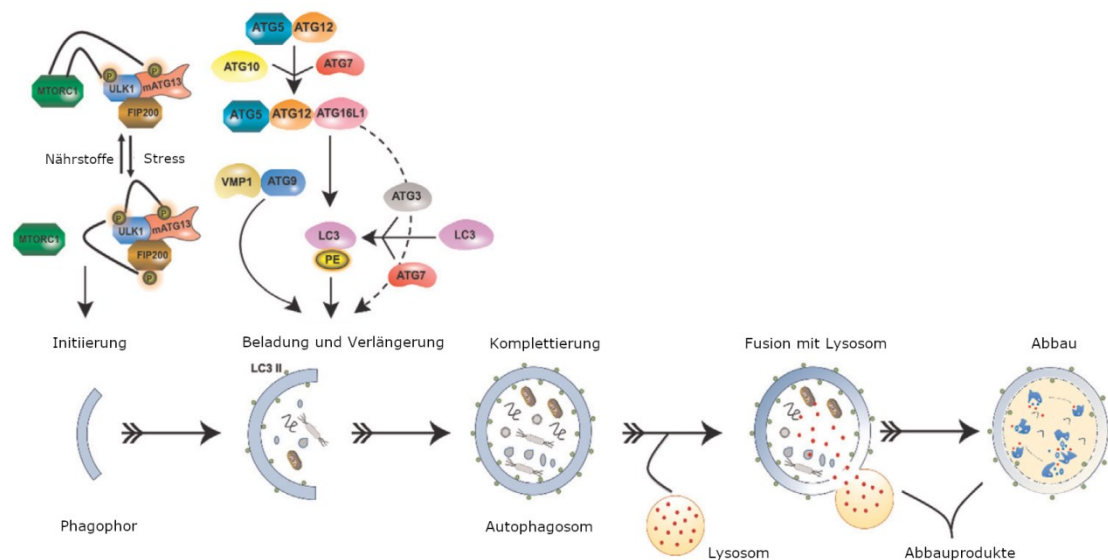


Abbildung 1-5: Stadien der Autophagosombildung adaptiert nach (Sureshbabu, Ryter *et al.* 2015), Erlaubnis vorliegend. Regulierte initiale Bildung einer Doppelmembran, dem Phagophor, welcher über Signalkaskaden mit Proteinen beladen und verlängert wird und sich letztendlich um die abzubauenen Substanzen zum Autophagosom schließt. Dieses fusioniert mit einem Lysosom zum Autophagolysosom, welches seinen Inhalt mittels lysosomaler Enzyme abbaut.

1.6.3 Regulierung

Der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene stufenweise Prozess der Autophagie, der Teil eines komplexen zellulären Netzwerkes ist, wird auf allen Ebenen durch eine Reihe von Proteinen reguliert. Dabei spielen fünf Untergruppen der ATG-Gene bestehend aus 16 Genen, die auch als „Autophagy core machinery“ bezeichnet werden, eine entscheidende Rolle: (1) der ULK1-Komplex, (2) der PI3K-Komplex, (3) das Atg9-Transportsystem, (4) das Atg12-Konjugationssystem, und (5) das Atg8/LC3-Konjugations-/De-konjugationssystem (Reggiori and Ungermann 2017).

1 Einleitung

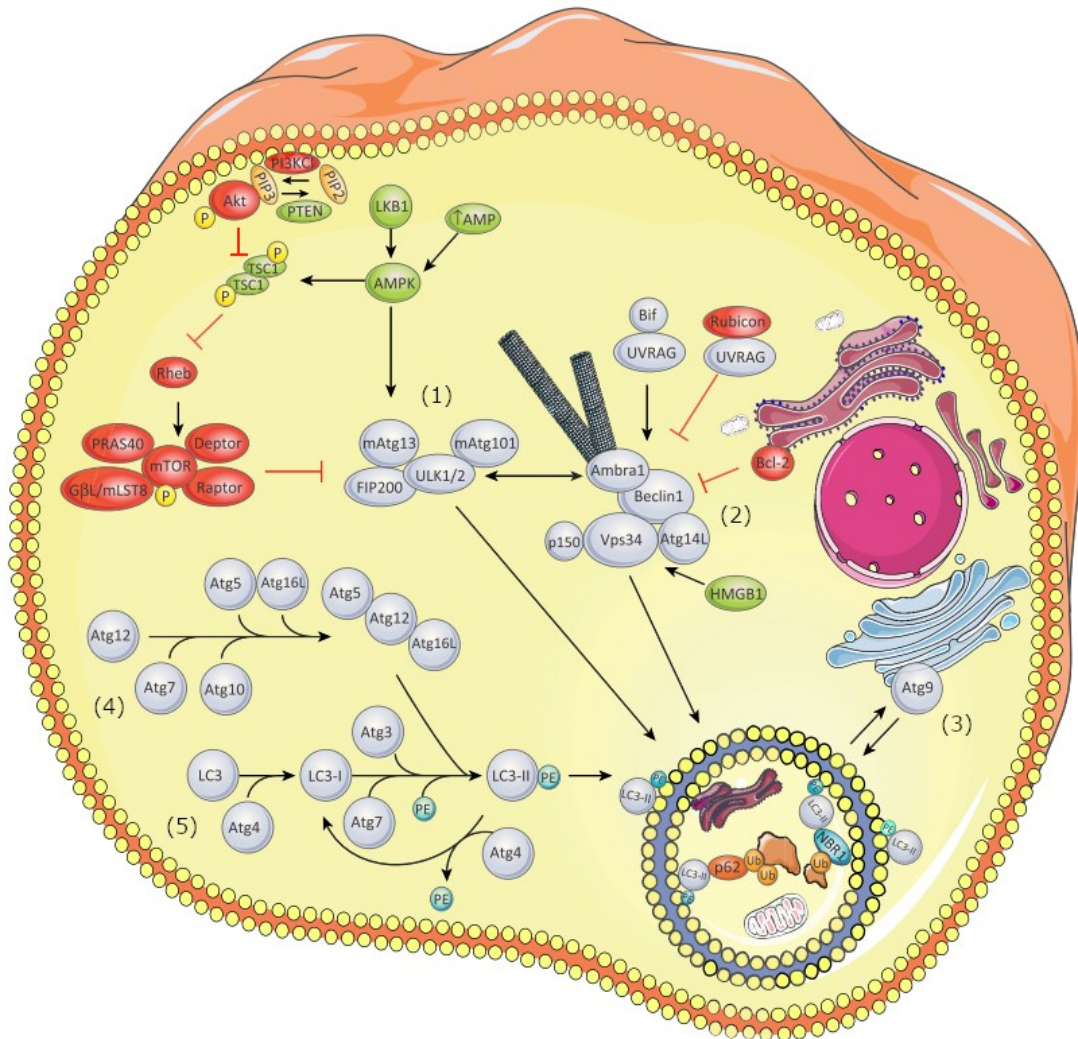


Abbildung 1-6: Regulation der Autophagie adaptiert nach (Maes, Rubio *et al.* 2013), Erlaubnis vorliegend. Mehrere Proteine bilden insgesamt fünf Kernkomplexe: (1) Der ULK1-Komplex wird durch den mTOR-Komplex inhibiert sowie durch den Energiesensor AMPK aktiviert und am Phagophor lokalisiert. (2) Der PI3K-Komplex mit Beclin1 ist an Mikrotubuli verankert und dockt ebenfalls an das Phagophor an. (3) Das Atg9-Transportsystem rekrutiert Lipide vom trans-Golgi-Netzwerk zum Phagophor. (4 und 5) Zwei Konjugationssysteme aus Atg-Proteinen aktivieren und lokalisieren kaskadenförmig LC3-II-PE an das Phagophor, welches weiter elongiert und sich zum Autophagosom schließt.

Der ULK1-Komplex ist ein zentraler Komplex zur Initiierung. Er ist aufgebaut aus den Kinasen ULK1 oder ULK2, den Adapterproteinen FIP200 und Atg13 sowie Atg101 als Stabilisator des Komplexes (Abbildung 1-6). Seine Aktivität wird hauptsächlich gesteuert durch den mTORC1-Komplex, der ein zentraler Nährstoffsensor ist, sowie durch AMPK, welche eine große Rolle im Energiehaushalt spielt. Liegt ein nährstoffreiches Milieu vor, führt die Aktivität von mTORC1 zu einer Hemmung des ULK1-Komplexes. Findet sich ein Mangel an Nährstoffen oder Energie, wird jedoch

1 Einleitung

mTORC1 gehemmt. Dadurch wird die Inhibition von ULK1/2 aufgelöst. Außerdem erfolgt eine Aktivierung von AMPK, was den ULK1-Komplex zusätzlich stimuliert, zum einen direkt über Atg13, zum anderen indirekt über den TSC1-Komplex, welcher wiederum den mTORC1-Komplex hemmt. Mittels Phosphorylierungen wird der ULK1-Komplex aktiviert und am Phagophor lokalisiert.

Der zweite für die Einleitung der Autophagie relevante Komplex ist der PI3K-Komplex. Der zentrale Anteil ist aufgebaut aus der Klasse III-PI3K Vps34, Beclin1 sowie dem Adapterprotein p150, welches den Komplex am Phagophor verankert. Dieser Komplex ist mit positiven Regulatoren wie Atg14L, Bif-1/UVRAG und Ambra1 assoziiert, wobei letzteres den gesamten Komplex mit Mikrotubuli des Zytoskelettes verbindet. Durch die Produktion von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) am Phagophor werden zusätzliche Autophagieproteine rekrutiert und es findet eine Elongation der Doppelmembran statt. Wird dieser Komplex durch Phosphorylierung von Ambra1 durch ULK1 aktiviert, kommt es zur Ablösung vom Zytoskelett und Relokalisierung des PI3K-Komplexes an das endoplasmatische Retikulum (Maes, Rubio *et al.* 2013). Dabei wird auch das Transmembranprotein mAtg9, welches unter basalen Bedingungen als Transferprotein zwischen späten Endosomen und dem trans-Golgi-Netzwerk pendelt, zur wachsenden Phagophore rekrutiert, um Lipide zur Elongation bereitzustellen und womöglich als Plattform zur Rekrutierung weiterer Effektoren zu dienen (Young, Chan *et al.* 2006). Negative Regulatoren des PI3K-Komplexes sind Rubicon/UVRAG sowie Bcl-2, wobei letzteres auch eine zentrale Rolle in der Apoptose hat und somit zu dieser als Bindeglied fungiert (Nikoletopoulou, Markaki *et al.* 2013). Im basalen nährstoffreichen Milieu kommt es dabei zu einer Bindung von Bcl2 an Beclin, wodurch Autophagie inhibiert wird. Unter Nährstoffmangel wird diese Bindung jedoch gelöst. Hierdurch wird Beclin1 freigesetzt, welches somit zu einer Stimulierung der Autophagie führt.

Dabei werden zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme aktiviert, die zusammen zu einer weiteren Elongation des Phagophors und letztendlich zur Bildung des reifen Autophagosoms führen. Die einzelnen Schritte werden mittels mehrerer Enzyme durchgeführt, welche eine E1-, E2- beziehungsweise E3-Aktivität aufweisen, die man

1 Einleitung

auch im Rahmen der Ubiquitinierung von Proteinen findet (Yin, Popelka *et al.* 2020). Durch das erste System wird Atg12 kovalent an Atg5 gebunden. Dieser Prozess wird durch Atg7 und Atg10, welche eine E1- beziehungsweise E2-Aktivität aufweisen, vermittelt (Chen and Klionsky 2011). Das Atg12-Atg5-Konjugat bindet anschließend an Atg16 und formiert den Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex, welcher für die Lokalisation am Phagophor verantwortlich ist. Im zweiten Konjugationssystem wird das Atg8-Homolog LC3, wovon von den drei Varianten LC3A/LC3B/LC3C LC3B am besten charakterisiert ist, unter Zuhilfenahme von Atg4 in LC3I überführt. Phosphatidylethanolamin (PE) wird über eine Atg7 (E1-Aktivität)- und Atg3 (E2-Aktivität)-abhängige Reaktion an LC3I gebunden, wodurch mittels des ersten Konjugationssystems Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex (E3-Aktivität) LC3II entsteht, welches an das Autophagosom gebunden ist (Tanida, Tanida-Miyake *et al.* 2002, Hanada, Noda *et al.* 2007).

Nachdem die Autophagosomen fertiggestellt wurden, kommt es zu einer Abspaltung der involvierten Proteine und Komplexe, welche anschließend wiederverwendet werden können. Ausgenommen hiervon ist jedoch das LC3II, welches an der inneren Autophagosomenmembran lokalisiert ist. Es wird zusammen mit dem Inhalt des Vesikels intralysosomal degradiert (Tanida 2011).

Bei der ungerichteten Autophagie wie zum Beispiel unter Nährstoffentzug werden unspezifisch Teile des Zytoplasmas inkludiert und degradiert. Es sind jedoch auch selektive Autophagieprozesse bekannt. Darunter versteht man den regulierten Abbau von Organellen oder anderer Zellbestandteile wie Pexophagie (Peroxisomen), Ribophagie (Ribosomen), Retikulophagie (endoplasmatisches Retikulum), Lipophagie (Lipide), Aggrephagie (Proteinaggregate), Ziliophagie (Zilien) und Xenophagie (Krankheitserreger) (Johansen and Lamark 2011, Kaushal and Shah 2016). Ähnlich dem Proteasom-System werden ubiquitin-markierte Proteine über selektive Rezeptorproteine erkannt, zum Beispiel durch p62 (= SQSTM1, Sequestom1). Dieses Protein besitzt zum einen eine Andockstelle für Ubiquitin (UBA = Ubiquitin-associated domain), zum anderen für LC3 (LIR = LC3-interacting region) und bildet zusammen einen Ubiquitin-p62-LC3-Komplex im Inneren des Phagosoms, welcher durch

1 Einleitung

lysosomale Hydrolasen degradiert wird. Im Gegensatz zum Proteasom, welches vorwiegend kurzlebige sowie regulatorische Proteine abbaut, ist die Autophagie für den Abbau langlebiger Proteine und als adaptiver Mechanismus bei zellulärem Stress zuständig (Lippai and Low 2014).

1.6.4 Medikamentöse Angriffspunkte

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, wird der Autophagiezyklus durch die „Autophagy core machinery“ reguliert. Dabei können verschiedene Stationen der Autophagiekaskade durch Inhibitoren beziehungsweise Induktoren beeinflusst werden (Abbildung 1-7).

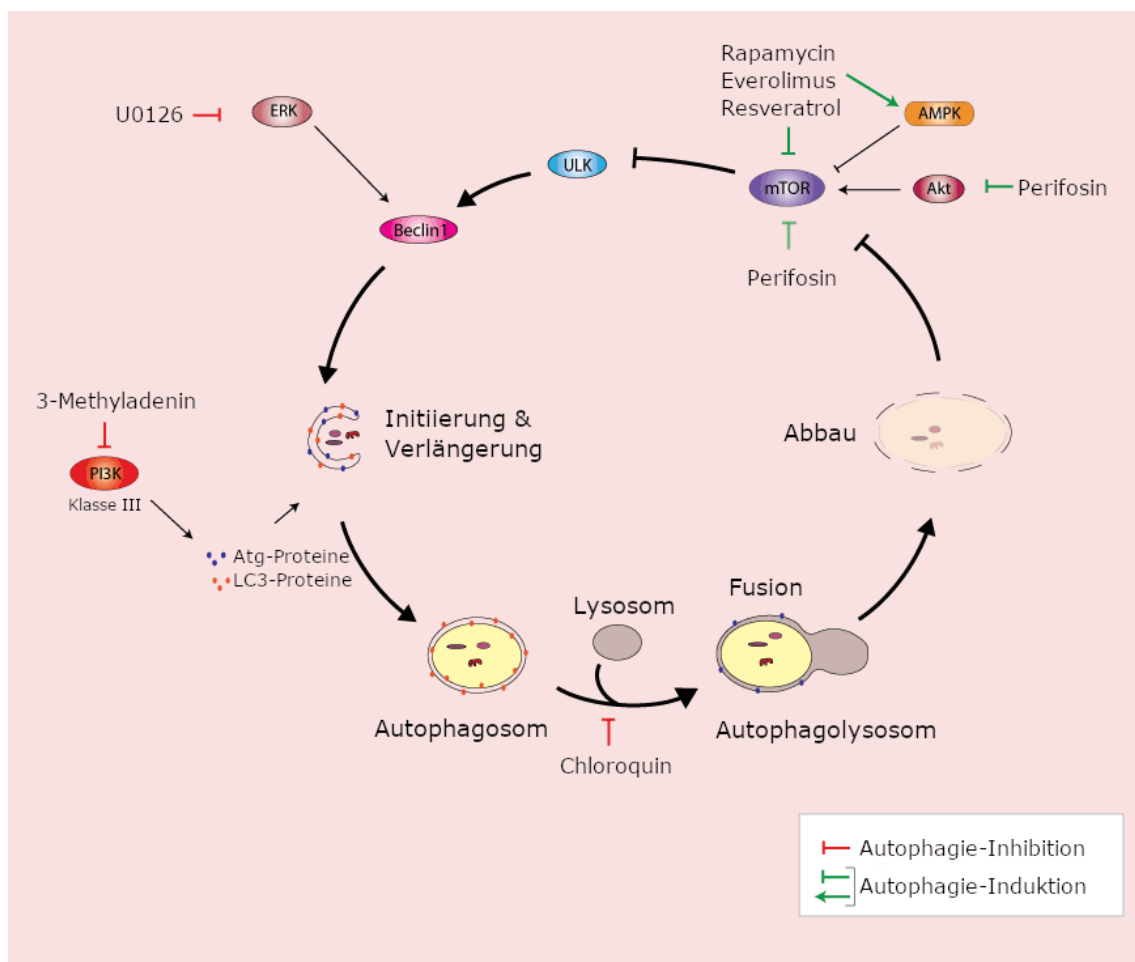


Abbildung 1-7: Medikamentöse Regulation des Autophagiezyklus (adaptiert, Quelle: Invivogen, Erlaubnis vorliegend): Als Angriffspunkte dienen „upstream“ direkt beziehungsweise indirekt der mTOR-Komplex sowie der PI3K-Komplex mit Beclin1, „downstream“ der Fusionshemmer Chloroquin.

1 Einleitung

So wird das Protein mTOR (mammalian target of rapamycin), welches Teil des zentralen Nährstoffsensors mTORC1-Komplex ist, selber durch das makrozyklische Lacton Rapamycin (Synonym Sirolimus) beziehungsweise dessen Derivat Everolimus (Synonym RAD001) mittels Komplexbildung inhibiert und somit Autophagie induziert (Granata, Dalla Gassa *et al.* 2016). Dies geschieht auch indirekt über eine Aktivierung von AMPK, welches wiederum den mTORC1-Komplex hemmt (Habib 2011).

Das Alkylphospholipid Perifosin führt zu einer Inhibierung von Akt, welches als Aktivator des mTORC1-Komplexes bekannt ist (Kondapaka, Singh *et al.* 2003), und so zu einer indirekten mTOR-Inhibierung. Darüber hinaus scheint es eine direkte mTOR-Hemmung zu bewirken, indem es eine Ubiquitinierung der Komplexe mTOR/RICTOR und mTOR/RAPTOR induziert und diese somit degradiert werden (Fu, Kim *et al.* 2009). Zu beachten ist, dass Perifosin wie alle Alkylphospholipide jedoch auch zu einer Induktion der Apoptose führt (Elrod, Lin *et al.* 2007). Darüber hinaus hemmt es die Phosphatidylcholin-Biosynthese (Fensterle, Aicher *et al.* 2014).

U0126 ist ein spezifischer Inhibitor der MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Kinasen MEK1/2, welche die MAP-Kinasen ERK1/2 (ERK = extracellular-signal-regulated kinase) und diese wiederum das Effektorprotein Beclin1 aktivieren. Somit führt U0126 zu einer indirekten Hemmung des Beclin1-Komplexes (Nishimoto and Nishida 2006).

3-Methyladenin (3-MA) wirkt vorwiegend als PI3K-III-Inhibitor (Petiot, Ogier-Denis *et al.* 2000), einem im Abschnitt 1.6.3 beschriebenen Komplex der „Autophagy core machinery“. Dabei ist zu beachten, dass dieser Effekt transient ist und 3-MA unter anderem inhibitorisch auf die PI3K-I-Kinase wirkt, welche aktivierend auf das Protein Akt wirkt, was unter nährstoffreichen Bedingungen zu einer Autophagieinduktion führt (Vinod, Padmakrishnan *et al.* 2014). Somit weist 3-MA eine duale modulatorische Rolle auf.

Chloroquin wird seit langem zur Prophylaxe und Therapie der Malaria angewandt. Es wird von Lysosomen aufgenommen und protoniert, wodurch es zu einer lysosomalen Akkumulation kommt, welche den pH-Wert anhebt. Dadurch wird die lysosomale

1 Einleitung

Funktion vermindert und die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom gehemmt (Kimura, Takabatake *et al.* 2013).

Resveratrol (trans-3,5,4'-Trihydroxystilben) ist ein Polyphenol, welches in roten Weintrauben und Erdnüssen vorkommt. Es induziert Autophagie via AMPK und direkte Hemmung des mTORC1-Komplexes (Alayev, Doubleday *et al.* 2014). Darüber hinaus besitzt es eine direkte und indirekte antioxidative Wirkung und ist ein allosterischer Aktivator von Sirtuin 1 (Kitada and Koya 2013, Galluzzi, Pietrocola *et al.* 2014). Sirtuin 1 wirkt zytoprotektiv über eine ganze Reihe von Mechanismen, unter anderem antiapoptotisch, antioxidativ, antiinflammatorisch, anabol auf den Glukose- und Lipidmetabolismus sowie durch Induktion der Autophagie und der mitochondrialen Biogenese (Kitada and Koya 2013). Für Resveratrol wird wie für 3-MA eine duale Wirkung beschrieben. So führt eine längere Inkubation mit Resveratrol unter nährstoffreichen Bedingungen zu einer Induktion, eine kurzfristige Inkubation unter nährstoffarmen Bedingungen jedoch zu einer Inhibition der Autophagie (Alayev, Doubleday *et al.* 2014).

1.7 Hinführung zur Fragestellung

Wie bereits oben beschrieben, konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass HES *in vitro* zu einer mengenabhängigen Viabilitätsreduktion proximaler Nierentubuluszellen (HK-2-Zellen) führt, welche unabhängig von der Molekülgröße, dem pH und der Osmolalität ist (Bruno, Neuhaus *et al.* 2014). Das histologische Korrelat der osmotischen Nephrose wurde in einem Sepsis-Maus-Modell mit HES der 3. Generation nachgewiesen (Schick, Isbary *et al.* 2010). Eine Gruppe um Liu *et al.* konnte mit derselben Zelllinie (HK-2-Zellen) zeigen, dass der Mechanismus der Autophagie eine wichtige Rolle für die Funktion proximaler Nierentubuluszellen spielt. Hierbei wurden Urinproteine verwendet, welche von Patienten mit einer Minimal-Change-Glomerulonephritis gewonnen wurden (Liu, Luo *et al.* 2014). Diese führten zu einer Viabilitätsreduktion, welche jedoch durch den Autophagieinduktor Rapamycin aufgehoben werden konnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Urinproteine selbst zu einer Induktion der Autophagie führten.

Die Pathogenese des akuten Nierenversagens beinhaltet viele Stressoren wie Hypoxie, Nährstoff- und Wachstumsfaktorentzug sowie Radikale, welche für eine Induktion der Autophagie bekannt sind (Kaushal and Shah 2016). So konnte in verschiedenen Modellen des akuten Nierenversagens, welche auf einer Schädigung durch Cisplatin (Periyasamy-Thandavan, Jiang *et al.* 2008, Jiang, Wei *et al.* 2012), Ischämie-Reperfusion (Jiang, Liu *et al.* 2010, Kimura, Takabatake *et al.* 2011) oder Sepsis (Hsiao, Tsai *et al.* 2012) beruhen, *in vivo* beziehungsweise *in vitro* eine Autophagieinduktion nachgewiesen werden. Welchen Einfluss HES auf das zelluläre Autophagiesystem hat, wurde bisher noch nicht untersucht.

1.8 Fragestellung

Diese Arbeit sollte als erstes den Einfluss von HES auf die Viabilität von HK-2-Zellen mit zwei unabhängigen *in vitro* Assays überprüfen. Des Weiteren sollte getestet werden, ob eine vermutete Viabilitätsreduktion durch die medikamentöse Induktion des Autophagiemechanismus abgeschwächt oder sogar aufgehoben werden kann. Hierbei wurden verschiedene Substanzklassen eingesetzt und deren Wirkung auf die Zellviabilität überprüft. Darüber hinaus sollte ein möglicher Effekt auf Autophagie-relevante Proteine mittels Western Blotting untersucht werden.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden zunächst die verwendeten Zellkulturmethoden sowie die angewandten Versuchslösungen vorgestellt. Anschließend werden die mit diesen Lösungen durchgeführten Viabilitätsassays (EZ4U und PrestoBlue) und Westernblots erläutert.

2.1 Material

2.1.1 Proximale Nierentubuluszellen (HK-2-Zellen)

Eingesetzt wurden Zellen der Zelllinie HK-2 (humane kidney 2) der Firma American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (CRL-2190). Es handelt sich hierbei um humane proximale Nierentubuluszellen, die aus einer nicht infizierten menschlichen Niere gewonnen wurden und durch Transduktion mit HPV (= humanes Papilloma-Virus) 16 E6/7 immortalisiert wurden. Über ein Jahr wurde dieser Zellklon als Monolayer in serum-freiem Medium kultiviert. Diese Zelllinie wurde erstmals von Ryan *et al.* charakterisiert (Ryan, Johnson *et al.* 1994) und zeigt laut diesem histochemische, immunzytochemische und funktionelle Charakteristika humaner proximaler Nierentubuluszellen. So ist das Wachstum abhängig von EGF (Epidermal Growth Factor). Antikörper gegen Zytokeratin, Fibronectin, Alkalische Phosphatase, Gamma-Glutamyltranspeptidase, Leucin-Aminopeptidase, Saure Phosphatase und Alpha3-Beta1-Integrin binden an HK-2-Zellen, Antikörper gegen Faktor-VIII-Antigen, 6.19-Antigen und CALLA-Endopeptidase jedoch nicht. Außerdem besitzen laut Ryan *et al.* (1994) HK-2-Zellen einen Natrium-abhängigen, Phlorizin-sensitiven Glukosetransport, der ebenfalls charakteristisch für proximale Nierentubuluszellen ist, sowie die Fähigkeit, die Adenylatcyclase durch Parathormon zu stimulieren, aber nicht durch antidiuretisches Hormon. HK-2-Zellen sind darüber hinaus in der Lage, Glukoneogenese sowie die Synthese und Speicherung von Glykogen durchzuführen. In Zytotoxizitäts-Versuchen mit H₂O₂ konnten ähnliche Ergebnisse mit HK-2-Zellen erzielt werden wie mit frisch isolierten proximalen Tubulussegmenten. Somit werden HK-2-Zellen als geeignetes *in vitro* Modell angesehen, um die Auswirkung nephrotoxischer

2 Material und Methoden

und -protektiver Substanzen auf proximale humane Nierentubuluszellen in der Zellkultur zu untersuchen (Ryan, Johnson *et al.* 1994).

2.1.2 Zellkulturmaterialien

- Kulturmedium: Gibco DMEM/F12 (ref. 11039)
- Fetales Kälberserum = FCS: Hycultec (Lot. 1107325)
- PenStrep: Biochrom (A2212)
- Trypsin/EDTA-Solution in PBS (0,05%/0,02%): Biochrom (L2143)
- Dulbecco's PBS: Sigma (D8537)
- Gelatine: Serva (22151.02)
- Zellkulturflaschen: Greiner Bio-one Cellstar T75 und T175 (Art.-Nr. 658175 und 660175)
- Petrischalen: Sarstedt TC-Schale 100 (Ref. 83.3902)
- Zellkulturplatten: 6-well: BD Falcon (Ref. 353046)
96-well: ThermoScientific NunclonDeltaSurface (#163320)
- Zählkammer: Neubauer improved 13.23 (0,100 mm, 0,0025 mm³)
- Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen)

2.1.3 Versuchslösungen

- Hydroxyethylstärke (HES): Fresenius Kabi Volulyte 6% freeflex (01236236)
- NaCl: Fresenius Kabi 0,9% (B101308)
- InoLab WTW technical buffer TRACE (pH7 = TPL7, pH4 = TPL4)

2.1.4 Substanzen

- 3-Methyladenin: Sigma (M9281)
- Everolimus: Invivogen (tlrl-eve)
- Rapamycin: Invivogen (tlrl-rap)
- U0126: Invivogen (tlrl-u0126)
- Resveratrol: Invivogen (tlrl-resv)
- Perifosin: Invivogen (tlrl-peri)
- Chloroquin: Invivogen (tlrl-chq)

2.1.5 Antikörper

- Sekundärantikörper: GE Healthcare (alpha-rabbit NA934, alpha-mouse NA931)
- Beta-Aktin und POD: Sigma (A3854) 1 : 20.000
- LC3B: Sigma (L7543) 1 : 500
- SQSTM1/p62: SantaCruz (28359) 1 : 100
- Beclin1: Abcam (114071) 1 : 200
- LAMP2: Abcam (25631) 1 : 200
- pERK: Cell Signalling (#9102 S) 1 : 1000 (für Versuche im Abschnitt 3.5)
beziehungsweise 1 : 200 (für Versuche im Abschnitt 3.7)
- ppERK: Cell Signalling (#9101 S) 1 : 200
- Akt123: SantaCruz (sc8312) 1 : 100
- pAkt: Cell Signalling (#4060) 1 : 100

2.1.6 Messgeräte

- Tecan Sunrise microplate reader
- Tecan Genios Pro microplate reader
- Alpha Innotech Multimage II FC Light Cabinet
- pH-Meter: InoLab pH-720 WTW-Series

2.1.7 Viabilitätsassays

- EZ4U, Biomedica (Kat.Nr. BI-5000)
- PrestoBlue, Life Technologies (Kat.Nr. A-13261)

2.1.8 Herstellung von Proteinextrakten

- Tris pH = 8,0 (Roth 5429.3)
- NaCl (Sigma 31434)
- SDS (AppliChem SDS ultrapure, Art.-Nr. A1112,1000)
- Na-Deoxycholate (Sigma D6750)
- NP40 (Appllichem A1694)
- PhosSTOP (Roche, Ref 04 906 837 001)
- Complete ULTRA Tablets (Roche Ref 05 892 970 001)

2 Material und Methoden

RIPA-Puffer (pH = 8,0):

Tris-Puffer	50 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,1 %
Na-Deoxycholate	0,5 %
NP40	1 %

- RIPA++ = 10 mL RIPA-Puffer + 1x PhosSTOP + 1x Complete ULTRA Tablet

2.1.9 Proteinkonzentrationsbestimmungen

- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Produktnummer 23227)

2.1.10 Gelelektrophorese

- H₂O (Braun, Aqua)
- Acrylamid/Bis (30:2) (Roth, Rotiphorese Gel 30, Art.Nr. 3029.2)
- Tris Pufferan (Roth, Art.Nr. 5429.3)
- 10% SDS (AppliChem SDS ultrapure, Art.Nr. 1112.1000)
- 10% APS (Roth Ammoniumperoxodisulfat, Art.Nr. 9592.3)
- TEMED (Sigma, T9281)
- Bandenmarker (peqGOLD Protein Marker V (prestained protein))
- Elektrophoresekammer (BioRad Mini Protean Tetra System)
- Zentrifuge (ThermoScientific Heraeus Megafuge 16R)
- Glycerol (Serva, 23175)
- Bromophenol Blue (Sigma, 114391)
- 2-Mercaptoethanol (Sigma, M6250)

Trenngel (pH = 8,8):	10%	12%
H ₂ O	4 mL	3,35 mL
Acrylamid/Bis (30:2)	3,4 mL	4 mL
3M Tris pH = 8,8	2,5 mL	2,5 mL
10% SDS	100 µL	100 µL
10% APS	100 µL	100 µL
TEMED = Starter	6 µL	6 µL

2 Material und Methoden

Sammelgel (pH = 6,8):

H ₂ O	3,48 mL
Acrylamid/Bis (30:2)	850 µL
1M Tris pH = 6,8	625 µL
10% SDS	50 µL
10% APS	50 µL
TEMED = Starter	5 µL

Laemmli buffer:

SDS	8 %
Glycerol	40 %
Bromophenol Blue	0,004 %
Tris-HCL pH = 6,8	0,250 M
2-Mercaptoethanol	6 %

Elektrophoresepuffer (in 2000 mL H₂O):

Tris	6,04 g
Glycin	28,8 g
SDS	2 g

2.1.11 Übertragung der Proteine auf PVDF-Membranen (Western Blotting)

- Immun-Blot PVDF (BioRad, 162-0177)
- Blotting-Papier (Whatman, 3MM Chr)
- Glycin (Sigma, G-6388)
- Methanol (Sigma, 32213)
- Blotgerät (PeqLab, Biotechnologie GmbH)

Towbin-Transferpuffer (in 2000 mL H₂O):

Tris	6,06 g
Glycin	28,83 g
Methanol	400 mL
SDS 10%	7,5 mL

2.1.12 Detektion der Proteine mit Antikörpern

- Milchpulver (Applichem Pancreas, A0830)
- Tween 20 (Sigma, P7949)
- BSA (Sigma, A7906) 1% in PBS
- Luminol (Sigma, 123072)
- PCA (Sigma, C-9008)
- H₂O₂ (Sigma, 216763)
- Tris Pufferan (Roth, Art.Nr. 9592.3)

Waschpuffer: 5% Milchpulver in PBS

Blockpuffer (PBST): 0,1% Tween 20 in PBS

ECL-Lösungen:	I	II
1M Tris pH = 8,8	25 mL	25 mL
Luminol	5 mL	
PCA	5 mL	
H ₂ O ₂		160 µL
H ₂ O	jeweils auf 250 mL auffüllen	

2.1.13 Software

- Microsoft Office 2010
- Thomson Reuters Endnote 7
- IBM SPSS 23
- TECAN Magellan 5.0
- ProteinSimple AlphaView 1.3
- GIMP 2.10

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinie HK-2 wurde in DMEM/HämF12-Medium mit 10% FCS und 1% PenStrep, das alle zwei bis drei Tage unter der Sterilbank gewechselt wurde, kultiviert. Das Wachstum erfolgte in mit 0,5% Gelatine beschichteten T75-Flaschen im Inkubator bei 37 °C mit 95% angefeuchteter Luft bei einem CO₂-Anteil von 5% für jeweils eine Woche pro Passage. Anschließend wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS (ohne Calcium oder Magnesium) mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) gelöst und nach gründlicher Resuspension mittels Pipetboy® in einem Verhältnis von 1:4 in neue T75-Flaschen ausgesät. Es wurden Zellen von der Passage 18 bis 32 verwendet.

2.2.2 Aussaat der HK-2-Zellen für Viabilitätsassays

Für die Versuche wurden die HK-2-Zellen in einer Konzentration von 50.000 Zellen/cm² auf 96-Well-Platten, die zuvor mit 0,5% Gelatine beschichtet worden waren, ausgesät. Dabei ist zu beachten, dass die erste Reihe einer 96-Well-Platte keine Zellen enthielt. Diese Reihe wurde später als Leerwert (= BLANK) verwendet. Das Wachstum erfolgte analog zu den oben geschilderten Bedingungen, wobei alle zwei bis drei Tage das Nährmedium gewechselt wurde. Dieses – 200 µL pro Well – wurde nach sieben Tagen entfernt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die zu untersuchenden Lösungen appliziert. Je nach Versuchsaufbau wurden die HK-2-Zellen für eine, sieben oder 21 Stunden mit diesen Lösungen inkubiert.

2.2.3 Versuchslösungen

Alle Versuchslösungen wurden unter der Sterilbank hergestellt. Als Grundlage wurde Volulyte 6% freeflex der Firma Fresenius verwendet. Jede hergestellte Versuchslösung enthielt denselben prozentualen Anteil an Nährmedium (27,5%). Variiert wurden der Anteil des 0,9% NaCl sowie der Anteil an Hydroxyethylstärke-Lösung. Es wurden Lösungen nach dem folgenden Verdünnungsschema hergestellt:

2 Material und Methoden

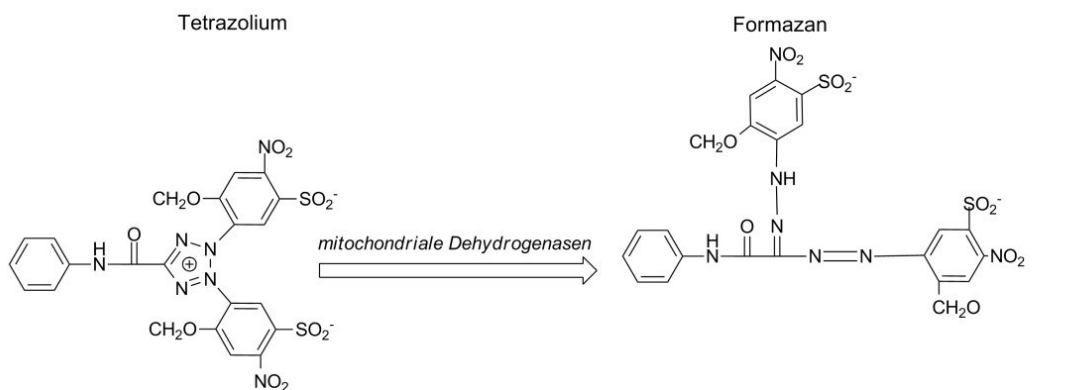
Verdünnung Volulyte	Nährmedium (%)	0,9% NaCl (%)	HES-Anteil Volulyte 6%
0%	27,5	72,50	0,00
0,1%	27,5	70,83	1,67
0,5%	27,5	64,17	8,833
1%	27,5	55,83	16,67
1,5%	27,5	47,50	25,00
2%	27,5	39,17	33,33
3%	27,5	22,5	50,00
4%	27,5	5,83	66,67
Medium	100	0	0

2.2.4 pH-Wert-Einstellung

Der pH-Wert der Infusionslösungen kann aus galenischen Gründen im sauren Bereich liegen. Daher fanden sich die damit hergestellten Versuchslösungen trotz des Zusatzes von Zellmedium oft nicht exakt bei einem pH-Wert von 7,4. Aus diesem Grund wurde nach der Herstellung der Versuchslösungen der pH-Wert der Lösungen mit dem pH-Meter „pH 720 WTW-Series“ der Firma inoLAB bestimmt. Das pH-Meter wurde vor jeder Messung durch einen pH-Kalibrierungspuffer mit einem pH-Wert von 7 (1. Lösung) und einem pH-Wert von 4 (2. Lösung) kalibriert. Die Temperatureinstellung betrug 23 °C. Der angestrebte pH-Wert der Versuchslösungen lag in einem Bereich von 7,38 bis 7,42. Dieser wurde durch Hinzugabe von HCl und NaOH in verschiedener molarer Konzentration erreicht. Der Ausgangs-pH-Wert und der erreichte pH-Wert wurden dokumentiert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte unter unsterilen Bedingungen. Daher wurden anschließend alle Lösungen unter der Sterilbank in 20 mL Spritzen (Steril BD Discardit II) über 20G Kanülen (Steril BD Microlance 3 20G 1 1/2 Nr. 1 0,9 x 40 mm) aufgezogen und mittels Filter (Sartorius stedim Minisart Single use filter unit. Non-pyrogenic, steril, 0,2 µm) in neue sterile und beschriftete 50 mL Biofugenröhrchen überführt. Die Versuchslösungen waren anschließend bereit zur Verwendung nach dem jeweiligen Versuchsprotokoll.

2.2.5 EZ4U-Versuche

Für die Bestimmung der Zellviabilität wurde vornehmlich der EZ4U-Kit der Firma Biomedica (Kat.Nr. BI-5000) verwendet. Dies ist ein etablierter, nichtradioaktiver Testkit zur Zellproliferations- und Zytotoxizitätsbestimmung und stellt eine Weiterentwicklung des klassischen MTT-Tests dar. Bei dem Substrat handelt es sich laut Herstellerangaben um XTT (= Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat, $C_{22}H_{12}N_7O_{13}S_2Na$, relative Molekülmasse = 674,53). Zudem liegt als Aktivatorlösung ein spezielles Puffergemisch vor, dass die nötige Substratstabilität sicherstellt und im Vergleich zum herkömmlichen XTT-Test die Farbentwicklung verbessert. Im Gegensatz zum klassischen MTT-Test ist das gebildete Formazan wasserlöslich. Somit ist die zeitaufwendige Lösung des Reaktionsproduktes hinfällig. Der Test basiert auf der Umsetzung von schwach gefärbten Tetrazoliumsalzen zu intensiv gefärbten Formazanderivaten durch mitochondriale Dehydrogenasen (vor allem Succinatdehydrogenase). Diese können die Zellmembran nicht mehr frei durchdringen und akkumulieren so in intakten Zellen (Fotakis and Timbrell 2006) (siehe Abbildung 2-1).



Formazan kann die Zellmembran nicht mehr passieren und akkumuliert in intakten Zellen.

XTT - Farbstoff

(= Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat, $C_{22}H_{12}N_7O_{13}S_2Na$)

nach [Shimamura et al., 2003]

Strukturformeln nach [Scudiero et al., 1988]

Abbildung 2-1: XTT-Strukturformeln und Umsetzung in das gefärbte Formazanderivat nach (Scudiero, Shoemaker *et al.* 1988), Erlaubnis vorliegend

2 Material und Methoden

Zellen mit avitalen Mitochondrien können diesen Reduktionsschritt nicht durchführen, es kommt zu einer verringerten Reduktionsrate des Testsubstrates und damit zu einer Abnahme der gemessenen Absorption.

Nach Ablauf der vorgesehenen Inkubation wurde das EZ4U-Substrat in dem zugehörigen Aktivator (ACT) gelöst und je 20 μL zu 200 μL der Versuchslösung in jedes 96-Well pipettiert. Nachdem alle Versuchsplatten so vorbereitet worden waren, wurden sie in den Inkubator zurückgebracht. Die photometrische Messung mittels des Microplate reader Sunrise der Firma Tecan und des Programmes zur Datenanalyse Magellan erfolgte nach 15, 30, 60 und 120 Minuten bei 450 nm (620 nm Referenz). Angegeben wird für jeden Versuch mit N die Anzahl der unabhängigen 96-Well-Platten sowie mit n die Anzahl der Wells.

2.2.6 PrestoBlue-Versuche

Als zweiter Viabilitätsassay kam der Testkit PrestoBlue der Firma Life Technologies (Kat.Nr. A-13261) zur Anwendung. Der Test basiert auf der Reduktion von blau gefärbtem Resazurin zu rot gefärbtem Resorufin durch zytosolische Dehydrogenasen.

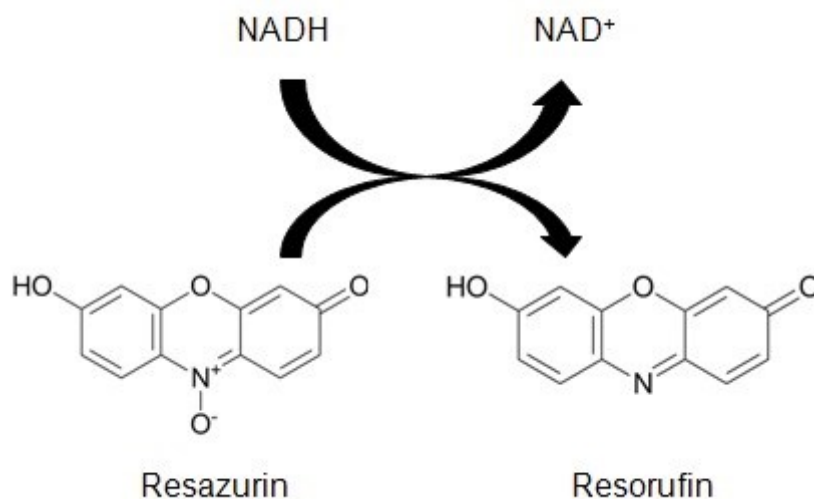


Abbildung 2-2: Strukturformeln des PrestoBlue-Kits nach (Riss, Moravec *et al.*), Erlaubnis vorliegend (CC BY-NC-SA 3.0)

Im Gegensatz zum EZ4U-Kit muss PrestoBlue nicht aktiviert werden und kann direkt hinzugegeben werden (Invitrogen 2012).

2 Material und Methoden

Nach Ablauf der vorgesehenen Inkubation wurde je 20 μL der PrestoBlue-Lösung zu 200 μL Versuchslösung in jedes 96-Well pipettiert. Nachdem alle Versuchsplatten so vorbereitet worden waren, wurden sie in den Inkubator zurückgebracht. Anschließend erfolgte nach 15, 30, 60 und 120 Minuten die Messung der Fluoreszenz am Tecan Genios Pro (Exzitationsfilter 535 nm, Emissionsfilter 590 nm). Angegeben wird für jeden Versuch mit N die Anzahl der unabhängigen 96-Well-Platten sowie mit n die Anzahl der Wells.

Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass das PrestoBlue-Substrat Resazurin beziehungsweise das umgesetzte Substrat Resofurin mit der Hydroxyethylstärke interagiert. Deshalb wurde in zwei weiteren Versuchen eine mögliche Interaktion der Substrate und Produkte mit HES untersucht.

Messung der Interaktion zwischen HES und PrestoBlue-Substrat

Es wurden wie oben beschrieben HES-Lösungen verschiedener Konzentration hergestellt. Anschließend wurden diese auf mit 0,5% Gelatine beschichtete zellfreie 96-Well-Platten pipettiert (90 μL pro Well) und jeweils 10 μL frisches PrestoBlue-Substrat hinzugegeben. Die Fluoreszenz wurde nach null, einer, zwei und 24 Stunden gemessen.

Messung der Interaktion zwischen HES und umgesetztem PrestoBlue-Substrat

Im nächsten Schritt wurden HK-2-Zellen, die nach dem Standardschema sieben Tage auf einer 96-Well-Platte kultiviert wurden, zweimal mit PBS gewaschen, alle Wells mit jeweils 90 μL 0%-HES-Lösung gefüllt und über eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde in jedes Well 20 μL PrestoBlue-Substrat hinzugegeben und für weitere zwei Stunden inkubiert. Danach wurden die Lösungen mit dem umgesetzten PrestoBlue abpipettiert und gesammelt. Auf eine in der Zwischenzeit mit 0,5% Gelatine beschichtete zellfreie Platte wurden jetzt jeweils 45 μL umgesetzte Lösung sowie 55 μL einer frisch hergestellten HES-Versuchslösung verschiedener Konzentration pipettiert. Die Fluoreszenz wurde nach null, einer, zwei und 24 Stunden gemessen.

Reversibilitätsversuch

Um zu testen, ob es sich bei den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen um einen irreversiblen Effekt handelt, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. HK-2-Zellen wurden zunächst nach dem oben beschriebenen Standardschema auf 96-Well-Platten ausgesät und sieben Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und HES-Versuchslösungen aufsteigender Konzentration aufgebracht. Diese wurden nach 21 Stunden durch eine 0%-HES-Lösung ersetzt. Die Fluoreszenz wurde nach 30, 60 und 120 Minuten gemessen.

2.2.7 Western-Blot-Versuche

2.2.7.1 Herstellung der Proteinextrakte

Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden HK-2-Zellen in einer Konzentration von 50.000 Zellen/cm² auf 6-Well-Platten, die zuvor mit 0,5% Gelatine beschichtet worden waren, ausgesät. Das Nährmedium – 3 mL pro Well – wurde alle zwei bis drei Tage erneuert und nach sieben Tagen entfernt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 3 mL pro Well PBS gewaschen und die zu untersuchenden Lösungen ebenfalls mit jeweils 3 mL pro Well appliziert. Je nach Versuchsanordnung wurden die Platten für eine, zwei, vier, sechs, acht oder 22 Stunden erneut bei 37 °C inkubiert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Platten auf Eis gestellt, der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut zweimal mit je 3 mL pro Well eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde eiskaltes 50 µL RIPA++/Well zugegeben, der Zellrasen mit einem Zellscriper geerntet, die Proteinextrakte in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.7.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die zuvor eingefrorenen Proben wurden aufgetaut, kurz gevortext und für zehn Minuten bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Der hierbei gewonnene Überstand wurde in frische, gekühlte Reaktionsgefäße überführt. Auf eine 96-Well-Platte wurden pro Well 24 µL RIPA-Puffer und 1 µL Probe gegeben, anschließend 200 µL frisch gemischtes BCA-Reagenz/Well. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurde die Absorption bei 540 nm im Tecan Sunrise gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe

2 Material und Methoden

eines Kits mit Albumin Standardkurve zwischen 0-1500 mg/mL bestimmt. Anschließend wurde in gekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße jeweils 10 µL Laemmli Puffer und 30 µL Probe gegeben und bei -80 °C eingefroren.

2.2.7.3 Gelelektrophorese

Die Proteine wurden nach ihrer Molekülgröße mittels einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. In einem ersten Schritt erfolgte die Mischung des Trenngels, welches zwischen zwei Glasplatten mit 1,5 mm Spacer (BioRad Laboratories GmbH, München), die in einer speziellen Halterung (BioRad Laboratories GmbH, München) fixiert waren, eingefüllt wurde. Obenauf wurde ein 1 cm breiter Film destilliertes H₂O gegeben.

Zunächst wurde das H₂O nach Polymerisation des Trenngels vollständig entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel, welches zuvor gemischt wurde, auf das Trenngel aufgebracht und 1,5 mm breite Kämme luftblasenfrei eingesetzt. Diese wurden nach Aushärtung der Gele wieder entfernt und die so entstandenen Probenaschen mit destilliertem H₂O gespült, um Gelreste zu entfernen. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und fixiert. Die vorbereiteten Probengemische wurden für fünf Minuten auf 70 °C erhitzt und mithilfe von Gelloader-Pipettenspitzen gemäß der Proteinbestimmung in die Taschen pipettiert. In eine beziehungsweise zwei der Taschen wurde je 2 µL des Molekulargewichtsmarkers geladen. Anschließend wurde die Kammer vollständig mit Elektrophorese-Puffer gefüllt und mit dem Deckel verschlossen, wobei auf die richtige Polung zu achten war. Die Elektrophoresekammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und die Spannung zunächst auf 60 V eingestellt. Sobald die Lauffront das Sammelgel passiert hatte, wurde die Spannung auf 120 - 135 V erhöht. Die Auftrennung der Proteine wurde beendet, sobald die Blaufront des Lämmli-Puffers das Trenngel vollständig durchlaufen hatte.

2.2.7.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Western Blotting)

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Wetblot-Verfahren auf PVDF-Membranen einer Porengröße von 0,2 µm transferiert und dadurch immobilisiert. Um den Proteintransfer durchführen zu können, wurde zunächst eine in Transfer-Puffer

2 Material und Methoden

getränkte Fasermatte in die Blotting-Kassette gelegt und darauf ein ebenfalls mit Transfer-Puffer getränktes Blotting-Papier. Die beiden Glasplatten, zwischen denen die Auftrennung der Proteine erfolgte, wurden mit einem Skalpell voneinander getrennt. Das Sammelgel mit den Probestaschen wurde ebenfalls mit einem Skalpell vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Daraufhin wurde das Trenngel vorsichtig auf das Blotting-Papier gelegt. Auf das Gel wurde die in Puffer getränkte PVDF-Membran in der Größe des Gels blasenfrei aufgelegt. Darauf wurde nochmals ein getränktes Blotting-Papier und zum Schluss eine zweite getränkte Fasermatte aufgebracht. Die Kassette wurde verschlossen und senkrecht in die Transferkammer gestellt, die Kammer vollständig mit Transfer-Puffer aufgefüllt und an eine Stromquelle angeschlossen (40 mA pro Gel). Der Transfer wurde im Kühlraum bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

Nach Ablauf des Transfers wurden die Membranen herausgenommen. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden alle Membranen in einer 5%-Milchpulverlösung über mindestens eine Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.7.5 Antikörper-Inkubationen

Die blockierten Membranen wurden aus der Milchlösung herausgenommen und jeweils separat in Folie eingeschweißt. In diese wurde jeweils die gewünschte Konzentration des spezifischen primären Antikörpers, gelöst in 1%-BSA (in PBS), pipettiert (zirka 800 µL/Gel). Die Folien wurden eingeschweißt, zwischen Glasplatten eingespannt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Folien geöffnet, die Membranen entnommen und mindestens dreimal in einem Zeitabstand von zehn Minuten in PBST-Lösung (0,1% Tween 20/PBS) unter leichtem Schütteln gespült. Daraufhin wurden sie erneut für 20 Minuten in Milchlösung gebracht. Die Sekundärantikörper wurden in 1%-BSA-Lösung verdünnt und mit den Membranen für eine Stunde in Kontakt gebracht. Anschließend wurden die Membranen wieder nach obigem Schema gespült.

2.2.7.6 Detektion

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels ECL-Reagenz. Die beiden Reaktionslösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für zwei Minuten auf den Membranen belassen. Anschließend wurde das Signal mittels automatischer Belichtung im Alpha Innotech Multimage II FC Light Cabinet entwickelt und mit der Software AlphaView (Alpha Innotech) quantitativ densitometrisch ausgewertet. Dabei variierte die Dauer der Filmexposition zwischen 35 Sekunden und 12 Minuten je nach Target.

2.2.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2010 und SPSS Version 23.

2.2.8.1 Viabilitäts-Versuche

Die gemessenen Absorptions- beziehungsweise Fluoreszenzwerte wurden zunächst in das Microsoft®-EXCEL-Format konvertiert. Zuerst wurde der Mittelwert der zelllosen Reihe (= BLANK) jeder Platte berechnet und von allen anderen Messwerten subtrahiert. Der plattenspezifische Mittelwert der 0%-Lösung wurde als plattenspezifische 100% Viabilität definiert. Danach wurden mit dem Grubbs-Test Ausreißer-Werte ausgeschlossen. Anschließend erfolgte die statistische Analyse der Viabilitätswerte mittels einfaktorieller ANOVA und post-hoc-Testung (Dunnett-Test beziehungsweise Games-Howell-Test) sowie ergänzend durch einen nicht-parametrischen Test (Kruskall-Wallis-Test). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte (= MW) \pm Standardabweichung (SD) des Mittelwertes. Eine Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen, für hochsignifikante Unterschiede wurde ein p-Wert $< 0,001$ festgelegt.

2.2.8.2 Western-Blot-Versuche

Die – wie in Abschnitt 2.2.7 ausführlich beschrieben – ermittelten Werte wurden nach Abzug des jeweiligen Background-Wertes zunächst in das Microsoft®-EXCEL-Format konvertiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Normierung der Werte auf die interne Ladekontrolle, in diesem Fall Beta-Aktin. Für die Zeitreihen-Versuche aus Abschnitt 3.5 wurden die Werte auf den jeweiligen Ein-Stunden-Wert der HES- beziehungsweise HK-

2 Material und Methoden

2-Medium-Reihe, für die Versuche mit verschiedenen Substanzen beziehungsweise Substanzkombinationen aus Abschnitt 3.7 auf 0% HES bezogen. Als nächstes wurden mit dem Grubbs-Test Ausreißer-Werte ausgeschlossen. Anschließend erfolgte die statistische Analyse mittels ANOVA sowie die post-hoc-Testung mit einem parametrischen paarweisen Vergleichstest (Games-Howell-Test), da keine Varianzhomogenität vorlag. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte (= MW) \pm Standardfehler (SEM) des Mittelwertes. Eine Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

Wie in der Einleitung im Abschnitt 1.5.2 auf Seite 13 beschrieben, konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass HES *in vivo* in einem Sepsis-Ratten-Modell zu dem histologischen Korrelat der osmotischen Nephrose mit intrazellulären Vesikeln führt (Schick, Isbary *et al.* 2010). Bruno *et al.* konnten passend dazu in einem neu etablierten *in vitro* Modell von immortalisierten, humanen proximalen Tubuluszellen (HK-2-Zellen, siehe Seite 27) nachweisen, dass fluoreszierendes mit APTS markiertes HES intrazellulär aufgenommen wird (Bruno 2015). Die Aufnahme von HES führte *in vitro* zu einer mengenabhängigen Viabilitätsreduktion, welche unabhängig von der Molekülgröße, dem pH-Wert und der Osmolalität ist (Bruno, Neuhaus *et al.* 2014). In den einstigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde der auf der Aktivität der mitochondrialen Enzyme basierende EZ4U-Test eingesetzt, um den Einfluss von HES auf die Zellviabilität zu testen. In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Schritt die Effekte von HES auf HK-2-Zellen im EZ4U-Test mit dem auf der Aktivität von zytosolischen Dehydrogenasen beruhenden Test PrestoBlue verglichen.

3.1 Auswirkungen von HES auf die Zellviabilität

3.1.1 HES reduziert die Zellviabilität konzentrationsabhängig im EZ4U-Test

Eine konzentrationsabhängige Zellviabilitätsreduktion für HES im EZ4U-Test konnten Bruno *et al.* wie im vorherigen Abschnitt beschrieben bereits unmittelbar nach Inkubationsbeginn bis zu 21h Inkubationszeit nachweisen (Bruno 2015). Dies wurde durch eigene Versuchsreihen mit Inkubationszeiten von einer Stunde, sieben Stunden und 21 Stunden bestätigt. Hierbei zeigte sich ebenfalls bereits nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde eine konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion der HK-2-Zellen.

3 Ergebnisse

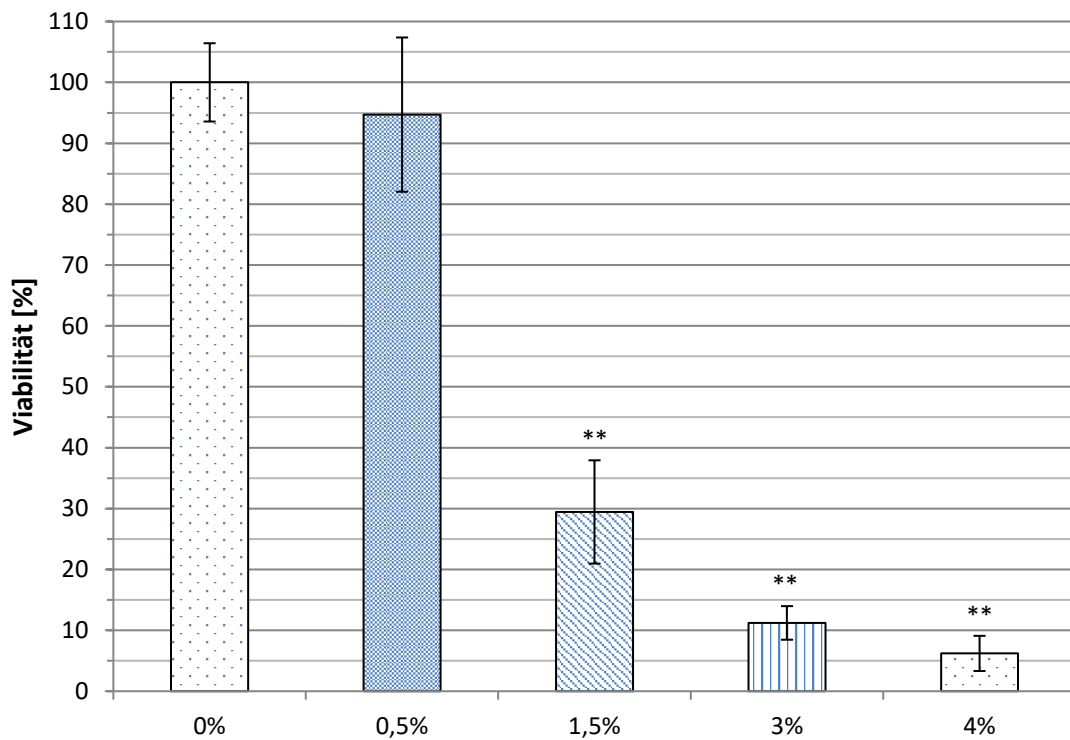


Abbildung 3-1: EZ4U: Konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion der HK-2-Zellen durch HES nach einer Stunde Inkubation und zum Messzeitpunkt 60 Minuten nach EZ4U-Reagenzzugabe (MW \pm SD, ** = $p < 0,001$ zu 0%, N = 3, n = 46 - 48)

In Abbildung 3-1 wurden jeweils die nach 60 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitätswerte für 0% bis 4% HES nach einer Stunde Inkubation dargestellt. Die niedrigste Dosis von 0,5% HES unterschied sich mit $94,28\% \pm 12,15\%$ SD nicht signifikant von der 0% Referenzlösung. Eine Konzentration von 1,5% HES reduzierte die Zellviabilität statistisch hochsignifikant um $70,42\% \pm 8,58\%$ SD. Mit steigender Konzentration sank die gemessene Viabilität weiter ab. So verringerte die Konzentration von 3% HES die Zellviabilität um 88,29% auf $11,71\% \pm 3,76\%$ SD und die applizierte Maximaldosis von 4% HES führte zu einer Viabilitätsreduktion von 93,63% auf $6,37\% \pm 3,13\%$ SD.

3 Ergebnisse

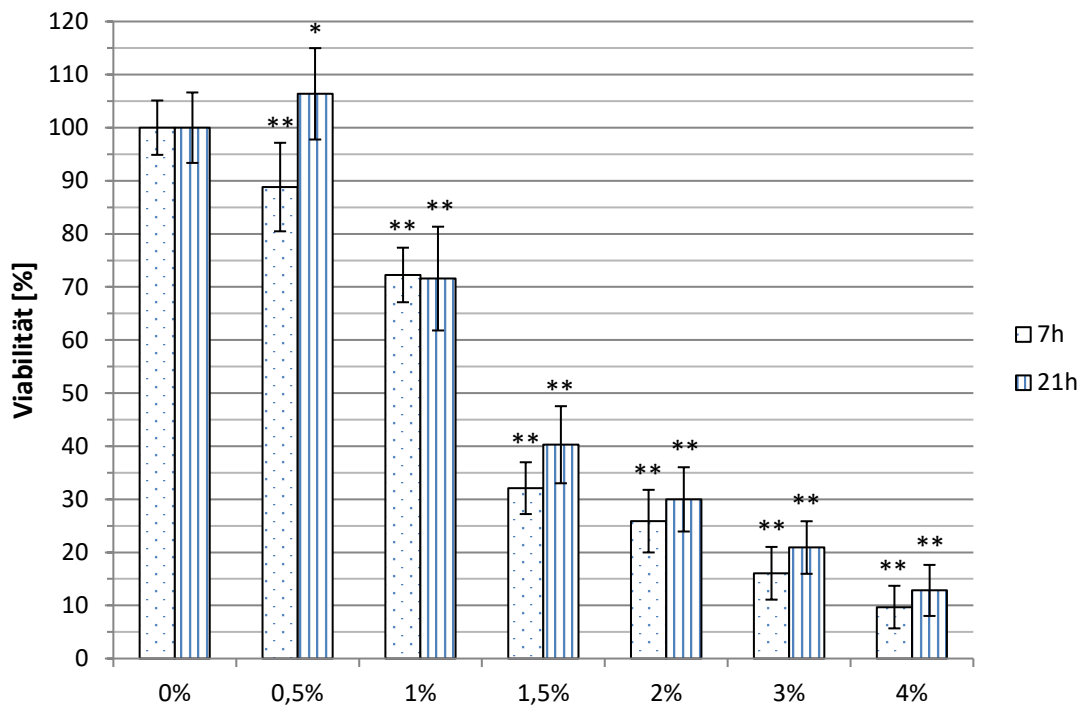


Abbildung 3-2: EZ4U: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Viabilitätsreduktion von HK-2-Zellen durch HES. HES-Lösungen aufsteigender Konzentration jeweils nach sieben und 21 Stunden Inkubation. (MW ± SD, * = p < 0,05 zu 0%, ** = p < 0,001 zu 0%, N = 3, n = 31 - 48)

In Abbildung 3-2 sind jeweils die nach 60 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitätswerte für 0,5% bis 4% HES nach sieben und 21 Stunden Inkubation dargestellt. Dabei zeigte sich nach sieben Stunden Inkubation ein hochsignifikante Viabilitätsreduktion bereits für 0,5% HES mit $88,81 \pm 8,34\%$ SD im Vergleich zur 0%-Referenzlösung. Hochsignifikante Viabilitätsreduktionen wiesen auch die Behandlung mit 1% HES mit $72,25 \pm 5,14\%$ SD, 1,5% HES mit $32,48 \pm 5,27\%$ SD, 2% HES mit $25,88 \pm 5,90\%$ SD, 3% HES mit $16,06 \pm 4,96\%$ SD und zuletzt 4% HES mit $9,69 \pm 4,01\%$ SD auf.

Nach 21 Stunden Inkubation war die Viabilität mit 0,5% HES signifikant erhöht mit $106,15 \pm 9,17\%$ SD im Vergleich zur 0% Referenzlösung. Analog zu den Versuchen nach einer beziehungsweise sieben Stunden Inkubation fand sich eine konzentrationsabhängige hochsignifikante Viabilitätsreduktion auf $71,57 \pm 9,77\%$ SD bei 1% HES, $39,42 \pm 7,51\%$ SD bei 1,5%, $29,98 \pm 6,05\%$ SD bei 2%, über $20,63 \pm 4,88\%$ SD bei 3% auf letztendlich $13,06 \pm 4,91\%$ SD bei der maximalen Applikationsdosis von 4% HES.

3.2 PrestoBlue-Test

Wie im Abschnitt 2.2.6 auf Seite 36 beschrieben basiert der PrestoBlue-Test auf einem Substratumsatz durch zytosolische Dehydrogenasen im Gegensatz zum EZ4U-Test, welcher die Funktion mitochondrialer Dehydrogenasen nutzt. Ein ähnliches Viabilitätsverhalten der HK-2-Zellen würde somit möglicherweise einen Hinweis auf eine generelle zelluläre Viabilitätsreduktion geben, da es sich um zwei verschiedene Zellkompartimente handelt.

3.2.1 Validierung des PrestoBlue-Tests

Der PrestoBlue-Test wurde als erstes hinsichtlich seiner Eignung für die Bestimmung der möglichen Viabilitätsreduktion der Zellen durch HES überprüft, analog zur Vorarbeit von Bruno *et al.*, in der dies für den EZ4U-Test durchgeführt wurde.

Interaktion zwischen HES und dem Reaktant

Hierbei musste zunächst ausgeschlossen werden, dass das Substrat des PrestoBlue-Tests – Resazurin – mit HES reagiert. Dafür wurden HES-Lösungen in aufsteigender Konzentration von 0% bis 6% in eine mit 0,5% Gelatine beschichtete 96-Well-Platte gefüllt. Zur besseren Einordnung der erhobenen Daten wurde zudem die durchschnittliche Fluoreszenz der 0%-Lösung nach Inkubation mit HK-2-Zellen angegeben.

3 Ergebnisse

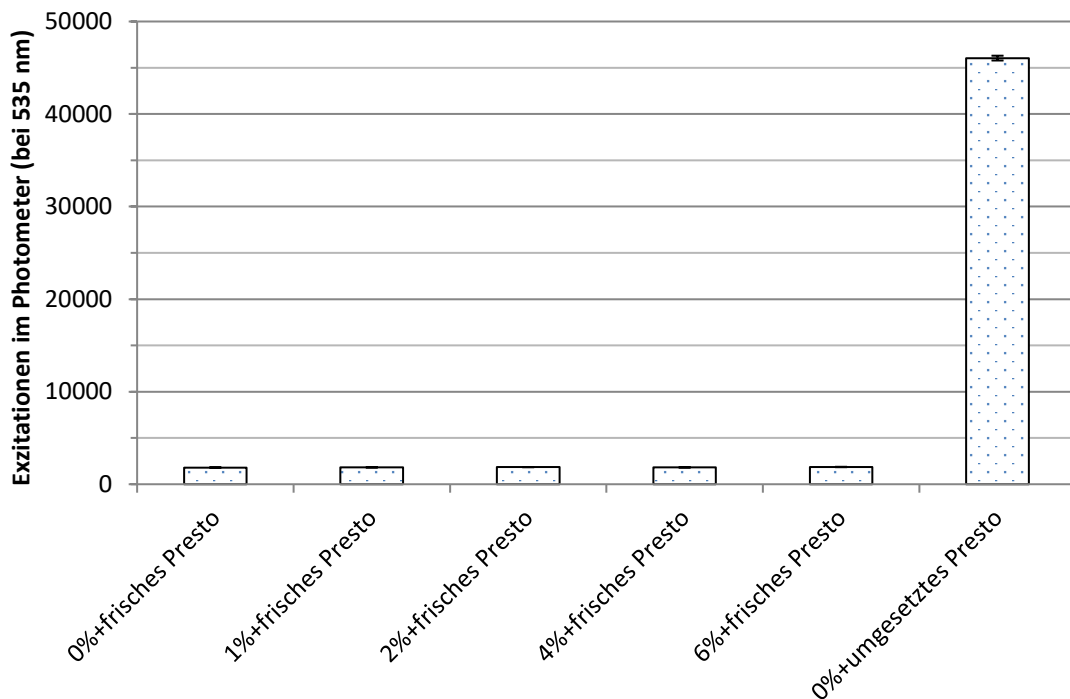


Abbildung 3-3: PrestoBlue: Bestimmung der Exzitationen der Versuchslösungen ohne Zellen. Dargestellt sind die im Photometer gemessenen Exzitationen von HES-Lösungen aufsteigender Konzentration je mit PrestoBlue-Substrat (Presto) versetzt und jeweils inkubiert in Wells ohne HK-2-Zellen sowie 0%-Lösung mit HK-2-Zellen. Dargestellt ist der Messzeitpunkt nach 60 Minuten nach vier Stunden Inkubation. (MW \pm SD, N = 1, n = 8 - 16)

Die mit Abstand stärkste Fluoreszenz wurde in jenen Wells gemessen, die eine 0% HES-Lösung enthielten, welche zuvor mit PrestoBlue auf HK-2-Zellen inkubiert worden waren. Der Messwert nach insgesamt vier Stunden Inkubation betrug 46046 ± 259 SD Exzitationen (= RFU = relative fluorescence units). Für die Wells, die jeweils eine HES-Lösung mit neu hinzugegebenem Reaktant enthielten, wurden Messwerte von 1806 ± 13 SD RFU für die 0%-Lösung, 1822 ± 13 SD RFU für die 1%-Lösung, 1849 ± 14 SD RFU für die 2%-Lösung, 1820 ± 18 SD RFU für die 4%-Lösung sowie 1864 ± 19 SD RFU für die 6%-Lösung ermittelt.

Zusammenfassend zeigt die Abbildung 3-3, dass sich die Fluoreszenz der Versuchslösungen bei Koinkubation mit dem Substrat des PrestoBlue-Tests verglichen mit dem Ergebnis zellhaltiger Wells in einem sehr niedrigen Bereich der Exzitation bewegt und kein HES-konzentrationsabhängiger Effekt vorliegt. Damit konnte eine Interaktion von HES mit dem PrestoBlue-Substrat ausgeschlossen werden.

3 Ergebnisse

Interaktion zwischen HES und dem Produkt

Im nachfolgend gezeigten Versuch wurde geprüft, inwiefern durch HK-2-Zellen bereits entstandenes Resorufin – also das Produkt des PrestoBlue-Tests – durch die anschließende Inkubation mit HES beeinflusst wird. Der in Abschnitt 2.2.6 beschriebene Versuch prüft, ob HES mit dem Produkt der von zytosolischen Dehydrogenasen katalysierten Reaktion interagiert.

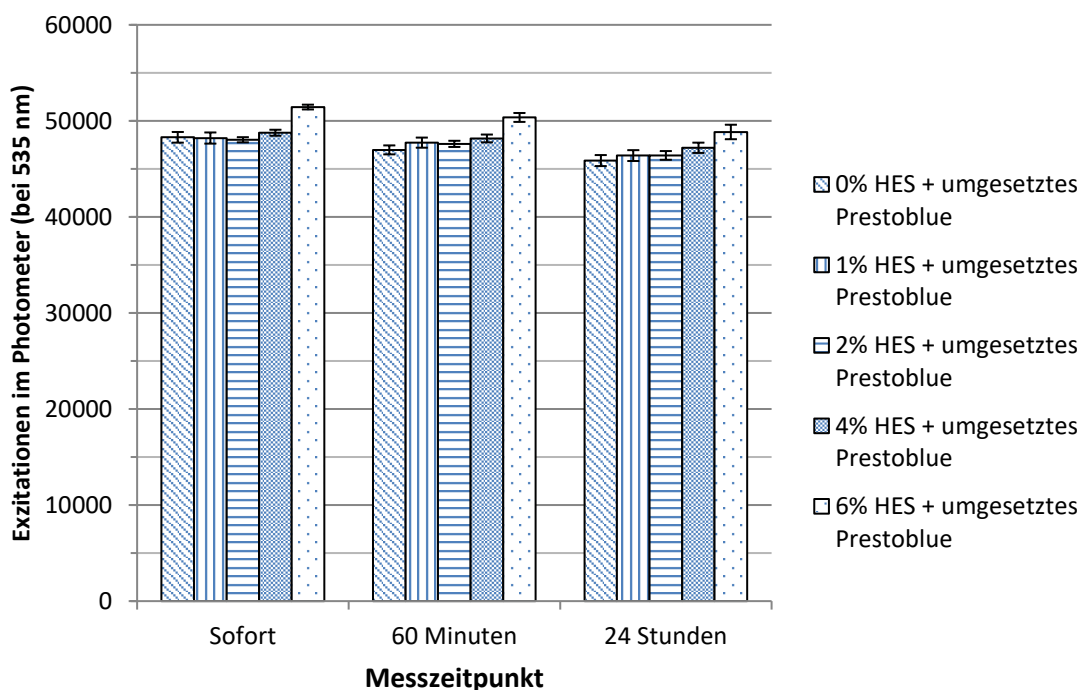


Abbildung 3-4: PrestoBlue: Bestimmung der Interaktion des PrestoBlue-Farbstoffs und HES. Dargestellt sind die gemessenen Exzitationen folgender Versuchslösungen: Jeweils umgesetzttes PrestoBlue mit HES-Lösungen aufsteigender Konzentration von 0% bis 6%. Die Exzitationen wurden gemessen sofort nach Applikation, nach 60 Minuten sowie nach 24 Stunden. (MW \pm SD, N = 3, n = 16)

Die Abbildung 3-4 zeigt die photometrische Messung der Exzitationen der Versuchslösungen sofort, 60 Minuten und 24 Stunden nach Applikation. Für die Bezeichnung der Konzentration der Lösungen ist zu beachten, dass 45% der Versuchslösung aus 0%-Lösung mit umgesetzttem Resorufin und 55% aus 0%, 1%, 2%, 4% oder 6% HES besteht. Unmittelbar nach Applikation zeigten die aufsteigend konzentrierten HES-Lösungen mit umgesetzttem PrestoBlue-Substrat die Messwerte

3 Ergebnisse

48290 ± 555 SD RFU (0% HES), 48215 ± 581 SD RFU (1% HES), 48034 ± 269 SD RFU (2% HES), 48767 ± 311 SD RFU (4% HES) und 51441 ± 248 SD RFU (6% HES). Beim nächsten Messzeitpunkt von 60 Minuten wurde für 0% HES 46982 ± 467 SD RFU, für 1% HES 47737 ± 526 SD RFU, für 2% HES 47608 ± 321 SD RFU, für 4% HES 48173 ± 405 SD RFU und für 6% HES 50359 ± 465 SD RFU gemessen. Die Messwerte waren sowohl nach 60 Minuten als auch nach 24 Stunden im Vergleich zur unmittelbaren Messung etwas niedriger. So wurden nach 24 Stunden für 0,5% HES die Werte 45870 ± 574 SD RFU, für 1% HES 46389 ± 565 SD RFU, für 2% HES 46405 ± 456 SD RFU, für 4% HES 47199 ± 535 SD RFU und für 6% HES 48848 ± 754 SD RFU gemessen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass HES weder mit dem Substrat noch mit dem Produkt des PrestoBlue-Tests interagiert. Somit sind etwaige gemessene Messwertveränderungen auf eine Substratumsetzung der Zellen zurückzuführen. Insgesamt wiesen höher konzentrierte HES-Lösungen keine niedrigeren Exzitationen als schwächer konzentrierte oder HES-freie Lösungen auf. Dies bedeutet, dass die aus den Exzitationen bestimmte Viabilität nicht durch ein Messartefakt bei hohen HES-Konzentrationen falsch niedrig gemessen wird. Darüber hinaus findet sich im Zeitverlauf eine kontinuierliche geringgradige Abnahme der Messwerte durch alle Gruppen hindurch. Es ist davon auszugehen, dass diese Tendenz entweder von einer Änderung der enzymatischen Zellaktivität herrührt, oder von einem im zeitlichen Verlauf schwachen Abbau des Produktes, da wie bereits oben erwähnt eine Interaktion von HES mit dem Substrat beziehungsweise Produkt des PrestoBlue-Tests ausgeschlossen werden kann.

3.2.2 HES reduziert die Zellviabilität im PrestoBlue-Test konzentrationsabhängig

Nach erfolgreicher Qualifizierung des PrestoBlue-Kits wurde analog zum EZ4U-Test in einer Reihe mit aufsteigender HES-Konzentration zu den Zeitpunkten eine, sieben und 21 Stunden untersucht, welche Auswirkung HES im PrestoBlue-Test auf die Zellviabilität hat.

3 Ergebnisse

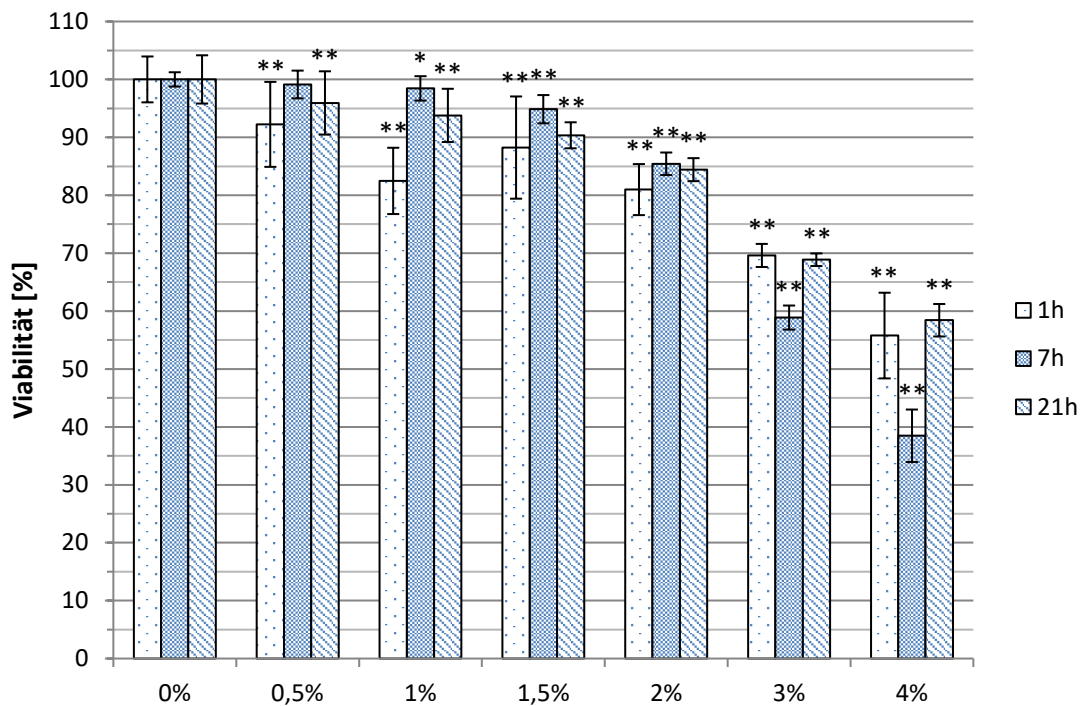


Abbildung 3-5: PrestoBlue: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Viabilitätsreduktion von HK-2-Zellen durch HES-Lösungen aufsteigender Konzentration nach einer, sieben und 21 Stunden Inkubation (MW ± SD, * = p < 0,05 zu 0%, ** = p < 0,001 zu 0%, N = 3, n = 30 - 48)

Abbildung 3-5 zeigt das Ergebnis nach einer, sieben und 21 Stunden Inkubation. Dabei bestand nach einer Stunde Inkubation für 0,5% HES mit einer Viabilität von $92,24\% \pm 7,34\%$ SD bereits eine hochsignifikante Viabilitätsreduktion im Vergleich zur 0%-Kontrollgruppe. Auch 1% HES reduzierte die Viabilität hochsignifikant auf $82,48\% \pm 5,72\%$ SD, 1,5% HES auf $88,23\% \pm 8,83\%$ SD, 2% HES auf $80,97\% \pm 4,40\%$ SD, 3% HES auf $69,60\% \pm 1,99\%$ SD und 4% HES schließlich auf $55,77\% \pm 7,40\%$ SD. Nach sieben Stunden Inkubation zeigte sich für 0,5% HES mit $99,12\% \pm 2,40\%$ SD kein signifikanter Unterschied zur 0%-Kontrollgruppe. Die Viabilitätsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe war jedoch für 1% HES mit $98,27\% \pm 2,18\%$ SD signifikant, ab 1,5% HES hochsignifikant mit $94,68\% \pm 2,48\%$ SD, für 2% HES mit $85,27\% \pm 1,93\%$ SD, für 3% HES mit $58,88\% \pm 2,08\%$ SD sowie für 4% HES mit $38,64\% \pm 4,63\%$ SD. Schließlich zeigte sich ein ähnlicher Verlauf nach 21 Stunden Inkubation. Hierbei reduzierte 0,5% HES im Vergleich zur 0%-Kontrollgruppe die Viabilität mit $95,94\% \pm 5,46\%$ SD signifikant. Die nächsthöhere Konzentration von 1% HES wies eine hochsignifikante Viabilitätsreduktion mit $93,40\% \pm 5,02\%$ SD auf, ebenso im weiteren Verlauf 1,5% HES

3 Ergebnisse

mit $90,35\% \pm 2,25\%$ SD, 2% HES mit $84,42\% \pm 2,00\%$ SD, 3% HES mit $68,53\% \pm 1,71\%$ SD und 4% HES mit $58,42\% \pm 2,80\%$ SD.

Zusammenfassend konnte mit zwei verschiedenen Viabilitätstests jeweils eine konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion durch HES-Moleküle festgestellt werden, die bereits nach einer Stunde nachweisbar war und über 21 Stunden das prozentuale Ausmaß in etwa beibehielt. Durch den PrestoBlue-Test, der auf eine Substratumsetzung zytosolischer Dehydrogenasen beruht, konnte analog zum EZ4U-Test, der mitochondriale Dehydrogenasen benötigt, eine Viabilitätsreduktion in einem zweiten Zellkompartiment festgestellt werden. Wie bereits erläutert, konnten Schick *et al.* zeigen, dass sich HES in Form von Konglomeraten in der Zelle ablagert, was auch 21 Stunden danach noch nachweisbar war (Schick, Isbary *et al.* 2010). Hier stellte sich nun die Frage, ob die nachgewiesene Viabilitätsreduktion durch Induktion des Autophagiemechanismus, der einen universellen zellulären Wiederverwertungskreislauf darstellt, reduziert oder sogar aufgehoben werden kann.

3.3 Einfluss von Everolimus auf die Zellviabilität unter HES

Wie bereits in der Einleitung im Abschnitt 1.6.1 auf Seite 15 beschrieben, stellt der Autophagiekreislauf einen universellen Zellreinigungsmechanismus dar. In diesem komplexen Netzwerk spielt insbesondere der „upstream“ gelegene Regulator mTOR-Komplex eine zentrale inhibierende Rolle. Dieser wird durch das Rapamycin-Derivat Everolimus (Synonym RAD001) mittels Komplexbildung inhibiert und somit Autophagie induziert. Ob dies einen Einfluss auf die Zellviabilität unter HES hat, wird im nächsten Abschnitt erläutert.

3.3.1 Die Viabilitätsreduktion durch HES lässt sich durch Everolimus partiell aufheben

Zunächst konnte in einer Versuchsreihe nach Inkubation von einer Stunde eine partielle Aufhebung der HES-vermittelten Zellviabilitätsreduktion durch den mTOR-Inhibitor Everolimus in einer Konzentration von 30 μM nachgewiesen werden. Hierfür wurde in Anlehnung an den Vorversuch (siehe Abbildung 3-1 auf Seite 44) eine Lösungskonzentration von 1,5% HES gewählt, da diese eine signifikante Viabilitätsreduktion erbrachte.

3 Ergebnisse

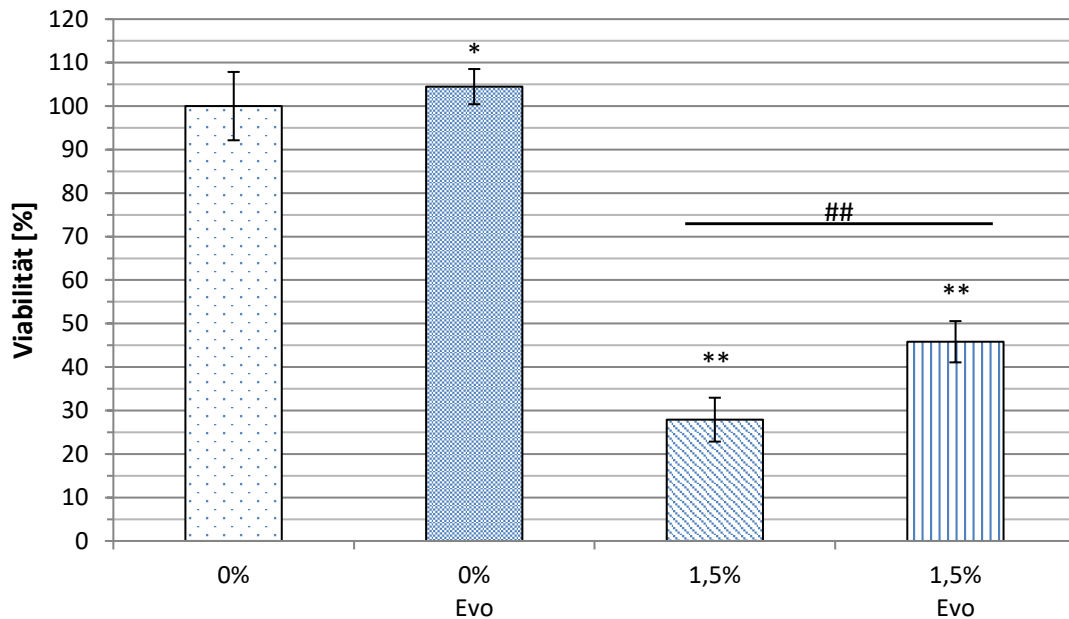


Abbildung 3-6: EZ4U: Partielle Aufhebung der HES-induzierten Viabilitätsreduktion durch Everolimus (Evo) mit 30 μ M nach einer Stunde Inkubation zum Messzeitpunkt 60 Minuten für HES-Lösungen verschiedener Konzentration (MW \pm SD, * = $p < 0,05$ zu 0%, ** = $p < 0,001$ zu 0%, ## = $p < 0,001$ gegeneinander, N = 3, n = 16 - 47)

Abbildung 3-6 zeigt die vorbekannte hochsignifikante Viabilitätsreduktion im EZ4U nach einstündiger Inkubation mit 1,5% HES auf 27,90% \pm 5,04% SD. Eine Koinkubation mit 30 μ M Everolimus führte zu einer im Vergleich zu 1,5% HES hochsignifikanten partiellen Aufhebung der Viabilitätsreduktion mit 45,82% \pm 4,74% SD. Dabei ist jedoch zu beachten, dass auch die Koinkubation der 0%-Kontrollgruppe mit Everolimus zu einer signifikanten Verbesserung der Viabilität auf 104,48% \pm 4,05% SD führte im Vergleich zur 0%-Kontrollgruppe mit 100% \pm 7,86 SD. Insgesamt ist dieser Versuch jedoch ein starker Hinweis auf einen relevanten Effekt von Everolimus.

3.3.2 Zeitabhängigkeit des Everolimus-Effektes

Nachdem bereits nach einer Stunde Inkubation ein positiver Effekt von Everolimus nachweisbar war und unsere Arbeitsgruppe eine intrazelluläre Aufnahme von HES nach 21 Stunden Inkubation zeigen konnte, stellte sich die Frage, ob es einen optimalen Inkubationszeitraum für den dynamischen Prozess der Autophagie gibt. Liu *et al.* konnten für mit Urinproteinen inkubierten HK-2-Zellen eine Autophagieinduktion

3 Ergebnisse

nachweisen (Liu, Luo *et al.* 2014). Dabei zeigte sich eine zeitabhängige perinukleäre Lysosomenakkumulation, welche die Autophagosomdegradation beschleunigt, mit einem Optimum bei acht Stunden (Korolchuk, Saiki *et al.* 2011). In Anlehnung daran wurden die folgenden Versuche mit einer siebenstündigen Inkubation und einem Messzeitpunkt von 60 Minuten nach Substratzusatz durchgeführt. Dabei wurde von Bruno *et al.* (2015) zuvor gezeigt, dass für einen Zeitraum von 24 Stunden nur eine geringe Zytotoxizität ab einer Konzentration von 1,5% HES besteht (Bruno 2015). Somit spielt diese keine relevante Rolle für die nachfolgenden Versuche dieser Arbeit.

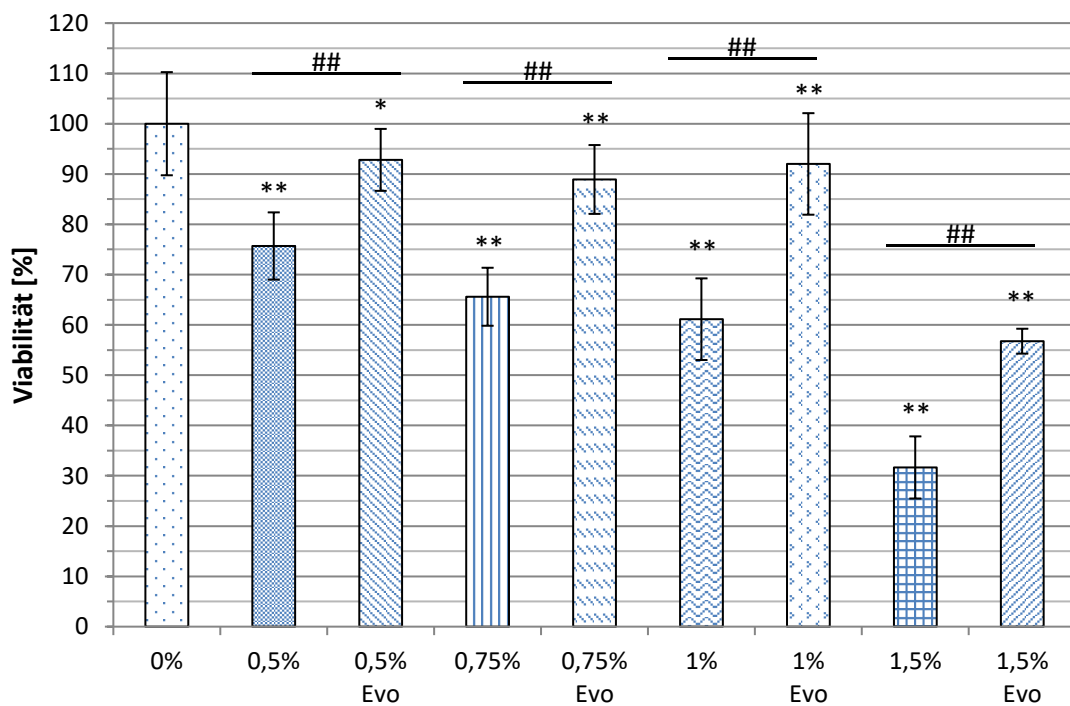


Abbildung 3-7: EZ4U: Partielle Aufhebung der HES-induzierten Viabilitätsreduktion durch Everolimus (Evo) mit 30 μ M nach sieben Stunden Inkubation bei verschiedenen HES-Konzentrationen (MW \pm SD, * = $p < 0,05$ zu 0%, ** = $p < 0,001$ zu 0%, ## = $p < 0,001$ gegeneinander, N = 3, n = 15 - 48)

Abbildung 3-7 zeigt zum einen nach siebenstündiger Inkubation den vorbekannten Effekt der konzentrationsabhängigen Viabilitätsreduktion durch HES, angefangen bei 0,5% mit 75,69% \pm 6,68% SD, 0,75% mit 65,59% \pm 5,77% SD, 1% mit 61,13% \pm 8,12% SD und schließlich 1,5% mit 31,65% \pm 6,18% SD. Eine Koinkubation mit 30 μ M Everolimus ergab jeweils eine hochsignifikante partielle Aufhebung der Viabilitätsreduktion um 17,12% auf 92,81% \pm 6,16% SD bei 0,5%, um 23,32% auf 88,91% \pm 6,84% SD bei 0,75%, um 30,87% auf 92,00% \pm 10,09% SD bei 1% sowie um 35,11% auf 56,76% \pm 2,47% SD

3 Ergebnisse

bei 1,5% HES. Somit war dieser Effekt auch nach sieben Stunden Inkubation für verschiedene HES-Konzentrationen bis 1,5% nachweisbar. Eine Viabilitätsreduktion um zirka ein Drittel durch HES wurde dabei als am besten geeignet für die nachfolgenden Versuche betrachtet. Dies traf bei einer Inkubationszeit von sieben Stunden am ehesten für die 0,75% HES-Lösung zu.

3.3.3 Everolimus-Effekt im PrestoBlue-Test

Eine signifikante Viabilitätsreduktion im PrestoBlue-Test nach sieben Stunden Inkubation war nach dem Vorversuch – siehe Abbildung 3-5 auf Seite 50 – erst ab einer Konzentration von 1% HES zu erwarten.

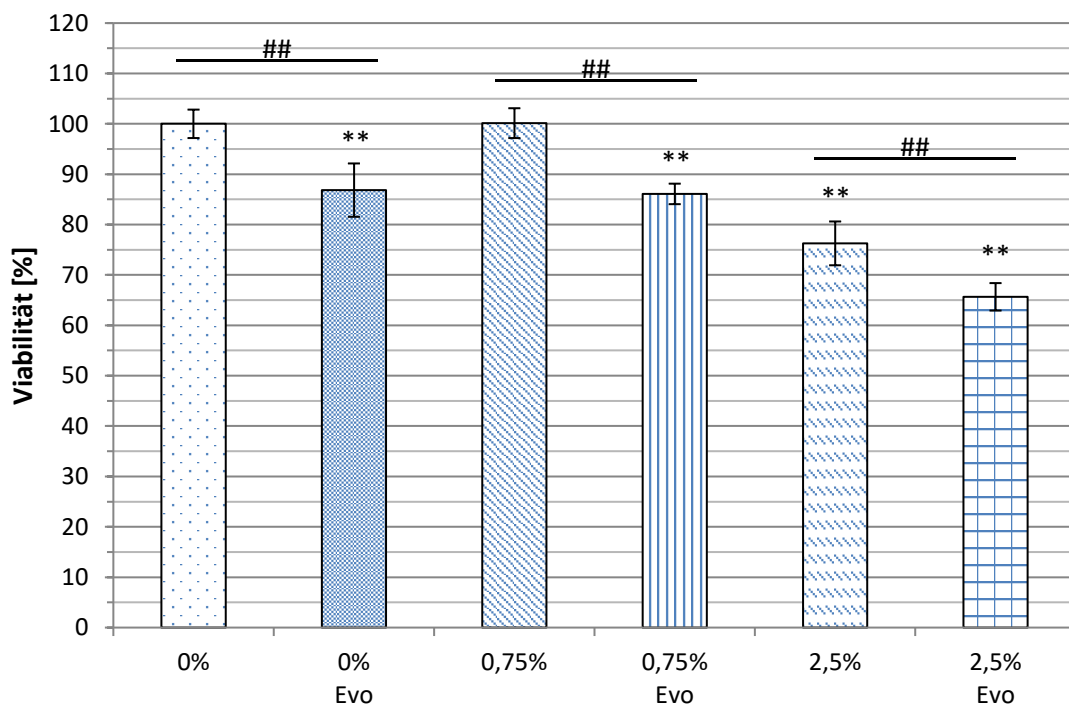


Abbildung 3-8: PrestoBlue: Verstärkung der HES-induzierten Viabilitätsreduktion durch Everolimus (Evo) mit 30 μ M nach sieben Stunden Inkubation bei verschiedenen HES-Konzentrationen (MW \pm SD, ** = $p < 0,001$ zu 0%, ## = $p < 0,001$ gegeneinander, N = 6, n = 32 - 96)

Aus der Abbildung 3-8 ist zum einen ersichtlich, dass die 0,75%-Lösung mit 100,14% \pm 2,96% SD keinen signifikanten Unterschied zur 0%-Kontrollgruppe aufwies, die 2,5%-Lösung mit 76,27% \pm 4,35% SD jedoch hochsignifikant reduziert war in ihrer Viabilität. Zum anderen kam es dabei unter Koinkubation von 30 μ M Everolimus bereits bei 0% HES zu einer hochsignifikanten Viabilitätsreduktion um 13,16% von 100% \pm 2,82% SD

3 Ergebnisse

auf $86,84\% \pm 5,30\%$ SD. Auch bei 0,75% HES führte die Zugabe von Everolimus zu einer Reduktion um 14,05% von $100,14\% \pm 2,96\%$ SD auf $86,09\% \pm 2,03\%$ SD, bei 2,5% HES schließlich um 10,61% von $76,27\% \pm 4,35\%$ SD auf $65,66\% \pm 2,72\%$ SD.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Everolimus die zytosolischen Dehydrogenasen, welche im PrestoBlue-Test für den Farbumsatz und somit die gemessene Viabilität verantwortlich sind, invers zu den für den EZ4U-Test relevanten mitochondrialen Dehydrogenasen beeinflusst. Eine weitere Untersuchung dieser Effekte war jedoch nicht primärer Gegenstand dieser Arbeit.

3.4 Untersuchung der potentiellen Reversibilität im PrestoBlue-Test

Wie bereits im Abschnitt 3.3.2 auf Seite 53 beschrieben, konnte Bruno *et al.* (2015) nur einen geringen zytotoxischen Effekt von HES auf HK-2-Zellen ab einer Konzentration von 1,5% nach 24 Stunden Inkubation nachweisen. Bei einer gleichzeitig signifikanten Viabilitätsreduktion sowohl im EZ4U-Test als auch im PrestoBlue-Test stellte sich die Frage, inwiefern die Zellen sich von einer HES-Behandlung erholen können. Dies wurde in einem Versuch wie in Abschnitt 2.2.6 auf Seite 36 beschrieben durchgeführt.

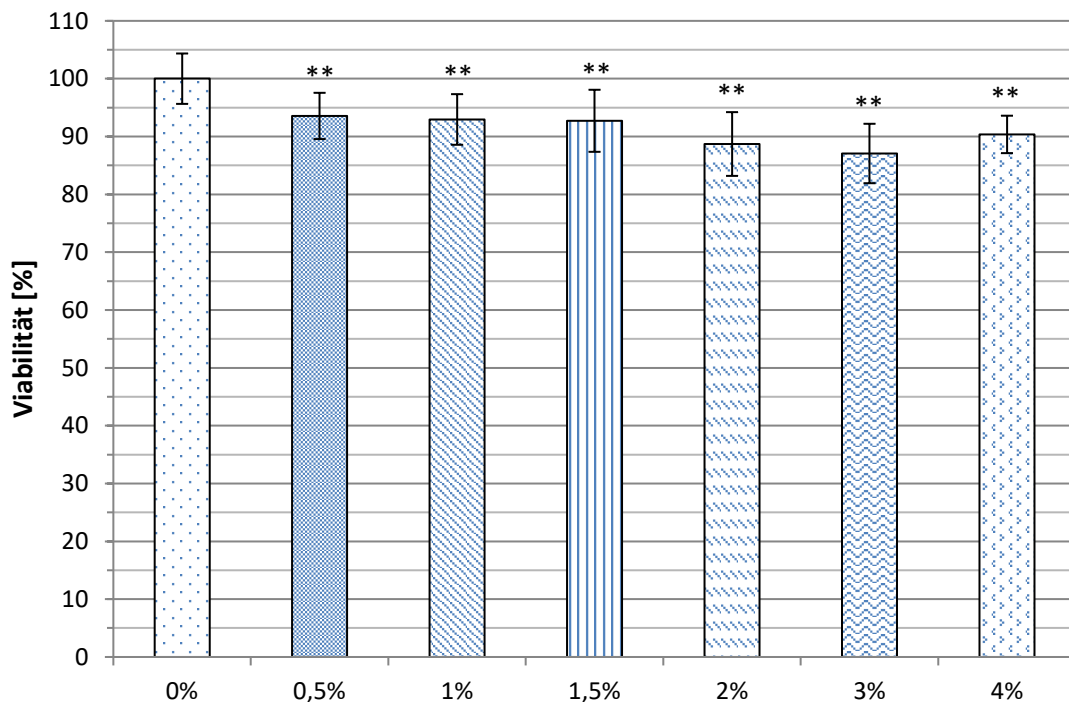


Abbildung 3-9: PrestoBlue: Potentielle Reversibilität - Wirkung verschiedener HES-Lösungen auf die Zellviabilität von HK-2-Zellen nach 21 Stunden Inkubation mit anschließendem Wechsel auf 0% HES. Messung im Photometer nach 60 Minuten (MW \pm SD, ** = $p < 0,001$ zu 0%, N = 3, n = 32 - 48)

Abbildung 3-9 zeigt die Zellviabilität, nachdem nach 21-stündiger Inkubation mit HES verschiedener Konzentrationen auf eine 0% HES-Lösung umgestellt wurde. Dargestellt ist der Messzeitpunkt 60 Minuten nach Reagenzzugabe. Hier ließ sich bereits für 0,5% HES eine hochsignifikante Viabilitätsreduktion auf $93,56\% \pm 4,00\%$ SD feststellen. In aufsteigender Konzentration fand sich jeweils ebenfalls eine hochsignifikante Reduktion auf $92,95\% \pm 4,38\%$ SD für 1%, $92,72\% \pm 5,37\%$ SD für 1,5%, $88,71\% \pm 5,51\%$ SD für 2%, $87,06\% \pm 5,14\%$ SD für 3% und schließlich $90,36\% \pm 3,23\%$ SD für 4% HES.

3 Ergebnisse

Damit wurde gezeigt, dass die Zellviabilität durch HES gemessen im PrestoBlue-Test auch nach einer Rekonvaleszenzphase beeinträchtigt wird. Bruno *et al.* (2015) konnte dies bereits für den EZ4U-Test nachweisen, wobei zu beachten ist, dass hierbei die Rekonvaleszenzphase nicht eine Stunde sondern 21 Stunden betrug.

3.5 Einfluss von HES auf zentrale Proteine der Autophagie im zeitlichen Verlauf

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass HES zu einer konzentrationsabhängigen Viabilitätsreduktion führt, welche im auf mitochondrialen Dehydrogenasen beruhenden EZ4U-Test durch Everolimus partiell aufgehoben werden kann. Dabei konnte insbesondere nach insgesamt acht Stunden Inkubation – sieben Stunden HES- und eine Stunde EZ4U-Reagenz-Inkubation – eine signifikante Viabilitätsverbesserung durch Everolimus nachgewiesen werden. In dem auf zytosolischen Dehydrogenasen beruhenden Viabilitätsassay PrestoBlue führte die Koinkubation mit Everolimus jedoch gegensätzlich zu einer signifikanten Viabilitätsreduktion. In diesem Abschnitt soll nun dargestellt werden, ob mehrere für die Autophagie zentrale Proteine eine veränderte Proteinexpression nach HES-Behandlung im zeitlichen Verlauf aufweisen.

Es wurde die Proteinexpression nach der Behandlung mit 0%-, 0,75%- und 2,5%-HES-Lösung sowie unter HK-2-Medium (= Nährmedium) zu den Zeitpunkten eine, zwei, vier, sechs, acht und 22 Stunden untersucht. Zur Quantifizierung der Expressionsstärke wurde jeweils auf die Ladekontrolle beta-Aktin normiert und das Ergebnis in Vielfache des Ein-Stunden-Wertes dargestellt.

3 Ergebnisse

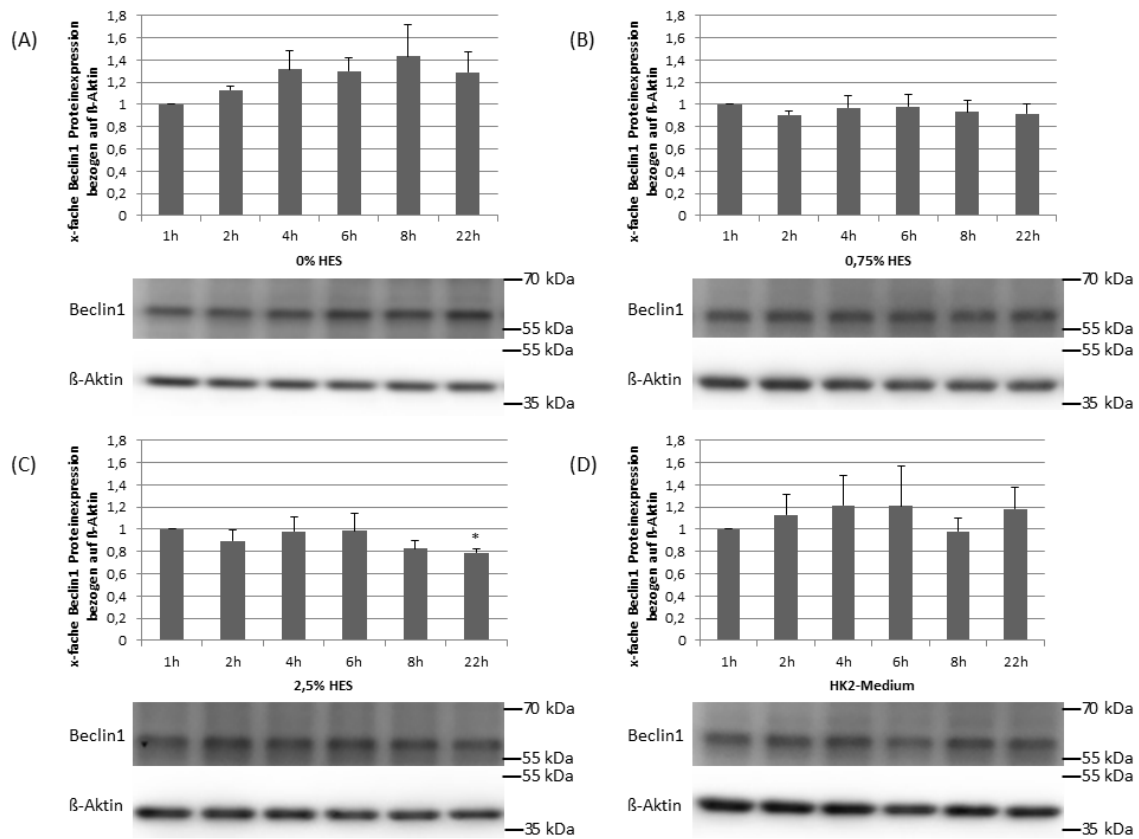


Abbildung 3-10: Westernblotanalyse der Proteinexpression von Beclin1 im zeitlichen Verlauf von einer bis 22 Stunden für (A) 0% HES, (B) 0,75% HES, (C) 2,5% HES und (D) HK2-Medium (= Nährmedium), jeweils normiert auf den Ein-Stunden-Wert. Die untere Proteinbande des Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit beta-Aktin (MW \pm SEM, * = $p < 0,05$ zu 1h, $n = 5 - 6$ von drei unabhängigen Experimenten)

Abbildung 3-10 stellt die Proteinexpression von Beclin1 – eines zentralen Proteins des PI3K-Komplexes (siehe Abschnitt 1.6.3) – dar. Hierbei ließ sich lediglich für den 22-Stunden-Wert der 2,5%-HES-Reihe eine signifikante Reduktion der Proteinexpression auf $0,79 \pm 0,09$ SD erkennen. Dies deutet eher auf eine geringe Reduktion der Autophagierate hin, wobei alle übrigen Werte keine signifikante Veränderung zum jeweiligen Ausgangswert der Messung nach einer Stunde Inkubation mit der jeweiligen Lösung aufwiesen, was wiederum für keine Beeinflussung der Autophagierate spricht.

3 Ergebnisse

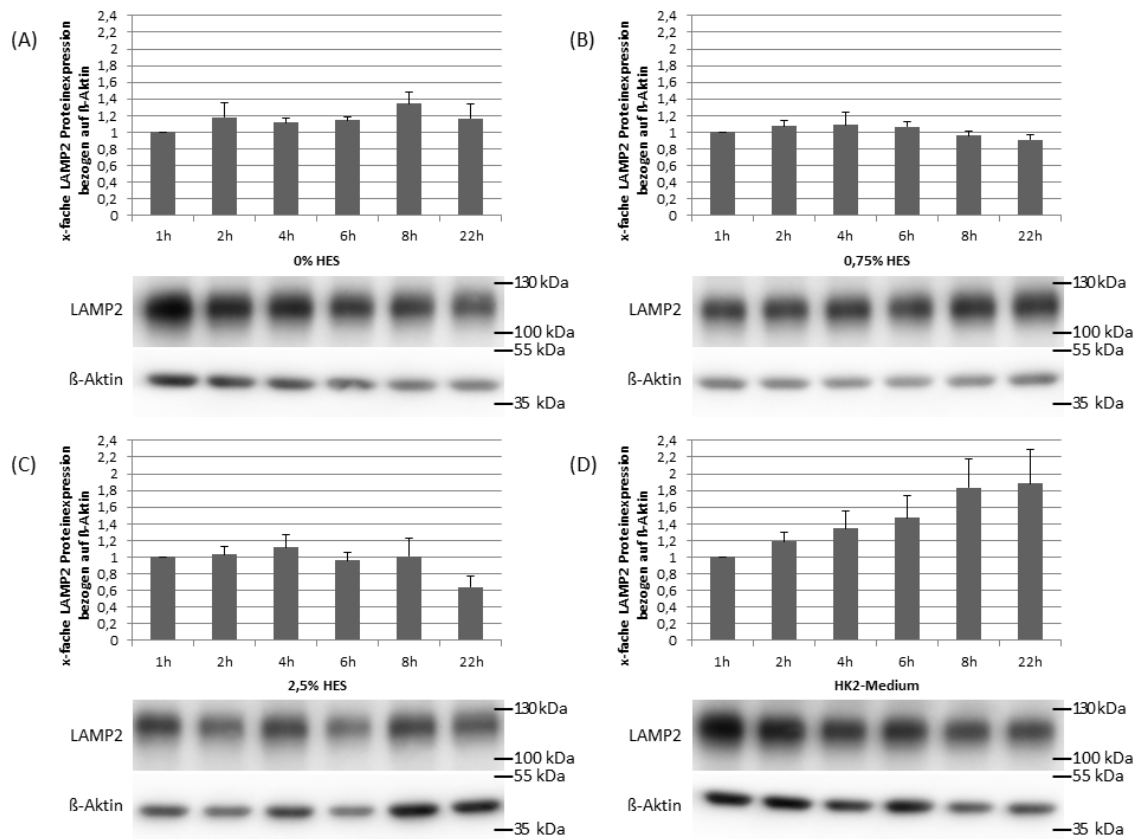


Abbildung 3-11: Westernblotanalyse der Proteinexpression von LAMP2 im zeitlichen Verlauf von einer bis 22 Stunden für (A) 0% HES, (B) 0,75% HES, (C) 2,5% HES und (D) HK2-Medium (= Nährmedium), jeweils normiert auf den Ein-Stunden-Wert. Die untere Proteinbande des Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit beta-Aktin (MW \pm SEM, n = 5 - 6 von drei unabhängigen Experimenten)

Auch das für die lysosomale Funktion essentielle Protein LAMP2 (lysosome-associated membrane protein type 2) wies in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede zum Ein-Stunden-Wert auf, wie aus Abbildung 3-11 ersichtlich.

3 Ergebnisse

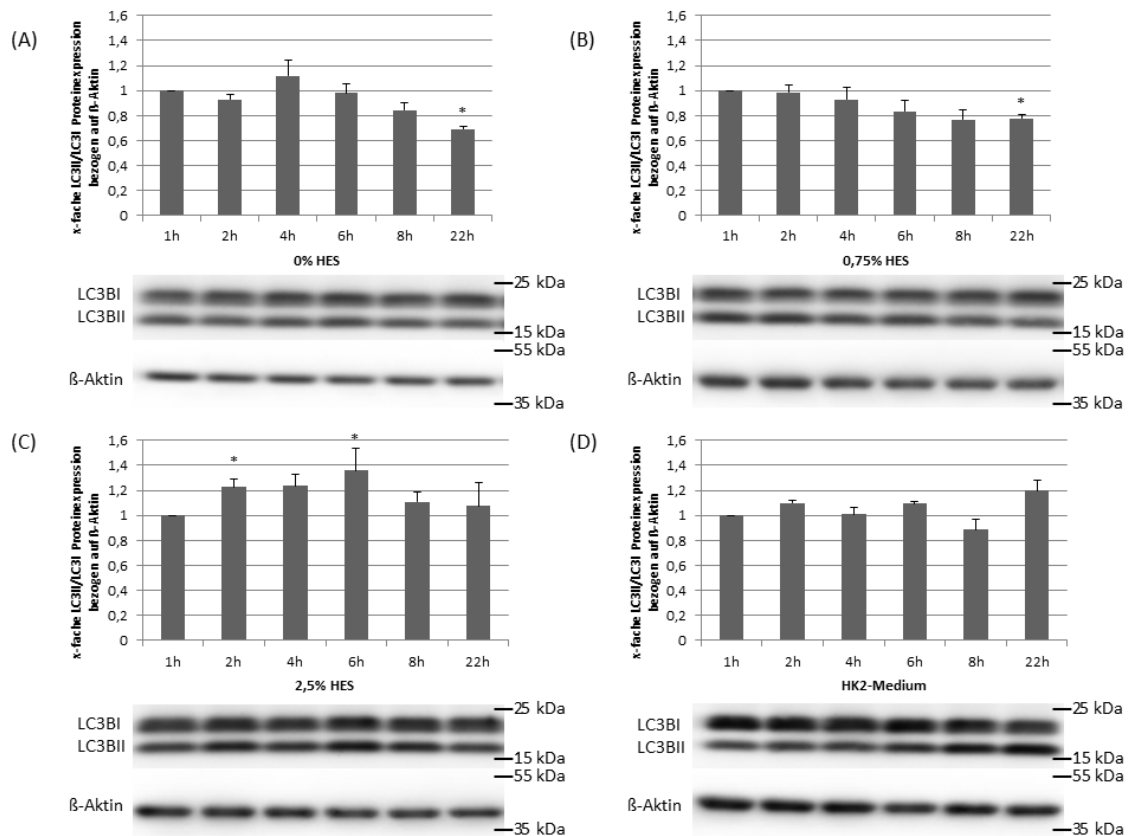


Abbildung 3-12: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten aus LC3BII und LC3BI im zeitlichen Verlauf von einer bis 22 Stunden für (A) 0% HES, (B) 0,75% HES, (C) 2,5% HES und (D) HK2-Medium (= Nährmedium), jeweils normiert auf den Ein-Stunden-Wert. Die untere Proteinbande des Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit beta-Aktin (MW ± SEM, * = $p < 0,05$ zu 1h, $n = 5 - 6$ von drei unabhängigen Experimenten)

Abbildung 3-12 demonstriert die Proteinexpression für den Quotienten aus LC3BII und LC3BI, welche beide Teil des Atg8/LC3-Konjugations-/Deconjungationssystems sind (siehe Abschnitt 1.6.3). Dabei spricht eine Erhöhung des Quotienten für eine erhöhte Autophagierate. Die 22-Stunden-Werte der 0% HES- und 0,75% HES-Lösung wiesen eine signifikante Reduktion auf $0,69 \pm 0,05$ SD beziehungsweise $0,78 \pm 0,07$ SD auf, wobei eine generelle Tendenz zu niedrigeren Werten im zeitlichen Verlauf zu sehen war. Im Gegensatz dazu waren für die 2,5% HES-Lösung der 2-Stunden-Wert auf $1,23 \pm 0,16$ SD und der 6-Stunden-Wert auf $1,36 \pm 0,44$ SD signifikant erhöht. Die übrigen Werte der 2,5% HES-Lösung sowie der Nährlösung wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

3 Ergebnisse

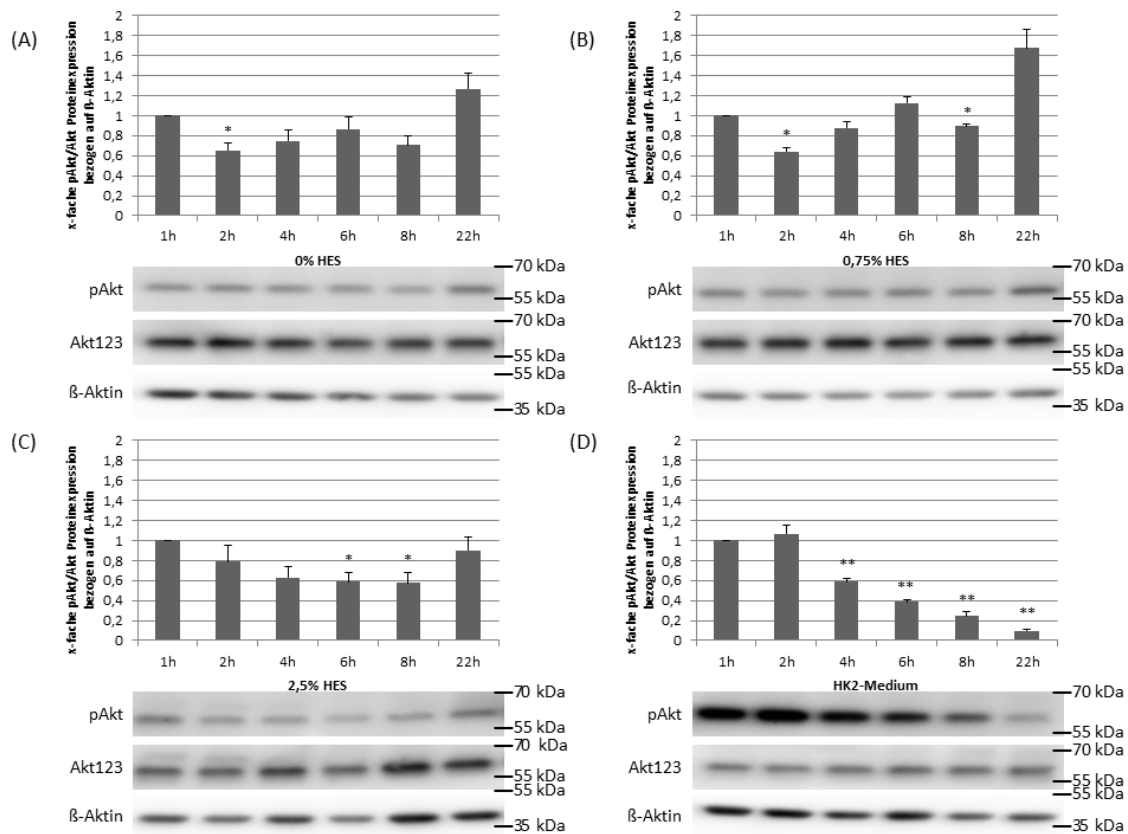


Abbildung 3-13: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten aus pAkt und Akt123 im zeitlichen Verlauf von einer bis 22 Stunden für (A) 0% HES, (B) 0,75% HES, (C) 2,5% HES und (D) HK2-Medium (= Nährmedium), jeweils normiert auf den Ein-Stunden-Wert. Die untere Proteinbande des Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit beta-Aktin (MW ± SEM, * = $p < 0,05$ zu 1h, ** = $p < 0,001$ zu 1h, $n = 5 - 6$ von drei unabhängigen Experimenten)

Abbildung 3-13 stellt nach dem initial in diesem Kapitel beschriebenen Schema die Werte für den Quotienten aus phosphoryliertem Akt (pAkt) sowie Akt1/2/3 dar. Dabei führt eine Verringerung des Quotienten indirekt über die geringere Aktivierung des mTOR-Komplexes zu einer Zunahme der Autophagierate und vice versa. Zum einen wiesen die 2-Stunden-Werte von 0% HES und 0,75% HES eine signifikante Reduktion auf $0,66 \pm 0,18$ SD beziehungsweise $0,64 \pm 0,10$ SD auf. Auch der 8-Stunden-Wert war für 0% HES tendenziell niedriger mit $0,71 \pm 0,23$ SD. Signifikant erniedrigt waren ebenfalls die 8-Stunden-Werte von 0,75% HES mit $0,89 \pm 0,04$ SD sowie der 6-Stunden- und 8-Stunden-Wert der 2,5% HES-Lösung mit $0,59 \pm 0,21$ SD beziehungsweise $0,58 \pm 0,24$ SD. Zum anderen wiesen bei allen drei Lösungen die 22-Stunden-Werte eine tendenzielle Erhöhung auf. Die Werte für die Nährmedium-Zeitreihe zeigten hingegen

3 Ergebnisse

ab dem 4-Stunden-Wert bis zum Zeitpunkt 22 Stunden eine hochsignifikante Reduktion, letzterer auf zirka $0,1 \pm 0,03$ SD.

Insgesamt ließ sich für die HES-Reihen eine zumeist signifikante Reduktion des Quotienten der Proteinexpression von pAkt und Akt1/2/3 feststellen, was auf eine vermehrte Autophagierate hinweist, was für die 22-Stunden-Werte nicht mehr zutrifft. Dies ist in Einklang mit dem von Liu *et al.* beobachteten Maximum der perinukleären Lysosomenakkumulation nach 8 Stunden Inkubation (Liu, Luo *et al.* 2014). Die im zeitlichen Verlauf starke Reduktion im Nährmedium könnte die Folge eines zunehmenden Verbrauchs von Wachstumsfaktoren sein, welche im Vergleich zu den anderen Lösungsansätzen im Nährmedium überproportional vorhanden sind.

3 Ergebnisse

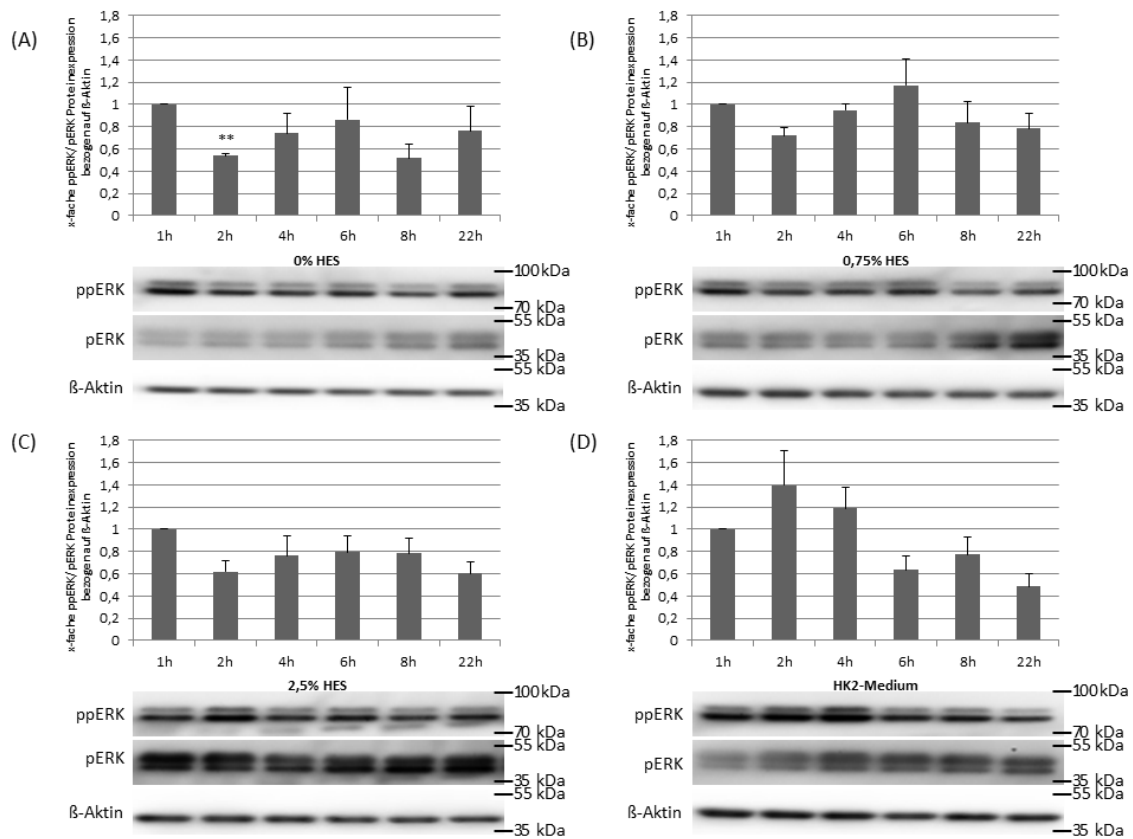


Abbildung 3-14: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten aus ppERK und pERK im zeitlichen Verlauf von einer bis 22 Stunden für (A) 0% HES, (B) 0,75% HES, (C) 2,5% HES und (D) HK2-Medium (= Nährmedium), jeweils normiert auf den Ein-Stunden-Wert. Die untere Proteinbande des Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit beta-Aktin (MW ± SEM, ** = $p < 0,001$ zu 1h, $n = 5 - 6$ von drei unabhängigen Experimenten)

Der Quotient aus ppERK und pERK beeinflusst direkt die Aktivierung von Beclin1, welches Teil des PI3K-Komplexes ist, der wiederum Bestandteil der „Autophagy core machinery“ ist (siehe Abschnitt 1.6.3). Eine Erhöhung des Quotienten führt hierbei indirekt zu einer steigenden Autophagierate. Abbildung 3-14 demonstriert, dass lediglich der 2-Stunden-Wert für die 0% HES-Lösung eine hochsignifikante Reduktion auf $0,54 \pm 0,04$ SD aufwies, was für eine verminderte Autophagierate sprechen könnte. Alle anderen Werte waren unter anderem aufgrund der hohen Standardfehler statistisch nicht signifikant.

3 Ergebnisse

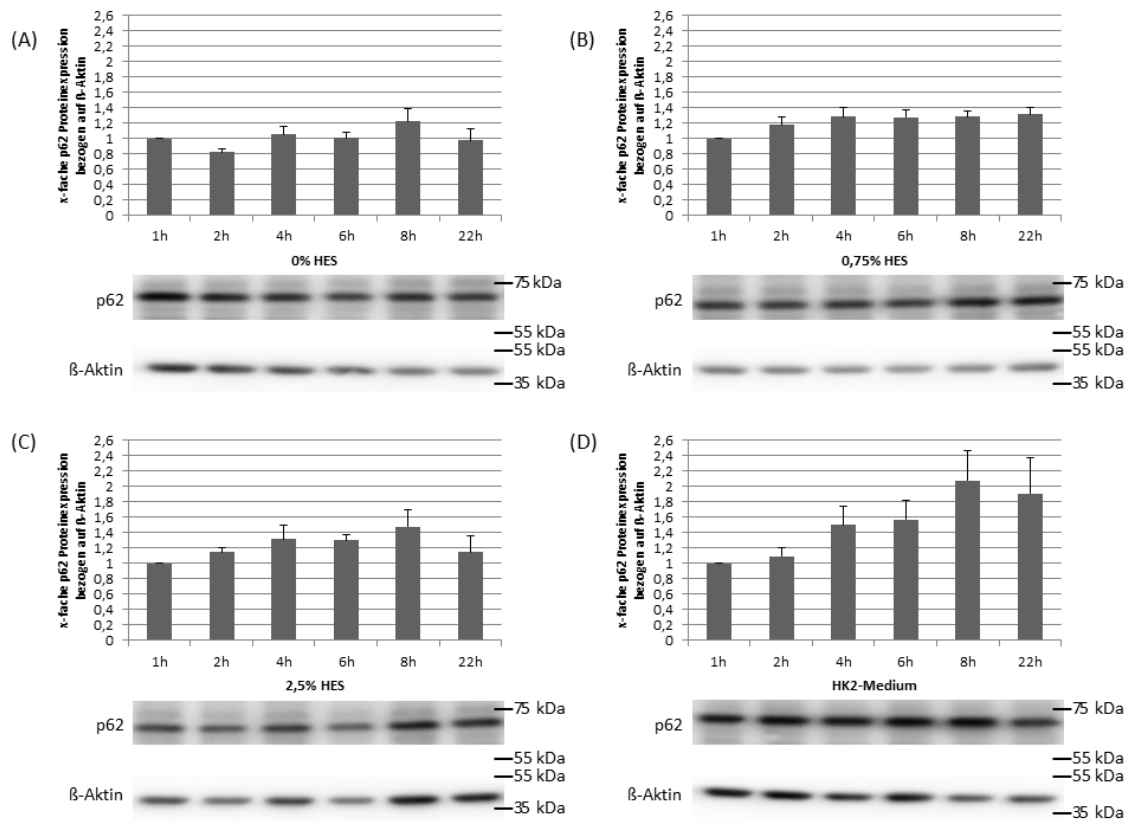


Abbildung 3-15: Westernblotanalyse der Proteinexpression von p62 (= SQSTM1) im zeitlichen Verlauf von einer bis 22 Stunden für (A) 0% HES, (B) 0,75% HES, (C) 2,5% HES und (D) HK2-Medium (= Nährmedium), jeweils normiert auf den Ein-Stunden-Wert. Die untere Proteinbande des Immunblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit beta-Aktin (MW \pm SEM, n = 5 - 6 von drei unabhängigen Experimenten)

Das Protein p62 (= SQSTM1 = Sequestom1) weist bei vermehrter Autophagie eine geringere Expression auf und dient als Marker der Autophagierate (Liu, Ye *et al.* 2016). Aus Abbildung 3-15 geht hervor, dass die Proteinexpression aller Reihen keine statistisch signifikanten Werte im Vergleich zur Ein-Stunden-Kontrolle aufwies.

Die Ergebnisse dieses Kapitels sprechen insgesamt für einen wenn überhaupt geringen Einfluss von HES im zeitlichen Verlauf bis 22 Stunden auf die Proteinexpression mehrerer zentraler Autophagieproteine. Interessant ist vorwiegend die zumeist signifikante Reduktion des Quotienten von pAkt und Akt1/2/3 nach acht Stunden Inkubation sowie dessen starke zeitabhängige Reduktion für das Nährmedium.

3.6 Einfluss verschiedener die Autophagie regulierender Substanzen auf die Zellviabilität

Im Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von HK-2-Zellen mit dem Rapamycin-Derivat und Autophagieinduktor Everolimus zu einer partiellen Aufhebung der Viabilitätsreduktion im EZ4U-Test führte – sowohl nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde als auch nach sieben Stunden. In den folgenden Abschnitten werden die Auswirkungen verschiedener als Induktoren beziehungsweise Hemmer der Autophagie bekannte Substanzen auf mit HES inkubierten Zellen dargestellt. Dabei wurden diese jeweils insgesamt acht Stunden inkubiert – sieben Stunden mit den Substanzen und HES sowie eine Stunde zusätzlich mit dem Reagenz EZ4U.

3.6.1 Rapamycin schwächt die Viabilitätsreduktion durch HES ab

Das makrozyklische Lacton Rapamycin gilt wie dessen Derivat Everolimus als ein Autophagieinduktor, da es den mTOR-Komplex mittels Komplexbildung inhibiert. Im folgenden Versuch wurde dessen Einfluss auf die HES-vermittelte Viabilitätsreduktion untersucht.

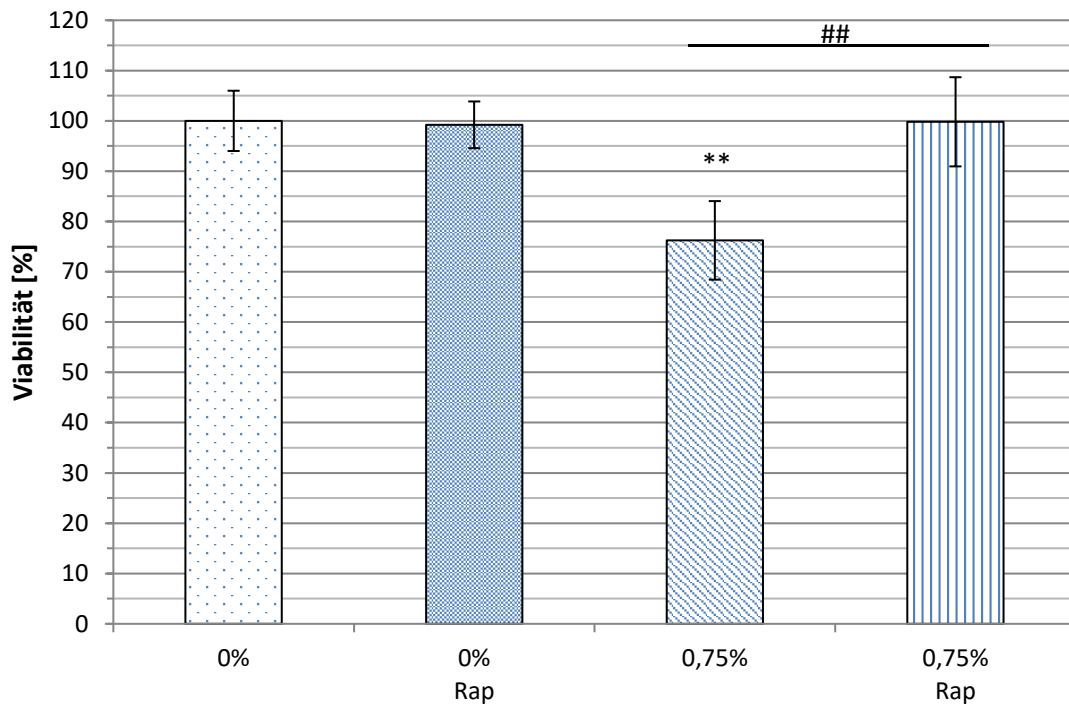


Abbildung 3-16: EZ4U: Einfluss von 30 μ M Rapamycin (Rap) auf die Viabilitätsreduktion durch 0,75% HES nach einer Inkubation von sieben Stunden, Messzeitpunkt nach 60 Minuten (MW \pm SD, ** = $p < 0,001$ zu 0%, ## = $p < 0,001$ gegeneinander, N = 6, n = 16 - 95)

Abbildung 3-16 zeigt verschiedene Lösungsansätze nach einer Inkubation von sieben Stunden. Zunächst ist ersichtlich, dass die Zugabe von 30 μ M Rapamycin zu einer 0%-Lösung die Zellviabilität mit $99,21\% \pm 4,65\%$ SD im Vergleich zur Kontrolllösung nicht signifikant veränderte. Ebenso ließ sich eine zu erwartende Viabilitätsreduktion auf $76,24\% \pm 7,81\%$ SD durch 0,75% HES reproduzieren. Eine Koinkubation mit 30 μ M Rapamycin führte zu einer zu 0,75% HES hochsignifikanten Viabilitätssteigerung mit $99,81\% \pm 8,87\%$ SD auf dem Niveau der Kontrolllösung. Dieses Ergebnis verstärkt die Vermutung, dass HES über den Autophagiezyklus in seiner zellschädigenden Wirkung geschwächt werden kann.

3 Ergebnisse

3.6.2 U0126 blockt den Effekt von Everolimus

Falls die in den vorangegangenen Abschnitten gemessene partielle Aufhebung der HES-vermittelten Viabilitätsreduktion durch die Autophagieinduktoren Everolimus und Rapamycin auf eine Steigerung der Flussrate des Autophagiezyklus beruht, sollte diese theoretisch durch eine Blockade distal mTOR gelegener Enzyme blockiert werden können. Exemplarisch soll dies an dem MAP-Kinase-Kinase-Blocker U0126 demonstriert werden, welcher MEK1/2 und in weiterer Folge ppERK inhibiert, wodurch Beclin1 gehemmt wird, welches Bestandteil des PI3K-Komplexes ist (siehe Abschnitt 1.6.3).

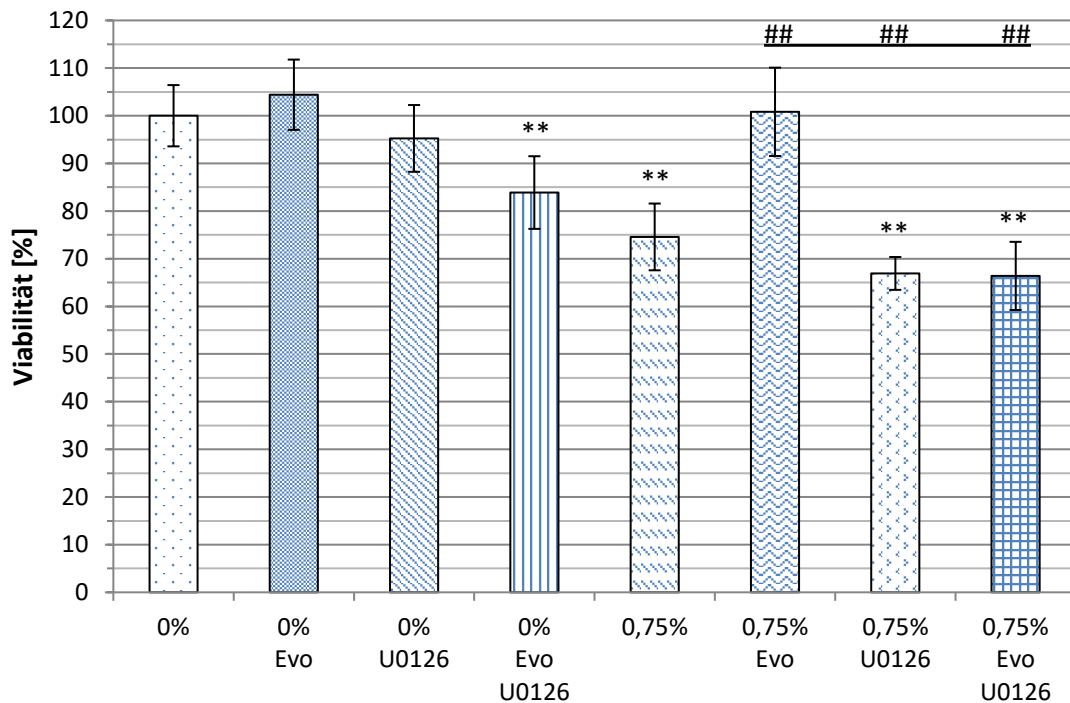


Abbildung 3-17: EZ4U: Einfluss von jeweils 30 μM Everolimus (Evo) sowie 30 μM U0126 und deren Kombination auf die Zellviabilität nach sieben Stunden Inkubation, Messzeitpunkt nach 60 Minuten bei verschiedenen HES-Konzentrationen (MW ± SD, ** = p < 0,001 zu 0%, ## = p < 0,001 zu 0,75% HES, N = 8, n = 16 - 128)

Abbildung 3-17 stellt die Auswirkungen von 30 μM Everolimus sowie 30 μM U0126 beziehungsweise deren Kombination zusammen mit 0% HES beziehungsweise 0,75% HES auf die Zellviabilität dar. Zunächst ließ sich eine geringe nicht signifikante Viabilitätserhöhung für die mit Everolimus koinkubierte 0%-Lösung auf 104,41% ± 7,37% SD sowie eine nicht signifikante Viabilitätsreduktion für die mit U0126 koinkubierte 0% Lösung auf 95,24% ± 7,01% SD feststellen. Erstaunlicherweise wurde

3 Ergebnisse

die Zellviabilität bei Kombination beider Substanzen mit 0% HES hochsignifikant auf $83,88\% \pm 7,62\%$ SD reduziert. Wie bereits in Versuchen gezeigt, führte auch hier 0,75% HES zu einer zur Kontrollgruppe hochsignifikanten Viabilitätsreduktion auf $74,57\% \pm 7,01\%$ SD, welche zusammen mit Everolimus jedoch mit $100,82\% \pm 9,27\%$ SD vollständig aufgehoben wurde. Im Vergleich zu 0,75% HES führte deren Kombination mit U0126 aber zu einer weiteren hochsignifikanten Minderung der Viabilität von $74,57\% \pm 7,01\%$ SD auf $66,91\% \pm 3,45\%$ SD. Auch eine Kombination von Everolimus mit U0126 und 0,75% HES reduzierte die Zellviabilität im Vergleich zu 0,75% HES auf $66,39\% \pm 7,15\%$ SD hochsignifikant.

Zusammengefasst zeigt sich ein die Zellviabilität signifikant reduzierender Effekt durch U0126, welcher die Viabilitätserhöhung von Everolimus vollständig kompensiert.

3.6.3 Chloroquin führt zu einer geringgradigen Viabilitätserhöhung

Chloroquin hemmt die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom und greift somit am Ende des Autophagiezyklus als Inhibitor ein.

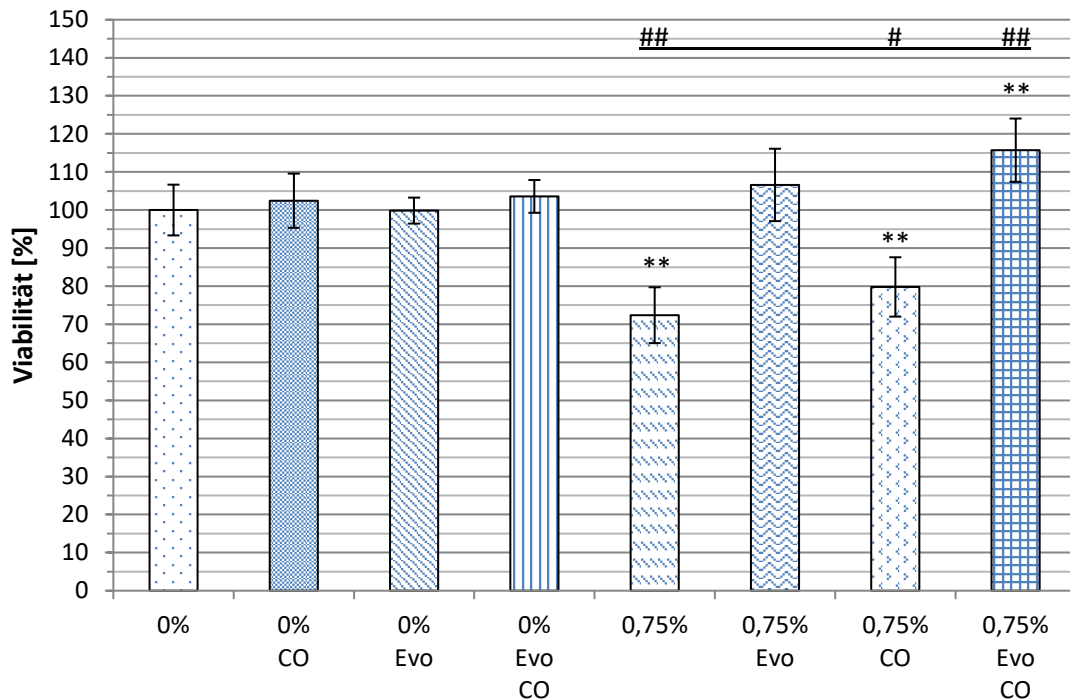


Abbildung 3-18: EZ4U: Einfluss von jeweils 30 μ M Everolimus (Evo) sowie 30 μ M Chloroquin (CO) und deren Kombination auf die Zellviabilität nach sieben Stunden Inkubation, Messzeitpunkt nach 60 Minuten bei verschiedenen HES-Konzentrationen (MW \pm SD, ** = $p < 0,001$ zu 0%, # = $p < 0,05$ zu 0,75%, ## = $p < 0,001$ zu 0,75%, N = 6, n = 15 – 96)

In Abbildung 3-18 zeigten zunächst die 0%-Lösungen, welche mit 30 μ M Chloroquin beziehungsweise 30 μ M Everolimus oder deren Kombination versetzt wurden, keinen signifikanten Unterschied zur 0%-Kontrollgruppe. Dabei wies die Gruppe mit Chloroquin eine Zellviabilität von 102,44% \pm 7,12% SD, die Gruppe mit Everolimus 99,85% \pm 3,41% SD und deren Kombination 103,58% \pm 4,31% SD auf. Die bekannte hochsignifikante Viabilitätsreduktion bei 0,75% HES belief sich in diesem Versuch auf 72,38% \pm 7,34% SD, deren Aufhebung durch Zusatz von 30 μ M Everolimus auf 106,59% \pm 9,51% SD. Interessant ist, dass die Zugabe von Chloroquin zu 0,75% HES im Vergleich zur reinen 0,75% HES-Lösung eine signifikante Viabilitätssteigerung von 72,38% \pm 7,34% SD auf 79,79% \pm 7,80% SD bewirkte, die Kombination von Chloroquin und Everolimus eine Steigerung auf 115,72% \pm 8,31% SD. Die Viabilität letzterer Lösung lag

3 Ergebnisse

zwar 9,13% über der 0,75%-HES-Lösung mit Everolimus, diese Differenz ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Somit scheint Chloroquin die Zellviabilitätsreduktion unter 0,75% HES leicht zu vermindern.

3.6.4 Perifosin reduziert die Zellviabilität konzentrationsabhängig

Perifosin agiert als direkter und indirekter Hemmer des mTORC1-Komplexes und führt so theoretisch zu einer Induktion der Autophagie. Gleichzeitig kommt es insbesondere in Zellen mit einer hohen Proliferationsrate wie Tumorzellen zu einer Induktion der Apoptose, da unter anderem die Phosphatidylcholin-Biosynthese gehemmt wird (Fensterle, Aicher *et al.* 2014).

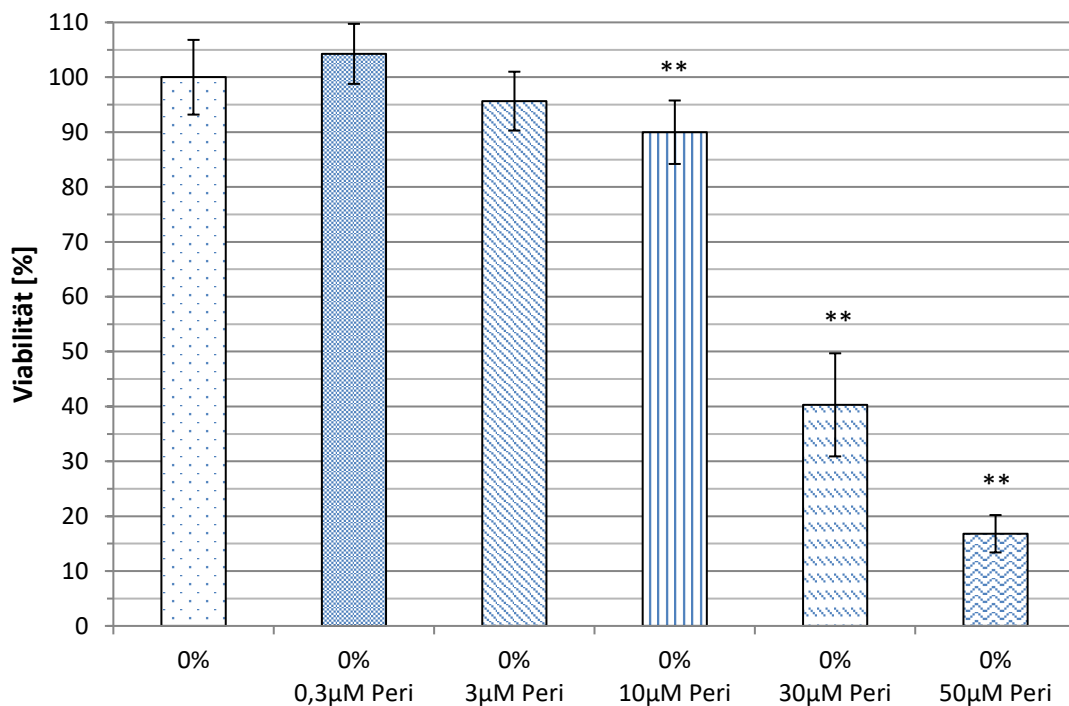


Abbildung 3-19: EZ4U: Einfluss von Perifosin (Peri) in aufsteigender Konzentration auf die Zellviabilität nach sieben Stunden Inkubation unter 0% HES, Messzeitpunkt nach 60 Minuten (MW \pm SD, ** = $p < 0,001$ zu 0%, N = 6, n = 16 - 96)

Abbildung 3-19 zeigt die Zellviabilität mehrerer 0%-Lösungen nach siebenstündiger Inkubation, welche mit Perifosin in Konzentrationen von 0,3 μ M bis 50 μ M versetzt wurden. Im Vergleich zur 0%-Kontrollgruppe führte die Zugabe von 0,3 μ M Perifosin zu einer geringen Viabilitätserhöhung auf 104,26% \pm 5,47% SD, 3 μ M Perifosin zu einer

3 Ergebnisse

ebenfalls nicht signifikante Viabilitätsreduktion auf $95,65\% \pm 5,36\%$ SD. Hochsignifikant war die Viabilitätsreduktion für $10\ \mu\text{M}$ Perifosin auf $90,00\% \pm 5,78\%$ SD, für $30\ \mu\text{M}$ auf $40,29\% \pm 9,39\%$ SD und für $50\ \mu\text{M}$ Perifosin schließlich auf $16,80\% \pm 3,41\%$ SD. Somit zeigte sich eine konzentrationsabhängige starke Viabilitätsreduktion bereits ohne Zugabe von HES. In einem weiteren Versuch wurde diese Konzentrationsreihe mit $0,75\%$ HES kokubiert, wie im Folgenden dargestellt.

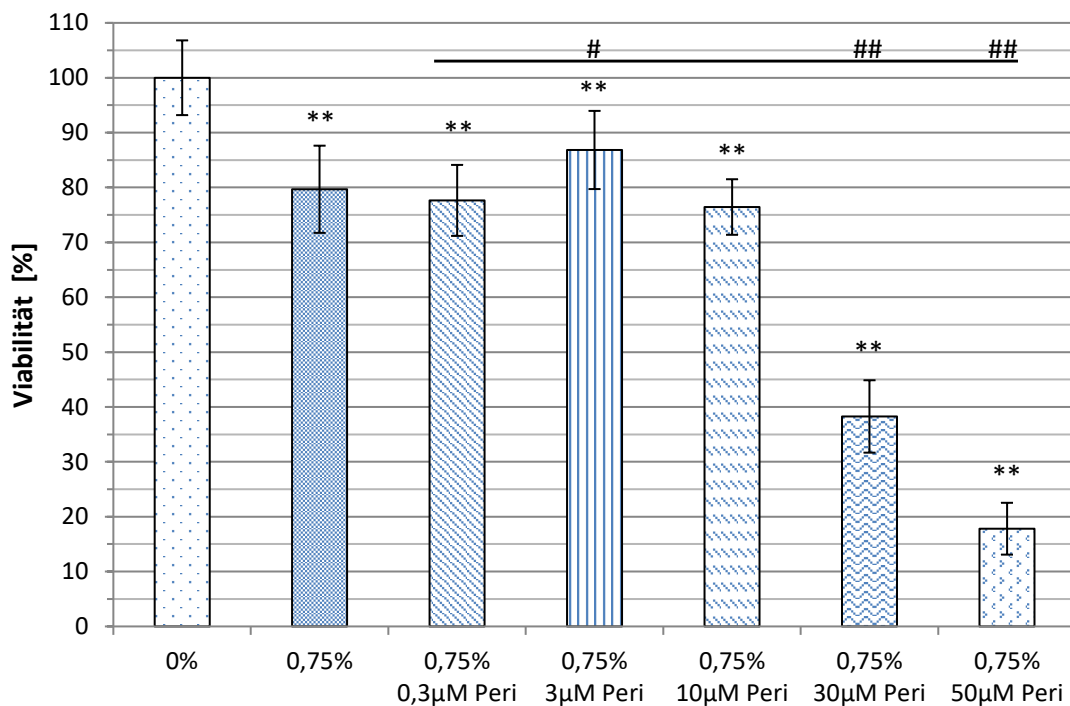


Abbildung 3-20: EZ4U: Einfluss von Perifosin (Peri) in aufsteigender Konzentration auf die Zellviabilität nach sieben Stunden Inkubation unter $0,75\%$ HES, Messzeitpunkt nach 60 Minuten (MW \pm SD, ** = $p < 0,001$ zu 0% , # = $p < 0,05$ zu $0,75\%$ HES, ## = $p < 0,001$ zu $0,75\%$ HES, N = 6, n = 16 - 96)

Abbildung 3-20 stellt zunächst eine hochsignifikante Viabilitätsreduktion für $0,75\%$ HES auf $79,68\% \pm 7,94\%$ SD dar. Im Vergleich dazu war eine Kombination von $0,75\%$ HES mit $0,3\ \mu\text{M}$ Perifosin ohne signifikante Änderung mit $77,64\% \pm 6,47\%$ SD, $3\ \mu\text{M}$ Perifosin erhöhte die Viabilität signifikant auf $86,84\% \pm 7,12\%$ SD, $10\ \mu\text{M}$ Perifosin wiederum ließ die Viabilität annähernd unverändert mit $76,44\% \pm 5,07\%$ SD. Erst die höheren Konzentrationen von Perifosin in Kombination mit $0,75\%$ HES reduzierten die Viabilität hochsignifikant auf $38,27\% \pm 6,60\%$ SD bei $30\ \mu\text{M}$ und auf $17,81\% \pm 4,72\%$ SD bei $50\ \mu\text{M}$.

3 Ergebnisse

Insgesamt führte Perifosin unabhängig von HES zu einer konzentrationsabhängigen hochsignifikanten Viabilitätsreduktion ab 10 μM , wobei Konzentrationen von 0,3 μM bis 50 μM untersucht wurden. Eine Verbesserung der Zellviabilität konnte lediglich in geringem Maße mit 3 μM Perifosin gemessen werden als möglicher Hinweis auf eine Autophagieinduktion.

3.6.5 3-Methyladenin erhöht die Zellviabilität unabhängig von HES konzentrationsabhängig

Der Substanz 3-Methyladenin (3-MA) wird eine duale Rolle in Bezug auf die Autophagie zugeschrieben. Zum einen wirkt sie unter Nährstoffmangel vorübergehend hemmend, indem sie die PI3K-III-Kinase inhibiert. Zum anderen wurde unter nährstoffreichen Bedingungen eine Induktion der Autophagie über einen längeren Zeitraum bis zu neun Stunden beobachtet (Wu, Tan *et al.* 2010).

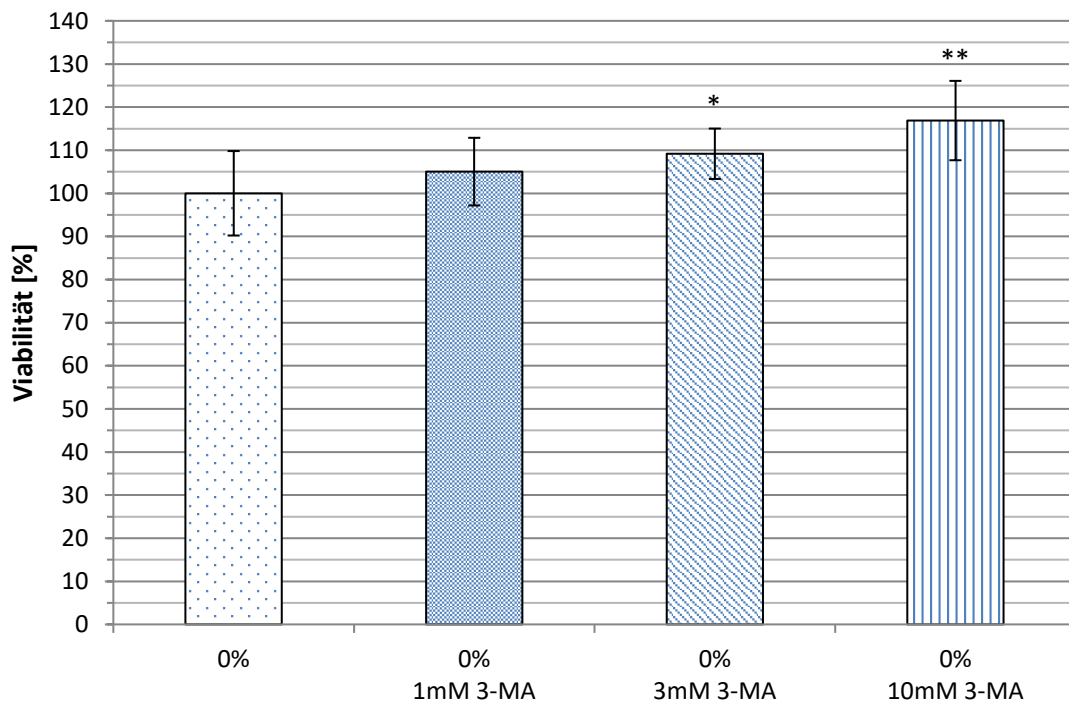


Abbildung 3-21: EZ4U: Einfluss von 3-Methyladenin (3-MA) verschiedener Konzentration unter 0% HES nach sieben Stunden Inkubation, Messzeitpunkt nach 60 Minuten (MW ± SD, * = $p < 0,05$ zu 0%, ** = $p < 0,001$ zu 0%, N = 1, n = 15 - 16)

Abbildung 3-21 stellt jeweils 0%-Lösungen dar, wobei im Vergleich zur 0%-Kontrollgruppe ein kontinuierlicher Viabilitätsanstieg unter Zugabe von 3-Methyladenin (3-MA) steigender Konzentration ersichtlich wird. Die Zugabe von 1 mM 3-MA bewirkte einen noch geringen, nicht signifikanten Viabilitätsanstieg auf $105,02\% \pm 7,85\%$ SD, 3 mM 3-MA bereits einen signifikanten Anstieg auf $109,17\% \pm 5,84\%$ SD und 10 mM 3-MA letztendlich einen hochsignifikanten Viabilitätszuwachs auf $116,87\% \pm 9,20\%$ SD.

3 Ergebnisse

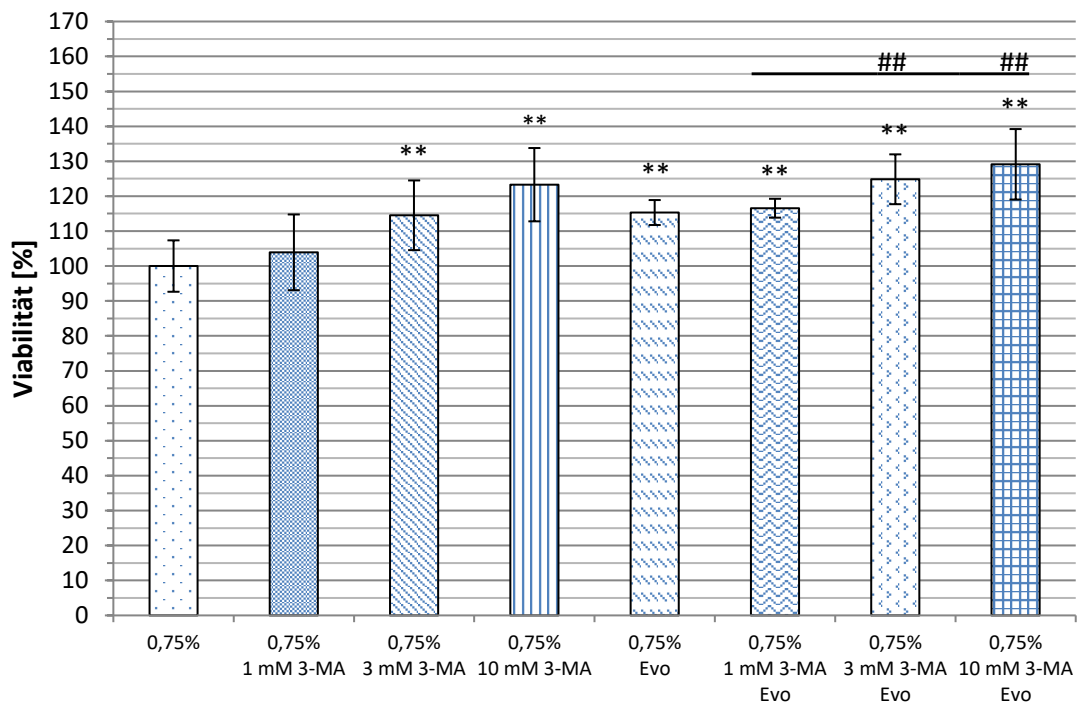


Abbildung 3-22: EZ4U: Einfluss von 3-Methyladenin (3-MA) aufsteigender Konzentration sowie 30 μ M Everolimus (Evo) bei 0,75% HES nach sieben Stunden Inkubation, Messzeitpunkt nach 60 Minuten (MW \pm SD, ** = $p < 0,001$ zu 0,75%, ## = $p < 0,001$ zu 0,75% + Evo, N = 4, n = 15 - 63)

In einem weiteren Versuch wurde 3-MA in aufsteigender Konzentration von 1 mM bis 10 mM ohne sowie mit 30 μ M Everolimus jeweils in einer 0,75%-HES-Lösung über sieben Stunden inkubiert. Die Zellviabilität der einzelnen Gruppen zum Messzeitpunkt 60 Minuten ist in Abbildung 3-22 dargestellt. Dabei werden nur die Effekte von 3-MA auf 0,75% HES gezeigt. Wie in dem zuvor erörterten Versuch ließ sich unabhängig von den koinkubierten Stoffen eine geringe konzentrationsabhängige Viabilitätssteigerung durch 3-MA feststellen. So führte die alleinige Zugabe von 1 mM 3-MA zu 0,75% HES im Vergleich zur Kontrollgruppe lediglich zu einer geringen Viabilitätserhöhung von 3,93% auf 103,93% \pm 10,84% SD. Bei 3 mM 3-MA war die Steigerung jedoch bereits hochsignifikant auf 114,53% \pm 9,97% SD, 10 mM 3-MA ergaben eine Zellviabilität von 123,29% \pm 10,49% SD in Bezug zur Kontrollgruppe. Unter Zugabe von 30 μ M Everolimus ergab sich wie zu erwarten eine hochsignifikante Viabilitätszunahme von 15,32% auf 115,32% \pm 3,57% SD. Wurde dieser Lösung 3-MA in einer Konzentration von 1 mM hinzugegeben, war lediglich eine geringe Viabilitätszunahme von 1,23% auf 116,55% \pm 2,70% SD festzustellen. Unter 3 mM 3-MA zeigte sich jedoch eine

3 Ergebnisse

hochsignifikante Steigerung um 9,52% auf $124,84\% \pm 7,13\%$ SD, 10 mM 3-MA bewirkten eine höhere Steigerung von 13,81% auf $129,13\% \pm 10,09\%$ SD.

Zusammenfassend zeigte sich unabhängig von HES eine geringe konzentrationsabhängige Viabilitätssteigerung durch 3-MA, wobei signifikante Unterschiede ab einer Konzentration von 3 mM auftraten.

3.6.6 Resveratrol führt zu einer geringfügigen Viabilitätsreduktion

Resveratrol wird in der Literatur als ein Polyphenol beschrieben, welches ähnlich 3-Methyladenin je nach Bedingung eine Induktion oder eine Hemmung der Autophagie bewirken kann. So soll eine längere Inkubation unter nährstoffreichen Bedingungen zu einer Induktion, eine kurzfristige Inkubation unter nährstoffarmen Bedingungen jedoch zu einer Inhibition führen, wie bereits in Abschnitt 1.6.4 auf Seite 22 beschrieben.

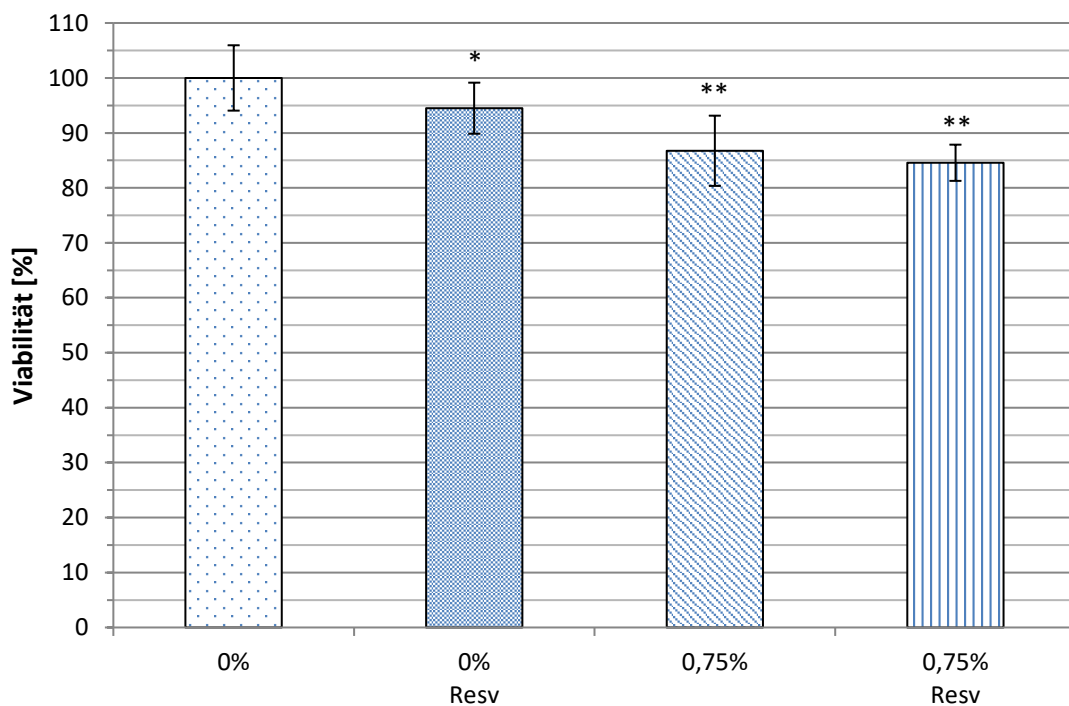


Abbildung 3-23: EZ4U: Einfluss von 30 μ M Resveratrol (Resv) auf die HES-induzierte Zellviabilitätsreduktion nach sieben Stunden Inkubation, Messzeitpunkt nach 60 Minuten (MW \pm SD, * = $p < 0,05$ zu 0%, ** = $p < 0,001$ zu 0%, N = 3, n = 16 - 47)

Aus Abbildung 3-23 wird ersichtlich, dass sich im EZ4U nach siebenstündiger Inkubation die Zellviabilität unter Zugabe von 30 μ M Resveratrol im Vergleich zur 0%-Kontrollgruppe signifikant auf $94,49\% \pm 4,65\%$ SD verringerte. Ebenso zeigte eine

3 Ergebnisse

0,75%-HES-Lösung eine Viabilitätsreduktion auf $86,74\% \pm 6,39\%$ SD. Wurde dieser jedoch ebenfalls $30 \mu\text{M}$ Resveratrol hinzugegeben, ließ sich mit $84,56\% \pm 3,30\%$ SD kein signifikanter Unterschied zu 0,75% HES feststellen.

Zusammenfassend bewirkte Resveratrol unter den beschriebenen Versuchsbedingungen lediglich eine geringe, unter 0% HES signifikante Viabilitätsreduktion. Eine Viabilitätssteigerung konnte nicht festgestellt werden.

3.7 Auswirkungen von Modulatoren auf die Expression zentraler Autophagieproteine unter Koinkubation mit HES

Im vorangegangenen Kapitel wurden mehrere Substanzen, welche für eine die zelluläre Autophagie modulierende Funktion bekannt sind, auf ihre Wirkung auf die Zellviabilität in Kombination mit HES untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Effekte beobachtet.

Im Folgenden wurde die Proteinexpression zentraler Moleküle der Autophagie nach Inkubation mittels der bereits in den Viabilitätsassays verwendeten Substanzen Everolimus, U0126 und Chloroquin mit jeweils 30 μM , Perifosin mit 5 μM , 3-Methyladenin mit 3 mM sowie deren jeweilige Kombination mit 30 μM Everolimus unter 0,75% HES bezogen auf eine 0%-HES-Kontrolle bestimmt. Dabei wurden die Zellen acht Stunden. Der Zeitraum wurde als geeignet erachtet, da die ausgewählten Zielmoleküle – wie in Abschnitt 3.5 gezeigt – über einen Zeitraum von acht Stunden keine signifikante Änderung ihrer Proteinexpression aufwiesen.

3 Ergebnisse

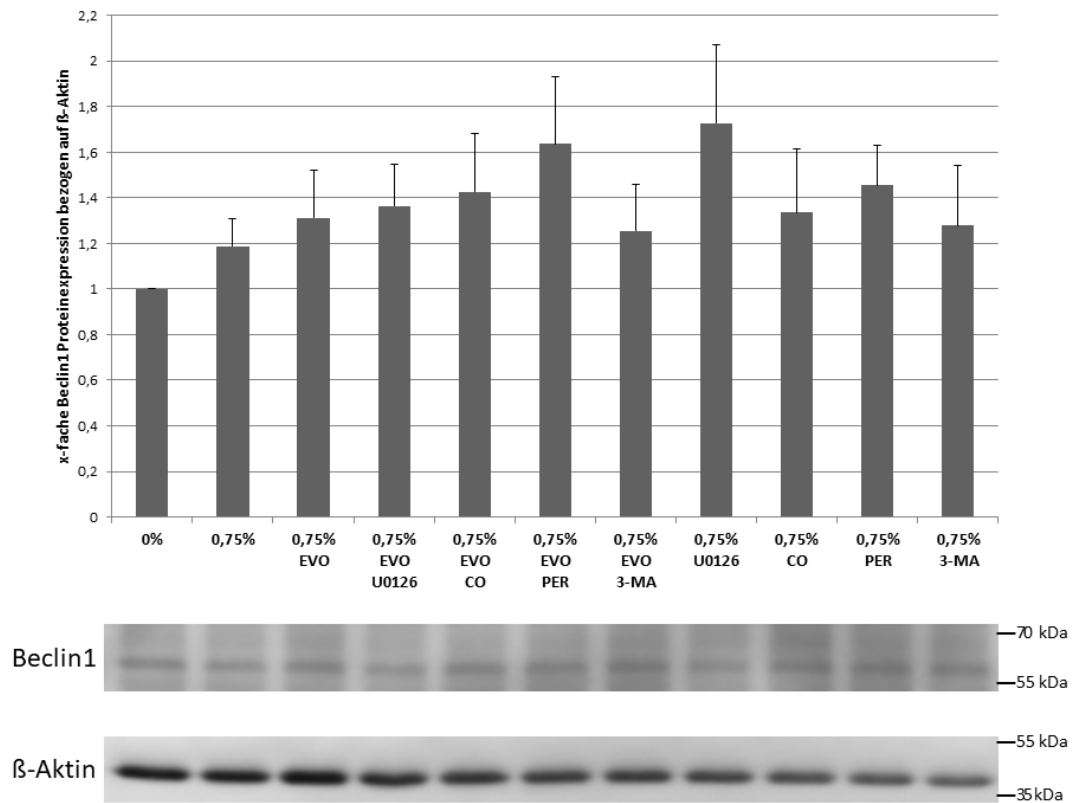


Abbildung 3-24: Westernblotanalyse der Proteinexpression von Beclin1, normiert auf die 0% HES-Kontrolle. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots, wobei die untere Proteinbande des Immunoblots die Ladekontrolle mit beta-Aktin zeigt. EVO = 30 μ M Everolimus; U0126 mit 30 μ M; CO = 30 μ M Chloroquin; PER = 5 μ M Perifosin; 3-MA = 3 mM 3-Methyladenin. (MW \pm SEM, n = 5 - 6 von drei unabhängigen Versuchen)

Abbildung 3-24 stellt die Proteinexpression von Beclin1 verschiedener Lösungen dar. Dabei dient die 0%-HES-Kontrolle als Bezugspunkt für 0,75% HES sowie die Kombination von 0,75% HES mit Everolimus und den oben beschriebenen Substanzen. Dabei konnte jeweils keine signifikante Differenz festgestellt werden.

3 Ergebnisse

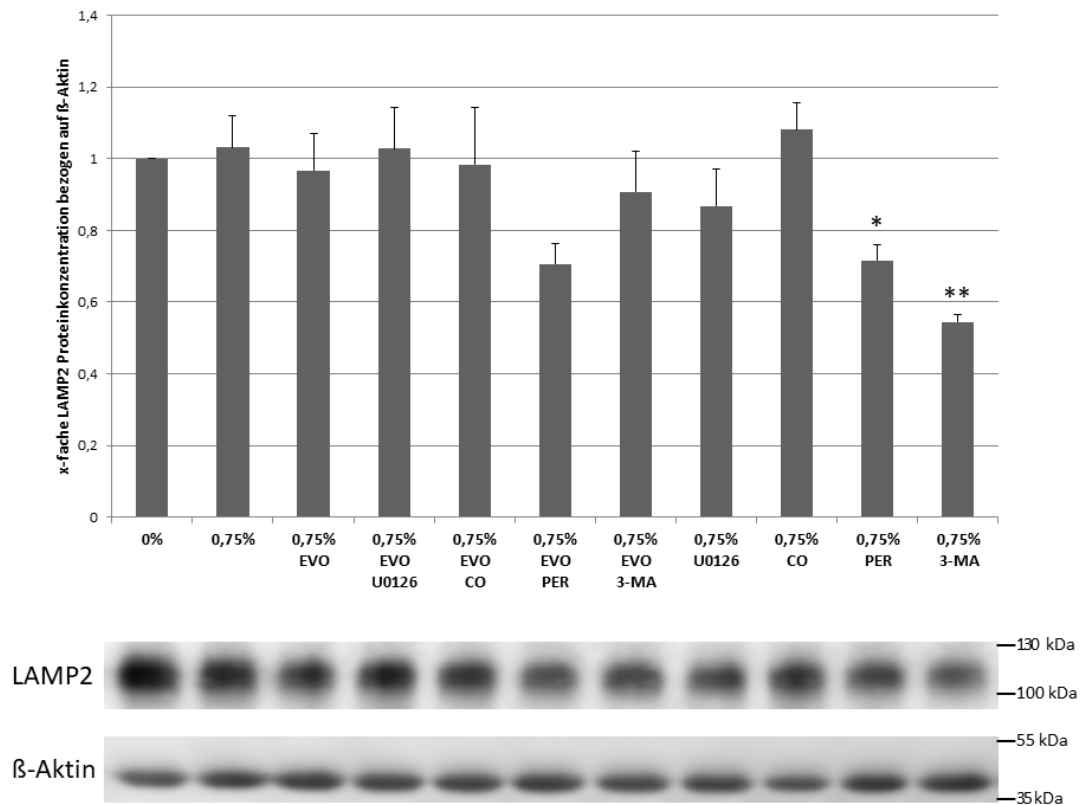


Abbildung 3-25: Westernblotanalyse der Proteinexpression von LAMP2, normiert auf die 0% HES-Kontrolle. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots, wobei die untere Proteinbande des Immunoblots die Ladekontrolle mit beta-Aktin zeigt. EVO = 30 µM Everolimus; U0126 mit 30 µM; CO = 30 µM Chloroquin; PER = 5 µM Perifosin; 3-MA = 3 mM 3-Methyladenin. (MW ± SEM, * = p < 0,05 zu 0% HES, ** = p < 0,001 zu 0% HES, n = 5 - 6 von drei unabhängigen Versuchen)

Aus Abbildung 3-25 ist ersichtlich, dass lediglich die Kombination von 0,75% HES mit Perifosin eine mit $0,72 \pm 0,04$ SD signifikant und 0,75% HES mit 3-Methyladenin eine mit $0,54 \pm 0,02$ SD hochsignifikant verminderte Proteinexpression von LAMP2 in Bezug auf die 0% HES-Kontrolle aufweisen. Tendenziell scheint auch 0,75% HES mit Everolimus und Perifosin auf $0,71 \pm 0,14$ SD reduziert, jedoch ohne Signifikanz. Alle übrigen Lösungsansätze zeigten keinen relevanten Unterschied.

3 Ergebnisse

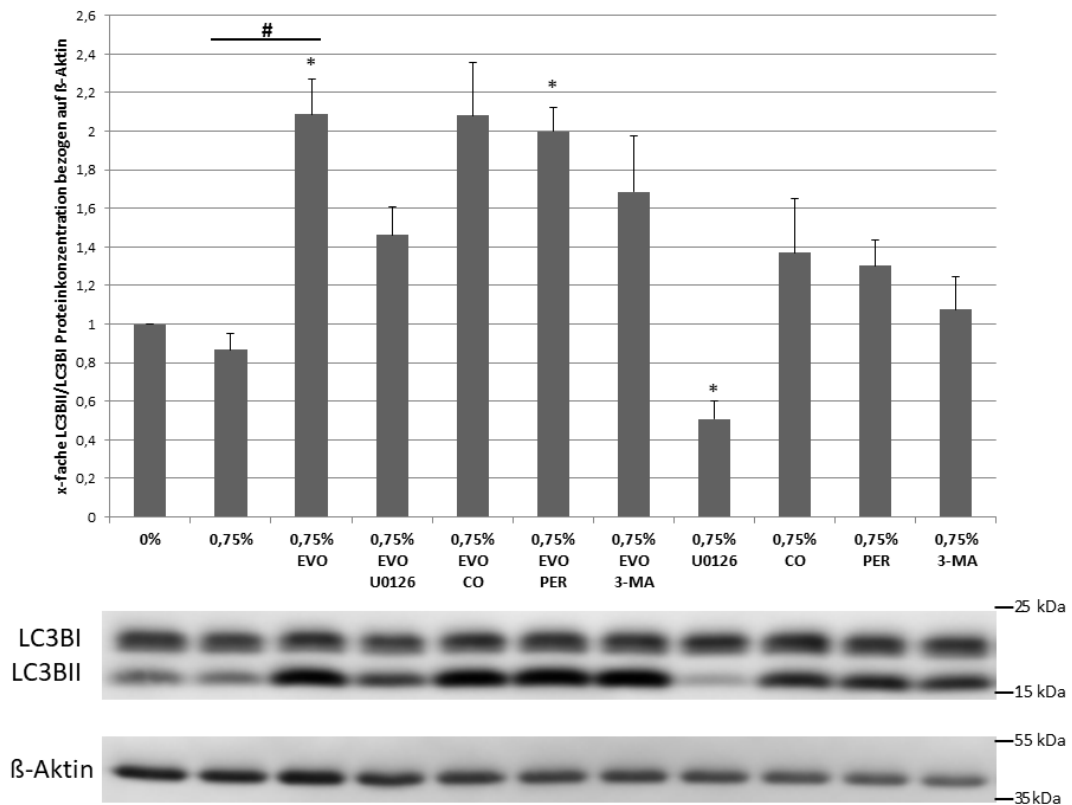


Abbildung 3-26: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten von LC3BII und LC3BI, normiert auf die 0% HES-Kontrolle. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots, wobei die untere Proteinbande des Immunoblots die Ladekontrolle mit beta-Aktin zeigt. EVO = 30 μ M Everolimus; U0126 mit 30 μ M; CO = 30 μ M Chloroquin; PER = 5 μ M Perifosin; 3-MA = 3 mM 3-Methyladenin. (MW \pm SEM, * = $p < 0,05$ zu 0% HES, # = $p < 0,05$ zu 0,75% HES, n = 5 - 6 von drei unabhängigen Versuchen)

Abbildung 3-26 zeigt zunächst eine statistisch signifikante Erhöhung des Quotienten aus LC3BII und LC3BI bei 0,75% HES mit Everolimus auf $2,09 \pm 0,45$ SD im Vergleich zur 0% HES-Kontrolle, was für eine erhöhte Autophagierate spricht. In Kombination mit dem ERK1/2-Blocker U0126 wird diese Erhöhung wieder partiell aufgehoben auf $1,46 \pm 0,37$, was jedoch statistisch nicht signifikant ist. Darüber hinaus führt auch die alleinige Kombination von 0,75% HES mit U0126 zu einer signifikanten Reduktion auf $0,51 \pm 0,23$ SD, jedoch nur in Bezug auf die 0% HES-Kontrolle. Statistisch signifikant erhöht zur Kontrolllösung ist außerdem die Kombination von 0,75% HES mit Everolimus und Perifosin mit $2,00 \pm 0,30$ SD. Dies trifft für 0,75% HES allein nicht zu, welches tendenziell niedriger, aber mit $0,87 \pm 0,20$ SD nicht signifikant ist.

3 Ergebnisse

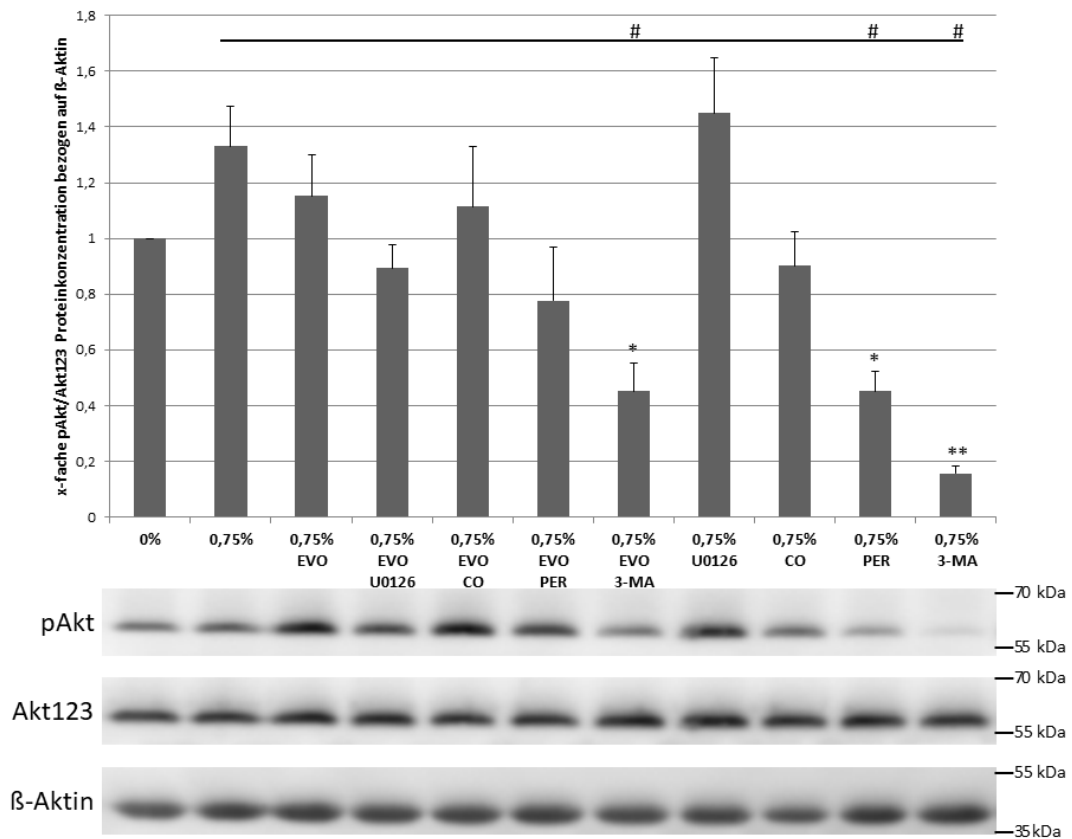


Abbildung 3-27: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten von pAkt und Akt123, normiert auf die 0% HES-Kontrolle. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots, wobei die untere Proteinbande des Immunoblots die Ladekontrolle mit beta-Aktin zeigt. EVO = 30 μ M Everolimus; U0126 mit 30 μ M; CO = 30 μ M Chloroquin; PER = 5 μ M Perifosin; 3-MA = 3 mM 3-Methyladenin. (MW \pm SEM, * = $p < 0,05$ zu 0% HES, ** = $p < 0,001$ zu 0% HES, # = $p < 0,05$ zu 0,75% HES, n = 5 - 6 von drei unabhängigen Versuchen)

Abbildung 3-27 stellt die Proteinexpression des Quotienten aus phosphoryliertem Akt (pAkt) und unphosphoryliertem Akt (Akt1/2/3) dar, wobei pAkt ein direkter Aktivator von mTOR ist. Dabei führt theoretisch Perifosin zu einer direkten und 3-Methyladenin über PI3K-Klasse-I-Kinasen zu einer indirekten Hemmung, das heißt einer geringeren Phosphorylierungsrate. Passend dazu ist die Proteinexpression von 0,75% HES mit Everolimus und 3-Methyladenin sowie die Kombination von 0,75% HES mit Perifosin signifikant, die Kombination von 0,75% HES mit 3-Methyladenin hochsignifikant erniedrigt, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch zu 0,75% HES. Alle übrigen Lösungsansätze weisen keine relevanten Abweichungen auf, insbesondere gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen 0,75% HES und der Kontrollgruppe.

3 Ergebnisse

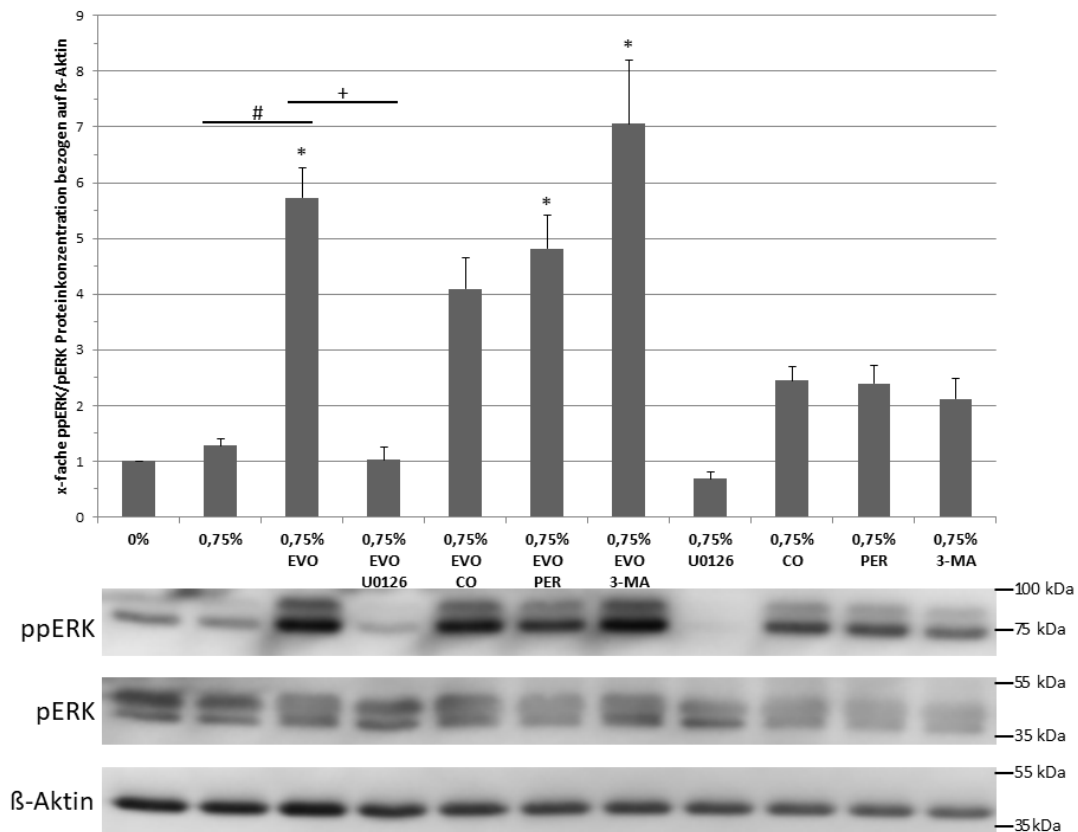


Abbildung 3-28: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten von ppERK und pERK, normiert auf die 0% HES-Kontrolle. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots, wobei die untere Proteinbande des Immunoblots die Ladekontrolle mit beta-Aktin zeigt. EVO = 30 μ M Everolimus; U0126 mit 30 μ M; CO = 30 μ M Chloroquin; PER = 5 μ M Perifosin; 3-MA = 3 mM 3-Methyladenin. (MW \pm SEM, * = $p < 0,05$ zu 0% HES, # = $p < 0,05$ zu 0,75% HES, + = $p < 0,05$ zu 0,75% HES + EVO, n = 5 - 6 von drei unabhängigen Versuchen)

In Abbildung 3-28 ist der Quotient der Proteinexpression von phosphoryliertem ERK (ppERK) und unphosphoryliertem ERK (pERK) dargestellt. Auch hier weist der Lösungsansatz mit 0,75% HES zur 0% HES-Kontrollgruppe keine Signifikanz auf. Statistisch signifikant erhöht zu 0% HES ist aber die Proteinexpression der Lösungsansätze von 0,75% HES und Everolimus, sowie von diesem mit zusätzlich Perifosin beziehungsweise 3-Methyladenin. Auch 0,75% HES mit Everolimus und Chloroquin ist tendenziell mit $4,10 \pm 1,38$ SD erhöht. Der Zusatz von Everolimus führt also zu einer relevanten Erhöhung des Quotienten der Proteinexpression von ppERK und pERK. Dabei besteht eine signifikante Erhöhung von 0,75% HES und Everolimus ebenfalls zu 0,75% HES. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Zugabe von U0126 diesen Effekt wieder vollständig aufhebt. Zu beachten ist weiterhin, dass 0,75% HES mit U0126 ebenfalls im Vergleich zu 0,75% HES allein zu einer Reduktion führt von $1,28 \pm$

3 Ergebnisse

0,27 SD auf $0,69 \pm 0,27$ SD, welche allerdings nicht signifikant ist. Relativ erhöht zu 0,75% HES sind hier noch die Lösungsansätze von 0,75% HES und Chloroquin beziehungsweise Perifosin oder 3-Methyladenin.

3 Ergebnisse

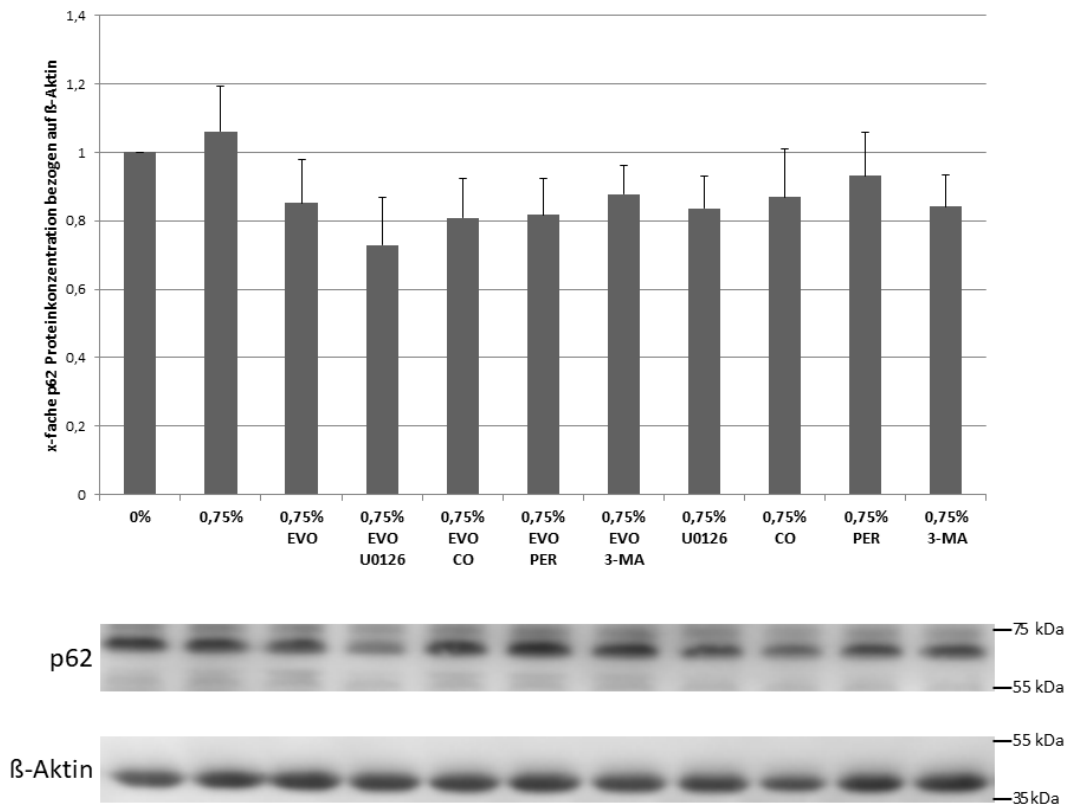


Abbildung 3-29: Westernblotanalyse der Proteinexpression von p62 (= SQSTM1), normiert auf die 0% HES-Kontrolle. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots, wobei die untere Proteinbande des Immunoblots die Ladekontrolle mit beta-Aktin zeigt. EVO = 30 μ M Everolimus; U0126 mit 30 μ M; CO = 30 μ M Chloroquin; PER = 5 μ M Perifosin; 3-MA = 3 mM 3-Methyladenin. (MW \pm SEM, n = 5 – 6 von drei unabhängigen Versuchen)

Aus Abbildung 3-29 ist ersichtlich, dass zwischen den einzelnen Gruppen in Bezug auf die Proteinexpression von p62 (= SQSTM1 = Sequestom1) keine statistisch signifikanten Unterschiede bestehen.

4 Diskussion

Hydroxyethylstärke (HES), ein seit Jahrzehnten etabliertes und in Deutschland lange Zeit das am meisten verwendete synthetische Kolloid, welches unter anderem als akuter Volumenersatz bei Blut- oder Plasmaverlust, schwerer Exsikkose oder hypovolämisch-hämorrhagischem Schock eingesetzt wurde, steht seit einigen Jahren im Verdacht, eine relevante Rate nephrotoxischer Nebenwirkungen aufzuweisen (Myburgh, Finfer *et al.* 2012, Perner, Haase *et al.* 2012). Der zugrunde liegende Mechanismus ist dabei jedoch bis heute weitestgehend unbekannt.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass HES der 3. Generation in renalen proximalen Tubuluszellen der septischen Ratte sowohl morphologische als auch funktionelle Schäden induzierte (Schick, Isbary *et al.* 2010). Dabei wurden histopathologisch große Mengen intrazellulärer Vesikel im Zytoplasma nachgewiesen, welche vermutlich akkumulierten HES-Molekülen entsprechen, wie fluoreszenzmikroskopisch mittels ATPS-markiertem HES *in vitro* demonstriert wurde (Neuhaus, Schick *et al.* 2012, Bruno 2015). Der genaue Mechanismus der intrazellulären Aufnahme ist bis heute unbekannt. Vermutet wird jedoch, dass dies mittels Pinozytose, einer unspezifischen Unterform der Endozytose ohne Beteiligung von Rezeptoren, geschieht (Wiedermann and Joannidis 2014). Dies führt zu einer Zellschwellung, welche allgemein als osmotische Nephrose bezeichnet und prinzipiell als reversibel erachtet wird (Dickenmann, Oetzel *et al.* 2008). Dabei ist bekannt, dass diese bisweilen über Jahre persistieren kann. So zeigt Abbildung 4-1 das elektronenmikroskopische Bild proximaler Tubuluszellen eines Patienten, der sechs Monate zuvor ein akutes Nierenversagen nach Gabe von 6% HES 130/0.4 in einer kumulativen Dosis von 4,9 g/kgKG entwickelt hatte. Zu erkennen sind multiple disseminierte zytoplasmatische Vakuolen. Dieses histologische Erscheinungsbild wird auch als Klarzelltransformation bezeichnet (Dickenmann, Oetzel *et al.* 2008).

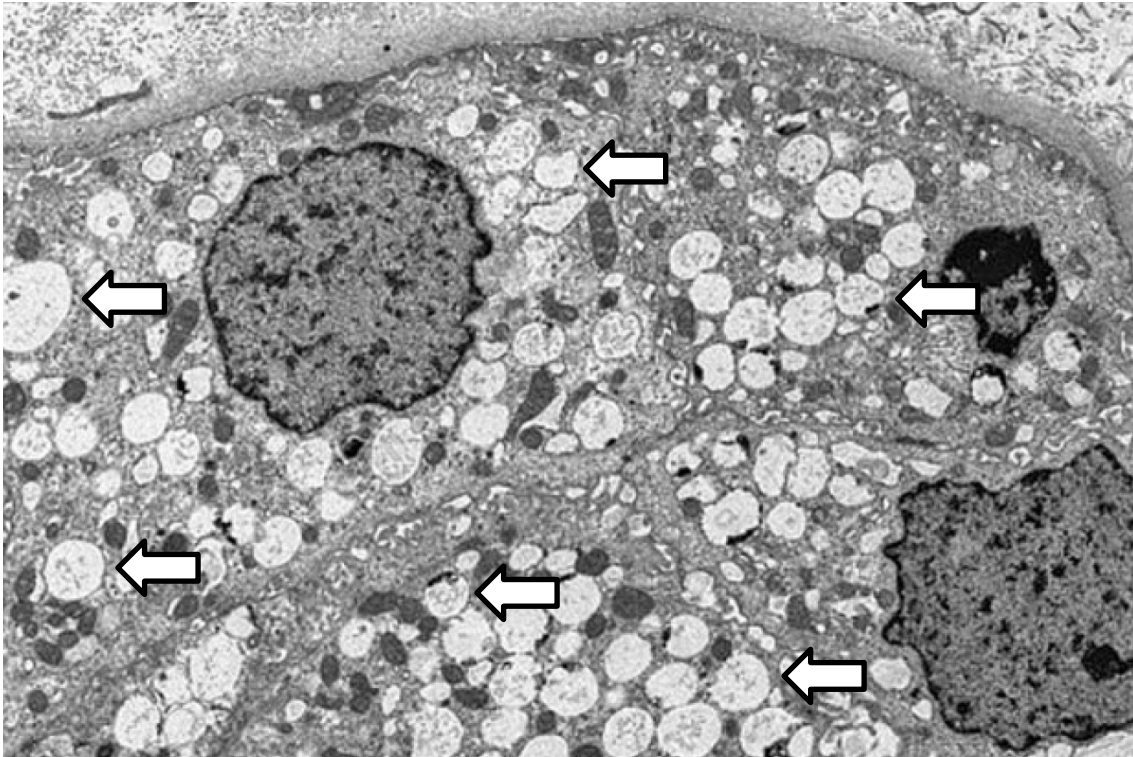


Abbildung 4-1: Elektronenmikroskopisches Bild einer osmotischen Nephrose adaptiert nach (Wiedermann and Joannidis 2014), Erlaubnis vorliegend (CC BY-NC 4.0). Die Pfeile zeigen exemplarisch auf einige der multiplen disseminierten zytoplasmatischen Vakuolen

Außerdem zeigte sich, dass HES *in vitro* zu einer rein mengenabhängigen Viabilitätsreduktion proximaler Nierentubuluszellen (HK-2-Zellen) führt, welche unabhängig von der Molekülgröße und dem Ausgangsmaterial für die Herstellung des Stärkederivates ist (Bruno, Neuhaus *et al.* 2014). Dabei scheint die Schädigung nicht auf einer Induktion der Inflammation zu beruhen (Bruno 2015).

Hieran anknüpfend wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss von HES auf die Viabilität von HK-2-Zellen mittels zweier unabhängiger *in vitro* Assays überprüft.

4.1 HES reduziert die Zellviabilität *in vitro* in zwei unabhängigen Assays

4.1.1 HES reduziert die Zellviabilität konzentrationsabhängig im EZ4U-Test

Zunächst wurde die von Bruno *et al.* (2015) beschriebene konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion von HES mittels EZ4U, einem photometrischen Test, der auf der Umsetzung von schwach gefärbten Tetrazoliumsalzen zu intensiv gefärbten Formazanderivaten durch mitochondriale Dehydrogenasen beruht, nachvollzogen (siehe Abschnitt 3.1.1). Das Substrat kann dabei die Zellmembran nicht mehr frei passieren und akkumuliert in intakten Zellen (Scudiero, Shoemaker *et al.* 1988). Eine Eignung zur Viabilitätsbestimmung von HK-2-Zellen nach Inkubation mit HES wurde bereits durch Bruno *et al.* nachgewiesen (Bruno, Neuhaus *et al.* 2014). Sowohl nach einer, nach sieben als auch nach 21 Stunden Inkubation zeigte sich wie erwartet in den durchgeführten Versuchen eine konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion mit in etwa gleichem Verlauf (siehe Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 auf Seite 44 beziehungsweise 45).

4.1.2 Der Prestoblue-Test ist geeignet für die Viabilitätsbestimmung von HK-2-Zellen nach Inkubation mit HES

In einem zweiten Schritt wurde ein weiterer Viabilitätsassay, der im Gegensatz zu EZ4U auf der Reduktion von blau gefärbtem Resazurin zu rot gefärbtem Resorufin durch zytosolische Dehydrogenasen beruht, zunächst auf seine Eignung für die Bestimmung der möglichen Viabilitätsreduktion der HK-2-Zellen durch HES überprüft.

Zum einen musste eine Interaktion zwischen HES und dem Test-Substrat Resazurin ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 3-3 auf Seite 47 demonstriert, ist die Fluoreszenz der Versuchslösungen bei Koinkubation mit dem Substrat in den zelllosen Wells in einem sehr niedrigen Bereich, insbesondere im Vergleich zu einer Koinkubation einer 0%-Lösung auf zellhaltigen Wells. Ein HES-konzentrationsabhängiger Effekt war nicht nachweisbar.

Zum anderen wurde überprüft, ob das bereits umgesetzte Produkt Resorufin zusammen mit HES die Viabilität von HK-2-Zellen beeinflusst. Aus Abbildung 3-4 auf

Seite 48 ist ersichtlich, dass zu allen Messzeiten zwischen HES-Lösungen unterschiedlicher Konzentration zusammen mit umgesetztem Resorufin kein signifikanter Unterschied der Exzitationen vorliegt. Somit sind etwaige Messwertveränderungen auf eine Substratumsetzung der Zellen zurückzuführen. Die im Zeitverlauf kontinuierliche geringe Abnahme der Messwerte durch alle Gruppen hindurch beruht dabei möglicherweise auf einer graduellen Minderung der enzymatischen Zellaktivität.

Zusammenfassend erbringen diese Versuche den Nachweis, dass der PrestoBlue-Test ebenso wie der EZ4U-Test dazu geeignet ist, die Auswirkungen von HES auf die Viabilität von HK-2-Zellen zu untersuchen.

4.1.3 HES reduziert auch im PrestoBlue-Test die Zellviabilität konzentrationsabhängig

Nach erfolgreicher Validierung des PrestoBlue-Tests sollte nun mit diesem analog zum EZ4U-Test der Einfluss von HES auf die Zellviabilität untersucht werden. In Abbildung 3-5 auf Seite 50 dargestellt ist eine konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion durch HES nach einer Inkubation von einer, sieben und 21 Stunden. Dabei fällt auf, dass sich die prozentuale Abnahme im Vergleich zum EZ4U-Test im erfassten Spektrum von 0,5% bis 4% HES zu höheren HES-Konzentrationen verschiebt und insgesamt geringer ausfällt. Dies ist vermutlich auf die Enzymlokalisierung in zwei verschiedenen Zellkompartimenten zurückzuführen und wäre ein Hinweis darauf, dass HES womöglich eher zu einer mitochondrialen Schädigung führt.

Insgesamt lässt sich somit zeigen, dass eine konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion durch HES mit zwei verschiedenen validierten Viabilitätsassays jeweils bereits nach einer Stunde nachweisbar ist und über 21 Stunden das prozentuale Ausmaß in etwa beibehält. Dabei beruht der eine Test auf einer Substratumsetzung mittels zytosolischer, der andere mittels mitochondrialer Dehydrogenasen (siehe Abschnitt 2.2.5 und 2.2.6). Daraufhin stellte sich die Frage, ob dieser Effekt vorübergehender Natur ist oder über die reine Inkubationszeit hinaus besteht.

4.1.4 Der HES-Effekt ist auch im PrestoBlue-Test über die Inkubation hinaus messbar

Bruno *et al.* (2015) konnte für den EZ4U-Test zeigen, dass der HES-Effekt auch über die Inkubationszeit hinaus nachweisbar ist (Bruno 2015). Wie in Abschnitt 3.4 auf Seite 57 beschrieben konnte auch im PrestoBlue-Test nach 21-stündiger Inkubation mit HES verschiedener Konzentrationen nach einstündigem Wechsel auf eine 0%-Lösung bereits für die niedrigste Konzentration von 0,5% eine persistierende hochsignifikante Viabilitätsreduktion um zirka 10 Prozent ebenso wie für die übrigen HES-Lösungen nachgewiesen werden. Im Unterschied zum EZ4U-Test betrug die Rekonvaleszenzphase dabei statt 21 Stunden nur eine Stunde. Somit scheinen die zytosolischen Dehydrogenasen trotz kürzerer Erholungszeit einer geringeren verbleibenden Beeinträchtigung zu unterliegen.

4.2 Die HES-vermittelte Viabilitätsreduktion lässt sich im EZ4U-Test partiell durch eine Autophagieinduktion aufheben

Neben dem Ubiquitin-Proteasom-System, das vorwiegend kurzlebige und regulatorische Proteine degradiert, findet im Allgemeinen der zelluläre Abbau langlebiger Proteine, defekter Organelle und verschiedener löslicher Moleküle über das Autophagie-Lysosom-System statt (Lippai and Low 2014). Dies geschieht zum einen dauerhaft auf einem basalen Niveau unter physiologischen Bedingungen, um unter anderem beschädigte Organellen abzubauen und deren Bestandteile wieder zu verwenden. Zum anderen kommt es insbesondere unter Stressbedingungen wie Nährstoffmangel, Hypoxie, oxidativem Stress, Infektion durch Pathogene, Strahlung oder Chemotherapeutika zu einer drastischen Induktion (Ryter, Cloonan *et al.* 2013). Dadurch werden der Zelle zusätzliche Bausteine und Energie zur Verfügung gestellt, was als ein zytoprotektiver Adaptationsmechanismus zu verstehen ist (Feng, He *et al.* 2014).

Auch die Pathogenese des akuten Nierenversagens, bei der proximale Tubuluszellen eine zentrale Rolle spielen, beinhaltet verschiedene oben genannte Stresskomponenten. Dabei wurde, wie im Abschnitt 1.7 auf Seite 25 beschrieben, in

mehreren Szenarien eine Autophagieinduktion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen. Ob dies auch unter Einfluss von HES geschieht, ist bisher nicht untersucht.

In einer Arbeit von Liu *et al.* führten Urinproteine, welche von Patienten mit einer Minimal-Change-Glomerulonephritis gewonnen wurden, im MTT-Test zu einer Viabilitätsreduktion von HK-2-Zellen, welche durch den Autophagieinduktor Rapamycin aufgehoben werden konnte (Liu, Luo *et al.* 2014). Darüber hinaus induzierten sie selbst konzentrationsabhängig eine Steigerung der Autophagierate, wie mittels Immunfluoreszenzmarkierung von LC3BII und SQSTM1 sowie Transfektion mit tandem-fluoreszenz-markiertem LC3 (tfLC3) als auch Transmissionselektronenmikroskopie gezeigt wurde. Bemerkenswert ist außerdem die Beobachtung, dass es nach zirka acht Stunden zu einer perinukleären Cluster-Bildung der Lysosomen kam – nachvollzogen über den lysosomalen Marker LAMP2 –, welche nach 16 Stunden nicht mehr sichtbar war.

Analog dazu wurde in dieser Arbeit im nächsten Schritt die potentielle Reversibilität der HES-vermittelten Viabilitätsreduktion im EZ4U-Test untersucht. Dabei erschien in Anbetracht der beschriebenen Ergebnisse von Liu *et al.* eine Inkubationsdauer der HK-2-Zellen von insgesamt acht Stunden am geeignetsten. Abbildung 3-7 auf Seite 54 demonstriert, dass das makrozyklische Lakton Everolimus, ein Rapamycin-Derivat und erwiesener Autophagieinduktor, zu einer partiellen Aufhebung der durch HES verursachten Viabilitätsreduktion führte, wobei dies für alle verwendeten HES-Konzentrationen von 0,5% bis 1,5% zutraf. Die Viabilitätssteigerung bewegte sich in einem Rahmen von zirka 20% bis 35%. Damit wurde die Viabilität der Kontrolllösungen wieder fast vollständig erreicht.

4.3 Im PrestoBlue-Test führt die medikamentöse Autophagieinduktion zu einer weiteren Viabilitätsreduktion

Da in dem laut Hersteller auf mitochondrialen Dehydrogenasen beruhenden EZ4U-Viabilitätsassay Everolimus tatsächlich zu einer fast vollständigen Aufhebung der HES-vermittelten Viabilitätsreduktion führte, wurde dies auch mit dem laut

4 Diskussion

Produktinformation auf zytosolischen Dehydrogenasen beruhenden PrestoBlue-Test untersucht. Überraschenderweise ergab hier die Zugabe von Everolimus stattdessen eine weitere Viabilitätsreduktion im Bereich von zirka 10% bis 15%, wie in Abbildung 3-8 auf Seite 55 ersichtlich.

Nachdem wie oben beschrieben eine Wechselwirkung zwischen dem PrestoBlue-Substrat und HES in einem Versuch ausgeschlossen wurde, wäre eine denkbare Erklärung, dass Everolimus selbst mit Resazurin beziehungsweise Resorufin wechselwirkt und dies bindet oder den Substratumsatz verringert. Dafür spricht, dass Resazurin bekanntlich mit einer ganzen Reihe biologischer Substanzen wechselwirkt (O'Brien, Wilson *et al.* 2000). Insbesondere reagiert es intrazellulär mit NADH, Thiolen, Aminosäuren und Phenolen und ist in Redox-Reaktionen involviert, die zur ROS-Bildung beitragen (Prutz, Butler *et al.* 1996). Somit liegt es nahe, dass auch Resazurin selbst den Redox-Status und die zelluläre Energiehomöostase beeinflusst (Erikstein, Hagland *et al.* 2010). Für Everolimus konnte in einem Ischämie-Reperfusion-Modell der Mäuseniere gezeigt werden, dass dies im Vergleich zu den Kontrollgruppen ebenfalls zu einer Erhöhung der Oxidationsmarker wie Glutathion führte (Kezic, Thaiss *et al.* 2013). Denkbar wäre daher rein theoretisch, dass es bei gleichzeitigem Einsatz von Resazurin und Everolimus so zu einer vermehrten ROS-Bildung kommt, welche die Zellviabilität herabsetzt. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass Resazurin im Gegensatz zu XTT nicht durch mitochondriale, sondern durch zytosolische Dehydrogenasen umgesetzt wird. Diese könnten durch Everolimus in ihrer Funktion eingeschränkt beziehungsweise blockiert werden und dadurch zu einem verringerten Substratumsatz führen.

Kritisch zu betrachten ist jedoch auch XTT, das Substrat des EZ4U-Tests, welches eine Weiterentwicklung von MTT darstellt. Für MTT ist mittlerweile nachgewiesen, dass eine Substratreduktion nicht exklusiv im Mitochondrium, sondern wohl vorwiegend nicht-mitochondrial, unter anderem im Zytosol und mikrosomal stattfindet (Stepanenko and Dmitrenko 2015). Dabei wird der Substratumsatz durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst, die auf Ebene des Energiemetabolismus und der ROS-Bildung

liegen. Dazu zählt auch Temsirolimus, dessen primär aktiver Metabolit ebenso wie für Everolimus Rapamycin ist. Möglicherweise spielen diese Effekte auch für Weiterentwicklungen wie XTT eine Rolle. Berridge *et al.* schätzten die Formazan-basierten Viabilitätsassays daher wie folgt ein:

„... do not actually measure the number of viable cells or their growth but rather an integrated set of enzyme activities that are related in various ways to cell metabolism.“
aus (Berridge, Herst *et al.* 2005)

Um die Ergebnisse auf metabolischer Ebene zu unterstützen, wurde im nächsten Schritt ein möglicher HES-Einfluss auf Proteinebene untersucht.

4.4 Einfluss von HES auf zentrale Proteine der Autophagie im zeitlichen Verlauf

Wie in Abschnitt 1.6 ab Seite 15 erläutert, wird der stufenweise Prozess der Autophagie, der aus einer Kaskade fünf zentraler Komplexe aufgebaut ist (siehe Abbildung 1-6 auf Seite 19), auf allen Ebenen durch eine Reihe von Proteinen reguliert. Nachdem HES in zwei verschiedenen *in vitro* Viabilitätsassays zu einer konzentrationsabhängigen Viabilitätsreduktion zu verschiedenen Zeitpunkten von einer Stunde bis 21 Stunden führte und eine Koinkubation mit dem Autophagieinduktor Everolimus in diesen Assays gegensätzliche Resultate erbrachte – wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert – erfolgte nun die Bestimmung der Proteinexpression mehrerer relevanter Autophagiemarker im zeitlichen Verlauf von einer bis zu 22 Stunden (siehe Abschnitt 3.5 ab Seite 59), um Änderungen zu überprüfen und den optimalen Zeitpunkt für weitere Tests zu bestimmen. Dabei fand im jeweiligen Zeitraum je eine Behandlung mit 0%-, 0,75%- und 2,5%-HES-Lösung sowie mit HK2-Medium (= Nährmedium) statt und die Werte wurden jeweils auf den Ein-Stunden-Wert normiert. Diese HES-Konzentrationen wurden verwendet, da sie die Basis für die vorausgegangenen Viabilitätsversuche mit EZ4U und PrestoBlue bilden. Ausgewählt wurden die Proteine Beclin1, ein zentrales Protein des PI3K-Komplexes, der Quotient aus LC3BII und LC3BI, welche beide Teil des Atg8/LC3-Konjugations-/DeKonjugationssystems sind, der Quotient aus pAkt und Akt1/2/3, welche die

Aktivität des mTOR-Komplexes steuern, der Quotient aus ppERK und pERK, welche die Aktivität von Beclin1 beeinflussen, das für die lysosomale Funktion relevante LAMP2 sowie p62 (= SQSTM1), das als lysosomales Adaptorprotein für Ubiquitin und LC3B dient.

Erstaunlicherweise fanden sich für die Lösungsansätze im zeitlichen Verlauf zumeist keine signifikanten Unterschiede der Proteinexpression. Für den Quotienten aus LC3BI und LC3BI schien für die 0%- und 0,75%-Lösung eine generelle Tendenz zu niedrigeren Werten im Verlauf zu bestehen, was für eine Abnahme der Autophagierate spricht, jedoch nicht für die 2,5%-Lösung (siehe Abbildung 3-12 auf Seite 62). Dagegen wiesen für den Quotienten aus pAkt und Akt1/2/3 insbesondere die 8-Stunden-Werte der HES-Lösungen eine teils signifikante Reduktion und die 22-Stunden-Werte eine tendenzielle Erhöhung auf, was wiederum für eine gesteigerte Autophagierate bis zu acht Stunden spräche (siehe Abbildung 3-13 auf Seite 63). Insgesamt sprechen diese Ergebnisse allerdings dafür, dass es durch HES zu keiner relevanten Modulation der Autophagierate im zeitlichen Verlauf bis 22 Stunden kommt.

Unabhängig davon weisen die Werte des Quotienten aus pAkt und Akt1/2/3 für die Nährmedium-Zeitreihe ab dem 4-Stunden-Wert bis zum Zeitpunkt 22 Stunden eine hochsignifikante Reduktion auf. Dies könnte die Folge eines zunehmenden Verbrauchs von Wachstumsfaktoren sein, welche im Vergleich zu den anderen Lösungsansätzen im Nährmedium überproportional vorhanden sind. So wird Akt bekanntermaßen in mehr oder weniger allen Zellen PI3K-abhängig durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren aktiviert (Manning and Toker 2017).

4.5 Auswirkungen von Autophagiemodulatoren auf die Zellviabilität im EZ4U-Test unter Koinkubation von HES

Obwohl die Resultate des EZ4U-Tests, wie in Abschnitt 4.3 erläutert, mit Einschränkungen zu interpretieren sind, ist er wie andere Formazan-basierte Viabilitätsassays eine weit verbreitete und etablierte Methode, die Zellviabilität über die metabolische Aktivität *in vitro* zu bestimmen. Nachdem die Koinkubation mit Everolimus eine fast vollständige Aufhebung der HES-vermittelten Viabilitätsreduktion

4 Diskussion

ergab, wurden somit im nächsten Schritt mehrere Substanzen, welche die Autophagie in verschiedene Weise beeinflussen, auf ihre Auswirkung auf die Zellviabilität getestet. Eine Viabilitätsreduktion um zirka ein Drittel durch HES wurde dabei als am besten geeignet für die nachfolgenden Versuche betrachtet. Dies traf in einer Versuchsreihe bei einer Inkubationszeit von sieben Stunden und einem Messzeitpunkt von 60 Minuten nach Substratzusatz am ehesten für die 0,75% HES-Lösung zu (siehe Abbildung 3-7 auf Seite 54). Dieser Zeitraum wurde – wie bereits im Abschnitt 3.3.2 erwähnt – gewählt, da sich im Rahmen des Autophagieprozesses eine zeitabhängige perinukleäre Lysosomenakkumulation, die für die Beschleunigung der Autophagosomdegradation verantwortlich ist, nach zirka acht Stunden zeigte (Korolchuk, Saiki *et al.* 2011). Dies konnte unter anderem auch für Urinproteine in HK-2-Zellen gezeigt werden (Liu, Luo *et al.* 2014). Die verwendete HES-Konzentration von 0,75% liegt dabei im klinisch relevanten Bereich. So betrug die Plasmakonzentration bei gesunden Probanden nach Infusion von 500 mL 6% HES 130/0,4 bis zu 0,37% (Jungheinrich and Neff 2005). Bei kritisch Kranken ist durch Blutungen oder andere Verteilungsstörungen von einem erniedrigten intravasalen Volumen auszugehen. So konnte Jungheinrich *et al.* (2004) für Patienten 24 Stunden nach einer durchschnittlichen Infusion von zirka zwei Liter 6% HES 130/0,4 residuale Plasmakonzentrationen von ungefähr 1% ermitteln (Jungheinrich, Sauer mann *et al.* 2004).

Falls die in den vorangegangenen Abschnitten gemessene fast vollständige Aufhebung der HES-vermittelten Viabilitätsreduktion durch die Autophagieinduktoren Everolimus und Rapamycin auf eine Steigerung der Flussrate des Autophagiezyklus beruht, sollte diese theoretisch durch eine Blockade distal mTOR gelegener Enzyme blockiert werden können. Exemplarisch wurde dies an dem MAP-Kinase-Kinase-Blocker U0126 demonstriert, welcher MEK1/2 und in weiterer Folge ppERK inhibiert, wodurch Beclin1 gehemmt wird, welches Bestandteil des für die Autophagie zentralen PI3K-Komplexes ist (siehe Abbildung 3-17 auf Seite 69). Dabei führte die Koinkubation mit U0126 tatsächlich zu einer Viabilitätsreduktion, die den Effekt von Everolimus vollständig aufhob. Die signifikante Viabilitätsreduktion von U0126 trat jedoch auch unabhängig

4 Diskussion

davon auf. Dies spricht für eine generelle Tendenz von U0126, die Zellviabilität zu reduzieren. Passend dazu konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass U0126 zum einen über eine Erhöhung des AMP-ATP-Quotienten zu einer Aktivierung von AMPK führt (Dokladda, Green *et al.* 2005, LaRosa and Downs 2005), zum anderen die mitochondriale ATP-Produktion über einen eigenen Mechanismus inhibiert (Yung, Wyttenbach *et al.* 2004, Freeman, Kim *et al.* 2011) und somit die Zellviabilität reduzieren kann (Stepanenko and Dmitrenko 2015).

Chloroquin führt über eine lysosomale Akkumulation und folglich Anhebung des pH-Wertes zu einer Minderung der lysosomalen Funktion und so zu einer Fusionshemmung mit dem Autophagosom (Kimura, Takabatake *et al.* 2013). Eine Koinkubation sollte daher theoretisch zu einer Viabilitätsreduktion führen. Wie aus Abbildung 3-18 auf Seite 71 ersichtlich, ergab die Koinkubation mit Chloroquin jedoch eine signifikante geringe Viabilitätserhöhung, was gegen eine Beteiligung der Autophagie spricht. Diese Beobachtung deckt sich aber damit, dass Chloroquin in Formazan-basierten Viabilitätsassays scheinbar über einen bisher unbekanntem Mechanismus im Vergleich zu anderen Viabilitätsassays zu einer konzentrationsabhängigen Viabilitätserhöhung führt (Weyermann, Lochmann *et al.* 2005).

Perifosin bewirkt zum einen über eine direkte als auch indirekte Hemmung von mTOR eine Autophagieinduktion, zum anderen führt es wie alle Alkylphospholipide über eine Hemmung der Phosphatidylcholin-Biosynthese, welche essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellmembranen und somit der Zellintegrität ist, zu einer Induktion der Apoptose (Kondapaka, Singh *et al.* 2003, Elrod, Lin *et al.* 2007, Fu, Kim *et al.* 2009, Fensterle, Aicher *et al.* 2014). Aus den im Abschnitt 3.6.4 ab Seite 72 dargestellten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es unabhängig von HES auch bei Koinkubation von Perifosin jeweils mit einer 0%-HES-Lösung zu einer konzentrationsabhängigen starken Viabilitätsreduktion ab einer Konzentration von 10 μM kam. Lediglich die Koinkubation von 0,75% HES mit 3 μM Perifosin ergab eine geringe, aber signifikante Viabilitätserhöhung im Vergleich zu 0,75% HES, was mit einer

4 Diskussion

Autophagieinduktion gleichzusetzen wäre. Somit scheint ein toxischer Effekt ab einem Bereich zwischen 3 μM und 10 μM aufzutreten.

3-Methyladenin wird in Bezug auf die Autophagie eine duale Rolle zugeschrieben. Zum einen wirkt es unter Nährstoffmangel vorübergehend inhibitorisch durch Hemmung der PI3K-III-Kinasen (Petiot, Ogier-Denis *et al.* 2000), zum anderen werden unter nährstoffreichen Bedingungen auch PI3K-I-Kinasen gehemmt, welche aktivierend auf das Protein Akt wirken, was zu einer Induktion der Autophagie führt (Wu, Tan *et al.* 2010, Vinod, Padmakrishnan *et al.* 2014). Wie aus Abbildung 3-21 auf Seite 75 hervorgeht, führte bereits eine Zugabe von 3-Methyladenin zu einer 0%-HES-Lösung konzentrationsabhängig zu einer signifikanten leichten Viabilitätserhöhung. Auch bei Koinkubation mit 0,75% HES beziehungsweise zusätzlich mit Everolimus blieb dieser Effekt unverändert nachweisbar (siehe Abbildung 3-22 auf Seite 76), eine darüber hinausgehende Änderung der Zellviabilität war jedoch nicht zu sehen. Diese Ergebnisse deuten daher auf ein nährstoffreiches Milieu hin, unter dem 3-Methyladenin zu einer Erhöhung der Autophagierate führt. Denkbar wäre aber auch ein von der Autophagie unabhängiger Effekt zum Beispiel über eine Wechselwirkung mit Formazan oder einen bisher nicht bekannten Mechanismus.

Resveratrol, ein unter anderem in roten Weintrauben und Erdnüssen vorkommendes Polyphenol, hat wie 3-Methyladenin kontextbedingt gegensätzliche Auswirkungen auf den Autophagiemechanismus. Unter nährstoffreichen Bedingungen führt eine längere Inkubation über AMPK und eine direkte Hemmung des mTORC1-Komplexes zu einer Induktion, eine kurzfristige Inkubation unter nährstoffarmen Bedingungen jedoch zu einer Inhibition der Autophagie (Alayev, Doubleday *et al.* 2014). Neben einem sowohl direkten als auch indirekten antioxidativen Effekt wirkt es über die Aktivierung von Sirtuin 1 über verschiedene Signalwege zytoprotektiv (Kitada and Koya 2013, Galluzzi, Pietrocola *et al.* 2014). Die Zugabe von Resveratrol zu einer 0%- beziehungsweise 0,75%-HES-Lösung führte – wie in Abbildung 3-23 auf Seite 77 demonstriert – lediglich zu einer geringen Viabilitätsreduktion in beiden Lösungsansätzen. Dies steht, falls die beschriebenen Effekte von 3-Methyladenin und Resveratrol auf die

4 Diskussion

Versuchsbedingungen in HK-2-Zellen zutreffen, im Widerspruch zu den oben erörterten Effekten von 3-Methyladenin. Falls nährstoffreiche Bedingungen vorliegen, sollte dies auch bei Koinkubation mit Resveratrol zu einer Induktion der Autophagie führen und theoretisch darüber zu einer Erhöhung der Zellviabilität. Der gegenteilige Effekt wurde jedoch festgestellt. Umgekehrt könnte die geringe HES-unabhängige Viabilitätssteigerung durch Zugabe von 3-Methyladenin wie oben beschrieben andere Ursachen haben.

Da Resveratrol antioxidativ wirkt, wäre auch eine indirekte Hemmung der Autophagie über eine Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species) denkbar. Es ist bekannt, dass für die Erhaltung vieler intrazellulärer Signaltransduktionswege, zu denen auch die Autophagie gezählt wird, ein basales ROS-Level nötig ist (Holmstrom and Finkel 2014, Reczek and Chandel 2015). Dieses könnte durch Resveratrol soweit vermindert werden, dass die zelluläre Homöostase gestört und die mit dem EZ4U-Test gemessene Viabilität, welche auf dem Substratumsatz mitochondrialer Dehydrogenasen beruht, verringert wäre.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der beschriebenen Viabilitätsassays unter jeweils gemeinsamer siebenstündiger Inkubation von 0,75% HES mit den als Autophagiemodulatoren bekannten Substanzen unter Berücksichtigung der diskutierten Einschränkungen und erwiesenen Nebeneffekte eher dafür, dass die HES-vermittelte Viabilitätsreduktion durch eine medikamentöse Autophagieinduktion größtenteils aufgehoben werden kann. Um diese Vermutung zu untermauern und um die einzelnen Rollen der Autophagiekomponenten aufzuklären, wurde unter Auslassung von Resveratrol die Expression zentraler Autophagieproteine – analog zu Abschnitt 4.4 ab Seite 94 – für verschiedene Kombinationen der in diesem Kapitel dargelegten Substanzen untersucht. Diese Ergebnisse sollen im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

4.6 Auswirkungen von Autophagiemodulatoren auf Proteinebene unter Koinkubation von HES

Die analog zu den Versuchen in Kapitel 3.5 ab Seite 59 erfolgten Expressionsbestimmungen zentraler Autophagieproteine fanden nach Koinkubation der in Abschnitt 3.7 ab Seite 79 dargelegten Substanzen mit 0,75% HES bezogen auf eine 0%-HES-Kontrolle über insgesamt acht Stunden statt. Zunächst soll ein Diskurs über die einzelnen Proteinexpressionen erfolgen, im Anschluss eine Einordnung in einen allgemeineren Zusammenhang.

Die Proteinexpression von Beclin1, einem zentralen Proteinkomplex der Autophagiekaskade, zeigte erstaunlicherweise für alle dargelegten Substanzkombinationen keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 3-24 auf Seite 80). Dies widerspricht den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen und dem aktuellen Wissensstand. So sollte insbesondere die Inkubation mit Everolimus ebenso wie mit Rapamycin über die Hemmung des mTOR-Komplexes zu einer vermehrten Expression von Beclin1 führen (Su, Lu *et al.* 2018, Yang, Yan *et al.* 2018). Auch die Inkubation mit Perifosin beziehungsweise 3-Methyladenin sollte theoretisch über eine mTOR-Hemmung und Chloroquin über eine distale Blockade reaktiv eine Expressionserhöhung von Beclin1 bewirken. Wie allerdings aus der Abbildung 3-24 ersichtlich liegen hohe statistische Schwankungen der Proteinexpression vor und die Proteinbanden sind nur sehr schwach abzugrenzen. Dies könnte ursächlich für die fehlenden Expressionsdifferenzen sein. Möglicherweise liegen auch nährstoffarme Bedingungen vor, da – wie im vorherigen Abschnitt erwähnt – alle Lösungen lediglich einen Anteil an Nährmedium von 27,5% aufweisen. Beclin1 könnte daher bereits auf einem hohen Niveau exprimiert sein und die Koinkubation von Autophagiemodulatoren so zu keiner signifikanten Änderung der Proteinexpression führen.

Für das lysosomale Protein Lamp2 wiederum konnten deutliche Proteinbanden nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-25 auf Seite 81). Doch auch für dieses Protein finden sich keine relevanten Expressionsunterschiede bis auf eine mäßige

4 Diskussion

statistisch signifikante Reduktion bei einer Koinkubation von 0,75% HES mit Perifosin beziehungsweise mit 3-Methyladenin.

Der Quotient aus LC3BII und LC3BI ist ebenso wie Beclin1 ein zentraler Autophagiemarker und seine Erhöhung zeigt im Allgemeinen eine verstärkte Autophagierate an, falls unter gleichzeitiger Inkubation eines Fusionshemmers wie Chloroquin ebenfalls eine Erhöhung feststellbar ist (Barth, Glick *et al.* 2010). Abbildung 3-26 auf Seite 82 demonstriert, dass unter 0,75% HES eher eine tendenzielle Erniedrigung vorliegt als Hinweis darauf, dass HES eventuell sogar eine Autophagiereduktion bedingt. Die Koinkubation mit Everolimus führte zu einer signifikanten Erhöhung und auch für die anderen Ansätze mit Everolimus ist ein teils signifikanter Anstieg vorhanden. Werden 0,75% HES und Everolimus gleichzeitig mit dem MAP-Kinase-Kinase-Blocker U0126 inkubiert, findet sich eine tendenzielle Reduktion des Quotienten. Diese lässt sich jedoch auch bei alleiniger Inkubation von 0,75% mit U0126 im Vergleich zur Kontrolllösung feststellen, was sich mit den Beobachtungen der Viabilitätsassays deckt, wie auf Seite 97 erörtert. Auf der anderen Seite konnte zwar keine Reduktion der Beclin1-Expression festgestellt werden, was aber eventuell technisch bedingt ist. Somit wäre – wie nach dem Schema auf Seite 22 dargestellt – auch eine Reduktion indirekt über die Hemmung von ERK und konsekutiv Beclin1 denkbar.

Hierfür sprechen auch die Ergebnisse des Quotienten aus ppERK und pERK, wie in Abbildung 3-28 auf Seite 84 demonstriert. Zwar führt auch hier die Inkubation mit 0,75% HES zu keiner Änderung, jedoch weisen ebenfalls alle Lösungsansätze mit Everolimus eine meist signifikante Erhöhung des Quotienten auf. Darüber hinaus führt die gemeinsame Inkubation von 0,75% HES und Everolimus mit U0126 zu einer vollständigen Normalisierung auf Niveau der Kontrolllösung beziehungsweise 0,75% HES, wie aufgrund des bekannten direkten Blockademechanismus zu erwarten ist (siehe Abbildung 1-7 auf Seite 22). Hier muss eingefügt werden, dass der exakte Mechanismus der Hochregulation durch Everolimus in proximalen Nierentubuluszellen zwar noch nicht bekannt ist, jedoch ein hoher Vernetzungsgrad der Signalwege von

4 Diskussion

ERK und Akt/mTOR besteht (Mendoza, Er *et al.* 2011). Eine Hochregulation des Quotienten aus ppERK und pERK durch Everolimus konnte für Karzinomzellen der Niere *in vitro* bereits nachgewiesen werden (Zeng, Tian *et al.* 2018). Dort wurde jedoch gleichzeitig eine signifikante Reduktion der Expression von p62 und Hochregulation von Beclin1 gemessen, welche als notwendig erachtet werden, um eine Autophagieinduktion zu belegen (Klionsky, Abdelmohsen *et al.* 2016). Wie aus Abbildung 3-29 auf Seite 86 ersichtlich, ergab die Analyse der p62-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lösungsansätzen. Auch führte die Koinkubation mit Chloroquin, welche theoretisch über eine Hemmung der Fusion von Autophagosom und Lysosom einen Aufstau von LC3BII bewirkt, zu keiner relevanten Erhöhung des Quotienten. Dies sind weitere Hinweise darauf, dass unter den gewählten Zellkulturbedingungen klassische Eckpfeiler der Autophagie nicht wie erwartet reguliert wurden. Analog zu dem vorherig diskutierten Quotienten aus LC3BII und LC3BI ist außerdem anzumerken, dass auch die alleinige Inkubation von 0,75% HES mit U0126 zu einer tendenziellen Reduktion des Quotienten aus ppERK und pERK führte, wie aufgrund einer direkten Blockade zu erwarten war.

Zuletzt wurde – wie in Abbildung 3-27 auf Seite 83 dargestellt – der Quotient aus pAkt und Akt1/2/3 bestimmt. Auch dieser zeigte keine signifikante Änderung bei Zellinkubation mit 0,75% HES im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die Substanzen Perifosin und 3-Methyladenin ist eine direkte beziehungsweise indirekte Hemmung des Quotienten bekannt, wie auf Seite 83 erläutert. Dies lässt sich für die Koinkubation von 3-Methyladenin mit 0,75% HES alleine beziehungsweise zusätzlich mit Everolimus als auch für 0,75% HES mit Perifosin bestätigen. Alle anderen Substanzkombinationen wiesen keine relevante Änderung des Expressionsquotienten auf.

4.7 Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen wissenschaftlichen Diskurs und offene Fragen

Ausgangspunkt dieser Arbeit war zum einen die Frage, welchen Einfluss HES auf die Zellviabilität proximaler Nierentubuluszellen *in vitro* hat. Hierbei wurde ein etabliertes Modell immortalisierter humaner proximaler Tubuluszellen verwendet (HK-2-Zellen). Sowohl in dem laut den Herstellern auf mitochondrialen Dehydrogenasen beruhenden Viabilitätsassay EZ4U als auch im auf zytosolischen Dehydrogenasen beruhenden Viabilitätsassay PrestoBlue konnte eine konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion durch HES nachgewiesen werden. Dabei demonstrierte Bruno *et al.* (2014), dass diese weder von der Molekülgröße, noch dem pH-Wert oder der Osmolalität, sondern allein von der applizierten HES-Menge abhängt (Bruno, Neuhaus *et al.* 2014). Der genaue Mechanismus ist dabei bis heute nicht bekannt.

Nach aktuellem Wissensstand wird vermutet, dass HES mittels Pinozytose in die Zelle aufgenommen wird, was relativ rasch innerhalb weniger Stunden nach intravenöser Gabe geschieht (Jesch, Hübner *et al.* 1979). Dabei akkumuliert es in Lysosomen, welche zum Abbau langkettiger Stärkemoleküle im Gegensatz zum Blutplasma keine α -Amylasen, sondern saure α -Glukosidasen beinhalten (Wiedermann and Joannidis 2014). Der partielle Ersatz von Hydroxyl- durch Hydroxyethylgruppen schützt HES dabei vor dem schnellen Abbau durch beide Enzyme. Dies korreliert mit den teils über Jahre nachweisbaren intrazellulären Vesikeln (Pillebout, Nochy *et al.* 2005). Dabei führt die osmotische Wirksamkeit von HES scheinbar zur Ausbildung eines wassergefüllten Zentrums innerhalb der Vesikel, welches randständig von HES umgeben ist, wie histopathologisch demonstriert werden kann (Schmidt-Hieber, Loddenkemper *et al.* 2006). Diese Zellschwellung, auch bezeichnet als osmotische Nephrose, wird als prinzipiell reversibel erachtet (Dickenmann, Oettl *et al.* 2008). Interessanterweise ist die HES-vermittelte Viabilitätsreduktion sowohl für den EZ4U- als auch den PrestoBlue-Test ebenfalls partiell reversibel, wie durch Bruno *et al.* (2015) beziehungsweise in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. So könnte die über die Inkubationszeit hinausgehende persistierende Viabilitätsreduktion auf eine Funktionsbeeinträchtigung durch die massive intrazelluläre HES-Speicherung zurückzuführen sein. Der größere

4 Diskussion

Anteil an der Viabilitätsreduktion bestand jedoch unter Inkubation mit HES. Dies könnte für eine zusätzliche Beeinflussung der Zellviabilität durch den extrazellulären HES-Anteil über Membranrezeptoren, zum Beispiel den Megalinrezeptor, sprechen. Auch dies wurde bisher nicht untersucht. Vermutet wird, dass der zentrale, die Autophagie beeinflussende mTOR-Komplex in proximalen Nierentubuluszellen auch für die Steuerung der Endozytose und der nachfolgenden Transportprozesse verantwortlich ist (Grahammer, Ramakrishnan *et al.* 2017).

Wenn die ausgeprägte intrazelluläre Akkumulation von HES-Molekülen als eine erworbene lysosomale Speicherkrankheit zu verstehen ist (Auwerda, Leebeek *et al.* 2006), stellt sich die Frage, ob die Zelle als Reaktion auf diesen Stressfaktor möglicherweise vergeblich versucht, mittels Induktion der Autophagie einen beschleunigten Abbau der Speichervesikel herbeizuführen. Dagegen sprechen, dass weder eine Viabilitätsverbesserung noch eine signifikante Expressionsveränderung zentraler Autophagieproteine im zeitlichen Verlauf von einer bis 21 Stunden nachzuweisen war. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass HES den eigenen Abbau durch lysosomale Enzyme oder Autophagie inhibiert, oder dass HES durch andere Mechanismen als Autophagie abgebaut wird.

Der zweite Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Frage, ob der oben beschriebene „HES-Effekt“ auf die Zellviabilität möglicherweise durch eine medikamentöse Induktion der Autophagie beeinflusst werden kann. Wie in den beiden vorangegangenen Abschnitten diskutiert, scheint die im EZ4U-Viabilitätsassay beobachtete fast vollständige Aufhebung der HES-vermittelten Viabilitätsreduktion durch Everolimus nicht auf eine direkte Induktion des gesamten Autophagiezyklus zu beruhen, da mehrere zentrale Proteinkomplexe keine signifikante Expressionsänderung aufwiesen. Nur die Quotienten der Proteinexpression von ppERK und pERK sowie LC3BII und LC3BI wiesen unter der Koinkubation von 0,75% HES mit Everolimus relevante Erhöhungen auf. Wie in Abschnitt 4.6 erörtert, sollte bei einer Koinkubation von Everolimus mit Chloroquin der LC3B-Quotient sich weiter erhöhen, wenn eine verstärkte autophagische Flussrate vorliegt. Da der Quotient bei Koinkubation jedoch

4 Diskussion

unverändert blieb, spricht dies eher für eine Erhöhung durch eine bereits bestehende distale Blockade auf Höhe der Autophagosom-Degradation (Mizushima and Yoshimori 2007). Ebenso blieb eine Reduktion der Proteinexpression von p62 aus. Dabei ist zu beachten, dass eine Bindung von p62 an Kohlenhydrate bisher nicht bekannt ist und dieses somit eventuell auch nicht mit HES interagiert. Diese Resultate unterstützen daher die Hypothese, dass die intrazelluläre HES-Akkumulation durch einen erschwerten Vesikelabbau zustande kommt.

Somit stellt sich weiterhin die Frage, wie die Viabilitätsverbesserung im EZ4U-Assay durch Everolimus zustande kommt. Die scheinbar widersprüchliche Viabilitätsreduktion im PrestoBlue-Assay beruht dabei möglicherweise darauf, dass im Gegensatz zum EZ4U-Test, welcher auf mitochondrialen Dehydrogenasen beruht, hier zytosolische Dehydrogenasen für den Substratumsatz verantwortlich sind. Diese könnten durch Everolimus blockiert und so die Viabilität reduziert werden. Rein theoretisch denkbar wäre auch eine vermehrte ROS-Bildung aufgrund einer Wechselwirkung des Testsubstrates mit Everolimus, wofür es jedoch bisher keine direkten Belege gibt (siehe Abschnitt 4.3). Die Viabilitätssteigerung im EZ4U-Assay könnte, wie oben beschrieben, durch eine Wechselwirkung des Testsubstrates mit Everolimus verursacht sein. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass entsprechende Wechselwirkungen aktuell nur für den Vorläufertest MTT nachgewiesen worden sind. Dagegen sprechen auch, dass der Quotient der Proteinexpression von LC3BII zu LC3BI unter Koinkubation mit Everolimus erhöht war. Die beobachtete Viabilitätsverbesserung könnte daher auch über andere durch mTOR oder AMPK vermittelte Signalwege zustande kommen. Dies ist insofern wahrscheinlich, da der mTORC1-Komplex ein hochintegrierter Signalknotenpunkt ist, welcher die Steuerung der Nährstoffversorgung, von Wachstumsfaktoren, Hormonsignalen und der Sauerstoffverfügbarkeit mit der Regulation der Protein- und Lipidsynthese, Glykolyse, dem Pentosephosphatweg, der mitochondrialen Biogenese und Atmung, der ribosomalen und lysosomalen Biogenese, der Autophagie, der zellulären Alterung und anderer Prozesse miteinander verbindet (Haissaguerre, Saucisse *et al.* 2014, Iadevaia, Liu *et al.* 2014, Puertollano 2014, Shimobayashi and Hall 2014, Xu, Cai *et al.* 2014,

4 Diskussion

Morita, Gravel *et al.* 2015). So könnte Everolimus über eine mTOR-Blockade zu einer verminderten HES-Aufnahme durch Hemmung der Pinozytose führen und hierdurch die Zellviabilität erhöhen (Grahammer, Ramakrishnan *et al.* 2017). Denkbar wäre auch eine Beeinflussung von AMPK, welches unter anderem die Expression zellmembranständiger Glukosetransporter reguliert. Falls kleinere HES-Moleküle mit diesen wechselwirken, könnte eine Regulation ebenfalls zu einer verminderten Aufnahme führen.

Die im vorangegangenen Abschnitt erwähnte ROS-Bildung ist gleichermaßen eng mit dem Autophagiekomplex verknüpft (Kaushal, Chandrashekar *et al.* 2019). So führt eine vermehrte ROS-Synthese im Allgemeinen zu einer Induktion der Autophagie (Filomeni, De Zio *et al.* 2015). Dies geschieht unter anderem über die direkte Inaktivierung der Protease Atg4 via Oxidation, wodurch die Autophagosom-Formation über Atg8 (= LC3) verstärkt stattfinden kann (Scherz-Shouval, Shvets *et al.* 2019). ROS hemmt darüber hinaus auch den mTORC1-Komplex direkt und indirekt über AMPK (Jung, Jun *et al.* 2009, Zhang, Kim *et al.* 2013). AMPK wird dabei direkt oxidativ oder über die Oxidation der ATM(= ataxia-telangiectasie mutated)-Proteinkinase aktiviert (Choi, Kim *et al.* 2001, Guo, Kozlov *et al.* 2010). AMPK selber bewirkt eine Autophagieinduktion über Hemmung des mTORC1-Komplexes, Aktivierung von sowohl ULK1 als auch Beclin1 und Regulierung der Lokalisation von Atg9A (Inoki, Zhu *et al.* 2003, Mack, Zheng *et al.* 2012, Kim, Kim *et al.* 2013, Egan, Chun *et al.* 2015). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass HES zu einer verminderten ROS-Bildung führt. Theoretisch wäre es daher möglich, dass HES hierüber die Autophagierate vermindert. Als Hinweis darauf fand sich eine geringe Verminderung des Quotienten aus LC3BII und LC3BI durch HES (siehe Abbildung 3-26 auf Seite 82). Dies konnte durch den Autophagieinduktor Everolimus wiederum fast vollständig aufgehoben werden. Basierend auf diesen Annahmen ergeben sich viele neue Fragen. Interessant wäre zum Beispiel, ob unter Einfluss von Everolimus eine verminderte intrazelluläre Akkumulation von HES stattfindet. Dies könnte mittels ATPS-markiertem HES fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Falls die HES-bedingte Viabilitätsreduktion zumindest teilweise über Glukosetransporter vermittelt wird, sollte erforscht werden, ob HES zum Beispiel

4 Diskussion

über eine kompetitive Hemmung am Glukosetransporter zu einer verminderten intrazellulären Aufnahme von Glukose führt. Denkbar wäre, dass Everolimus durch eine Funktionsverbesserung oder vermehrte Expression der Glukosetransporter wieder zu einer höheren Glukoseaufnahme in die Zelle führt und so die Viabilität verbessert. Da HES in einer Lösung in verschiedenen Molekülgrößen vorliegt, könnten größere Moleküle auch mittels Endozytose aufgenommen werden, welche in proximalen Nierentubuluszellen unter anderem durch den mTORC1-Komplex reguliert wird (Grahammer, Ramakrishnan *et al.* 2017). So könnte die mTORC1-Hemmung durch Everolimus zu einer verringerten Endozytose von größeren HES-Molekülen durch eine verminderte Expression von Megalin und Cubilin führen, wie bereits für HK-2-Zellen nachgewiesen wurde (Oroszlan, Bieri *et al.* 2010). Dies wären starke Hinweise darauf, dass Everolimus die Zelle vor einer HES-Überladung schützt. Auch hier könnte AMPK als Energiesensor eine Rolle spielen, da es als wichtiger Regulator des Membrantransportsystems proximaler Tubuluszellen fungiert (Hallows, Mount *et al.* 2010, Pastor-Soler and Hallows 2012). Zur weiteren Klärung, ob eine Autophagieinduktion durch Everolimus nicht doch über einen alternativen Weg stattfindet, könnte zum Beispiel mittels siRNA gegen den Atg5-Komplex überprüft werden, ob hierdurch die Zellviabilität reduziert wird. Das wäre ein klarer Beweis, dass der Autophagiemechanismus ebenfalls eine Rolle spielt (Kimura, Takabatake *et al.* 2011). Völlig unbekannt ist auch, ob HES aller Molekülgrößen über einen oder verschiedene Mechanismen in die Zelle aufgenommen wird.

5 Zusammenfassung

In der Volumentherapie galt das Kolloid Hydroxyethylstärke (HES) lange Zeit als ideale Infusionslösung und war der in Deutschland am häufigsten eingesetzte Plasmaexpander. In den letzten Jahren mehrten sich jedoch die Hinweise, dass HES insbesondere bei kritisch Kranken zu einer akuten Nierenfunktionsverschlechterung beitragen könnte, welche das klinische Ergebnis wesentlich beeinflusst. Der genaue Pathomechanismus ist bis heute nicht geklärt. Bekannt ist, dass sich HES nach intravenöser Applikation in vielen verschiedenen Geweben ablagert, wobei eine renale Anreicherung bevorzugt in proximalen Tubuluszellen stattfindet. Histopathologisch finden sich große Mengen intrazellulärer Vesikel im Zytoplasma, welche zu einer Zellschwellung führen, die auch als osmotische Nephrose bezeichnet und als prinzipiell reversibel erachtet wird. Der zelluläre Abbau soll dabei im Allgemeinen über das lysosomale System stattfinden. Dieses ist fester Bestandteil der Autophagie, welche ein evolutionär in allen Eukaryonten konservierter stress-induzierter kataboler Prozess ist, der der zellulären Homöostase und energieeffizienten Selbstreinigung dient. Hierbei werden defekte Makromoleküle durch Lysosomen in ihre Grundbestandteile zerlegt und der Zelle als Bausteine wieder zur Verfügung gestellt.

In dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt der Einfluss von HES der 3. Generation auf die Viabilität von HK-2-Zellen mit zwei unabhängigen *in vitro* Assays überprüft. Diese beruhen auf einem Substratumsatz durch zytosolische beziehungsweise mitochondriale Dehydrogenasen. Für beide Assays konnte zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten bis 21 Stunden jeweils eine konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion durch HES festgestellt werden, welche auch nach einer „Regenerationsphase“ noch verringert nachweisbar und somit partiell reversibel war.

Im nächsten Schritt wurde die Hypothese überprüft, ob eine medikamentöse Induktion der Autophagie die beobachtete Viabilitätsreduktion abschwächen oder sogar aufheben kann. Hierbei wurde analog zu einer Arbeit von Liu *et al.* (2014) eine Inkubationszeit von insgesamt acht Stunden gewählt, da nach diesem Zeitraum eine perinukleäre Cluster-Bildung der Lysosomen beobachtet werden konnte, welche für

5 Zusammenfassung

eine erhöhte Autophagierate spricht. Es kamen im Folgenden HES-Lösungen von 0,75% zum Einsatz, da diese aufgrund einer Viabilitätsreduktion um zirka ein Drittel als am besten geeignet betrachtet wurden. Der Autophagieinduktor Everolimus zeigte hierbei in dem auf mitochondrialen Dehydrogenasen basierenden EZ4U-Assay eine fast vollständige Aufhebung der HES-vermittelten Viabilitätsreduktion. Dieser Effekt konnte durch den MAP-Kinase-Kinase-Blocker U0126 aufgehoben werden. Andere Autophagiemodulatoren hingegen bewirkten zumeist nur geringe Änderungen der Zellviabilität. So führte Resveratrol zu einer geringen Abnahme, 3-Methyladenin zu einer leichten Zunahme der gemessenen Viabilität. Eine Ausnahme bildete Perifosin, welches in höheren Konzentrationen zu einer konzentrationsabhängigen starken Viabilitätsreduktion führte. Zwar konnte für eine niedrige Konzentration ein leicht positiver Effekt beobachtet werden, wie aufgrund der indirekten Hemmung von mTOR durch Akt und hierdurch Steigerung der Autophagierate zu erwarten war. Die starke Viabilitätsreduktion durch Perifosin in höheren Konzentrationen ist dabei jedoch wohl auf eine Hemmung der Phosphatidylcholin-Biosynthese zurückzuführen, welche zu einer Induktion der Apoptose führt.

Zuletzt wurde auf Proteinebene untersucht, ob zentrale Moleküle beziehungsweise Komplexe der Autophagie unter HES zum einen im zeitlichen Verlauf und zum anderen unter zusätzlichem Einfluss der Modulatoren eine Expressionsänderung aufwiesen. HES alleine bewirkte im zeitlichen Verlauf weitestgehend keine signifikante Expressionsänderung. Auch im Vergleich zu einer 0%-HES-Kontrolllösung konnten keine relevanten Unterschiede festgestellt werden. Die Koinkubation mit Everolimus führte zu einer erhöhten Expression der Quotienten ppERK/pERK und LC3BII/LC3BI, U0126 konnte dies jeweils weitestgehend wieder aufheben. Perifosin bewirkte ebenso wie 3-Methyladenin eine verringerte Expression von Akt, Chloroquin führte zu keiner signifikanten Expressionsänderung aller bestimmter Proteine. Darüber hinaus verursachten alle Modulatoren keine signifikante Expressionsänderung des zentralen Autophagiekomplexes Beclin1 sowie von LAMP2 und SQSTM1.

5 Zusammenfassung

beobachten. Das Autophagienetzwerk ist eng mit der zellulären Redox-Homöostase verknüpft. Eine verminderte ROS-Bildung könnte zu einer verminderten Autophagierate und somit auch verringerten Zellviabilität führen, welche durch Everolimus kompensiert wird.

Bisher ungeklärt ist auch, auf welchem Weg HES in die Zelle aufgenommen wird. Denkbar wäre, dass größere HES-Moleküle via Endozytose in die Zelle gelangen. Hierbei ist der mTORC1-Komplex ein wichtiger Regulator, der durch Everolimus gehemmt wird und somit über eine verringerte HES-Aufnahme zu einer Viabilitätssteigerung führen könnte. Kleinere HES-Moleküle dagegen könnten über Glukose-Transporter aufgenommen werden, die möglicherweise über AMPK reguliert werden. Weitere Grundlagenforschung ist nötig, um ein tieferes Verständnis über die pathophysiologischen Vorgänge im proximalen Nierentubulus unter Einwirkung von Hydroxyethylstärke zu erlangen.

6 Literaturverzeichnis

Adamik, K. N. and I. D. Yozova (2018). "Starch Wars-New Episodes of the Saga. Changes in Regulations on Hydroxyethyl Starch in the European Union." Front Vet Sci **5**: 336.

Adams, H. A. (2007). Volumen- und Flüssigkeitsersatz - Physiologie, Pathophysiologie, Pharmakologie und klinischer Einsatz. Anästhesiologie und Intensivmedizin. **48**: 448-460.

Alayev, A., P. F. Doubleday, S. M. Berger, B. A. Ballif and M. K. Holz (2014). "Phosphoproteomics reveals resveratrol-dependent inhibition of Akt/mTORC1/S6K1 signaling." J Proteome Res **13**(12): 5734-5742.

Ärzteblatt (08/2012). "Anästhesist hat jahrelang Studien manipuliert." Deutsches Ärzteblatt abgerufen am 23.05.2021, online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/51201/Anaesthesist-hat-jahrelang-Studien-manipuliert>.

Auwerda, J. J., F. W. Leebeek, J. H. Wilson, O. P. van Diggelen, K. H. Lam and P. Sonneveld (2006). "Acquired lysosomal storage caused by frequent plasmapheresis procedures with hydroxyethyl starch." Transfusion **46**(10): 1705-1711.

Barth, S., D. Glick and K. F. Macleod (2010). "Autophagy: assays and artifacts." J Pathol **221**(2): 117-124.

Bayliss, W. M. (1920). "The action of gum acacia on the circulation." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **15**(1): 29.

Behrends, C., M. E. Sowa, S. P. Gygi and J. W. Harper (2010). "Network organization of the human autophagy system." Nature **466**(7302): 68-76.

Bellmann, R., C. Feistritzer and C. J. Wiedermann (2012). "Effect of molecular weight and substitution on tissue uptake of hydroxyethyl starch: a meta-analysis of clinical studies." Clin Pharmacokinet **51**(4): 225-236.

Berridge, M. V., P. M. Herst and A. S. Tan (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." Biotechnol Annu Rev **11**: 127-152.

Boldt, J. (2009). "PRO: hydroxyethylstarch can be safely used in the intensive care patient--the renal debate." Intensive Care Med **35**(8): 1331-1336.

Brunkhorst, F. M., C. Engel, F. Bloos, A. Meier-Hellmann, M. Ragaller, N. Weiler, . . . S. German Competence Network (2008). "Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis." N Engl J Med **358**(2): 125-139.

Bruno, R. R. (2015). Auswirkung von Infusionslösungen mit Hydroxyethylstärke (HES) auf humane proximale Tubulusepithelzellen der Niere in vitro [Dissertation], Würzburg.

Bruno, R. R., W. Neuhaus, N. Roewer, C. Wunder and M. A. Schick (2014). "Molecular size and origin do not influence the harmful side effects of hydroxyethyl starch on human proximal tubule cells (HK-2) in vitro." Anesth Analg **119**(3): 570-577.

Bundesärztekammer (2011). "Wissenschaftlicher Beirat: Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten - Aussetzung Kapitel 5 Humanalbumin." Dtsch Arztebl International **108**(1-2): 58.

Bundesärztekammer (2014). "Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten." 4. Auflage. abgerufen am 23.05.2021, online verfügbar unter http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/QLL_Haemotherapie_2014.pdf.

Chen, Y. and D. J. Klionsky (2011). "The regulation of autophagy - unanswered questions." J Cell Sci **124**(Pt 2): 161-170.

Choi, S. L., S. J. Kim, K. T. Lee, J. Kim, J. Mu, M. J. Birnbaum, . . . J. Ha (2001). "The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂." Biochem Biophys Res Commun **287**(1): 92-97.

Cuervo, A. M. and E. Wong (2014). "Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging." Cell Res **24**(1): 92-104.

de Jonge, E. and M. Levi (2001). "Effects of different plasma substitutes on blood coagulation: a comparative review." Crit Care Med **29**(6): 1261-1267.

Delaney, A. P., A. Dan, J. McCaffrey and S. Finfer (2011). "The role of albumin as a resuscitation fluid for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis." Crit Care Med **39**(2): 386-391.

Dickenmann, M., T. Oettl and M. J. Mihatsch (2008). "Osmotic nephrosis: acute kidney injury with accumulation of proximal tubular lysosomes due to administration of exogenous solutes." Am J Kidney Dis **51**(3): 491-503.

Dokladda, K., K. A. Green, D. A. Pan and D. G. Hardie (2005). "PD98059 and U0126 activate AMP-activated protein kinase by increasing the cellular AMP:ATP ratio and not via inhibition of the MAP kinase pathway." FEBS Lett **579**(1): 236-240.

Egan, D. F., M. G. Chun, M. Vamos, H. Zou, J. Rong, C. J. Miller, . . . R. J. Shaw (2015). "Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates." Mol Cell **59**(2): 285-297.

Elrod, H. A., Y. D. Lin, P. Yue, X. Wang, S. Lonial, F. R. Khuri and S. Y. Sun (2007). "The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway." Mol Cancer Ther **6**(7): 2029-2038.

EMA (2013). "PRAC recommends suspending marketing authorisations for infusion solutions containing hydroxyethyl starch." European Medicines Agency abgerufen am 23.05.2021, online verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/news/prac-recommends-suspending-marketing-authorisations-infusion-solutions-containing-hydroxyethyl>.

EMA (2017). "Notification to the PRAC/EMA secretariat of a referral under article 107i of directive 2001/83/EC." Läkemedelsverket Medical Products Agency abgerufen am 23.05.2021, online verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/hydroxyethyl-starch-article-107i-referral-notification_en.pdf.

EMA (2018). "EMA 498908/2018 Hydroxyethylstärke-haltige Lösungen: CMDh führt neue Maßnahmen zum Schutz der Patienten ein." European Medicines Agency abgerufen am 23.05.2021, online verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/hydroxyethyl-starch-article-107i-referral-hydroxyethyl-starch-solutions-cmdh-introduces-new-measures_de.pdf.

Erikstein, B. S., H. R. Hagland, J. Nikolaisen, M. Kulawiec, K. K. Singh, B. T. Gjertsen and K. J. Tronstad (2010). "Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment." J Cell Biochem **111**(3): 574-584.

Ertmer, C., S. Rehberg, H. Van Aken and M. Westphal (2009). "Relevance of non-albumin colloids in intensive care medicine." Best Pract Res Clin Anaesthesiol **23**(2): 193-212.

Executive Committee of the German Medical Association on the Recommendation of the Scientific Advisory, B. (2016). "Cross-Sectional Guidelines for Therapy with Blood Components and Plasma Derivatives: Chapter 5 Human Albumin - Revised." Transfus Med Hemother **43**(3): 223-232.

Farooque, S., M. Kenny and S. D. Marshall (2019). "Anaphylaxis to intravenous gelatin-based solutions: a case series examining clinical features and severity." Anaesthesia **74**(2): 174-179.

Feng, Y., D. He, Z. Yao and D. J. Klionsky (2014). "The machinery of macroautophagy." Cell Res **24**(1): 24-41.

Fensterle, J., B. Aicher, I. Seipelt, M. Teifel and J. Engel (2014). "Current view on the mechanism of action of perifosine in cancer." Anticancer Agents Med Chem **14**(4): 629-635.

Literaturverzeichnis

- Filomeni, G., D. De Zio and F. Cecconi (2015). "Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs." Cell Death Differ **22**(3): 377-388.
- Finfer, S., B. Liu, C. Taylor, R. Bellomo, L. Billot, D. Cook, . . . J. Myburgh (2010). "Resuscitation fluid use in critically ill adults: an international cross-sectional study in 391 intensive care units." Crit Care **14**(5): R185.
- Finfer, S., S. McEvoy, R. Bellomo, C. McArthur, J. Myburgh and R. Norton (2011). "Impact of albumin compared to saline on organ function and mortality of patients with severe sepsis." Intensive Care Med **37**(1): 86-96.
- Fotakis, G. and J. A. Timbrell (2006). "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride." Toxicol Lett **160**(2): 171-177.
- Freeman, M. R., J. Kim, M. P. Lisanti and D. Di Vizio (2011). "A metabolic perturbation by U0126 identifies a role for glutamine in resveratrol-induced cell death." Cancer Biol Ther **12**(11): 966-977.
- Fu, L., Y. A. Kim, X. Wang, X. Wu, P. Yue, S. Lonial, . . . S. Y. Sun (2009). "Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy." Cancer Res **69**(23): 8967-8976.
- Galluzzi, L., F. Pietrocola, B. Levine and G. Kroemer (2014). "Metabolic control of autophagy." Cell **159**(6): 1263-1276.
- Grahammer, F., S. K. Ramakrishnan, M. M. Rinschen, A. A. Larionov, M. Syed, H. Khatib, . . . F. Theilig (2017). "mTOR Regulates Endocytosis and Nutrient Transport in Proximal Tubular Cells." J Am Soc Nephrol **28**(1): 230-241.
- Granata, S., A. Dalla Gassa, A. Carraro, M. Brunelli, G. Stallone, A. Lupo and G. Zaza (2016). "Sirolimus and Everolimus Pathway: Reviewing Candidate Genes Influencing Their Intracellular Effects." Int J Mol Sci **17**(5).
- Guo, Z., S. Kozlov, M. F. Lavin, M. D. Person and T. T. Paull (2010). "ATM activation by oxidative stress." Science **330**(6003): 517-521.
- Habib, S. L. (2011). "Mechanism of activation of AMPK and upregulation of OGG1 by rapamycin in cancer cells." Oncotarget **2**(12): 958-959.
- Hackenbroch, V. (01/2011). "Wissenschaftliches Vakuum." DER SPIEGEL abgerufen am 23.05.2021, online verfügbar unter <https://www.spiegel.de/wissenschaft/wissenschaftliches-vakuum-a-5c804bf9-0002-0001-0000-000076121103>.
- Haissaguerre, M., N. Saucisse and D. Cota (2014). "Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis." Mol Cell Endocrinol **397**(1-2): 67-77.

Literaturverzeichnis

Hallows, K. R., P. F. Mount, N. M. Pastor-Soler and D. A. Power (2010). "Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease." Am J Physiol Renal Physiol **298**(5): F1067-1077.

Hammond, N. E., C. Taylor, S. Finfer, F. R. Machado, Y. An, L. Billot, . . . R. r. N. the (2017). "Patterns of intravenous fluid resuscitation use in adult intensive care patients between 2007 and 2014: An international cross-sectional study." PLoS One **12**(5): e0176292.

Hanada, T., N. N. Noda, Y. Satomi, Y. Ichimura, Y. Fujioka, T. Takao, . . . Y. Ohsumi (2007). "The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy." J Biol Chem **282**(52): 37298-37302.

Harnett, M. M., M. A. Pineda, P. Latre de Late, R. J. Eason, S. Besteiro, W. Harnett and G. Langsley (2017). "From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home." Biomed J **40**(1): 9-22.

Harper, N. J., T. Dixon, P. Dugue, D. M. Edgar, A. Fay, H. C. Gooi, . . . Ireland (2009). "Suspected anaphylactic reactions associated with anaesthesia." Anaesthesia **64**(2): 199-211.

Heinlein, H. and G. Hubner (1958). "[Demonstration of periston in the blood, urine and tissue]." Beitr Pathol Anat **119**(2): 301-315.

Holmstrom, K. M. and T. Finkel (2014). "Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(6): 411-421.

Hsiao, H. W., K. L. Tsai, L. F. Wang, Y. H. Chen, P. C. Chiang, S. M. Chuang and C. Hsu (2012). "The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis." Shock **37**(3): 289-296.

Iadevaia, V., R. Liu and C. G. Proud (2014). "mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis." Semin Cell Dev Biol **36**: 113-120.

Inoki, K., T. Zhu and K. L. Guan (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." Cell **115**(5): 577-590.

Invitrogen (2012, 23.03.2012). "Invitrogen PrestoBlue Cell Viability Reagent." abgerufen am 23.05.2021, online verfügbar unter <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>.

Jesch, F., G. Hübner, V. Zumtobel, M. Zimmermann and K. Messmer (1979). "Hydroxyäthylstärke (HAS 450/0,7) in Plasma und Leber Konzentrationsverlauf und histologische Veränderungen beim Menschen." Transfusion Medicine and Hemotherapy **6**(2): 112-117.

Literaturverzeichnis

- Jiang, M., K. Liu, J. Luo and Z. Dong (2010). "Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury." Am J Pathol **176**(3): 1181-1192.
- Jiang, M., Q. Wei, G. Dong, M. Komatsu, Y. Su and Z. Dong (2012). "Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury." Kidney Int **82**(12): 1271-1283.
- Johansen, T. and T. Lamark (2011). "Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins." Autophagy **7**(3): 279-296.
- Jung, C. H., C. B. Jun, S. H. Ro, Y. M. Kim, N. M. Otto, J. Cao, . . . D. H. Kim (2009). "ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery." Mol Biol Cell **20**(7): 1992-2003.
- Jungheinrich, C. and T. A. Neff (2005). "Pharmacokinetics of hydroxyethyl starch." Clin Pharmacokinet **44**(7): 681-699.
- Jungheinrich, C., W. Sauermann, F. Bepperling and N. H. Vogt (2004). "Volume efficacy and reduced influence on measures of coagulation using hydroxyethyl starch 130/0.4 (6%) with an optimised in vivo molecular weight in orthopaedic surgery : a randomised, double-blind study." Drugs R D **5**(1): 1-9.
- Kaushal, G. P., K. Chandrashekar and L. A. Juncos (2019). "Molecular Interactions Between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Kidney Disease." Int J Mol Sci **20**(15).
- Kaushal, G. P. and S. V. Shah (2016). "Autophagy in acute kidney injury." Kidney Int **89**(4): 779-791.
- Kezic, A., F. Thaiss, J. U. Becker, T. Y. Tsui and M. Bajcetic (2013). "Effects of everolimus on oxidative stress in kidney model of ischemia/reperfusion injury." Am J Nephrol **37**(4): 291-301.
- Kim, J., Y. C. Kim, C. Fang, R. C. Russell, J. H. Kim, W. Fan, . . . K. L. Guan (2013). "Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy." Cell **152**(1-2): 290-303.
- Kimura, T., Y. Takabatake, A. Takahashi and Y. Isaka (2013). "Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy." Cancer Res **73**(1): 3-7.
- Kimura, T., Y. Takabatake, A. Takahashi, J. Y. Kaimori, I. Matsui, T. Namba, . . . Y. Isaka (2011). "Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury." J Am Soc Nephrol **22**(5): 902-913.
- Kitada, M. and D. Koya (2013). "Renal protective effects of resveratrol." Oxid Med Cell Longev **2013**: 568093.

Literaturverzeichnis

- Klionsky, D. J. (2005). "The molecular machinery of autophagy: unanswered questions." J Cell Sci **118**(Pt 1): 7-18.
- Klionsky, D. J. (2008). "Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve." Autophagy **4**(6): 740-743.
- Klionsky, D. J., K. Abdelmohsen, A. Abe, M. J. Abedin, H. Abeliovich, A. Acevedo Arozena, . . . S. M. Zughaier (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy **12**(1): 1-222.
- Kondapaka, S. B., S. S. Singh, G. P. Dasmahapatra, E. A. Sausville and K. K. Roy (2003). "Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation." Mol Cancer Ther **2**(11): 1093-1103.
- Korolchuk, V. I., S. Saiki, M. Lichtenberg, F. H. Siddiqi, E. A. Roberts, S. Imarisio, . . . D. C. Rubinsztein (2011). "Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses." Nat Cell Biol **13**(4): 453-460.
- LaRosa, C. and S. M. Downs (2005). "MEK inhibitors block AICAR-induced maturation in mouse oocytes by a MAPK-independent mechanism." Mol Reprod Dev **70**(2): 235-245.
- Le Gal, Y. M. (1975). "A review of the history of blood replacement from the 17th to the 20th centuries." Rev Surg **32**(4): 229-239.
- Legendre, C., E. Thervet, B. Page, A. Percheron, L. H. Noel and H. Kreis (1993). "Hydroxyethylstarch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation." Lancet **342**(8865): 248-249.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2017). "Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(2): 201-205.
- Li, W. W., J. Li and J. K. Bao (2012). "Microautophagy: lesser-known self-eating." Cell Mol Life Sci **69**(7): 1125-1136.
- Lippai, M. and P. Low (2014). "The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy." Biomed Res Int **2014**: 832704.
- Liu, W. J., M. N. Luo, J. Tan, W. Chen, L. Z. Huang, C. Yang, . . . H. F. Liu (2014). "Autophagy activation reduces renal tubular injury induced by urinary proteins." Autophagy **10**(2): 243-256.
- Liu, W. J., L. Ye, W. F. Huang, L. J. Guo, Z. G. Xu, H. L. Wu, . . . H. F. Liu (2016). "p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation." Cell Mol Biol Lett **21**: 29.
- Mack, H. I., B. Zheng, J. M. Asara and S. M. Thomas (2012). "AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 regulates ATG9 localization." Autophagy **8**(8): 1197-1214.

Literaturverzeichnis

- Maes, H., N. Rubio, A. D. Garg and P. Agostinis (2013). "Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response." Trends Mol Med **19**(7): 428-446.
- Manning, B. D. and A. Toker (2017). "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network." Cell **169**(3): 381-405.
- Matsuura, A., M. Tsukada, Y. Wada and Y. Ohsumi (1997). "Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*." Gene **192**(2): 245-250.
- Mendoza, M. C., E. E. Er and J. Blenis (2011). "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." Trends Biochem Sci **36**(6): 320-328.
- Mizushima, N., B. Levine, A. M. Cuervo and D. J. Klionsky (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature **451**(7182): 1069-1075.
- Mizushima, N. and T. Yoshimori (2007). "How to interpret LC3 immunoblotting." Autophagy **3**(6): 542-545.
- Morita, M., S. P. Gravel, L. Hulea, O. Larsson, M. Pollak, J. St-Pierre and I. Topisirovic (2015). "mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation." Cell Cycle **14**(4): 473-480.
- Myburgh, J. A., S. Finfer, R. Bellomo, L. Billot, A. Cass, D. Gattas, . . . G. New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials (2012). "Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care." N Engl J Med **367**(20): 1901-1911.
- Neuhaus, W., M. A. Schick, R. R. Bruno, B. Schneiker, C. Y. Forster, N. Roewer and C. Wunder (2012). "The effects of colloid solutions on renal proximal tubular cells in vitro." Anesth Analg **114**(2): 371-374.
- Nikoletopoulou, V., M. Markaki, K. Palikaras and N. Tavernarakis (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." Biochim Biophys Acta **1833**(12): 3448-3459.
- Nishimoto, S. and E. Nishida (2006). "MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2." EMBO Rep **7**(8): 782-786.
- O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton and F. Pognan (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." Eur J Biochem **267**(17): 5421-5426.
- Oroszlan, M., M. Bieri, N. Ligeti, A. Farkas, B. Meier, H. P. Marti and P. Mohacsi (2010). "Sirolimus and everolimus reduce albumin endocytosis in proximal tubule cells via an angiotensin II-dependent pathway." Transpl Immunol **23**(3): 125-132.
- Ostermann, M. and R. W. Chang (2007). "Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE." Crit Care Med **35**(8): 1837-1843; quiz 1852.

Literaturverzeichnis

Pastor-Soler, N. M. and K. R. Hallows (2012). "AMP-activated protein kinase regulation of kidney tubular transport." Curr Opin Nephrol Hypertens **21**(5): 523-533.

Patel, A., K. Pieper, J. A. Myburgh, V. Perkovic, S. Finfer, Q. Yang, . . . L. Billot (2017). "Reanalysis of the Crystalloid versus Hydroxyethyl Starch Trial (CHEST)." N Engl J Med **377**(3): 298-300.

Perel, P., I. Roberts and K. Ker (2013). "Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients." Cochrane Database Syst Rev **2**: CD000567.

Periyasamy-Thandavan, S., M. Jiang, Q. Wei, R. Smith, X. M. Yin and Z. Dong (2008). "Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells." Kidney Int **74**(5): 631-640.

Perner, A., N. Haase, A. B. Guttormsen, J. Tenhunen, G. Klemenzson, A. Aneman, . . . G. Scandinavian Critical Care Trials (2012). "Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis." N Engl J Med **367**(2): 124-134.

Petiot, A., E. Ogier-Denis, E. F. Blommaert, A. J. Meijer and P. Codogno (2000). "Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells." J Biol Chem **275**(2): 992-998.

Pillebout, E., D. Nochy, G. Hill, F. Conti, C. Antoine, Y. Calmus and D. Glotz (2005). "Renal histopathological lesions after orthotopic liver transplantation (OLT)." Am J Transplant **5**(5): 1120-1129.

Prutz, W. A., J. Butler and E. J. Land (1996). "Photocatalytic and free radical interactions of the heterocyclic N-oxide resazurin with NADH, GSH, and Dopa." Arch Biochem Biophys **327**(2): 239-248.

Puertollano, R. (2014). "mTOR and lysosome regulation." F1000Prime Rep **6**: 52.

Reczek, C. R. and N. S. Chandel (2015). "ROS-dependent signal transduction." Curr Opin Cell Biol **33**: 8-13.

Reggiori, F. and C. Ungermann (2017). "Autophagosome Maturation and Fusion." J Mol Biol **429**(4): 486-496.

Rehm, M. (2013). "Limited applications for hydroxyethyl starch." Der Anaesthesist **62**(8): 644-655.

Rehm, M., M. Paptistella and H.-J. Dieterich (2012). "Volumenersatzlösungen." Die Anästhesiologie: Allgemeine und spezielle Anästhesiologie, Schmerztherapie und Intensivmedizin: 352-376.

Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella and L. Minor "Cell Viability Assays. BTI - Assay Guidance Manual."

- Rubinstein, A. D. and A. Kimchi (2012). "Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis." J Cell Sci **125**(Pt 22): 5259-5268.
- Ryan, M. J., G. Johnson, J. Kirk, S. M. Fuerstenberg, R. A. Zager and B. Torok-Storb (1994). "HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney." Kidney Int **45**(1): 48-57.
- Ryter, S. W., S. M. Cloonan and A. M. Choi (2013). "Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis." Mol Cells **36**(1): 7-16.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil and Z. Elazar (2019). "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." EMBO J **38**(10).
- Schick, M. A., T. J. Isbary, N. Schlegel, J. Brugger, J. Waschke, R. Muellenbach, . . . C. Wunder (2010). "The impact of crystalloid and colloid infusion on the kidney in rodent sepsis." Intensive Care Med **36**(3): 541-548.
- Schmidt-Hieber, M., C. Loddenkemper, S. Schwartz, G. Arntz, E. Thiel and M. Notter (2006). "Hydrops lysosomal generalisatus--an underestimated side effect of hydroxyethyl starch therapy?" Eur J Haematol **77**(1): 83-85.
- Schneider, J. L. and A. M. Cuervo (2014). "Autophagy and human disease: emerging themes." Curr Opin Genet Dev **26**: 16-23.
- Scudiero, D. A., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, . . . M. R. Boyd (1988). "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines." Cancer Res **48**(17): 4827-4833.
- Shimobayashi, M. and M. N. Hall (2014). "Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 155-162.
- Stepanenko, A. A. and V. V. Dmitrenko (2015). "Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability." Gene **574**(2): 193-203.
- Su, Y., J. Lu, P. Gong, X. Chen, C. Liang and J. Zhang (2018). "Rapamycin induces autophagy to alleviate acute kidney injury following cerebral ischemia and reperfusion via the mTORC1/ATG13/ULK1 signaling pathway." Mol Med Rep **18**(6): 5445-5454.
- Sureshbabu, A., S. W. Ryter and M. E. Choi (2015). "Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury." Redox Biol **4C**: 208-214.
- Takehige, K., M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda and Y. Ohsumi (1992). "Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction." J Cell Biol **119**(2): 301-311.

- Tanida, I. (2011). "Autophagy basics." Microbiol Immunol **55**(1): 1-11.
- Tanida, I., E. Tanida-Miyake, M. Komatsu, T. Ueno and E. Kominami (2002). "Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p." J Biol Chem **277**(16): 13739-13744.
- Thiel, H. and N. Roewer (2021). Anästhesiologische Pharmakotherapie: Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis. 4., unveränderte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Vincent, J. L. and L. Gottin (2011). "Type of fluid in severe sepsis and septic shock." Minerva Anesthesiol **77**(12): 1190-1196.
- Vinod, V., C. J. Padmakrishnan, B. Vijayan and S. Gopala (2014). "'How can I halt thee?' The puzzles involved in autophagic inhibition." Pharmacol Res **82**: 1-8.
- von Roten, I., C. Madjdpour, P. Frascarolo, M. A. Burmeister, A. Fisch, S. Schramm, . . . D. R. Spahn (2006). "Molar substitution and C2/C6 ratio of hydroxyethyl starch: influence on blood coagulation." Br J Anaesth **96**(4): 455-463.
- Weyermann, J., D. Lochmann and A. Zimmer (2005). "A practical note on the use of cytotoxicity assays." Int J Pharm **288**(2): 369-376.
- Wiedermann, C. J. and M. Joannidis (2014). "Accumulation of hydroxyethyl starch in human and animal tissues: a systematic review." Intensive Care Med **40**(2): 160-170.
- Wiedermann, C. J. and M. Joannidis (2014). "Albumin replacement in severe sepsis or septic shock." N Engl J Med **371**(1): 83.
- Wu, Y. T., H. L. Tan, G. Shui, C. Bauvy, Q. Huang, M. R. Wenk, . . . H. M. Shen (2010). "Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase." J Biol Chem **285**(14): 10850-10861.
- Xu, S., Y. Cai and Y. Wei (2014). "mTOR Signaling from Cellular Senescence to Organismal Aging." Aging Dis **5**(4): 263-273.
- Yang, X., X. Yan, D. Yang, J. Zhou, J. Song and D. Yang (2018). "Rapamycin attenuates mitochondrial injury and renal tubular cell apoptosis in experimental contrast-induced acute kidney injury in rats." Biosci Rep **38**(6).
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Eaten alive: a history of macroautophagy." Nat Cell Biol **12**(9): 814-822.
- Yin, Z., H. Popelka, Y. Lei, Y. Yang and D. J. Klionsky (2020). "The Roles of Ubiquitin in Mediating Autophagy." Cells **9**(9).

Literaturverzeichnis

Young, A. R., E. Y. Chan, X. W. Hu, R. Kochl, S. G. Crawshaw, S. High, . . . S. A. Tooze (2006). "Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes." J Cell Sci **119**(Pt 18): 3888-3900.

Yung, H. W., A. Wyttenbach and A. M. Tolkovsky (2004). "Aggravation of necrotic death of glucose-deprived cells by the MEK1 inhibitors U0126 and PD184161 through depletion of ATP." Biochem Pharmacol **68**(2): 351-360.

Zarychanski, R., A. M. Abou-Setta, A. F. Turgeon, B. L. Houston, L. McIntyre, J. C. Marshall and D. A. Fergusson (2013). "Association of hydroxyethyl starch administration with mortality and acute kidney injury in critically ill patients requiring volume resuscitation: a systematic review and meta-analysis." JAMA **309**(7): 678-688.

Zeng, Y., X. Tian, Q. Wang, W. He, J. Fan and X. Gou (2018). "Attenuation of everolimus-induced cytotoxicity by a protective autophagic pathway involving ERK activation in renal cell carcinoma cells." Drug Des Devel Ther **12**: 911-920.

Zhang, J., J. Kim, A. Alexander, S. Cai, D. N. Tripathi, R. Dere, . . . C. L. Walker (2013). "A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS." Nat Cell Biol **15**(10): 1186-1196.

Ziese, W. (1934) "Beitrag zur Spezifität der Amylasen. Einwirkung von Amylasen auf Oxyäthylstärke." **229**, 213-218 DOI: doi:10.1515/bchm2.1934.229.4-6.213.

Appendix

I **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1:	Übersicht über den weltweiten Einsatz von Infusionslösungen.....	4
Abbildung 1-2:	Übersicht über den weltweiten Einsatz von Kolloiden	5
Abbildung 1-3:	Schema der Umwandlung von Stärke in HES.....	8
Abbildung 1-4:	Formen der Autophagie	17
Abbildung 1-5:	Stadien der Autophagosombildung	18
Abbildung 1-6:	Regulation der Autophagie	19
Abbildung 1-7:	Medikamentöse Regulation des Autophagiezyklus	22
Abbildung 2-1:	XTT-Strukturformeln	35
Abbildung 2-2:	Strukturformeln des PrestoBlue-Kits	36
Abbildung 3-1:	EZ4U: Konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion der HK-2- Zellen durch HES.....	44
Abbildung 3-2:	EZ4U: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Viabilitätsreduktion	45
Abbildung 3-3:	PrestoBlue: Bestimmung der Exzitationen der Versuchslösungen ohne Zellen.....	47
Abbildung 3-4:	PrestoBlue: Bestimmung der Interaktion des PrestoBlue- Farbstoffs und HES	48
Abbildung 3-5:	PrestoBlue: Einfluss der Inkubationsdauer auf die Viabilitätsreduktion.....	50
Abbildung 3-6:	EZ4U: Partielle Aufhebung der HES-induzierten Viabilitätsreduktion durch Everolimus.....	53
Abbildung 3-7:	EZ4U: Partielle Aufhebung der HES-induzierten Viabilitätsreduktion durch Everolimus (Evo) mit 30 µM nach sieben Stunden Inkubation	54
Abbildung 3-8:	PrestoBlue: Verstärkung der HES-induzierten Viabilitätsreduktion durch Everolimus.....	55
Abbildung 3-9:	PrestoBlue: Potentielle Reversibilität	57

Abbildung 3-10: Westernblotanalyse der Proteinexpression von Beclin1 im zeitlichen Verlauf.....	60
Abbildung 3-11: Westernblotanalyse der Proteinexpression von LAMP2 im zeitlichen Verlauf.....	61
Abbildung 3-12: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten aus LC3BII und LC3BI im zeitlichen Verlauf	62
Abbildung 3-13: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten aus pAkt und Akt123 im zeitlichen Verlauf	63
Abbildung 3-14: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten aus ppERK und pERK im zeitlichen Verlauf.....	65
Abbildung 3-15: Westernblotanalyse der Proteinexpression von p62 (= SQSTM1) im zeitlichen Verlauf.....	66
Abbildung 3-16: EZ4U: Einfluss von 30 μ M Rapamycin (Rap) auf die Viabilitätsreduktion durch 0,75% HES	68
Abbildung 3-17: EZ4U: Einfluss von jeweils 30 μ M Everolimus (Evo) sowie 30 μ M U0126 und deren Kombination auf die Zellviabilität	69
Abbildung 3-18: EZ4U: Einfluss von jeweils 30 μ M Everolimus (Evo) sowie 30 μ M Chloroquin (CO) und deren Kombination auf die Zellviabilität	71
Abbildung 3-19: EZ4U: Einfluss von Perifosin (Peri) in aufsteigender Konzentration auf die Zellviabilität nach sieben Stunden Inkubation unter 0% HES	72
Abbildung 3-20: EZ4U: Einfluss von Perifosin (Peri) in aufsteigender Konzentration auf die Zellviabilität nach sieben Stunden Inkubation unter 0,75% HES	73
Abbildung 3-21: EZ4U: Einfluss von 3-Methyladenin (3-MA) verschiedener Konzentration unter 0% HES	75
Abbildung 3-22: EZ4U: Einfluss von 3-Methyladenin (3-MA) aufsteigender Konzentration sowie 30 μ M Everolimus (Evo) bei 0,75% HES	76
Abbildung 3-23: EZ4U: Einfluss von 30 μ M Resveratrol (Resv) auf die HES-induzierte Zellviabilitätsreduktion	77

Abbildung 3-24: Westernblotanalyse der Proteinexpression von Beclin1.....	80
Abbildung 3-25: Westernblotanalyse der Proteinexpression von LAMP2	81
Abbildung 3-26: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten von LC3BII und LC3BI.....	82
Abbildung 3-27: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten von pAkt und Akt123.....	83
Abbildung 3-28: Westernblotanalyse der Proteinexpression des Quotienten von ppERK und pERK	84
Abbildung 3-29: Westernblotanalyse der Proteinexpression von p62 (= SQSTM1).....	86
Abbildung 4-1: Elektronenmikroskopisches Bild einer osmotischen Nephrose.....	88
Abbildung 5-1: Zusammenfassung der Ergebnisse.....	110

II Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Christian Wunder für die Überlassung des Themas und die Durchführung der wissenschaftlichen Arbeit, der bis zu seinem Weggang nach Stuttgart im Jahr 2016 die Arbeitsgruppe leitete.

Vor allem aber bedanke ich mich sehr herzlich bei meinen beiden Betreuern, Herrn Priv.-Doz. Dipl.-Ing. Dr. Winfried Neuhaus und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Schick. Ihr Engagement, ihre konstruktive Kritik und ihre außerordentliche Unterstützung ermöglichten es mir, wissenschaftliches Arbeiten und Denken zu erlernen und waren Voraussetzung für ein gutes Vorankommen bei meiner Dissertation.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei den medizinisch-technischen Assistentinnen des ZOM, insbesondere bei Frau Anja Neuhoff, B. Sc., ohne deren technische und personelle Unterstützung diese Arbeit in der Form nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir mein Studium und die Dissertation ermöglichten und ohne die ich heute nicht an meinem Platz stünde.

Der größte Dank gilt aber meiner Frau, Dr. med. Anja Stein, die mit unerschöpflicher Geduld meine Abwesenheit durch lange Stunden im Labor und am Schreibtisch ertragen hat, mich permanent unterstützt und diese Arbeit über den gesamten Zeitraum konstruktiv begleitet hat.