

**AUTOPHAGIE ALS ADAPTIVE STRESSREAKTION  
IN DER SEPTISCHEN LEBER**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Antonia Adele Klockgether  
geboren am 19.06.1992 in Berlin

## **Gutachter**

- 1. PD Dr. Ralf A. Claus, Jena**
- 2. Prof. Dr. Reinhard Wetzker, Jena**
- 3. Prof. Dr. Hans-Uwe Simon, Bern**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.09.2016**

**Abschluss des Staatsexamens: 11.12.2018**

**für meine Eltern**

"The greatest obstacle to discovery is not ignorance  
- it is the illusion of knowledge."

Daniel J. Boorstin

## Inhaltsverzeichnis

|         |  |    |
|---------|--|----|
| I       | Abkürzungsverzeichnis .....  | IV |
| II      | Zusammenfassung .....  | X  |
| 1       | Einleitung .....   | 1  |
| 1.1     | Grundlagen, Definition und Pathophysiologie der Sepsis .....         | 1  |
| 1.2     | Wirtsreaktion der Leber .....  | 6  |
| 1.2.1   | Definition, Diagnostik und klinische Präsentation .....              | 6  |
| 1.3     | Autophagie .....   | 9  |
| 1.3.1   | Definition, Einteilung und Funktion .....                            | 9  |
| 1.3.2   | Die zentrale Maschinerie und Regulation der Autophagie .....         | 13 |
| 2       | Ziele der Arbeit .....   | 22 |
| 3       | Material und Methoden .....  | 24 |
| 3.1     | Materialien .....  | 24 |
| 3.1.1   | Chemikalien .....  | 24 |
| 3.1.2   | Primäre und sekundäre Antikörper für SDS-PAGE und Western Blot ..... | 25 |
| 3.1.3   | Primer für die qPCR .....  | 26 |
| 3.1.4   | Referenzgene für die qPCR .....                                      | 26 |
| 3.1.5   | Kits .....   | 27 |
| 3.1.6   | Geräte .....   | 27 |
| 3.1.7   | Verbrauchsmaterialien .....  | 28 |
| 3.2     | Methoden .....   | 29 |
| 3.2.1   | Studiendesign .....  | 29 |
| 3.2.2   | Tiermodell .....   | 30 |
| 3.2.2.1 | Polymikrobielle Sepsis .....   | 30 |
| 3.2.2.2 | Echokardiographie .....  | 31 |
| 3.2.2.3 | Serumanalysen .....  | 31 |
| 3.2.3   | <i>Real-time</i> quantitative PCR .....                              | 32 |

|          |   |      |
|----------|---|------|
| 3.2.3.1  | Datenbanken .....   | 32   |
| 3.2.3.2  | RNA-Isolation aus Lebergewebe .....   | 32   |
| 3.2.3.3  | Quantifizierung der RNA mittels Spektrophotometrie .....  | 33   |
| 3.2.3.4  | Gelelektrophorese der RNA.....  | 33   |
| 3.2.3.5  | cDNA-Synthese .....   | 34   |
| 3.2.3.6  | qPCR .....  | 35   |
| 3.2.3.7  | Primeretablierung und Effizienzbestimmung.....  | 37   |
| 3.2.3.8  | Schmelzkurvenanalyse .....  | 38   |
| 3.2.3.9  | Referenzgenanalyse .....  | 38   |
| 3.2.3.10 | Normalisierung der Genexpressionsdaten.....   | 39   |
| 3.2.4    | Proteinbiochemische Methoden.....   | 40   |
| 3.2.4.1  | Zell-Lyse .....   | 40   |
| 3.2.4.2  | BCA-Test .....  | 40   |
| 3.2.4.3  | Gießen der Gele .....   | 41   |
| 3.2.4.4  | SDS-PAGE .....  | 42   |
| 3.2.4.5  | Western Blot .....  | 43   |
| 3.2.5    | Statistik .....   | 44   |
| 3.2.6    | Nomenklatur der Gene und Proteine .....   | 44   |
| 4        | Ergebnisse.....   | 45   |
| 4.1      | Genexpressionsanalyse der Schlüsselmoleküle der Autophagosombildung<br>in septischen Ratten .....           | 45   |
| 4.2      | Analyse der Genexpression von Schlüsselmolekülen der Induktion der<br>Autophagie in septischen Ratten ..... | 48   |
| 4.3      | Relative Proteinmengen.....   | 50   |
| 4.4      | Hierarchische Clusteranalyse .....  | 53   |
| 5        | Diskussion .....  | 56   |
| 6        | Schlussfolgerung .....  | 75   |
| V        | Literatur- und Quellenverzeichnis .....   | VIII |

|      |   |        |
|------|---|--------|
| VI   | Anhang .....  | XXXI   |
| VI.1 | Mikrobiologische Analyse der gepoolten Faeces ..... | XXXI   |
| VI.2 | Klinischer Score .....                              | XXXII  |
| VI.3 | Klinische Daten .....                               | XXXIII |
| VI.4 | Abbildungsverzeichnis .....                         | XXXV   |
| VI.5 | Danksagung.....                                     | XXXVI  |
| VI.6 | Ehrenwörtliche Erklärung.....                       | XXXVII |

## I Abkürzungsverzeichnis

|              |   |
|--------------|---|
| ACTB         | Actin $\beta$   |
| ALI          | <i>acute lung injury</i>                                  |
| AMBRA1       | <i>activating molecule in Beclin1-regulated autophagy</i> |
| AMP          | Adenosinmonophosphat                                      |
| AMPK         | AMP-aktivierte Proteinkinase                              |
| AP-1         | <i>activator protein 1</i>                                |
| APS          | Ammoniumpersulfat   |
| aq. dest.    | <i>aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)             |
| ATG          | <i>autophagy-related</i>                                  |
| Atg12        | <i>autophagy protein 12</i>                               |
| Atg16L       | <i>autophagy 16-like protein</i>                          |
| Atg5         | <i>autophagy protein 5</i>                                |
| ATP          | Adenosintriphosphat                                       |
| ATPase       | Adenosintriphosphatase                                    |
| BCA          | <i>bicinchoninic acid</i>                                 |
| Bcl-2        | <i>B-cell lymphoma 2</i>                                  |
| Beclin-1     | Gentranskriptbezeichnung von <i>Becn1</i>                 |
| <i>Becn1</i> | <i>Beclin 1, autophagy related</i>                        |
| BNIP3        | <i>BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3</i>   |
| BSA          | <i>bovine serum albumin</i>                               |
| cDNA         | <i>complementary DNA</i>                                  |
| CLP          | <i>cecal ligation and puncture</i>                        |
| CO           | Kohlenstoffmonoxid  |
| CRP          | C-reaktives Protein                                       |
| Ct           | <i>cycle threshold</i>                                    |
| DIC          | disseminierte intravasale Gerinnung                       |
| DNA          | <i>deoxyribonucleic acid</i>                              |
| DNase        | Desoxyribonuklease  |
| dT           | Desoxythymidin  |
| E            | Effizienz   |

|                  |  |
|------------------|--|
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EF               | Ejektionsfraktion  |
| Endophilin B1    | <i>Bax-interacting factor 1</i>  |
| ER               | endoplasmatisches Retikulum  |
| Fe               | Eisen  |
| FIP200           | <i>focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD</i>        |
| FSD              | <i>Fibrinogen storage disease</i>  |
| fw               | <i>forward</i>   |
| GABA             | $\gamma$ -Aminobuttersäure   |
| GABARAP          | <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid receptor-associated protein</i> |
| GAPDH            | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                                 |
| GAPs             | <i>GTPase-activating proteins</i>  |
| GATE-16          | <i>Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa</i>                        |
| GC               | Guanin, Cytosin  |
| GDP              | Guanosindiphosphat   |
| GEFs             | <i>guanine nucleotide-exchange factors</i>                               |
| Gln              | Glutamin   |
| Glu              | Glutaminsäure  |
| GTP              | Guanosintriphosphat  |
| HCl              | Salzsäure  |
| $\text{HCO}_3^-$ | Hydrogencarbonat   |
| HIF-1 alpha      | <i>hypoxia-inducible factor-1 alpha</i>                                  |
| HMBS             | Hydroxymethylbilan-Synthase  |
| <i>Hmox1</i>     | <i>heme oxygenase 1</i>  |
| HO-1             | Hämoxygenase-1, Gentranskriptbezeichnung von <i>Hmox1</i>                |
| HOPS             | <i>homotypic fusion and vacuolar protein sorting</i>                     |
| HPRT             | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase                                   |
| HR               | <i>heart rate</i>  |
| hsc70            | <i>heat shock cognate protein</i>  |
| HZV              | Herzminutenvolumen   |
| i. p.            | intraperitoneal  |



|                |  |
|----------------|--|
| ICG            | Indocyaningrün   |
| IFN- $\gamma$  | Interferon- $\gamma$   |
| IL             | Interleukin  |
| IZKF           | Interdisziplinäres Zentrum für Klinische<br>Forschung  |
| JAK            | <i>Janus kinase</i>  |
| JNK/c-Jun      | <i>c-Jun N-terminal kinase/c-Jun</i>   |
| LAMP-2A        | <i>lysosome-associated membrane protein<br/>type-2A</i>                                      |
| LODS           | <i>logistic organ dysfunction system</i>   |
| LPS            | Lipopolysaccharid  |
| Lys            | Lysin  |
| mAb            | <i>monoclonal antibody</i>   |
| MAM            | <i>mitochondrial-associated membrane at the ER</i>   |
| MAP1LC3        | <i>microtubule-associated protein 1A/1B-light<br/>chain 3</i>                                |
| MFN2           | Mitofusin-2  |
| mLST8          | <i>mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>   |
| MODS           | <i>multiple organ dysfunction score</i>  |
| mTOR           | <i>mechanistic target of rapamycin</i>   |
| MW             | <i>molecular weight</i>  |
| MyD88          | <i>myeloid differentiation factor 88</i>   |
| NaCl           | Natriumchlorid   |
| NF- $\kappa$ B | <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>   |
| NO             | Stickstoffmonoxid  |
| NSF            | <i>vesicle-associated N-ethylmaleimide-sensitive<br/>factor attachment protein receptors</i> |
| OATL1          | <i>ornithine aminotransferase-like 1</i>   |
| p150           | <i>serine/threonine kinase Vps15</i>   |
| p62/SQSTM1     | <i>sequestosome-1</i>  |
| PAGE           | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| PAMPs          | <i>pathogen-associated molecular patterns</i>  |
| PAS            | <i>phagophore assembly site</i>  |
| P-Beclin-1     | Phospho-Beclin-1   |

|                    |  |
|--------------------|--|
| PCI                | <i>peritoneal contamination and infection</i>  |
| pCO <sub>2</sub>   | CO <sub>2</sub> -Partialdruck  |
| PCR                | Polymerase-Kettenreaktion  |
| PDR <sub>ICG</sub> | Indocyaningrün-Plasmaverschwinderate   |
| PE                 | Phosphatidylethanolamin  |
| Phe                | Phenylalanin   |
| PI(3)K             | <i>class III phosphoinositol-3 kinase</i>  |
| PI3P               | Phosphatidylinositol 3-phosphat  |
| PMN                | <i>polymorphonuclear leukocytes</i>  |
| pO <sub>2</sub>    | O <sub>2</sub> -Partialdruck   |
| PRRs               | <i>pattern-recognition receptors</i>   |
| PTM                | posttranslationale Proteinmodifikation   |
| PVC                | Polyvinylchlorid   |
| PVDF               | Polyvinylidenfluorid   |
| PWD                | <i>Pulsed-wave Doppler</i>   |
| qPCR               | <i>real-time</i> quantitative PCR  |
| Rab33b             | <i>Ras-related in brain 33b</i>  |
| Raptor             | <i>regulatory associated protein of mTOR</i>   |
| REs                | <i>recycling-endosomes</i>   |
| resp.              | respektiv  |
| RNA                | <i>ribonucleic acid</i>  |
| RNAi               | RNA-Interferenz  |
| RNase              | Ribonuklease   |
| ROS                | reaktive Sauerstoffspezies   |
| RR                 | <i>respiration rate</i>  |
| RT                 | Raumtemperatur   |
| Rubicon            | <i>RUN domain protein as Beclin1 interacting and cysteine-rich containing</i>            |
| rv                 | <i>reverse</i>   |
| SaO <sub>2</sub>   | Sauerstoffsättigung  |
| SDS                | <i>sodium dodecyl sulfate</i>  |
| SERPINA1           | <i>serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 1</i> |
| SIRS               | systemisches inflammatorisches   |

|                |  |
|----------------|--|
|                | Response-Syndrom   |
| SNARE          | <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment receptors</i>            |
| SOFA           | <i>sepsis-related organ failure assessment</i>   |
| STAT           | <i>signal transducer and activator of transcription</i>                                  |
| SV             | Schlagvolumen  |
| TBS            | <i>tris-buffered saline</i>  |
| TdT            | <i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>   |
| TECPR1         | <i>Tectonin beta-propeller repeat containing 1</i>                                       |
| TEMED          | Tetramethylethyldiamin   |
| TFEB           | Transkriptionsfaktor EB  |
| TGF- $\beta$ 1 | <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i>                                    |
| TIR            | <i>Toll/interleukin-1 receptor</i>   |
| TLR2           | <i>Toll-like receptor 2</i>  |
| T <sub>m</sub> | Schmelztemperatur  |
| TNF- $\alpha$  | Tumornekrosefaktor- $\alpha$   |
| Trif           | <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>              |
| TUNEL          | <i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>   |
| ULK1           | <i>uncoordinated 51-like kinase 1</i>  |
| UPR            | <i>unfolded protein response</i>   |
| UVRAG          | <i>UV-irradiation-resistance-associated gene protein</i>                                 |
| VAMP3          | <i>vesicle-associated membrane protein 3</i>   |
| VAMP8          | <i>vesicle-associated membrane protein 8</i>   |
| VMP1           | <i>vacuole membrane protein 1</i>  |
| VPS34          | <i>vacuolar protein sorting 34</i>   |
| v-SNARE        | <i>vesicle-associated N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i> |
| VTI            | <i>velocity time integral</i>  |
| Vti1b          | <i>vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B</i>                    |
| WIPI           | <i>WD-repeat protein interacting with phosphoinositides</i>                              |

### Verwendete Einheiten

|      |                               |
|------|-------------------------------|
| %    | Prozent                       |
| °C   | Grad Celsius                  |
| bp   | Basenpaare                    |
| Da   | Dalton                        |
| g    | Gramm                         |
| g    | mittlere Erdbeschleunigung    |
| G    | Gauge                         |
| h    | Stunde                        |
| Hz   | Hertz                         |
| K    | Kelvin                        |
| l    | Liter                         |
| M    | Molar                         |
| m    | Meter                         |
| min  | Minute                        |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule   |
| Pa   | Partialdruck                  |
| Rpm  | <i>revolutions per minute</i> |
| s    | Sekunden                      |
| U    | <i>units</i>                  |

### Verwendete Präfixe

|   |       |
|---|-------|
| μ | mikro |
| k | kilo  |
| m | milli |
| M | mega  |
| n | nano  |

## II Zusammenfassung

**Hintergrund** Die zelluläre Stressreaktion der Leber ist bei Sepsis unvollständig erforscht und entzieht sich daher weitgehend zielgerichteten therapeutischen Ansätzen, die auf biomolekularen Wirkmechanismen basieren; daher waren klinische Studien bisher weitgehend erfolglos. Insgesamt ist das Leberversagen Prognose-limitierend. Bei genauerer Betrachtung konnte festgestellt werden, dass eine gesteigerte Autophagie in Hepatozyten sowohl von septischen Patienten als auch in Tiermodellen zu verzeichnen ist. Des Weiteren wurde die Autophagie als ein protektiver Faktor identifiziert, der die Apoptoserate und irreversible Organ-dysfunktionen limitiert. Zur Zeit sind der Einfluss und das Ausmaß der Autophagie in der Sepsis noch unzureichend erforscht.

**Zielstellung** Wir untersuchten die Hypothese, ob die Autophagie bei Sepsis als adaptive Stressreaktion in der Leber differenzielle Expressionsmuster der Transkripte und Proteinmodifikationen in den stratifizierten Untersuchungsgruppen aufweist. Zudem wurde untersucht, ob insbesondere die frühe Autophagosombildung in den ersten 6 h der Sepsis prognoseentscheidend ist.

**Methodik** Um eine polymikrobiell-induzierte systemische Inflammation zu simulieren, wurden die Ratten der Untersuchungsgruppe nach dem PCI-Modell einer intraperitonealen (i. p) Faecesinjektion (PCI-Modell der Sepsis) unterzogen. 6 h *post injectionem* wurden die Versuchstiere anhand der kardialen Ejektionsfraktion (EF) hinsichtlich Überlebenswahrscheinlichkeit in prognostizierte *septic survivors* und *septic non-survivors* stratifiziert. Zu den Zeitpunkten 6 h, 24 h und 72 h wurden die Lebern entnommen und kryokonserviert. Zusätzlich wurden in regelmäßigen Zeitabständen post PCI-Induktion repräsentative Marker (Zytokinspiegel, SV, HF, pCO<sub>2</sub>, Kreatinin) bestimmt. Zur Beurteilung der Autophagie wurde das Genexpressionsmuster von entscheidenden Schlüsselparametern mit Hilfe der qPCR in den Leberhomogenaten ermittelt. Weiterhin wurde der autophagische Prozess auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht.

**Ergebnisse und Diskussion** Die Erfassung der Autophagie wurde in den experimentellen Studien bislang lediglich Endpunkt-bezogen erforscht und die Untersuchungsgruppe als weitgehend homogen angesehen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ratten jedoch zu einem frühen Zeitpunkt (6 h) nach dem individuellen

Ausmaß der Wirtsreaktion gegenüber dem septischen Insult stratifiziert, indem anhand klinischer Parameter (EF) der zukünftige Verlauf der Erkrankung präzise abgeschätzt (Phänotypisierung) wurde. Die Daten wiesen bereits nach 6 h signifikante und differenzielle Expressionsniveaus zwischen den *septic survivors* und *septic non-survivors* auf. Dadurch könnte die Autophagie einen neuen Ansatz der personalisierten Medizin darstellen, um Patienten anhand des Ausmaßes der Stressreaktion einzuteilen, das *outcome* zu bestimmen und gegebenenfalls gezielte therapeutische Strategien zu initiieren.

Die Daten dieser Arbeit zeigten zudem deutlich, dass die *septic non-survivor*-Gruppe überwiegend eine zweifach gesteigerte Genexpression zum Zeitpunkt 6 h im Vergleich zu den *septic survivors* aufwies. Eine übermäßige Aktivierung des autophagischen Prozesses reflektiert die adaptive Reaktion der Zelle gegenüber Stress und kann zur Selbstzerstörung der Hepatozyten und zur Apoptose beitragen. Trotz ähnlicher, wenn nicht sogar identischer Einflussgrößen wie genetischer Hintergrund, Geschlecht, Alter, Gewicht, Umgebung und septischen Insult, wiesen die Untersuchungsgruppen differenzielle Genexpressionsniveaus auf. Mögliche Mechanismen, die diese Expressionsmuster erklären könnten, sind Transkriptionsfaktoren (TFEB, HIF-1 alpha) und posttranslationale Proteinmodifikationen.

Bei der validierenden Untersuchung ausgewählter Proteine der Autophagie zeigte sich in der *septic non-survivor*-Gruppe eine Reduktion des relativen Proteingehalts von P-Beclin-1 und eine Steigerung bei den *septic survivors* zum Zeitpunkt 24 h. Zudem waren die relativen Proteinmengen von LC3B-II in den *septic non-survivors* über den Zeitraum von 24 h auf dem Niveau der Kontrollgruppe, während bei den *septic survivors* ein Anstieg von LC3B-II nach 6 h und 72 h zu verzeichnen war.

**Schlussfolgerung** Die Ergebnisse dieser Arbeit gewährleisteten erste Einblicke in den autophagischen Prozess der septischen Leber in einer nach Überleben stratifizierten Untersuchungsgruppe. Durch die vorliegenden Daten könnten Impulse für weitere Untersuchungen gesetzt werden, um die Wechselbeziehung zwischen der Autophagie und der Apoptose näher zu betrachten und dadurch neue therapeutische Ansätze für die Detektion und Behandlung von septischen Patienten zu ermitteln. Zudem könnte eine retrospektive klinische Studie durchgeführt werden, welche die Überlebensrate der septischen Patienten beurteilt, die Autophagie-induzierende Pharmaka, wie Carbamazepin, während ihres Krankheitsverlaufes erhalten haben.

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen, Definition und Pathophysiologie der Sepsis

Die Sepsis ist heutzutage immer noch eine Herausforderung des Gesundheitswesens und eine der führenden Todesursachen auf Intensivstation. Derzeit wird die Sepsis definiert als „die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die große biologische Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ definiert (Schuster und Müller-Werdan 2005).

Ende des 19. Jahrhunderts wurde mit der Bestätigung der Keimtheorie, u. a. durch Semmelweis und Pasteur, Sepsis als systemische Infektion oder auch als „Blutvergiftung“ beschrieben, die das Resultat einer Wirtsinvasion von pathogenen Organismen in den Blutstrom war (Angus und van der Poll 2013). Mit der Einführung von Antibiotika zeigte sich jedoch, dass die Keimtheorie die Pathogenese der Sepsis nicht vollständig erklärte, da Patienten trotz erfolgreicher Eliminierung der pathogenen Organismen einen letalen Ausgang erlitten. Demzufolge stellten Wissenschaftler die Hypothese auf, dass nicht das Pathogen allein sondern die überschießende Wirtsreaktion für die Pathogenese der Sepsis verantwortlich ist (Cerra 1985).

Sepsis ist heutzutage immer noch ein dringendes Problem auf Intensivstation mit einer inakzeptablen hohen Morbidität und Mortalität. Durchschnittlich sterben in Deutschland täglich 162 Menschen an Sepsis (Brunkhorst 2015). Demzufolge ist Sepsis die dritthäufigste Todesursache in Deutschland und fordert ebenso viele Todesopfer wie der Herzinfarkt.

Lange Zeit wurde die Bakteriämie als Grundlage der Sepsisdiagnose betrachtet. Nach heutiger Auffassung ist das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion des Wirtsorganismus auf ein Pathogen ausschlaggebend für die Diagnose der Sepsis. Dabei wird das systemische inflammatorische Response-Syndrom (SIRS) von der Sepsis abgegrenzt. SIRS wird als klinisches Erscheinungsbild zur systemischen Entzündungsreaktion des Wirtsorganismus definiert, ohne dass eine Infektion nachweisbar ist (Kaukonen et al. 2015). Mit Hilfe von Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen wird die Schwere der Sepsis

beurteilt, was auch eine epidemiologische Beurteilung der Inzidenz erlaubt (Engel et al. 2007).

Sepsis kann durch monomikrobielle oder polymikrobielle Infektionen verursacht sein (Ehrentraut et al. 2012) und durch verschiedene Krankheitserreger verursacht werden, wie z. B. Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten (Cohen 2002). Diese Pathogene treten mit *pattern-recognition receptors* (PRRs, z. B. Toll-like Rezeptoren) in Interaktion, aktivieren dadurch Immunzellen und lösen die angeborene Immunabwehr aus (Wirtsreaktion). Diese Rezeptoren erkennen Strukturen, die evolutionär hoch konserviert und spezifisch für bestimmte Erregergruppen sind (z. B. LPS/Endotoxin von gramnegativen Bakterien), die sog. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Demzufolge werden sowohl proinflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 u. v. a.) als auch antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1 u. v. a.) freigesetzt. Im Wesentlichen sind die proinflammatorischen Zytokine gegen die eindringenden Pathogene gerichtet, jedoch werden sie auch für die Schädigung des umliegenden gesunden Gewebes verantwortlich gemacht (Dinarello 2000, de Jong et al. 2010). Demgegenüber sind die antiinflammatorischen Zytokine, die erst in einem späteren Stadium gebildet werden, für die Begrenzung des lokalen Gewebes Schadens wichtig und bewirken aber dadurch eine höhere Anfälligkeit gegenüber Sekundärinfektionen (Angus und van der Poll 2013). Zusätzlich werden immunkompetente Zellen, wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Thrombozyten, mittels zytokinvermittelter Diapedese durch das aktivierte Gefäßendothel an den Herd der Entzündung rekrutiert und aktiviert (Muller 2013).

Durch die Stimulierung der Inflammationsmediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-1) exprimieren die Endothelzellen Adhäsionsfaktoren, wodurch Leukozyten adhären und aktiviert werden. In Folge dessen sezernieren die Leukozyten zytotoxische Substanzen und schädigen dadurch nicht nur die pathogenen Organismen, sondern auch die Gefäßendothelzellen (Cohen 2002). Neutrophile Granulozyten (*polymorphonuclear leukocytes*, PMN) und Makrophagen reagieren ebenfalls auf die Mediatoren und setzen Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei, welche zwar entscheidend sind, um Pathogene zu eliminieren, aber auch das umliegende Gewebe und das Gefäßendothel schädigen. Folglich kommt es zu einer Steigerung der Permeabilität des Gefäßendothels und zu Mikrozirkulationsstörungen, was eine vermehrte



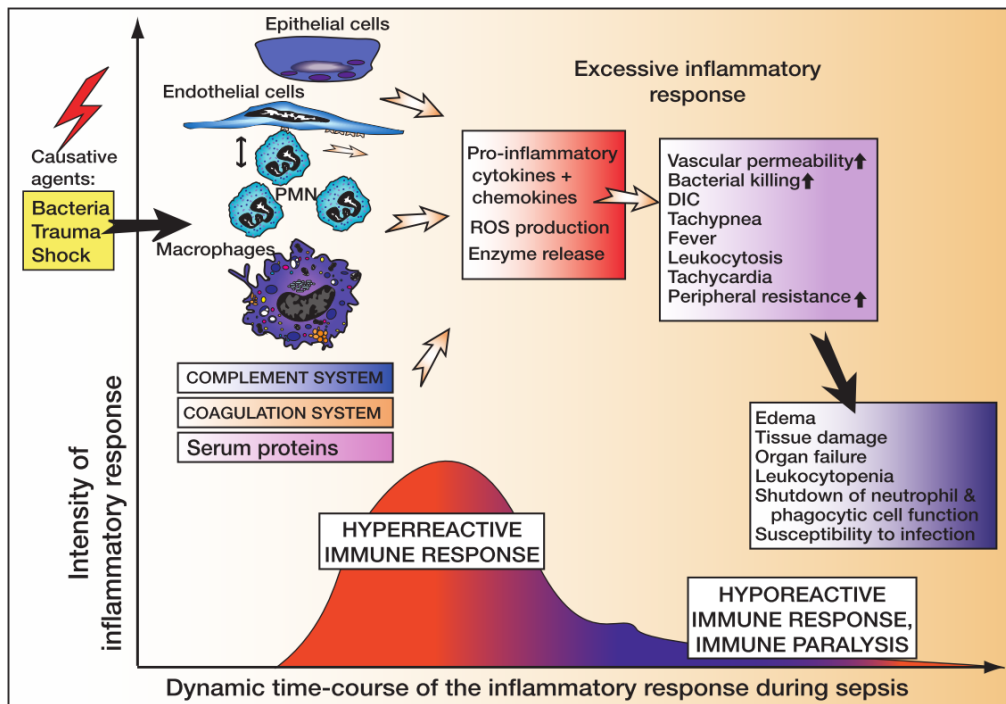
Extravasation von Flüssigkeit in das umliegende Gewebe verursacht. Zudem stimulieren die Inflammationsmediatoren die endotheliale NO-Synthetase mit darauffolgender Gefäßdilatation und Hypotension (Landry und Oliver 2001).

Ein weiterer Aspekt des inflammatorischen Prozesses sind wesentliche Veränderungen des Koagulationssystems. Septische Patienten manifestieren häufig eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) mit einem gesteigerten Verbrauch an Thrombozyten und einer verlängerten Blutgerinnungszeit. Zusätzlich tragen die oben beschriebenen Veränderungen des Gefäßendothels dazu bei, das Gerinnungssystem zu aktivieren (Remick 2007). Das komplexe Zusammenwirken dieser Mechanismen führt schließlich zu einer mikrozirkulatorischen Störung, die auch die Organperfusion betrifft und ein Multiorgandysfunktionssyndrom begünstigt (Claus et al. 2009, Bockmeyer et al. 2008).

Während der akuten Sepsis ist das Immunsystem hyperaktiv und involviert nicht nur die zellulären Abwehrmechanismen, sondern aktiviert durch die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, wie C-reaktives Protein (CRP), ebenfalls die humoralen Abwehrmechanismen, indem das Komplementsystem aktiviert wird. Dadurch wird die Komplementkomponente C5a produziert, welches die Zytokin- und Chemokinproduktion weiterhin steigert. Infolge der exzessiven Produktion von proinflammatorischen Mediatoren als auch der gesteigerten Gefäßpermeabilität und Gewebeschäden und darauffolgendem Organversagen werden die angeborenen Immunfunktionen der Wirtsreaktion dysreguliert.

Im späteren Stadium der Sepsis werden vermehrt antiinflammatorische Mediatoren produziert. Folglich resultiert eine Abnahme der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren. In dieser Phase sind diverse angeborene Immunabwehrreaktionen supprimiert, insbesondere die Funktion der neutrophilen Granulozyten ist eingeschränkt und führt somit zu einer Immunsystemparalyse (Hotchkiss und Nicholson 2006).

**Abb. 1** zeigt die schematische Darstellung der Immunantwort der Wirtsreaktion während des septischen Geschehens.



**Abb. 1: Darstellung der Intensität der Immunantwort in der Sepsis in Abhängigkeit von der Zeit** (Riedemann et al. 2003).

Bei septischen Patienten wurde beobachtet, dass in einzelnen Geweben im späteren Stadium vermehrte Apoptose und Nekrose von spezifischen Zellen zu verzeichnen ist. Insbesondere die Apoptose hat eine große klinische Relevanz im Krankheitsbild der Sepsis (Hotchkiss und Karl 2003). In erster Linie sind Lymphozyten von der beschleunigten Apoptose betroffen und tragen zur Immunparalyse bei. In immun-histochemischen Färbungen von Milzproben septischer Patienten wurde eine verringerte Anzahl an B-Lymphozyten und T-Helfer-Zellen nachgewiesen. Desgleichen wurde ein niedrigerer Anteil an T-Helfer-Zellen im peripheren Blut von septischen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen gefunden. Zudem konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass das Ausmaß der Apoptose mit dem Schweregrad der Symptome und dem Langzeitergebnis der Patienten stark korreliert (Le Tulzo et al. 2002, Hotchkiss et al. 2005). Des Weiteren zeigte sich eine Abnahme der Apoptose der T-Lymphozyten, sobald sich die Sepsis zurückbildete (Hotchkiss et al. 2005). Auch andere Zellen des Körpers, wie dendritische Zellen, Makrophagen und Epithelzellen der Darmmukosa sind während der Sepsis und dem septischen Schock in ihrer Funktion gestört und unterliegen einer erhöhten Apoptoserate (Wesche et al. 2005).

Aufgrund einer verlängerten Aktivierung des *nuclear factor κB* (NF-κB) und einer erniedrigten Caspase 3-Konzentration (Remick 2007) ist im Falle der neutrophilen Granulozyten eine verzögerte Apoptose zu verzeichnen (Taneja et al. 2004). Die Apoptose der Neutrophilen ist genauso schädlich für den Wirtsorganismus wie die übermäßige Apoptose der Lymphozyten. Neutrophile Granulozyten haben antimikrobielle Eigenschaften und gehören zu den ersten Immunzellen, die zum Herd der Entzündung rekrutiert werden. Unter physiologischen Bedingungen ist der programmierte Zelltod der Neutrophilen strikt kontrolliert und erlaubt damit eine engmaschige Kontrolle der vermittelten Entzündungsreaktion. Wenn die neutrophilen Granulozyten während der Sepsis stetig aktiviert sind und dauerhaft zytotoxische Substanzen freisetzen, können sie potenziell eine erhebliche Schädigung des umliegenden Gewebes bis hin zum Organversagen und einer erhöhten Sterblichkeitsrate des Patienten verursachen (Stearns-Kurosawa et al. 2011).

Des Weiteren kommt es während der Sepsis durch eine gesteigerte Hämolyse zur Akkumulation von Abbauprodukten des Hämoglobins, z. B. dem freien Häm (Kempe et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass gesteigerte Plasmawerte des freien Häms mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden (Janz et al. 2013). Bedingt durch proinflammatorische Stimuli und dem freien Häm wird die induzierbare Hämoxxygenase-1 (HO-1) hochreguliert (Takahashi et al. 2007) und katalysiert den ersten und limitierenden Schritt in dem oxidativen Abbau von freiem Häm zu zweiwertigem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid (CO) (Ryter und Choi 2015). Durch den Abbau vom prooxidativen Häm und die antiinflammatorischen Einflüsse von CO auf die Immunantwort, die antioxidative Wirkung von Biliverdin und Bilirubin und die Speicherung von  $\text{Fe}^{2+}$  als Ferritin (Pae und Chung 2009) beeinflusst die HO-1 inflammatorische Prozesse (Bauer et al. 2008, Kubulus et al. 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass HO-1 nicht nur eine protektive Wirkung in einem LPS-induzierten Sepsis-Modell hat (Tamion et al. 2007), sondern grundsätzlich in der Wirtsreaktion der Leber eine beträchtliche Rolle einnimmt. In Folge eines ischämischen Reperfusions-Schadens und portaler Hypertension, z. B. nach einer Lebertransplantation (Glanemann et al. 2005, Kobayashi et al. 2005), aber auch während eines septischen Schocks, konnte demonstriert werden, dass die antioxidative Wirkung von HO-1 die Regeneration der Leber positiv beeinflusst. HO-1-defiziente Mäuse präsentierten nach LPS Applizierung vermehrte Organdysfunktionen und eine erhöhte Sterblichkeitsrate (Wiesel et al. 2000).

## 1.2 Wirtsreaktion der Leber

### 1.2.1 Definition, Diagnostik und klinische Präsentation

Bei einer schweren Sepsis wird die Leber als das zentrale Organ angesehen. Sie hat wichtige Funktionen in der Wirtsreaktion und beteiligt sich an der Eliminierung von Pathogenen (Lee et al. 2013). Dementsprechend wird die adaptive Antwort der Leber auf das septische Geschehen als eine Komponente dargestellt, die zum Schweregrad des Krankheitsbildes beiträgt (Lin et al. 2015). Das akute Leberversagen wird anhand einer typischen Befundkonstellation aus schwerer Leberinsuffizienz mit Ikterus und Gerinnungsstörungen, abweichenden biochemischen Laborparametern und Bewusstseinsstörungen bei hepatischer Enzephalopathie definiert (Bernal und Wendon 2013). Bei einem vorbestehenden chronischen Leberschaden mit akuter Rekrudescenz wird von einem akut-auf-chronischen Leberversagen gesprochen. Basierend auf dem Abstand zwischen dem Beginn der Lebererkrankung und Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie wird zwischen einem hyperakuten (< 7 Tage), akuten (7-28 Tage) und subakuten Leberversagen (> 28 Tage) unterschieden (Bernal et al. 2010).

Zur Einschätzung der Organdysfunktion werden verschiedene Scoring-Systeme herangezogen, z. B. *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA), *Multiple Organ Dysfunction Score* (MODS) oder *Logistic Organ Dysfunction System* (LODS). Jedes dieser Systeme versucht den Leberschaden im Verlauf der Krankheit mit Hilfe der Bilirubinkonzentration (Peres Bota et al. 2002) und im Falle des LODS zudem mit der Prothrombinzeit zu bestimmen. Bilirubin wird häufig als klinischer Parameter zur Einschätzung der Leberfunktionsstörung gewählt, da es biochemisch einfach nachweisbar ist, eine umfangreiche Reflexion der physiologischen Leberfunktion darstellt und zwischen heterogenen Gruppen von schwer erkrankten Patienten einen signifikanten Unterschied aufzeigt. Im Gegensatz dazu wird argumentiert, dass Bilirubin ein später Marker für die exkretorischen Dysfunktion ist (Kortgen et al. 2010), eine zu geringe Spezifität aufweist und ungeeignet ist, um das gesamte Spektrum eines Leberschadens nachzuweisen (Marshall et al. 1995).

Eine weitere Möglichkeit den Leberschaden zu beurteilen, kann mittels dynamischer Verfahren, z. B. Indocyaningrün-Plasmaverschwinderate (PDR<sub>ICG</sub>) erfolgen. Indocyaningrün (ICG) ist ein im Infrarotbereich absorbierender und fluoreszierender

Farbstoff, der nahezu ausschließlich durch die Leber eliminiert wird und nicht in den enterohepatischen Kreislauf eintritt (Oellerich et al. 1991). Die Elimination von ICG aus dem Blut ist von der zellulären parenchymalen Funktion der Leber, dem Leberblutfluss und der biliären Sekretion abhängig (Sakka 2007). Somit stellt die ICG-Plasmaverschwinderate ein Maß für die Leberfunktion dar. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Schwere der Leberdysfunktion durch die  $PDR_{ICG}$  früher als durch Bilirubin angezeigt wird, sowie für die Prognose von Patienten mit schwerer Sepsis und Multiorganversagen von relevanter Bedeutung ist (Sakka et al. 2002, Merle et al. 2009). Dennoch bleibt die Beurteilung der Leberfunktion von schwer kranken Patienten eine Herausforderung, da weder statische noch dynamische Verfahren als Goldstandard angesehen werden können (Kortgen et al. 2009).

Das septische Leberversagen zeigt sich einerseits anhand der allgemeinen Symptome der Sepsis und andererseits treten organspezifische Symptome auf. Aufgrund der eingeschränkten Leberfunktion kommt es zu einer Hyperbilirubinämie im Blut mit anschließender Einlagerung im Gewebe und Gelbfärbung von Haut, Schleimhäuten und Skleren zu einem Ikterus. Die Hyperbilirubinämie kann vielfältige Ursachen haben, z. B. eine Cholestase mit Störung der Gallenbildung resp. -sekretion oder des Gallenabflusses. Des Weiteren kann es zu einer hepatischen Enzephalopathie auf Grund der Akkumulation von Ammoniak führen, wodurch es zu einer zentralnervösen Funktionsstörung bis hin zur Bewusstseinsstörung und Koma kommen kann. Hierbei werden 4 Stadien unterschieden. Das Stadium I ist von einer leichten Konzentrationschwäche, Schläfrigkeit und Dysarthrie gekennzeichnet. Im Stadium II sind eine vermehrte Bewusstseinsminderung und Feinmotorikstörungen mit sog. „flapping tremor“ zu verzeichnen. Das dritte Stadium zeichnet sich durch Sopor, stark verminderte Reaktion auf Schmerzreize und deutlichen Motorikstörungen mit Spastiken und Hypo- oder Hyperreflexie aus. Das letzte Stadium wird auch als *Coma hepaticum* bezeichnet (Toris et al. 2011). Durch die reduzierte Syntheseleistung der Leber kommt es zu einer Hypalbuminämie und infolgedessen zu einer Verminderung des onkotischen Druckes innerhalb der Gefäße, welches zusammen mit der Gefäßendothelschädigung zu generalisierten Ödemen und Aszites führt. Die verringerte Synthese von Gerinnungsfaktoren hat Spontanblutungen, insbesondere im Bereich des Gastrointestinaltraktes mit anschließender mikrozytärer Anämie durch chronischen

Blutverlust zur Folge. Zudem können die im Rahmen der Sepsis freigesetzten Zytokine durch die Leberdysfunktion nicht mehr vollständig abgebaut werden. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) mit anschließender systemischen Vasodilatation und Hypotension. Bei einem fortgeschrittenen Leberversagen kann es durch einen verringerten effektiven arteriellen Blutdruck zu einem hepato-renalen Syndrom mit Vasokonstriktion der Nierengefäße und resultierendem Nierenversagen kommen (Dundar und Yilmazlar 2015). Zudem führt die hepatozelluläre Funktionseinschränkung zu einer reduzierten Glykogensynthese sowie einer ausgeprägten Insulinresistenz, die auch als hepato-gener Diabetes mellitus bezeichnet wird (Fahy et al. 2009).

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass insbesondere die exkretorische Funktion der Leber von dem septischen Geschehen beeinflusst ist (Gonnert et al. 2013) und zu einer Cholestase führt (Chand und Sanyal 2007). Die exkretorische Funktion beschreibt die Eliminierung von Endo- und Xenobiotika und wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie z. B. die hepatozellulären Energielevel, die Aufnahme von Molekülen über die basolaterale Membran und die kanalikuläre Ausscheidung in die Gallenflüssigkeit (Oude Elferink und Jansen 1994). Während eines pathologischen Zustands werden die Endo- und Xenobiotika mit Hilfe von Transportproteinen aus dem Blut über die basolaterale Membran in die Hepatozyten befördert und können anschließend nicht mehr durch die kanalikulären Transportproteine in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden, da diese durch inflammatorische Mediatoren beeinträchtigt sind (Szabo et al. 2002). Infolgedessen akkumulieren die Endo- und Xenobiotika innerhalb der Hepatozyten und können potenziell hepatotoxisch wirken (Bolder et al. 1997). Die daraus folgende Cholestase hat v. a. Auswirkungen auf schwer kranke Patienten, die eine große Menge an Medikamenten erhalten. Die exkretorische Dysfunktion korreliert stark mit der Sterblichkeitsrate von Patienten, daher ist die akkurate Beurteilung der Leberfunktion von maßgeblicher Bedeutung (Brun-Buisson et al. 2004).

Neue tierexperimentelle Forschungen zeigen zudem, dass die Wirtsreaktion der Leber eine gesteigerte Biosynthese von Cholesterin beinhaltet und dadurch eine immunmodulierende Wirkung ausübt. In einer Studie von Weber et al. wurde die Auswirkung von *Streptococcus pneumoniae* auf die Signal- und Stoffwechselwege in verschiedenen Geweben von Mäusen untersucht. *S. pneumoniae* ist das häufigste

Pathogen der ambulant erworbenen Pneumonie und kann sich als lobuläre Pneumonie bis hin zum septischen Schock mit Leberversagen manifestieren. Die transkriptomischen und metabolischen Analysen zeigten eine bedeutende Hochregulation der Cholesterinbiosynthese in der Leber mit hohen Werten von Cholesterin und der Vorläufermoleküle Lanosterol und Demosterol im Blutplasma. Cholesterin ist in der Lage die zytolytische Aktivität von Pneumolysin zu neutralisieren und somit die Ausbreitung des Pathogens zu extrapulmonalen Organsystemen zu limitieren. Es konnte gezeigt werden, dass die immunmodulierende Wirkung der adaptiven Wirtsreaktion der Leber die Prognose verbessert, indem es die Mortalität und Morbidität senkt (Weber et al. 2012).

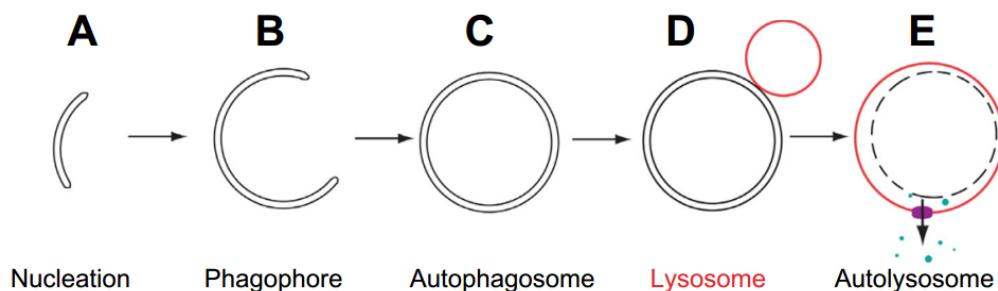
Durch das septische Geschehen sind die physiologischen Funktionen der Leber, zu denen die Eliminierung von Pathogenen und Antigenen aus dem Blut, die Proteinsynthese und Stoffwechselprozesse gehören, (Dhainaut et al. 2001) eingeschränkt und können im vollständigen Funktionsverlust enden. Bei septischen Patienten wurde beobachtet, dass in der Leber eine vermehrte Apoptose zu verzeichnen ist (Lee et al. 2013, Leist et al. 1995). Folglich könnte eine adaptive Stressreaktion, die die intrazellulären Pathogene eliminiert, denaturierte Proteine und defekte Organellen abbaut und somit die Energielevel der Hepatozyten erhält, einen neuen Ansatz bieten, um die möglicherweise gewebespezifische adaptive Reaktion der Leber besser zu verstehen und mit diesem Verständnis neue, auf mechanistischen Prinzipien beruhende therapeutische Optionen abzuleiten.

## **1.3 Autophagie**

### **1.3.1 Definition, Einteilung und Funktion**

Eine neue Möglichkeit, die komplexe Dynamik der Hyperaktivierung des Entzündungssystems und der zellulären Stressreaktion und damit der Begrenzung der systemischen inflammatorischen Reaktion besser zu verstehen, könnte die Autophagie sein. Der Begriff stammt aus dem Griechischen und bedeutet „selbst fressen“. Es beschreibt einen katabolen Prozess, bei dem intrazellulär defekte und alternde Organellen, denaturierte Proteine und Bakterien mit Hilfe der lysosomalen Maschinerie abgebaut und die entstandenen makromolekularen Bestandteile wieder verwendet werden (Klionsky 2013). Die Autophagie (Makroautophagie) beginnt mit

der Bildung einer einzelnen Doppelmembran (Nukleation), die sog. *isolation membrane*, die weiter heranreift, um eine *phagophore* zu bilden (**Abb. 2**). Diese Membran stammt vom endoplasmatischen Retikulum (ER), von Mitochondrien oder der Plasmamembran ab (Takabatake et al. 2014). Durch die Elongation der *isolation membrane* an beiden Enden bildet sich schließlich ein dreidimensionales Autophagosom aus, welches eine Doppelmembran besitzt (Mizushima und Komatsu 2011). Während dieser Maturation der *phagophore* werden gezielt lösliche zytoplasmatische Materialien und Organellen, die abgebaut werden sollen, umschlungen. Das Autophagosom ist frei beweglich und wandert vom Ort der Nukleation zu einem Lysosom, um miteinander zu verschmelzen und ein Autolysosom zu bilden. Anschließend werden sowohl die Makromoleküle durch die lysosomalen Hydrolasen in ihre wesentlichen Bestandteile degradiert, als auch die innere Membran des Autolysosoms (Mizushima et al. 2011). Die makromolekularen Bestandteile werden somit in das Zytoplasma freigesetzt und können für anabole Stoffwechselwege und für die Energieproduktion wiederverwendet werden (Mannack und Lane 2015). Somit übt die Autophagie einerseits eine essentielle Rolle für die Energiegewinnung und der Homöostase der Zelle aus, kann demgegenüber aber auch durch eine unangemessene Aktivierung zum Zelltod führen (Takagi et al. 2007).



**Abb. 2: Stadien des autophagischen Prozesses** (Mannack und Lane 2015).

Nukleation und Bildung der *isolation membrane* (A). Die *phagophore* entwickelt sich weiter (B), umhüllt die zytoplasmatischen Bestandteile und verschließt sich zum Autophagosom (C). Anschließend fusioniert das Autophagosom mit dem Lysosom (D), um ein Autolysosom zu bilden (E). Die Makromoleküle werden durch die Hydrolasen in ihre Bestandteile abgebaut und in das Zytoplasma freigesetzt.



Bislang sind drei Formen der Autophagie bekannt: Makroautophagie (wie oben beschrieben), Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie. Bei der Mikroautophagie werden zytoplasmatische Materialien direkt von einem Lysosom oder einer endosomalen Membran umschlossen und abgebaut (Li et al. 2012). Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden Proteine mit einer Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-ähnlichen Pentapeptidsequenz selektiv vom zytosolischen Protein hsc70 (*heat shock cognate protein*) und Ko-Chaperonen erkannt und anschließend zum Lysosom transportiert. Dort bindet der Komplex aus Substratprotein und Chaperonen an den lysosomalen Rezeptor LAMP-2A (*lysosome-associated membrane protein type-2A*). Anschließend wird das Protein entfaltet und im Lysosom abgebaut (Kaushik und Cuervo 2012). Von diesen drei Formen der Autophagie ist die Makroautophagie am Bedeutendsten und wird nachstehend lediglich als Autophagie bezeichnet (Takabatake et al. 2014). Obwohl die Autophagie als ein Prozess der Massendegradation beschrieben wird, wurden noch zusätzlich spezielle Arten der Autophagie definiert. Die selektive Autophagie ist gegen spezielle Organellen, wie z. B. Mitochondrien (Mitophagie), Peroxisomen (Pexophagie) oder intrazelluläre Bakterien (Xenophagie) gerichtet (Knodler und Celli 2011). Die Zelle muss zwischen normalem und anormalem Zellinhalt unterscheiden. Der genaue Mechanismus dieser Substraterkennung ist noch nicht vollständig bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Ubiquitin und *ubiquitin-binding receptors* wie beispielsweise p62/SQSTM1 (*sequestosome-1*) eine Rolle spielen (Ichimura und Komatsu 2010). Die Substrate werden selektiv mit Ubiquitin markiert, durch die Ubiquitin-Rezeptoren erkannt und zum nächsten Autophagosom transportiert, welches auf der Oberfläche das *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (MAP1LC3, Säugetierortholog des Hefeautophagie-Genes *Atg8*; im Folgenden als LC3 beschrieben) trägt (Kraft et al. 2010). Insbesondere spielt die Xenophagie eine wichtige Rolle für das angeborene und adaptive Immunsystem, indem sie eindringende Mikroorganismen gezielt markiert und anschließend durch die autophagische Maschinerie eliminiert.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Autophagie der grundlegende katabole Mechanismus für den Abbau und die Wiederverwertung von denaturierten Proteinen und alternden Organellen. Es wird als zelluläre Reaktion auf einerseits extrazelluläre Stresssituationen, z. B. Nährstoffmangel, Hypoxie, hohe Temperaturen und anderer seits auf intrazelluläre Stresssituationen, z. B. Akkumulation von defekten und

überflüssigen Organellen oder zytoplasmatischen Bestandteilen, ausgelöst. In neuesten tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Homöostase des ER während inflammatorischer Bedingungen gestört und an der Pathogenese der Sepsis beteiligt ist (Ferlito et al. 2014, Ma et al. 2008). In Folge dessen sind die Faltung und der Transport von Proteinen sowie weitere physiologische Aktivitäten eingeschränkt (Sano und Reed 2013), wodurch es zu einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen kommt und als ER-Stress bezeichnet wird (Ron und Walter 2007). Daraufhin wird die *unfolded protein response* (UPR) aktiviert, um die ER-Funktion wieder herzustellen (Pluquet et al. 2015). Wenn allerdings der Stress die Kompensationsfähigkeit der UPR überschritten hat, wird die Apoptose eingeleitet und kann im Zelltod resultieren (Hetz et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die UPR Autophagie auslösen kann und es zur Wechselbeziehung zwischen den Signalwegen der Autophagie und der UPR während pathologischer Bedingungen kommt (Senft und Ronai 2015). Durch die Eliminierung von z. B. fehlgefalteten Proteinen kann die Autophagie die Energielevel erhalten und zur Homöostase der Zelle beitragen.

Insbesondere die Leber ist ein klassisches Beispiel, in der die Autophagie während nährstoffarmer Konditionen aktiviert wird, um z. B. Aminosäuren für die Glukoneogenese bereitzustellen und dadurch den Energiebedarf des Gehirns und der Erythrozyten zu decken (Codogno und Meijer 2005). Zudem ist die Autophagie an weiteren physiologischen Prozessen beteiligt wie der frühen Embryonalentwicklung (Ravikumar et al. 2010), der Aufrechterhaltung und Wachstumskontrolle der Zelle, der Zelldifferenzierung, Anti-aging Mechanismen und dem Neugeborenen-Hunger (Kuma et al. 2004). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Deregulierung des autophagischen Prozesses eine Rolle in Tumorerkrankungen, Kardiomyopathien, Muskelerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen spielt (Levine und Klionsky 2004). Neueste Studien zeigten, dass die autophagische Aktivität auch in Hepatozyten von septischen Patienten gesteigert ist (Watanabe et al. 2009). Zur Zeit ist der Einfluss und das Ausmaß des autophagischen Prozesses (*autophagic flux*) in der Sepsis nicht vollumfänglich erforscht (Takahashi et al. 2013).

### 1.3.2 Die zentrale Maschinerie und Regulation der Autophagie

#### Induktion der Autophagie

Es existieren mehr als 30 Gene, die an dem *autophagic flux* beteiligt sind. Die verschiedenen Stadien der Biogenese des Autophagosoms unterliegen komplexen und koordinierten molekularen Signalwegen mit einer strengen Regulierung. Die meisten dieser Schlüsselregulatoren wurden zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert und werden insg. als ATG (*AuTophagy-related*) Gene bezeichnet (Klionsky 2012).

Das basale Niveau der Autophagie ist unter physiologischen Bedingungen in den Zellen niedrig, wodurch effektive Mechanismen gebraucht werden, um die Autophagie unter Stressreaktion zu induzieren. Ein zentraler Inhibitor der Autophagie ist die *serine/threonine protein kinase* mTOR (*mechanistic target of rapamycin*). Der mTOR-Komplex besteht aus mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*) und Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) (Jacinto 2008). Bei der Untereinheit Raptor wird vermutet, dass es den mTOR-Komplex zu den gezielten Lokalisationen der Signalaufnahme befördert. Unter nährstoffreichen Bedingungen ist mTOR aktiv und koordiniert das Zellwachstum und die Proliferation und blockiert die Autophagie, indem es ULK1 (*uncoordinated 51-like kinase 1*; Säugetierortholog des Hefeautophagie-Genes *Atg1*) durch Phosphorylierung negativ reguliert (Wong et al. 2013). Bei nährstoffarmen Konditionen, wie z. B. bei Aminosäure- oder Energiemangel, wird mTOR durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) inhibiert. Bei einer Veränderung des ATP:AMP-Verhältnisses durch den Anstieg von AMP (Adenosinmonophosphat) wird die AMPK aktiviert und inhibiert anabole Stoffwechsel und unterstützt die katabolen Prozesse. Durch die Inhibierung von mTOR und die anschließende Aktivierung von ULK1 steigt die Bindungsaffinität zwischen UKL1 und Atg13, FIP200 (*focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD*; Säugetierortholog des Hefeautophagie-Genes *Atg17*) und Atg101 (Behrends et al. 2010). Der Komplex aus Atg1-Atg13-Atg17-Atg101 rekrutiert weitere Atg-Proteine zum Ort der Autophagosombildung (Kawamata et al. 2008). Es konnte zudem gezeigt werden, dass ULK1 gezielt zu bestehenden Membranstrukturen geleitet wird, die das Membran überspannende *vacuole membrane protein 1* (VMP1) des ER beinhalten und für die spätere Bildung der Autophagosommembran benötigt wird (Carlsson und Simonsen 2015). In *Saccharomyces cerevisiae* wurde

herausgefunden, dass eine *phagophore assembly site* (PAS) existiert, wohingegen es bei Säugetieren multiple Lokalisationen für die Formation des Autophagosoms und der Rekrutierung der Atg-Proteine gibt (He und Klionsky 2009). Des Weiteren inhibiert ULK1 den mTOR-Komplex und erzeugt dadurch eine positive Rückkopplungsschleife im *autophagic flux* (Jung et al. 2011). Die Aktivierung von ULK1 und die weitere Komplexbildung ist essenziell für die Induktion der Autophagie (Russell et al. 2013).

Ferner konnte gezeigt werden, dass die HO-1, die unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert wird, neben ihren antiinflammatorischen Wirkungen auch die Autophagie positiv beeinflusst. Insbesondere in Hepatozyten interagiert die HO-1 z. B. direkt mit dem *class III phosphoinositol-3 kinase* (PI(3)K)-Komplex, um die Autophagie zu induzieren. Dadurch schützt die HO-1 vor dem Zelltod der Hepatozyten und wirkt protektiv gegen Organfunktionsstörungen. Es zeigte sich, dass ein *knockdown* der HO-1 die Induktion der Autophagie verhinderte und dadurch eine vermehrte hepatozelluläre Schädigung, Apoptose und eine gesteigerte Sterblichkeitsrate bewirkte (Carchman et al. 2011).

### **Formation des Autophagosoms**

Der vollständige ULK1-Komplex führt zur Rekrutierung des *class III PI(3)K-Komplexes*, auch *vacuolar protein sorting 34* (VPS34)-Komplex genannt, der für den nachfolgenden Signalweg der Nukleation der Vesikelmembran und den Aufbau des Autophagosoms benötigt wird. Es existieren drei verschiedene VPS34-Komplexe: I, II und III. Der Komplex I ist ein Bestandteil des Plasmamembran-assoziierten Insulin-signalweges und kontrolliert die Aktivität von mTOR und somit indirekt die Regulierung des autophagischen Prozesses. Der zweite Komplex beeinflusst die Autophagie nicht, sondern hat seine Funktion im endosomalen Netzwerk. Der Komplex III hat einen positiven Einfluss auf die Induktion der Autophagie und ist zusammengesetzt aus der katalytischen Untereinheit VPS34, Beclin-1 (Säugetier-ortholog des Hefeautophagie-Genes *Atg6*), p150 (*serine/threonine kinase Vps15*) und Atg14L. Beclin-1 wird als primär regulierende Untereinheit des *class III VPS34-Komplexes* betrachtet und wird durch die aktivierte ULK1 phosphoryliert, dieses führt zu einer Aktivitätserhöhung des *class III VPS34-Komplexes*. Atg14L soll über die

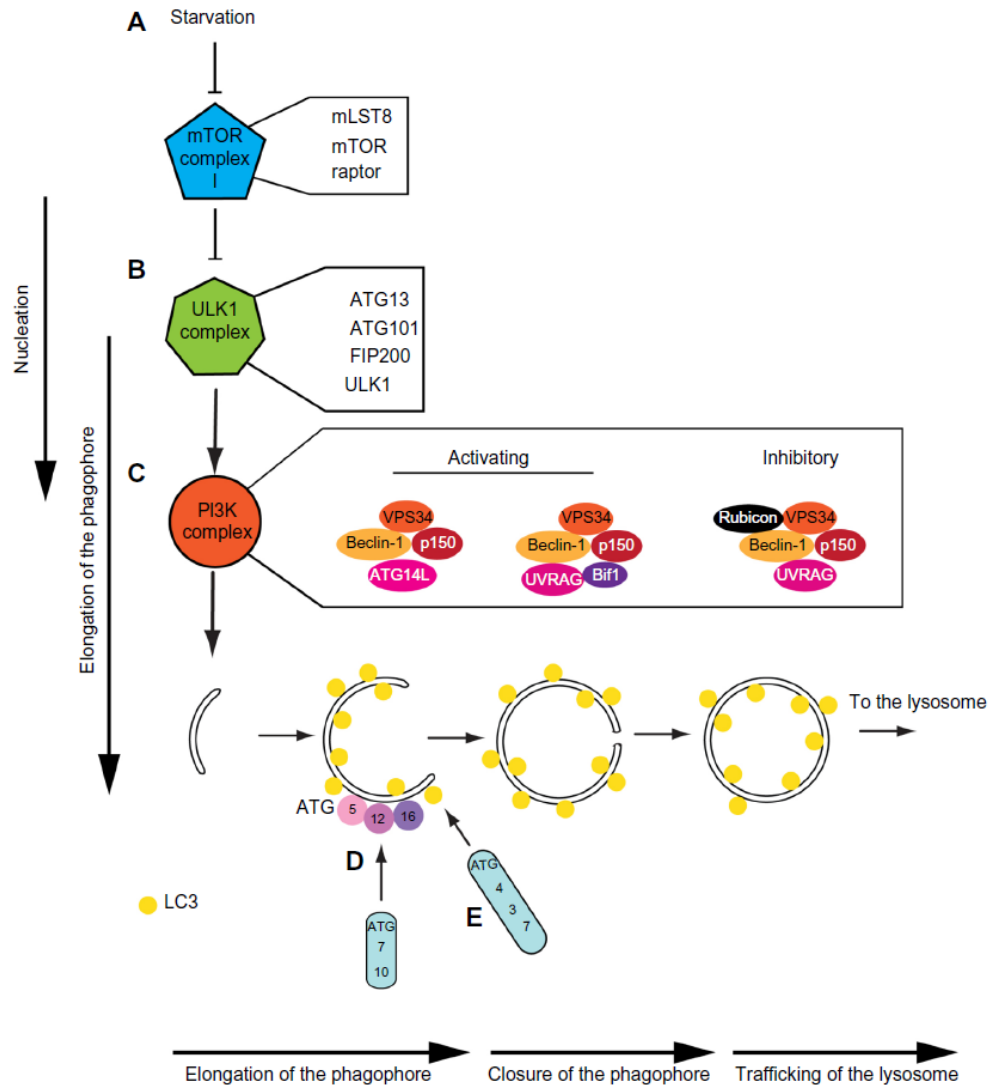
Fähigkeit der Erkennung, Stabilisierung und Generierung von Membrankurvaturen verfügen und bindet speziell Membrane, die mit PI3P (Phosphatidylinositol 3-phosphat) angereichert sind (Fan et al. 2011). Es existiert ein zweiter *class III* VPS34-Komplex, der die Autophagie auch positiv reguliert und anstelle von Atg14L UVRAG (*UV-irradiation-resistance-associated gene protein*) beinhaltet (Liang et al. 2006). Weitere Proteine wie z. B. AMBRA1 (*activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*) und Bif-1 (*Bax-interacting factor 1*) haben ebenso wie UVRAG und Atg14L einen positiven Einfluss auf die Autophagie (Takabatake et al. 2014). Bif-1 bindet indirekt über UVRAG an Beclin-1 und kann ebenfalls, wie Atg14L, Membrankurvaturen erkennen sowie induzieren (McKnight und Zhenyu 2013). Darüber hinaus gibt es einen inhibitorischen *class III* VPS34-Komplex, der sich aus VPS34, p150, Beclin-1, UVRAG und Rubicon (*RUN domain protein as Beclin1 interacting and cysteine-rich containing*) zusammensetzt. Dieser Komplex verhindert nicht nur die Induktion der Autophagie, sondern auch die Reifung des Autophagosoms (Kang et al. 2011). Eine weitere Aufgabe des VPS34-Komplexes ist es, Effektor-Proteine zu rekrutieren, um das lokale VPS34-Signal zur nachgeschalteten Membrangestaltung und Autophagosombildung weiterzuleiten. Der VPS34-Komplex rekrutiert die zwei zusammenhängenden ubiquitinähnlichen Konjugationssysteme Atg12-Atg5-Atg16L und Atg8-Phosphatidylethanolamin (Atg8-PE) zur *phagophore*, welche eine entscheidende Rolle in der frühen Entwicklung des Autophagosoms und somit in der Elongation der *isolation membrane* und der Vervollständigung des Autophagosoms spielen (Suzuki et al. 2007). Des Weiteren wird die WIPI (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*, Säugetierortholog des Hefeautophagie-Genes *Atg18*) Familie rekrutiert, die in Säugetieren aus WIPI1 und WIPI2 besteht (Polson et al. 2010). Es wurde erst kürzlich nachgewiesen, dass WIPI2 für die Rekrutierung von Atg16L verantwortlich ist, welches wiederum den Atg12-Atg5-Komplex mobilisiert (Mannack und Lane 2015).

Die erste ubiquitinähnliche Konjugationsreaktion umfasst die kovalente Bindung von Atg5, ein früher Marker der Autophagosombildung (Hailey et al. 2010), an Atg12. Zunächst wird Atg12 durch Atg7 (*E1-like enzyme*) aktiviert, auf Atg10 (*E2-like enzyme*) übertragen und anschließend an den internen Lysin-Rest vom Substrat Atg5 kovalent gebunden. Der Atg12-Atg5-Komplex interagiert anschließend nicht-kovalent mit Atg16L. Dieses wird benötigt, um den größeren Atg12-Atg5-Atg16L-

Komplex an die *phagophore* zu binden, indem es direkt mit FIP200 interagiert (Nishimura et al. 2013). Der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex fungiert nun als eine E3-Ligase (Noda und Inagaki 2015). In der zweiten Konjugationsreaktion wird LC3 mit PE gebunden, der als Anker an der Vesikelmembran agiert. In Säugetieren werden drei Mitglieder der Atg8-Familie anhand ihrer Aminosäurefrequenz unterschieden: MAP1LC3, GABARAP (*γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*) und GATE-16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*). Im Menschen existiert ein GATE-16-Gen, zwei GABARAP-Gene und vier *Map1lc3* (*Lc3*)-Gene (*Lc3A*, *Lc3B*, *Lc3B2* und *Lc3C*). LC3 wurde zuerst identifiziert und spielt nachweislich eine wichtige Rolle in der Autophagie und wird u. a. für die Expansion des Autophagosoms benötigt. Hingegen sind GATE-16 und GABARAP für den Verschluss des Autophagosoms essentiell (Weidberg et al. 2010). GATE-16 interagiert mit dem Golgi v-SNARE (*vesicle-associated N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) GOS-28 als auch mit dem NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) und führt dadurch zur Aktivierung der ATPase (Adenosintriphosphatase). Bei Betrachtung von GABARAP wurde zusätzlich gezeigt, dass es ein zytosolischer Faktor der Regulation des intrazellulären Transports von der  $\gamma 2$ -Untereinheit vom GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ist (Slobodkin und Elazar 2013). Tierexperimentelle Studien der Atg8-Familienmitglieder zeigten, dass sie eine strukturelle Gemeinsamkeit mit Ubiquitin besitzen (Shpilka et al. 2011). Insbesondere wird LC3B als wesentlicher Marker für die Formation des Autophagosoms angesehen (Kimura et al. 2007) und ist zudem das einzige Autophagie-Protein, dass am ausgereiften Autophagosom gebunden bleibt.

LC3 ist im Zytosol lokalisiert und wird unmittelbar nach der Synthese durch die Cysteinprotease Atg4 gespalten, um einen konservierten C-terminalen Glycinrest zu enthüllen und wird als LC3-I bezeichnet. Anschließend aktiviert Atg7 LC3-I und überträgt es auf Atg3. Der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex (E3-Ligase) konjugiert danach PE an den freigelegten Glycinrest von LC3-I und es entsteht LC3-II, das an beiden Seiten der *phagophore* lokalisiert ist (Kabeya et al. 2000). Atg8 kontrolliert und unterstützt das Wachstum des Autophagosoms, was auf die Fähigkeit der Erkennung von Membrankurvaturen zurückgeführt wird (Xie et al. 2008). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Konjugationssystemen ist, dass der Atg12-Atg5-Komplex konstitutiv konjugiert wird, wohingegen die kovalente Bindung zwischen Atg8 und PE eine Folge der Hochregulierung der Autophagie ist (Tanida et al. 2004).

Die Signalwege der Induktion und Entstehung des Autophagosoms sind in **Abb. 3** graphisch dargestellt.



**Abb. 3: Darstellung der Maschinerie der Autophagosombildung während nährstoffarmer Konditionen** (Mannack und Lane 2015).

Der mTOR-Komplex wird z. B. während Aminosäure- oder Energiemangel durch die AMPK inhibiert (A) und dadurch wird der ULK1-Komplex aktiviert (B). Der VPS34-Komplex wird rekrutiert und hat eine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf die Autophagosombildung (C). Der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex wird für die Formation des Autophagosoms konjugiert (D). Für die Konjugationsreaktion von LC3 und PE werden Atg4, Atg7 und Atg3 benötigt (E).

## Membranbiogenese und Vesikel *trafficking*

Es wird angenommen, dass die Membranen für die Formation des Autophagosoms von der Plasmamembran, dem ER, der Mitochondrien oder vom Golgi-Apparat abstammen. Dieser Prozess der Vesikelnukleation ist einer der ungeklärten Aspekte der Autophagie. Der Mechanismus, mit dem die zusätzlichen Membranen zum Ort der Autophagosombildung gelangen und mit der wachsenden *phagophore* fusionieren, ist noch unklar (Tooze 2013). Zur Biogenese des Autophagosoms werden SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment receptors*), die den Kopplungsprozess zwischen der Fusion von Transportvesikeln und gezielten Organellen herstellen, benötigt. SNARE-Proteine konstruieren spezifische Bindungspartner - einen für jedes Kompartiment, das an der späteren Fusion beteiligt ist - wodurch die Vesikel nur mit dem dazugehörigen Kompartiment fusionieren können, die die spezifisch verwandten SNARE-Proteine tragen.

Da sich verschiedene Membrane mit der Autophagosombildung in Verbindung bringen lassen, ist es auch möglich, dass der Ursprung der Membrane für das Autophagosom unterschiedlich ist (Hailey et al. 2010). In tierexperimentellen Studien wurde festgestellt, dass Atg9 eine Rolle in dem Vesikel *trafficking* der Plasmamembran spielt und FIP200 im Signalweg des Aufbaus des Autophagosoms nachgeschaltet ist (He et al. 2008). Atg9 ist an der Plasmamembran lokalisiert und wird mittels Clathrin-vermittelter Endozytose internalisiert und zuerst zu den frühen Endosomen und anschließend zu den *recycling-endosomes* (REs) transportiert. Zusätzlich zum Atg9 *trafficking* wurde nachgewiesen, dass auch Atg16L an der Plasmamembran von vesikulären Trägern (Clathrin-umhüllte Strukturen) durch Endozytose internalisiert und anschließend zu REs transportiert wird (Mijaljica et al. 2012). Die Atg9- und Atg16L-Vesikel fusionieren später miteinander, in einer sog. *homotypic fusion*. Diese intrazelluläre Vesikelfusion ist SNARE-abhängig, wobei das relevante SNARE-Protein für diesen Vorgang das VAMP3 (*vesicle-associated membrane protein 3*) ist (Puri et al. 2014). Durch die *homotypic fusion* bildet sich ein Tubulus aus, der sich in die *phagophore* ausbildet. Ein *knockdown* des VAMP3-Gens zeigte, dass die Vesikelfusion von Atg9 und Atg16L stark beeinflusst ist. (Nair und Klionsky 2011). Darüber hinaus zeigte sich, dass Atg9 nicht direkt am Autophagosom gebunden wird, sondern wahrscheinlich nur flüchtig mit der *phagophore* in einem „*kiss and run*“-Fusionsvorgang interagiert, um Membranstücke beizusteuern.



Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Rab33b (*Ras-related in brain 33b*) mit Atg16L interagiert und es dadurch zum nächsten Autophagosom rekrutiert (Itoh et al. 2008).

Ein weiterer Ursprung der Membranbiogenese ist die äußere Membran der Mitochondrien. Es konnte nachgewiesen werden, dass zuerst der frühe Autophagosommarker Atg5 vorübergehend an den Mitochondrien lokalisiert ist, gefolgt von dem späteren Autophagosommarker LC3. Zusätzlich konnten *tail-anchor*-Proteine der äußeren Mitochondrienmembran an Autophagosomen dargelegt werden. Durch eine Funktionsstörung der Mitochondrien mittels der Erschöpfung von Mitofusin-2 (MFN2) konnte gezeigt werden, dass die Autophagosombildung unmittelbar eingeschränkt ist (Hailey et al. 2010). Vor kurzem wurde die MAM (*mitochondrial-associated membrane at the ER*) als eine mögliche Stelle der Initiierung der Autophagosombildung identifiziert (Hamasaki et al. 2013). Dort konnten wichtige Proteine der Formation des Autophagosoms nachgewiesen werden, wie z. B. Beclin-1 und Atg14L (Mannack und Lane 2015).

### **Reifung und Abbau des Autophagosoms**

Sobald sich das Autophagosom vollständig ausgebildet hat, muss es zum endozytischen System wandern, mit diesem fusionieren und anschließend den Inhalt zur Degradation freigeben. Die genaue zeitliche Koordinierung dieses Vorgangs ist entscheidend und darf erst beginnen, wenn die *phagophore* sich vollständig geschlossen hat (Levine und Klionsky 2004). Demnach müssen Fusionsfaktoren in der Lage sein, ein vollständig gereiftes Autophagosom zu erkennen. Eines dieser Signale wird durch die Proteine der Atg8-Familie vermittelt, die an der Bildung und dem Verschluss der *phagophore* beteiligt sind, um das vollständige Autophagosom zu bilden (Puissant et al. 2012). In *Saccharomyces cerevisiae* konnte nachgewiesen werden, dass Atg8 sich von der äußeren Membran entfernt und somit ein positives Signal für die Fusionsfähigkeit des Autophagosoms darstellt (Yu et al. 2012). Es ist noch nicht erforscht, ob dieser Vorgang auch in Säugetieren stattfindet, da manche Mitglieder der Atg8-Familie, wie z. B. LC3, für die Bewegung vom Autophagosom zum Lysosom benötigt werden. Im Gegensatz dazu ist belegt, dass andere wichtige Proteine der Autophagosombildung, wie Atg16L und der ULK1-Komplex, am ausgebildeten

Autophagosom fehlen. Das Autophagosom kann mit frühen oder späten Endosomen fusionieren, um ein Amphisom zu bilden, welches anschließend mit einem Lysosom fusioniert, um ein Autolysosom zu erzeugen (Liou et al. 1997). Es ist auch möglich, ein Autolysosom direkt durch die Autophagosom-Lysosom-Fusion zu bilden (Ganley 2013). Das Zytoskelett spielt eine entscheidende Rolle in dem Transport des Autophagosoms innerhalb der Zelle. Mikrotubuli und Aktinfilamente bilden ein zusammenhängendes Netzwerk, welches gemeinsam mit Motorproteinen ein Transportsystem für Vesikel, Organellen und Autophagosomen bildet (Monastyrska et al. 2009). Für die Koordination der Fusion zwischen dem endozytischen System und dem Autophagosom werden drei Proteinfamilien benötigt: Rab GTPasen, *membrane-tethering*-Komplexe und SNAREs. Rab-Proteine sind an spezifischen Membranen lokalisiert und werden durch GTP-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide-exchange factors*, GEFs) aktiviert, indem sie ein gebundenes GDP (Guanosindiphosphat) gegen ein GTP (Guanosintriphosphat) austauschen. Durch die Bindung von GTP unterzieht sich das Rab-Protein einer Konformationsänderung und dadurch wird die Interaktion mit den Effektor-Proteinen ermöglicht. Eine wesentliche Rolle spielt das Rab7-Protein, das nicht nur für den Transport des Autophagosoms zum endozytischen System bedeutend ist, sondern auch für die Fusion zwischen diesen Kompartimenten, indem es an die Untereinheit VPS39 des HOPS (*homotypic fusion and vacuolar protein sorting*) *endosome-autophagosome tethering*-Komplex bindet (Mannack und Lane 2015, Hyttinen et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Blockierung der Rekrutierung von Rab7 die Fusion zwischen Autophagosom und endozytischem System inhibiert wird (Ganley et al. 2011). Rab-Proteine werden durch spezifische *GTPase-activating proteins* (GAPs) deaktiviert, indem das gebundene GTP unter Abspaltung eines Phosphat-Restes zu GDP hydrolysiert wird. OATL1 (*ornithine aminotransferase-like 1*) ist ein GAP und wird durch die Interaktion mit Mitgliedern der Atg8-Familie, v. a. durch GABARAP, zum Autophagosom rekrutiert (Mannack und Lane 2015). Rab33b bindet Atg16L und rekrutiert in Folge den Atg12-Atg5-Komplex zur *phagophore*. Es konnte gezeigt werden, dass Rab33b ein Substrat von OATL1 ist. Durch seine Gap-Aktivität spielt OATL1 eine entscheidende Rolle in der Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom (Itoh et al. 2011). Der *class III* VPS34-Komplex, der UVRAG beinhaltet, spielt nicht nur eine Rolle in der Formation des Autophagosoms, sondern auch in der Fusion des Autophagosoms mit dem endozytischen System. UVRAG stimuliert

VPS34 und bindet an die Untereinheit VPS16 des HOPS-*tethering*-Komplex (Kim et al. 2015). Die Rekrutierung der *tethering*-Moleküle bewirkt, dass die zu fusionierenden Kompartimente in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden. Der HOPS-*tethering*-Komplex wird für die Fusionierung von Endosom und Lysosom benötigt. Obwohl es noch keinen direkten Beweis gibt, dass der HOPS-*tethering*-Komplex auch eine Rolle in der Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom übernimmt, wird davon z. Zt. ausgegangen, da es mit Rab7 interagiert (Ganley 2013). Die *tethering*-Komplexe stimulieren im Anschluss die SNARE-Proteine, die den eigentlichen Kopplungsprozess durchführen. Um den Zusammenschluss zweier Membrane zu gewährleisten, muss ein R-SNARE (mit einem Argininrest im SNARE-Motiv) an der *donor*-Membran und drei Q-SNARE (mit einem Glutaminrest im SNARE-Motiv) in der *acceptor*-Membran lokalisiert sein (Jahn und Scheller 2006). Durch das „*zipping-up*“ von multiplen SNARE-Komplexen zu einer Vierfach-Helix-Struktur wird bewirkt, dass die gegenüberliegenden Lipiddoppelschichten zusammenkommen und miteinander fusionieren. Es wurde gezeigt, dass die Q-SNAREs VAMP8 und Vti1b (*vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B*) an der Fusion des Autophagosoms während der Beseitigung von intrazellulären Bakterien beteiligt sind (Furuta et al. 2010). Zudem wurde herausgefunden, dass auch der Atg12-Atg5-Komplex zu der Autophagosom-Lysosom-Fusion beiträgt. TECPR1 (*Tectonin beta-propeller repeat containing 1*) ist ein *tethering*-Molekül, das an Autolysosomen lokalisiert ist und den Atg12-Atg5-Komplex und PI3P bindet und dadurch das *tethering* und die Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom vermittelt (Chen et al. 2012).

Nach der erfolgreichen Fusion wird die innere Membran des Autolysosoms in Abhängigkeit von lysosomalen oder vesikulären sauren Hydrolasen, Proteinasen A, B und Cathepsin B, D und L abgebaut. Die daraus entstandenen Makromoleküle, insbesondere die Aminosäuren, werden wieder in das Zytosol transportiert und für die Proteinsynthese und Aufrechterhaltung der zellulären Funktionen verwendet.

## 2 Ziele der Arbeit

Trotz verminderter Mortalitätsraten aufgrund optimierter supportiver Therapien ist die Sepsis eine lebensbedrohliche Erkrankung und stellt fortbestehend ein wesentliches klinisches Problem dar. Eine überschießende inflammatorische Wirtsreaktion, charakterisiert durch einen Zytokinsturm, oxidativen Stress und Sequestration von neutrophilen Granulozyten, sind grundlegende Komponenten des Sepsis-assoziierten Organversagens. In dieser Arbeit stand die Leber im Vordergrund, da sie bei einer schweren Sepsis als das zentrale Organ angesehen wird und als Prognose-limitierend gilt.

Die Regulation der Autophagie könnte ein neuer Aspekt sein, um die komplexen biologischen Mechanismen der Sepsis besser zu verstehen. Das Ausmaß des autophagischen Prozesses (*autophagic flux*) in der Sepsis ist noch nicht umfassend verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand von unterschiedlichen Phänotypen (Ratten mit polymikrobieller Sepsis, mittels kardialer EF nach Überleben stratifiziert) herauszufinden, ob eine vermehrte Autophagie in der Leber einen prognostischen Vorteil (= Überleben) erbringt, indem es die zellulären Energielevel aufrechterhält, Proteinaggregate und Mitochondrien eliminiert und intrazelluläre Bakterien beseitigt.

Aufgestellt wurden folgende Arbeitshypothesen:

- Autophagie während der Wirtsreaktion ist ein Prognose-bestimmender Faktor
- Die Induktion einer polymikrobiellen Sepsis führt in Abhängigkeit von dem prognostizierten Verlauf zu differenziellen Expressionsmustern zwischen den Untersuchungsgruppen
- Die frühe Autophagosombildung in den ersten 6 h der Sepsis ist prognoseentscheidend

Für die Simulation einer polymikrobiellen Sepsis wurde das PCI-Modell (*peritoneal contamination and infection*) angewandt. In Zusammenarbeit mit Prof. Mervyn Singer (UNIVERSITY COLLEGE HOSPITAL, LONDON) wurde die kardiale EF als Prognosebestimmender Faktor analysiert und die Tiere zu einem frühen Zeitpunkt (6 h) in prognostizierte überlebende und versterbende Individuen stratifiziert.

Zur Überprüfung der Arbeitshypothesen wurde das Genexpressionsmuster von entscheidenden Schlüsselparametern der Autophagie mit Hilfe der *real-time* quantitative PCR (qPCR) in Leberhomogenaten ermittelt. Des Weiteren wurde der autophagische Prozess auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Die gewonnenen Daten bezüglich der Transkripte und Proteinmodifikationen von Schrittmachermolekülen wurden abschließend mit den klinischen Parametern (Zytokinantwort, Organfunktionsparameter) der stratifizierten Ratten verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die Autophagie in den Leberhomogenaten während der Wirtsreaktion ein Prognose-bestimmender Faktor ist und ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen den *septic survivors* und den *septic non-survivors* besteht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Liste der verwendeten Chemikalien.

| <b>Chemikalie</b>                              | <b>Hersteller</b>  |
|--|--|
| 30 % Acrylamid                                 | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland                    |
| APS  | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States                   |
| Brilliant®II SYBR Green®qPCR Master Mix        | Stratagene - Agilent Technologies,<br>United States        |
| Bromphenolblau                                 | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States                   |
| Clarity Western ECL Substrate                  | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland                  |
| DEPC-Wasser                                    | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland                    |
| EDTA   | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland                    |
| Glycerin                                       | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland                    |
| Glycine  | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States                   |
| HCl  | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland                    |
| Methanol                                       | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland                    |
| NaCl   | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland                    |
| Phosphatase-Inhibitor Cocktail 3               | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States (Cat. No.: P0044) |
| Precision Plus Protein Western C Standards     | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland                  |
| Precision Protein StrepTactin-HRP<br>Conjugate | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland                  |
| Protease-Inhibitor Cocktail                    | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States (Cat. No.: P8340) |
| RLT-Puffer                                     | Qiagen GmbH,<br>Deutschland                                |
| Saccharose                                     | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland                    |
| SDS  | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States                   |
| Sodium Orthovanadat                            | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States                   |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| TEMED                    | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland  |
| Tris-HCl                 | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland  |
| Triton X-100             | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States |
| Trizma base              | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States |
| Tween 20                 | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States |

### 3.1.2 Primäre und sekundäre Antikörper für SDS-PAGE und Western Blot

In **Tab. 2** und **Tab. 3** sind die primären und sekundären Antikörper mit der jeweils eingesetzten Verdünnung, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, dargestellt.

**Tab. 2: Primäre Antikörper.**

| <b>Antikörper</b>                                 | <b>produziert in</b> | <b>Hersteller</b>                              | <b>Verdünnung</b> | <b>Produkt-<br/>nummer</b> |
|---|----------------------|--|-------------------|----------------------------|
| Anti-LC3B antibody                                | Kaninchen            | Abcam plc.,<br>UK                              | 1:1000            | ab48394                    |
| Beclin-1 (D40C5)<br>Rabbit mAb                    | Kaninchen            | Cell Signaling<br>Technology,<br>United States | 1:1000            | 3495                       |
| Phospho-Beclin-1<br>(Ser93) (D9A5G)<br>Rabbit mAb | Kaninchen            | Cell Signaling<br>Technology,<br>United States | 1:1000            | 14717                      |
| GAPDH (14C10)<br>Rabbit mAb                       | Kaninchen            | Cell Signaling<br>Technology,<br>United States | 1:1000            | 2118                       |

**Tab. 3: Sekundäre Antikörper.**

| Antikörper  | produziert in | Hersteller  | Verdünnung | Produkt-<br>nummer |
|---|---------------|---|------------|--------------------|
| Peroxidase<br>AffiniPure Donkey<br>Anti-Rabbit IgG<br>(H+L) | Esel          | Jackson<br>ImmunoResearch<br>Laboratories,<br>United States | 1:2000     | 711-035-<br>152    |

### 3.1.3 Primer für die qPCR

**Tab. 4: Sequenzen der Primer, welche von biomers.net GmbH (Deutschland) bezogen wurden.**

| Primer        | Sequenz 5' - 3'   | Produkt (bp) |
|---------------|---|--------------|
| <i>Lc3</i>    | fw: GCC AGA GGC ACC TGT TAG AG<br>rv: GGC TGC TAC AGA CCA TAG GC                        | 147          |
| <i>Atg5</i>   | fw: TTT GAC GCT GGT AAC TGA CAA AGT G<br>rv: CAA GGC AGA GCT GAG CTT GAT G              | 162          |
| <i>Atg12</i>  | fw: CAC CAC TGC ACC TGC CTC ATT TTT AAC TC<br>rv: ATG GCA CAC ATG GCT GAG GAC TAC TCT G | 77           |
| <i>Atg16L</i> | fw: ATC AAT GCG GTG GCG TGG GC<br>rv: TCC AAA ATG GGC TGC GGG GT                        | 133          |
| <i>Becn1</i>  | fw: GGT AGC TTT TCT GGA CTG TGT GCA GCA G<br>rv: GTC TTC AAT CTT GCC TTT CTC CAC GTC C  | 109          |
| <i>Hmox1</i>  | fw: TCT GGA ATG GAA GGA GAT GC<br>rv: ACA GTT CTG GGG CTC TGT TG                        | 109          |

### 3.1.4 Referenzgene für die qPCR

Für die Analyse von den untersuchten Genen (*Lc3*, *Atg5*, *Atg12*, *Atg16L*, *Becn1*, *Hmox1*) wurden Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*Hprt*), Hydroxymethylbilan-Synthase (*Hmbs*), Aktin (*Actb*) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) als Referenzgene verwendet, deren Primer von biomers.net GmbH bezogen wurden. HPRT ist ein Enzym des Purinstoffwechsels (Sculley et al. 1992). HMBS ist ein Enzym der Porphyrin-Biosynthese (Greenbaum et al. 2003). ACTB ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts (Guo et al. 2013). GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, welches stets in einer stabilen Menge transkribiert wird (Tristan et al. 2011).



**Tab. 5: Sequenzen der Primer für die Referenzgene.**

| <b>Primer</b> | <b>Sequenz 5' - 3'</b>  | <b>Produkt (bp)</b> |
|---------------|---|---------------------|
| <i>Hprt</i>   | fw: CTC ATG GAC TCA GGA C<br>rv: GCA GGT CAG CAT AGC C            | 123                 |
| <i>Hmbs</i>   | fw: ATG ATC CTG AGC TTC G<br>rv: GTA CAG TTG CTT CAT C            | 116                 |
| <i>Actb</i>   | fw: GTC CAC CTT CCA GCA GAT GT<br>rv: AAG GGT GTA AAA CGC AGC TC  | 115                 |
| <i>Gapdh</i>  | fw: GCT CTC TGC TCC TCC CTG TT<br>rv: GAT ACG GCC AAA TCC GTT CAC | 108                 |

### 3.1.5 Kits

**Tab. 6: Verwendete Kits.**

| <b>Kit</b>  | <b>Hersteller</b>                          |
|---|--|
| RNeasy® Mini Kit                                  | Qiagen GmbH,<br>Deutschland                |
| RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1622) | Thermo Fisher Scientific,<br>United States |
| BCA Kit for Protein Determination                 | Sigma-Aldrich Co. LLC.,<br>United States   |

### 3.1.6 Geräte

**Tab. 7: Geräte.**

| <b>Gerät</b>                                   | <b>Hersteller</b>                          |
|--|--|
| 37 °C Brutschrank Heraeus                      | Thermo Fisher Scientific,<br>United States |
| Centrifuge 5414 D                              | Eppendorf AG.,<br>Deutschland              |
| ELISA Reader                                   | Tecan Trading AG.,<br>Schweiz              |
| Gelkammer                                      | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland  |
| Laufvorrichtung Gele (Mini-PROTEAN Tetra Cell) | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland  |
| NanoDrop® 2000c Spectrophotometer              | Thermo Fisher Scientific,<br>United States |

|  |   |
|--|---|
| Peltier Thermal Cycler   | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland         |
| Precision Liquid Handling System CAS-1200™   | Qiagen GmbH,<br>Deutschland                       |
| QIAcube  | Qiagen GmbH,<br>Deutschland                       |
| QIAxcel  | Qiagen GmbH,<br>Deutschland                       |
| Rotor-Gene rotary analyzer   | Qiagen GmbH,<br>Deutschland                       |
| Schüttler (Typ REAX 2000)  | Heidolph Instruments GmbH<br>& Co.KG, Deutschland |
| Spannungsquelle (Power Pac 200)  | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland         |
| Taschenkamm 10 well, 0,75 mm   | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland         |
| Thermomixer Comfort  | Eppendorf AG.,<br>Deutschland                     |
| TissueLyser LT   | Qiagen GmbH,<br>Deutschland                       |
| Vorrichtung für Proteintransfer (Mini Trans-Blot<br>Electrophoretic Transfer Cell) | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland         |

### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 8: Verbrauchsmaterialien.**

| <b>Gerät</b>                   | <b>Hersteller</b>                                 |
|--------------------------------|---|
| Pipettenspitzen                | Eppendorf AG.,<br>Deutschland                     |
| Filter-Tips (50 µl, 200 µl)    | Qiagen GmbH,<br>Deutschland                       |
| Safe-Lock-Reaktionsgefäße      | Eppendorf AG.,<br>Deutschland                     |
| 96-well Platte (F-Bottom)      | Greiner Bio-One International GmbH,<br>Österreich |
| 50 ml Cellstar Reaktionsgefäße | Greiner Bio-One International GmbH,<br>Österreich |
| PVDF-Membran                   | Carl Roth GmbH + Co. KG,<br>Deutschland           |
| Whatman-Papier                 | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland         |
| Pads                           | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>Deutschland         |

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine stratifizierende, randomisierte und kontrollierte tierexperimentelle Studie an 32 Ratten in Kooperation mit Prof. Mervyn Singer (UNIVERSITY COLLEGE HOSPITAL, LONDON), der kryokonservierte Leberpräparate geneierte und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stellte. Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in eine Untersuchungsgruppe (PCI-Gruppe, n = 20) und in eine Kontrollgruppe (*control*, n = 12) aufgeteilt. In den Ratten der Untersuchungsgruppe wurde auf Grundlage des PCI-Modell-Protokolls (Gonnert et al. 2011) durch i. p. Applikation einer mikrobiologisch validierten, humanen Stuhlsuspension eine polymikrobielle Sepsis induziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde statt des gepoolten, erregerhaltigen Stuhls eine Kochsalzlösung injiziert. Die Versuchstiere wurden anschließend mittels transthorakaler Echokardiographie (Vivid 7; GE Healthcare) zu einem frühen Zeitpunkt (6 h) hinsichtlich Überlebenswahrscheinlichkeit innerhalb 48 h nach etabliertem Protokoll stratifiziert (Rudiger et al. 2013). Anhand der kardialen EF wurden die Tiere in prognostizierte *septic survivors* (EF > 170  $\mu$ L) und *septic non-survivors* (EF < 170  $\mu$ L) eingeteilt (**Tab. 9**).

**Tab. 9: Darstellung der Aufteilung der Untersuchungsgruppe (*septic survivors*, *septic non-survivors*) anhand der EF und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Zeit.**

|  | 6 h   | 24 h  | 72 h  |
|--|-------|-------|-------|
| <i>septic survivors</i><br>(EF $t_{6h}$ > 170 $\mu$ L)     | n = 4 | n = 4 | n = 4 |
| <i>septic non-survivors</i><br>(EF $t_{6h}$ < 170 $\mu$ L) | n = 4 | n = 4 | -     |
| <i>control</i>   | n = 4 | n = 4 | n = 4 |

## 3.2.2 Tiermodell

### 3.2.2.1 Polymikrobielle Sepsis

Die Induktion der polymikrobiellen Sepsis mit anschließendem Monitoring erfolgte nach dem etablierten Protokoll des PCI-Modells nach Gonnert et al. (Gonnert et al. 2011). Unter lokaler Anästhesie (Isofluran 2 %) wurde den männlichen Wistar-Ratten (12-14 Wochen alt mit einem ungefähren Körpergewicht von 300 g) Polyvinylchlorid-(PVC)-Röhrchen (innerer Durchmesser: 0,58 mm; äußerer Durchmesser: 0,96 mm; Biocorp Ltd, Huntingdale, Australien) in die rechte *Vena jugularis* und die linke *Arteria carotis* eingeführt und durch eine Inzision am Nacken wurden die Röhrchen subkutan nach Außerhalb verlagert. Die Röhrchen wurden anschließend an einem Haltegurt-System befestigt (Instech, Plymouth Meeting, PA, United States), um der Ratte eine unbehinderte Bewegung im Käfig und freien Zugang zu Wasser und Futter zu ermöglichen. Für eine fortlaufende Überwachung des mittleren arteriellen Blutdruckes wurde der arterielle Gefäßzugang mit einem Druckwandler verbunden und mit einem *16-channel Powerlab system* und einer *Chart 5.0 acquisition software* aufgezeichnet (Powerlab, AD Instruments, Chalgrove, Oxon, UK). Eine subkutane Buprenorphin-Injektion (0,05 mg/kg) (Vetergesic, Reckitt Benckiser, York, UK) wurde zur Schmerzreduktion vor der Beendigung der Anästhesie administriert. Die Katheter wurden mit 0,1 ml/h heparinisierte Kochsalzlösung fortlaufend gespült.

Anschließend wurde den Ratten eine Faecessuspension (Abschnitt VI.1) (1,75 ml/kg Körpergewicht, 1:4 verdünnt mit NaCl 0,9 %) mit einer 19 G Kanüle in den rechten unteren Quadranten des Abdomens i. p. injiziert. Die humane Stuhlsuspension wurden nach dem etablierten Protokoll von Gonnert et al. aufbereitet (Gonnert et al. 2011). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten ein äquivalentes Volumen an NaCl 0,9 %. Eine Volumenersatztherapie bestehend aus einer 1:1 Lösung aus NaCl 0,9 % und Glukose wurden 2 h post PCI-Induktion mittels dem zentralvenösen Zugang eingeleitet (10 ml/kg/h). Die Supplementierung der Glukose verhinderte eine Hypoglykämie in den Ratten mit polymikrobieller Sepsis, aufgrund von einem verminderten Appetit und Aufnahme von Wasser und Futter. Die Infusionsrate wurde mit 10 ml/kg/h zwischen 2 h und 24 h aufrechterhalten. Nach 24 h wurde die Infusionsrate bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 72 h halbiert. Die Tiere der Kontrollgruppe mit gleichem Geschlecht, ähnlichem Alter und Körpergewicht, wurden der identischen Instrumentation und Flüssigkeitszufuhr unterzogen. In regelmäßigen

Zeitabständen wurde ein etablierter klinischer Score anhand von dem äußerlichen Erscheinungsbild, der Aufmerksamkeit und der Bewegung, von den Ratten der Untersuchungs- und Kontrollgruppe ermittelt (Brealey et al. 2004). Die Einteilung der Versuchstiere erfolgte nach *Abwesenheit* (0), *Anwesenheit* (1), *ausgeprägter Präsenz von Krankheitszeichen* (2) wie gekrümmter Haltung, aufgeblähtem Abdomen, konjunktivaler Injektion, Piloarrektion, Bewegungsmangel und verminderter Wachsamkeit sowie *Präfinalität* (3). Durch die Euthanasie der moribunden Tiere liegt ein zensierter Datensatz vor.

### **3.2.2.2 Echokardiographie**

Die Echokardiographie wurde 6 h, 24 h und 72 h nach i. p. Injektion unter einer leichten Anästhesie (Isofluran 1,5 %) mit einer 14 MHz-Sonde eines Vivid 7 Dimension Ultraschallgerätes (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Bucks, UK) durchgeführt. Mit einem *Pulsed-wave Doppler* (PWD) wurde die aortale Blutströmungsgeschwindigkeit in der proximalen aufsteigenden Aorta kurz vor der Bifurkation der rechten *Arteria carotis* gemessen. Die EF wurde anhand des Produktes der durchschnittlichen *velocity time integral* (VTI) durch einen Atmungszyklus und der aortalen Querschnittsfläche errechnet. Bei Ratten mit ähnlichem Alter und Körpergewicht wurde ein aortale Durchmesser von 2,6 mm gemessen (Slama et al. 2003). Das Herzminutenvolumen (HZV) wurde aus dem Produkt der EF und der Herzfrequenz berechnet.

### **3.2.2.3 Serumanalysen**

Eine Blutprobe von 0,7 ml wurde 6 h und 24 h nach PCI-Induktion von dem arterielle Gefäßzugang entnommen und mit 0,2 ml Blut wurde unmittelbar eine Blutgasanalyse durchgeführt (ABL 800 Flex analyzer, Radiometer, Copenhagen, Dänemark). Die restliche Blutprobe wurde in ein Reaktionsgefäß mit Lithium-Heparin gefüllt und anschließend für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Zytokinspiegel (IL-6 und IL-10) wurden mittels dem Rat-Quantikine enzyme-linked immunosorbent assay kits (R&D

Systems, Wiesbaden, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll bestimmt (Abschnitt VI.3) . Das restliche Plasma wurde bei -20 °C gelagert.

### **3.2.3 Real-time quantitative PCR**

#### **3.2.3.1 Datenbanken**

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Datenbanken für die Recherche von Literatur, Informationen über die Zielgene und das Design der Primer für die qPCR genutzt:

|                    |   |
|--------------------|---|
| Literaturrecherche | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>                                   |
| Genomdatenbank     | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>   |
| Primerdesign       | <a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm</a> |
| Primerblast        | <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>                           |
| Primeranalyse      | <a href="https://eu.idtdna.com/calc/analyzer">https://eu.idtdna.com/calc/analyzer</a>                                   |

#### **3.2.3.2 RNA-Isolation aus Lebergewebe**

Zur RNA-Isolation wurde ca. 20 mg schweres Lebergewebe verwendet. Das Lebergewebe wurde zusammen mit Lysepuffer (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit von Qiagen, 1 ml RLT-Puffer und 10 µl β-Mercaptoethanol) in Safe-Lock Reaktionsgefäße von Eppendorf überführt.

Im Anschluss wurde jeweils eine gekühlte Metallkugel in jedes Reaktionsgefäß platziert. Die Reaktionsgefäße wurden danach für 3 min bei der höchsten Stufe in eine Kugelmühle (TissueLyser LT, Qiagen) zur Homogenisierung gestellt. Hinterher wurden die Reaktionsgefäße für 3 min zentrifugiert (Centrifuge 5414 D, Eppendorf), um Zelltrümmer und verbleibendes Bindegewebe abzutrennen, damit anschließend der Überstand abpipettiert werden kann.

Nachfolgend wurde der QIAcube (Qiagen) nach Herstellerangaben mit den auf Eis gelagerten Reaktionsgefäße beladen und die Proben mittels des Programms RNeasy Mini - Animal tissues and cells - Large samples - Elution volume 30µl

weiterbearbeitet. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte an einem besonders gesäuberten RNA-Arbeitsplatz unter Gebrauch von RNase-DNase-freiem Material.

### **3.2.3.3 Quantifizierung der RNA mittels Spektrophotometrie**

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde spektrometrisch mit dem NanoDrop<sup>®</sup> 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Dazu wurde jeweils 1 µl der jeweilig eluierten Probe auf die Messeinheit pipettiert. Zusätzlich erfolgt eine Kontaminationskontrolle durch Quotientenbildung der Absorptionenwerte. Der Quotient 260 nm/280 nm gibt Aussage darüber, wie hoch die Kontamination an aromatischen Proteinen und Phenolen ist, da aromatische Proteine eine Wellenlänge von 280 nm und Phenole eine Wellenlänge von 270 nm absorbieren. Ein Quotient von ~ 2,0 signalisiert eine als „rein“ zu verwertende RNA, während ein Quotient von < 1,5 auf eine starke Verunreinigung deutet. Sämtliche verwendete Proben wiesen Werte zwischen 1,98-2,11 auf. Der Quotient 260 nm/230 nm beinhaltet Verunreinigungen von niedermolekularen Stoffen wie Überreste von Puffersubstanzen und Detergenzien, die Licht einer Wellenlänge von 230 nm absorbieren. Ein Quotient von 2,0-2,2 deutet auf „reine“ RNA hin. Alle verwendeten Proben wiesen Werte zwischen 1,96-2,26 auf.

### **3.2.3.4 Gelelektrophorese der RNA**

Zur Bewertung der Qualität der isolierten mRNA wurde eine Kapillar-Gelelektrophorese (QIAxcel, Qiagen) durchgeführt. Die RNA-Proben wurden zusammen mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einer Leiterprobe in die Einbuchungen (*wells*) auf den Gel-beladenen Chip gegeben. Die Detektion der kapillarelektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und wurde mittels der Software ausgewertet. Die Arbeitsdurchführung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls. Bei einer intakten RNA sind im Gel die zwei scharf begrenzten ribosomalen 18 S- und 28 S-Banden zu erkennen (Becker et al. 2009). Wenn diese Banden deutlich getrennt voneinander und keine weiteren niedermolekularen Banden zu erkennen sind, ist davon auszugehen, dass

die RNA durch den Isolationsvorgang nicht abgebaut wurde. Zudem kann eine Verunreinigung der Proben mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

### 3.2.3.5 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA kann mit der qPCR nicht amplifiziert werden, da diese keine passende Matrize für die Polymerase darstellt. Deswegen ist es erforderlich, die genaue RNA-Sequenz mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) und einem Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer in cDNA umzuschreiben. Die entstandene cDNA dient hinterher als Matrize für die qPCR.

Die cDNA-Synthese wurde durchgehend auf Eis mittels dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Proben mit einer RNA-Konzentration über 1000 ng/μl wurden mit DEPC-Wasser 1:2 oder 1:4 verdünnt, um später vergleichbare Resultate zu erhalten.

In **Tab. 10** ist der Versuchsansatz für den Präinkubationsmix pro Einzelreaktion in tabellarischer Form dargestellt:

**Tab. 10: Versuchsansatz des Präinkubationsmixes für die cDNA-Synthese.**

| Komponenten                     | Volumen pro Reaktion |
|---------------------------------|----------------------|
| RNA-Lösung (1 μg RNA)           | 11 μl                |
| Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer | 1 μl                 |
| Gesamtvolumen                   | 12 μl                |

Im Peltier Thermal Cycler (Biorad) wurden die Reaktionsgefäße für 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend für 2 min bei 4 °C abgekühlt. Während dieser Inkubationszeit wurde der Hauptinkubationsmix (**Tab. 11**) vorbereitet und anschließend mit dem Präinkubationsmix vermischt.



**Tab. 11: Versuchsansatz des Hauptinkubationsmixes für die cDNA-Synthese.**

| Komponenten                        | Volumen pro Reaktion |
|------------------------------------|----------------------|
| 5 x Reaction Buffer                | 4 µl                 |
| dNTP (10 mM)                       | 2 µl                 |
| RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl) | 1 µl                 |
| Revert Aid RT (200 U/µl)           | 1 µl                 |
| Gesamtvolumen                      | 8 µl                 |

Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße im Peltier Thermal Cycler 5 min bei 25 °C, dann 60 min bei 42 °C (Primeranlagerung und Extension) und zum Schluss für 5 min bei 70 °C (Denaturierung) inkubiert. Darauffolgend wurde die synthetisierte cDNA auf 5 ng/µl mit DEPC-Wasser verdünnt.

### **3.2.3.6 qPCR**

Die qPCR ist eine Methode der exponentiellen Vervielfältigung von DNA in Kombination mit einer Fluoreszenzmessung in Echtzeit, die proportional mit der Menge des PCR-Produktes zunimmt.

Für die qPCR wurde der Rotor-Gene rotary analyzer (Corbett Life Science, Qiagen) benutzt. Die Quantifizierung erfolgte in der exponentiellen Phase der qPCR, da nur hier optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Die Detektion erfolgte anhand des Fluoreszenzfarbstoffes Brilliant<sup>®</sup>II SYBR Green<sup>®</sup>qPCR Master Mix (Stratagene), der an die doppelsträngige DNA bindet und bei einer Wellenlänge von 490 nm fluoresziert.

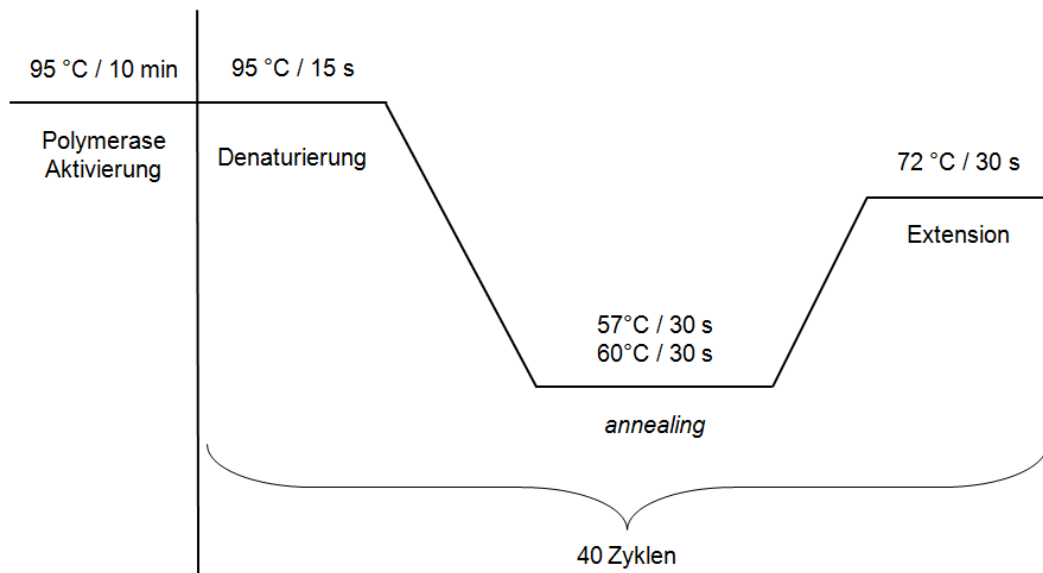
Die Proben wurden mit Hilfe des Precision Liquid Handling System CAS-1200<sup>™</sup> (Corbett Life Science) pipettiert.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatz pro Einzelreaktion in der **Tab. 12** zu entnehmen.

**Tab. 12: Reaktionsansatz für die qPCR.**

| Komponenten   | Volumen pro Reaktion |
|---|----------------------|
| Brilliant <sup>®</sup> II SYBR Green <sup>®</sup> qPCR Master Mix | 10 µl                |
| Primer-Mix (2 µM fw; 2 µM rv)                                     | 5 µl                 |
| cDNA (5 ng/µl)  | 5 µl                 |
| Gesamtvolumen   | 20 µl                |

Folgendes qPCR-Schema wurde entsprechend der Eigenschaften der Primer verwendet (**Abb. 4**):



**Abb. 4: Schematische Darstellung des qPCR-Programmes.**

Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der qPCR mit der beginnenden einmaligen Denaturierung der Polymerase bei 95 °C für 10 min. Anschließend erfolgt die Denaturierung der cDNA bei 95 °C für 15 s mit der nachfolgenden Anlagerung der Primer (*annealing*) an die cDNA. Die *annealing*-Temperatur wurde an die spezifischen Eigenschaften jedes Primers angepasst. *Atg5*, *Atg12*, *Becn1* und *Hmox1* wurden auf 57 °C und *Lc3* auf 60 °C für 30 s herunter gekühlt. Danach erfolgt die DNA-Amplifizierung (Extension) bei 72 °C für 30 s. Die letzten drei Schritte (ein Zyklus) werden 40-mal wiederholt.

### 3.2.3.7 Primeretablierung und Effizienzbestimmung

Damit das spezifische Expressionsniveau der ausgewählten Zielgene untersucht werden kann, ist es essentiell, die Effektivität der Amplifikationen unter Verwendung der jeweiligen Primer zu ermitteln (theoretisch = 2) sowie die Selektivität der Reaktion abzuschätzen. Dazu wurde in einer Genomdatenbank (Abschnitt 3.2.3.1) die Transkriptsequenz ermittelt und anhand eines Primerdesign- und Primeranalysenprogramms (Abschnitt 3.2.3.1) die entsprechenden Primer erstellt. Diese Primererstellung erfolgte nach folgenden Kriterien (Chuang et al. 2013):

- Primerlänge zwischen 16-28 bp
- Längendifferenz zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer unter 3 bp
- GC-Gehalt zwischen 40-60 %
- Schmelztemperatur ( $T_m$ ) zwischen 50-62 °C
- Schmelztemperaturdifferenz zwischen dem Primerpaar unter 5 °C
- homologe Sequenzen zwischen dem Vorwärts- und Rückwärts-Primer meiden, um Primerdimere zu reduzieren
- Primer sollten möglichst keine Hairpinstrukturen bilden
- Primersequenzen in einer Genomdatenbank (Abschnitt 3.2.3.1) abgleichen, um Co-Amplifikate ausschließen zu können

Zur Bestimmung der Primer-Effizienzen (E) wurde für jeden Primer eine Verdünnungsreihe angefertigt. Dafür wurde die cDNA um den Faktor 10 seriell verdünnt und die sechs Verdünnungsstufen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-9}$  eingesetzt. Die Ansätze wurden nach dem Reaktionsansatz der qPCR mit Hilfe des Precision Liquid Handling System CAS-1200<sup>TM</sup> (Corbett Life Science) pipettiert und anschließend im Rotor-Gene rotary analyzer (Corbett Life Science, Qiagen) amplifiziert. Je geringer die Konzentration des cDNA Template war desto später stieg die Fluoreszenz an und entsprechend größer waren die Ct-Werte.

Um die Standardkurve näherungsweise als lineare Regressionsgrade zu ermitteln, wurden die Ct-Werte gegen die Konzentration der mRNA halbalgorithmisch aufgetragen. Unter Verwendung der Pfaffl-Formel  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  konnte anhand des negativen Anstiegs (*slope*) die Effizienz der Primer bestimmt werden (Pfaffl 2001). Eine Effizienz von 1,8-2,0 wurde als optimal angesehen. Alle verwendeten Primer wiesen Effizienzwerte zwischen 1,92-1,99 auf.

### 3.2.3.8 Schmelzkurvenanalyse

Zusätzlich wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um das Amplifikationsprodukt zu charakterisieren und eventuell vorhandene Primer-Dimere oder unspezifische PCR-Produkte zu detektieren. Dazu wurde die Temperatur schrittweise ( $\Delta 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) von  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis auf  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhöht. Bei niedrigen Temperaturen ist die cDNA doppelsträngig und der Farbstoff kann binden. Wird die  $T_m$  des PCR-Produktes erreicht, denaturiert der Doppelstrang und der Farbstoff kann an dem Einzelstrang nicht mehr binden. Dadurch fällt die Fluoreszenz plötzlich ab. Der Zeitpunkt, an dem das Fluoreszenzsignal stark abfällt, nennt man  $T_m$ . Da jedes Amplifikat eine spezifische sequenz-immanente kalkulierbare  $T_m$  hat, können durch die Schmelzkurvenanalyse das Produkt identifiziert und unspezifische PCR-Produkte erkannt werden. Primer-Dimere haben einen niedrigen Schmelzpunkt und würden somit zu einem verfrühten Peak führen. Die kalkulierte  $T_m$  der PCR-Produkte war weitgehend übereinstimmend mit der tatsächlichen  $T_m$ .

### 3.2.3.9 Referenzgenanalyse

Referenzgene kodieren für Proteine des Grundstoffwechsels und sind dadurch für die Funktionalität einer Zelle existenziell (RocheDiagnostics 2012). Diese Gene sollten konstant exprimiert werden, ohne einer internen oder externen Regulation zu unterliegen. Diese endogene Kontrolle ist notwendig, um eine relative Quantifizierung der Zielgene durchzuführen. Anhand aktueller Durchsicht der Literatur wurde eine Vorauswahl an vier möglichen Referenzgenen getroffen (**Tab. 5**).

Eine Analyse hinsichtlich des Stabilitätsprofil (Referenzgenanalyse) für *Hprt*, *Hmbs*, *Actb* und *Gapdh* wurde mit Hilfe des Programms NormFinder durchgeführt, welches auf dem mathematischen Prinzip von Vandesompele et al. basiert (Vandesompele et al. 2002). Anhand der Schnittmengenanalyse wurde *Hmbs* als stabilstes exprimiertes Gen, sowie die beste Kombination zweier Gene aus *Hmbs* und *Actb* ermittelt.

Für das Referenzgen *Hmbs* wurde ebenfalls die Effizienz bestimmt und eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

### 3.2.3.10 Normalisierung der Genexpressionsdaten

Die Genexpressionsdaten wurden anhand der relativen Quantifizierungsstrategie normalisiert. Hierzu wurde die Genexpression des Zielgens auf ein nicht reguliertes Referenzgen bezogen (Abschnitt 3.2.3.9). Mittels der Normalisierung wurde die Varianz der Genexpressionsdaten reduziert und die individuellen Probeneffekte glichen sich wieder aus. Dadurch konnten Daten von verschiedenen Experimenten direkt verglichen werden. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung nach der Methode von Pfaffl (Pfaffl 2001) angewandt.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}$$

Der Kontroll-Ct-Wert entsprach hierbei dem arithmetischen Mittel der Ct-Werte der Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt (6 h, 24 h, 72 h).

Mit Hilfe dieses Berechnungsmodells lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob das Genexpressionsniveau des Zielgens im Vergleich zum Referenzgen erhöht, erniedrigt oder unverändert geblieben ist.

Zur übersichtlichen Darstellung wurden die errechneten Genexpressionsverhältnisse  $\log_2$ -transformiert und im Ergebnisteil als  $\log_2$ -fold changes ( $\log_2\text{FC}$ ) dargestellt. Ein  $\log_2\text{FC}$  von 1 bzw. -1 auf der y-Achse bedeutet eine Verdopplung bzw. eine Halbierung der Genexpression und bildet zugleich den Grenzwert, ab dem die Genexpressionsveränderung als biologisch bedeutsam angesehen wird.

## **3.2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.4.1 Zell-Lyse**

Zell-Lysepuffer: Tris-HCl (pH 7,5 bei RT) 10 mM; Saccharose 250 mM; EDTA 1 mM; (1 % Triton X-100; 1 % Protease-Inhibitor Cocktail; 1 % Phosphatase-Inhibitor Cocktail 3; 1 % Natrium Orthovanadat)

Der Lysepuffer wurde wie oben beschrieben hergestellt. Triton, Protease- und Phosphatase-Inhibitor und Natrium Orthovanadat wurden kurz vor der Lyse der Lebergewebeproben zu dem Lysepuffer hinzugegeben und ausgiebig vermischt, bis sich alle Substanzen gelöst hatten. Der angefertigte Lysepuffer wurde auf 4 °C gekühlt. Die Leberproben wurden durchgehend auf Eis gelagert. Anschließend wurde jeweils eine gekühlte Metallkugel und der Lysepuffer auf die Lebergewebsproben gegeben. Für eine 50 mg schwere Lebergewebeprobe wurden 500 µl Lysepuffer hinzugegeben. Danach wurden die Proben für 6 min bei 50 Hz in die 4 °C heruntergekühlte Kugelmühle (TissueLyser LT, Qiagen) platziert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 10 min bei 900 g zentrifugiert (Centrifuge 5414 D, Eppendorf). Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert und in neue Reaktionsgefäße gegeben und direkt auf Eis gestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### **3.2.4.2 BCA-Test**

Das Gesamtprotein wurde anhand des BCA Kit for Protein Determination (Sigma-Aldrich) in den Proteinlysaten quantifiziert. Laut Herstellerangaben wurde die Standard-Verdünnungsreihe mit dem Albuminstandard angesetzt und die Proteinlysate 1:10 und 1:20 mit dem Zell-Lysepuffer verdünnt. Folgend wurden jeweils 25 µl von dem Standard und den Proben auf eine 96-well Platte (F-Bottom) vorgelegt und die BCA-working Reagenz dazugegeben. Im Anschluss wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem ELISA Reader (Tecan) bei 550 nm.

### 3.2.4.3 Gießen der Gele

Das nachfolgende Pipettierschema ist für zwei 15 %-ige Polyacrylamidgele in **Tab. 13** dargestellt:

**Tab. 13: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.**

| Sammelgel |                            | Trenngel 15 % |                            |
|-----------|----------------------------|---------------|----------------------------|
| 1400 µl   | destilliertes Wasser       | 2300 µl       | destilliertes Wasser       |
| 330 µl    | 30 % Acrylamid             | 5000 µl       | 30 % Acrylamid             |
| 250 µl    | 1,0 M Trizma base (pH 6,8) | 2500 µl       | 1,5 M Trizma base (pH 8,8) |
| 20 µl     | 10 % SDS                   | 100 µl        | 10 % SDS                   |
| 20 µl     | 10 % APS                   | 100 µl        | 10 % APS                   |
| 2 µl      | TEMED                      | 4 µl          | TEMED                      |

Zu Beginn wurden die Komponenten des Trenngels miteinander vermischt und in die Gelkammer gegossen und mit etwas destilliertem Wasser bedeckt, um die Gele vor dem Austrocknen zu schützen. Nach 20 min hatten sich die Trenngele polymerisiert und das Wasser konnte abgegossen werden. Die Komponenten für das Sammelgel konnten anschließend das Trenngel gegossen werden. Zeitnah wurde jeweils ein Taschenkamm in die Gelkammern eingeschoben. Nach 20 min hatte sich das Sammelgel ebenfalls polymerisiert und die Gele konnten dann feucht im Kühlschrank gelagert werden.

#### 3.2.4.4 SDS-PAGE

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <u>5-fach SDS-Ladepuffer:</u>   | 3 ml 20 % SDS; 3 ml $\beta$ -Mercaptoethanol; 4 ml Glycerin; 1,66 ml Tris-HCl (pH 8,0); Spatelspitze Bromphenolblau                      |
| <u>10 x SDS-PAGE Laufpuffer</u> | 30,24 g (250 mM) Trizma base; 142,50 g (1,9 M) Glycine; 10 g (1 %) SDS in 800 ml aq. dest. lösen und mit aq. dest. auf 1000 ml auffüllen |

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren, das genutzt wird, um Proteine mit Hilfe eines homogenen elektrischen Feldes nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen. Die Konzentration an Acrylamid im Trenngel ist abhängig von dem Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins und ist entscheidend, um eine korrekte Auftrennung der Proteine zu gewährleisten. Da die gesuchten Proteine alle ein geringes Molekulargewicht aufwiesen, wurde ein 15 %-iges Trenngel gewählt.

Die Proben wurden mit dem 5-fach SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C und 750 rpm im Thermomixer Comfort (Eppendorf) erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben in der 4 °C herunter gekühlten Kugelmühle (TissueLyser LT, Qiagen) kurz zentrifugiert und dann sofort auf Eis gelagert. Die Gele wurden in der Kammer fixiert und mit einfachem SDS-PAGE Laufpuffer bedeckt. Es wurden 6  $\mu$ l Größenstandard (Precision Plus Protein Western C Standards, BioRad) und jeweils 15  $\mu$ l Gesamtproteinlysate auf das Gel aufgetragen, damit die Proben untereinander vergleichbar sind. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für ca. 120 min.



### 3.2.4.5 Western Blot

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <u>Transferpuffer</u>         | 3,025 g (25 mM) Trizma base; 14,4 g (192 mM) Glycine; 200 ml (20 %) Methanol in 800 ml aq. dest. lösen und mit aq. dest. auf 1000 ml auffüllen |
| <u>10 x TBS</u>               | 12,11 g (0.1 M) Trizma base; 58,44 g (1.0 M) NaCl auf pH 7,6 mit 37 % HCl einstellen   |
| <u>TBS-Tween</u>              | aus 10 x TBS mit aq. dest. verdünnen (900 ml aq. dest. und 100 ml 10 x TBS) und 1 ml Tween 20  |
| <u>5 % BSA-Blockinglösung</u> | 5 % BSA in 1 x TBS-Tween   |

Der Western Blot ist eine Methode, in der die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen und danach spezifisch nachgewiesen werden.

Zu Beginn wurde die hydrophobe PVDF-Membran 1 min in Methanol geschwenkt und anschließend für 10 min in dem Transferpuffer äquilibriert. Ebenso wurde das Whatman-Papier und die Pads im Transferpuffer getränkt. Danach wurde das Blot-Sandwich luftblasenfrei zusammengebaut. Das Blot-Modul wurde in die Blotkammer eingesetzt und mit Transferpuffer gefüllt. Der Blot wurde für 1 h bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt.

Nachfolgend wurde die PVDF-Membran unter regelmäßigem Schwenken für 1 h bei Raumtemperatur in 5 %-iger BSA-Blockinglösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal je 10 min mit TBS-Tween gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper und 0,4 µl vom Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate (BioRad) für 1 h bei Raumtemperatur unter stetigem Schwenken inkubiert. In Folge wurde die Membran erneut dreimal für je 10 min mit TBS-Tween gewaschen und schließlich 1 ml vom HRP-Substrat (Clarity Western ECL Substrate, BioRad) zugegeben und für 4 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend konnte die Detektion am LAS3000 erfolgen und mit

ImageJ (Version 1.49p, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) analysiert und ausgewertet werden.

Die eingesetzten Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind in **Tab. 2** und **Tab. 3** dargestellt.

### 3.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mithilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism Version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Für den Vergleich der Expressionsmuster zwischen den Untersuchungsgruppen (*septic survivors*, *septic non-survivors*) und der Kontrollgruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde der nichtparametrische, exakte Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte Daten verwendet. Die Testergebnisse wurden auf einem Niveau von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Das jeweilige Signifikanzniveau wurden in den Grafiken mit folgender Symbolik dargestellt:

–  $p < 0,05$ : \*

### 3.2.6 Nomenklatur der Gene und Proteine

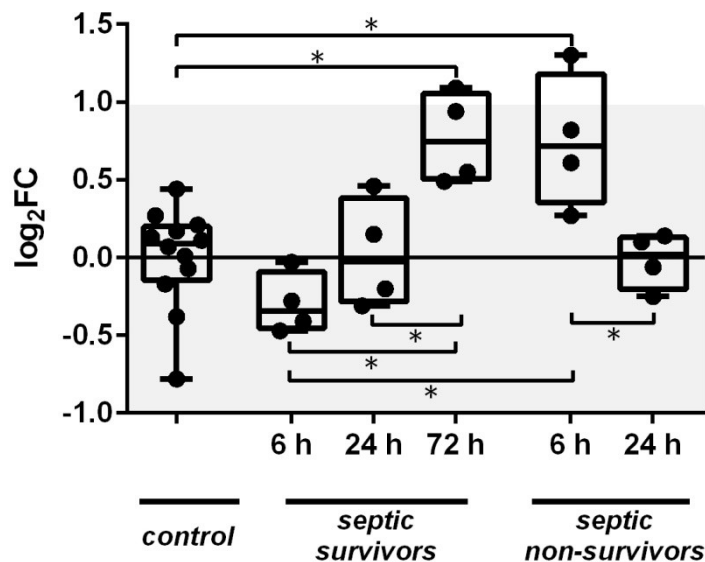
In der vorliegenden Arbeit wurde sich für die Nomenklatur der Gene und Proteine in *Rattus norvegicus* an folgende Richtlinien gehalten:

- Nomenklatur <http://rgd.mcw.edu/nomen/nomen.shtml>
- Gen- und Proteinbezeichnung <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genexpressionsanalyse der Schlüssel­moleküle der Autophagosombildung in septischen Ratten

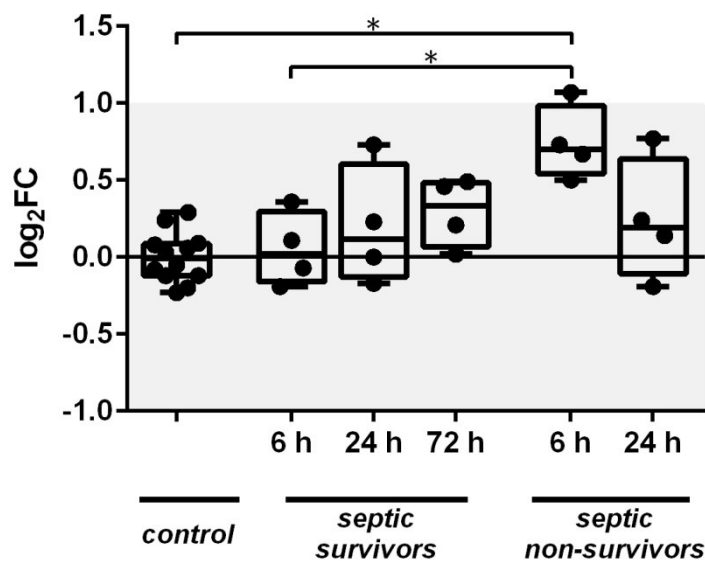
Um einen Überblick des autophagischen Prozesses zu erhalten, wurde zunächst *Atg5* als ein wesentlicher und früher Marker der Autophagosombildung untersucht. Die Auswertung der qPCR-Daten ergab eine signifikant erhöhte Genexpression in der *septic non-survivor*-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h im Vergleich zur *septic survivor*-Gruppe ( $p = 0,0286$ ) und insbesondere zur Kontrollgruppe ( $p = 0,0027$ ) (**Abb. 5**). In der *septic non-survivor*-Gruppe war die Reduzierung der Expression zwischen den Zeitpunkten 6 h und 24 h signifikant ( $p = 0,0286$ ). In der *septic survivor*-Gruppe war zu beobachten, dass der Anstieg zwischen 6 h und 72 h signifikant war, sowie die Hochregulierung zwischen 24 h und 72 h nach Sepsisinduktion ( $p = 0,0286$ ). Es zeigte sich 72 h nach PCI-Induktion eine signifikante Steigerung der Genexpression in der *septic survivor*-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0011$ ). Insgesamt fand eine Verdopplung der Genexpression in der *septic non-survivor*-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h und in der *septic survivor*-Gruppe zum Zeitpunkt 72 h statt.



**Abb. 5: *Atg5*-Genexpressionsniveau.**

Darstellung des *Atg5*-Genexpressionsniveaus ( $\log_2FC$ ) in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *septic survivors*, *septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

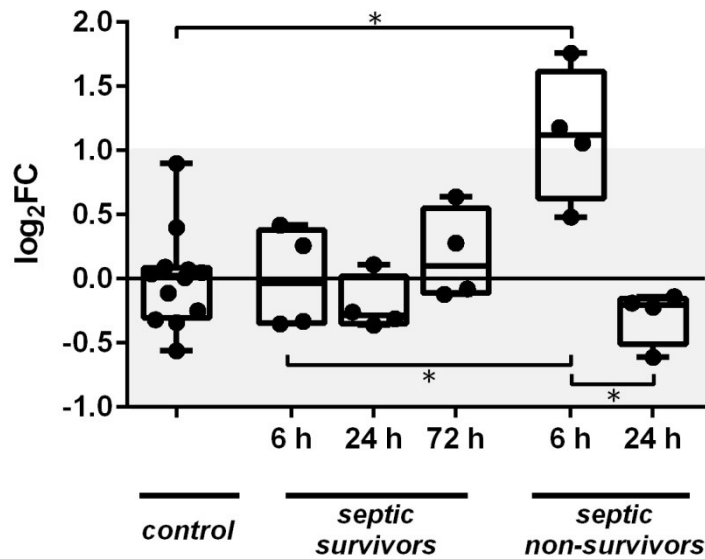
Für die Formation des Autophagosoms ist ebenfalls das Transkript *Atg12* essentiell, welches in einer ubiquitinähnlichen Konjugationsreaktion an *Atg5* kovalent gebunden wird. Das Genexpressionsmuster von *Atg12* ergab zum Zeitpunkt 6 h in der *septic non-survivor*-Gruppe eine signifikante Genexpressionserhöhung im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $p = 0,0011$ ) und zur *septic survivor*-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h ( $p = 0,0286$ ) (**Abb. 6**). In der *septic survivor*-Gruppe lässt sich ein tendenzieller Anstieg des Genexpressionsniveaus zum Zeitpunkt 72 h erkennen.



**Abb. 6: *Atg12*-Genexpressionsniveau.**

Darstellung des *Atg12*-Genexpressionsniveaus ( $\log_2FC$ ) in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *septic survivors*, *septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

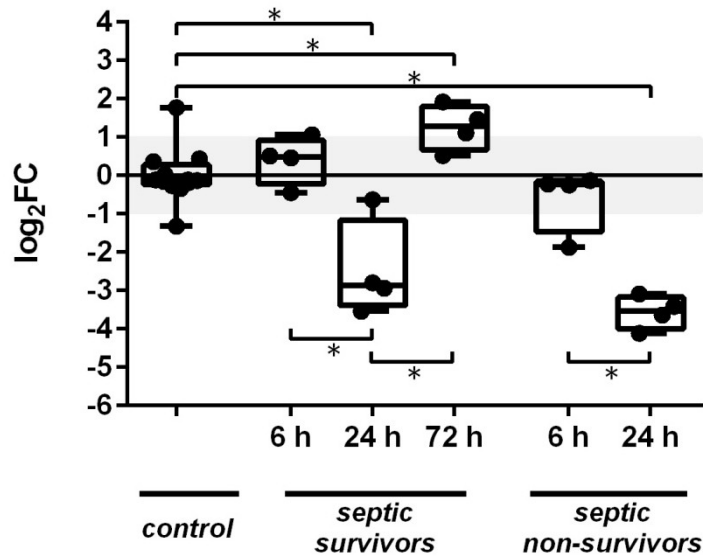
Da der vollständige *Atg12*-*Atg5*-*Atg16L*-Komplex für die Bildung des Autophagosoms benötigt wird, wurde das Genexpressionsniveau von *Atg16L* untersucht. Es zeigte sich 6 h nach PCI-Induktion in der *septic non-survivor*-Gruppe eine signifikante Verdopplung der Expressionsrate im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0022$ ) und zur *septic survivor*-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h ( $p = 0,0286$ ) (**Abb. 7**). In beiden Sepsis-Gruppen lässt sich ein tendenzieller Abfall der *Atg16L*-Genexpression zum Zeitpunkt 24 h beobachten. Die Genexpressionsdifferenz in der *septic non-survivor*-Gruppe zwischen den Zeitpunkten 6 h und 24 h war signifikant ( $p = 0,0286$ ).



**Abb. 7: Atg16L-Genexpressionsniveau.**

Darstellung des *Atg16L*-Genexpressionsniveaus ( $\log_2FC$ ) in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *septic survivors*, *septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

LC3 ist der hauptsächliche Marker der Autophagie und wird v. a. für die Bildung und der Expansion des Autophagosoms benötigt. Die Auswertung der qPCR-Daten zeigten zum Zeitpunkt 6 h nach PCI-Induktion bei den *septic survivors* und *septic non-survivors* bzgl. ihrer *Lc3*-Genexpression keine Unterschiede zu den Kontrolltieren (**Abb. 8**). 24 h nach PCI-Induktion wiesen beide septischen Gruppen sowohl die *septic survivors* ( $p = 0,0016$  vs. *control*,  $p = 0,0286$  vs. 6 h) als auch die *septic non-survivors* ( $p = 0,001$  vs. *control*,  $p = 0,0286$  vs. 6 h) eine signifikante Herunterregulation von *Lc3* auf. Zum Zeitpunkt 72 h nach PCI-Induktion war in der *septic survivor*-Gruppe eine signifikante Erhöhung des Genexpressionsniveaus im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0071$ ) und zum Zeitpunkt 24 h zu erkennen ( $p = 0,0286$ ).

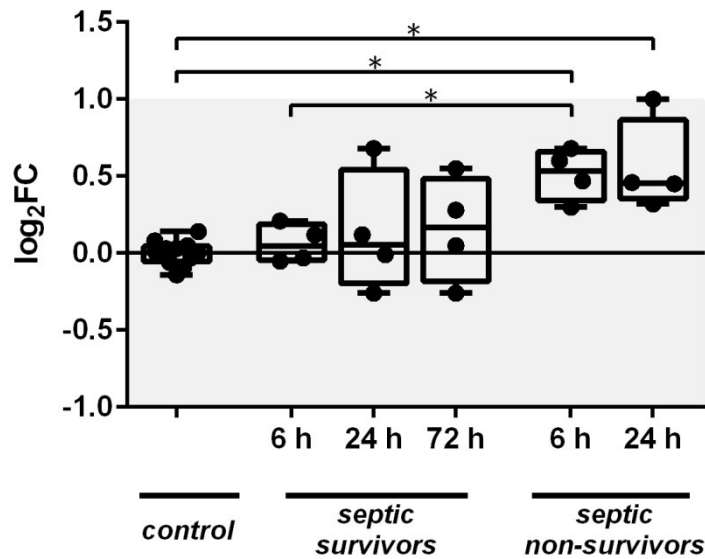


**Abb. 8: Lc3-Genexpressionsniveau.**

Darstellung des *Lc3*-Genexpressionsniveaus ( $\log_2FC$ ) in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *septic survivors*, *septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Analyse der Genexpression von Schlüsselmolekülen der Induktion der Autophagie in septischen Ratten

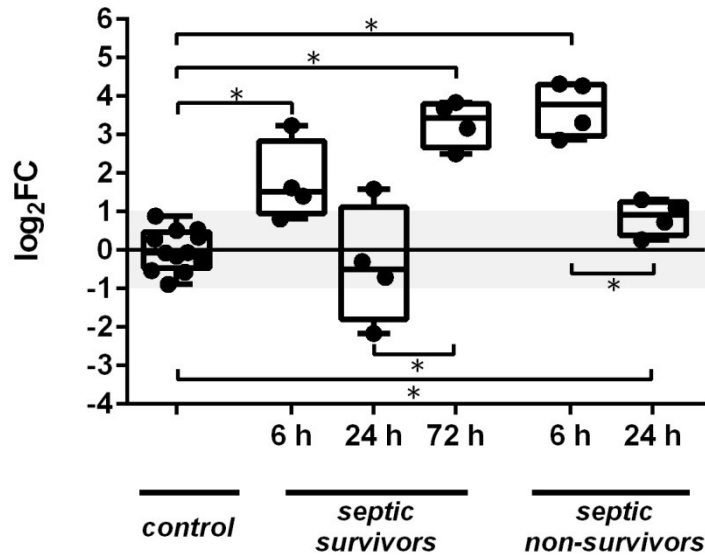
Beclin-1 ist die primär regulierende Untereinheit des class III VPS34-Komplexes, welcher die Autophagie positiv beeinflusst und induziert. Bezüglich des *Becn1*-Gens waren alle Veränderungen der Genexpression eher gering ausgeprägt. 6 h nach PCI-Induktion war eine signifikante Genexpressionserhöhung in der *septic non-survivor*-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,0011$ ) und der *septic survivor*-Gruppe ( $p = 0,0286$ ) zu verzeichnen (**Abb. 9**). Zum Zeitpunkt 24 h war in der *septic non-survivor*-Gruppe eine signifikante Hochregulation im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0011$ ) zu beobachten. Im Vergleich zum Zeitpunkt 6 h war jedoch in der *septic non-survivor*-Gruppe eine tendenzielle Reduktion des Genexpressionsniveaus zu verzeichnen.



**Abb. 9: *Becn1*-Genexpressionsniveau.**

Darstellung des *Becn1*-Genexpressionsniveaus ( $\log_2FC$ ) in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *septic survivors*, *septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

Die HO-1 ist ein Enzym, welches während der Sepsis hochreguliert wird und den autophagischen Prozess induziert. Das Genexpressionsmuster von *Hmox1* zeigte zum Zeitpunkt 6 h nach PCI-Induktion bei den *septic survivors* ( $p = 0,0022$ ) und die *septic non-survivors* ( $p = 0,0011$ ) eine signifikante Hochregulation im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abb. 10**). Beide Sepsis-Gruppen zeigten nach 24 h eine Erniedrigung der Genexpression, jedoch nur die *septic non-survivor*-Gruppe zeigte eine signifikante Herunterregulierung im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0297$ ) und zum Zeitpunkt 6 h ( $p = 0,0286$ ). Nach 72 h war in der *septic survivor*-Gruppe eine signifikante Hochregulation im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0011$ ) und dem Zeitpunkt 24 h zu verzeichnen ( $p = 0,0286$ ).



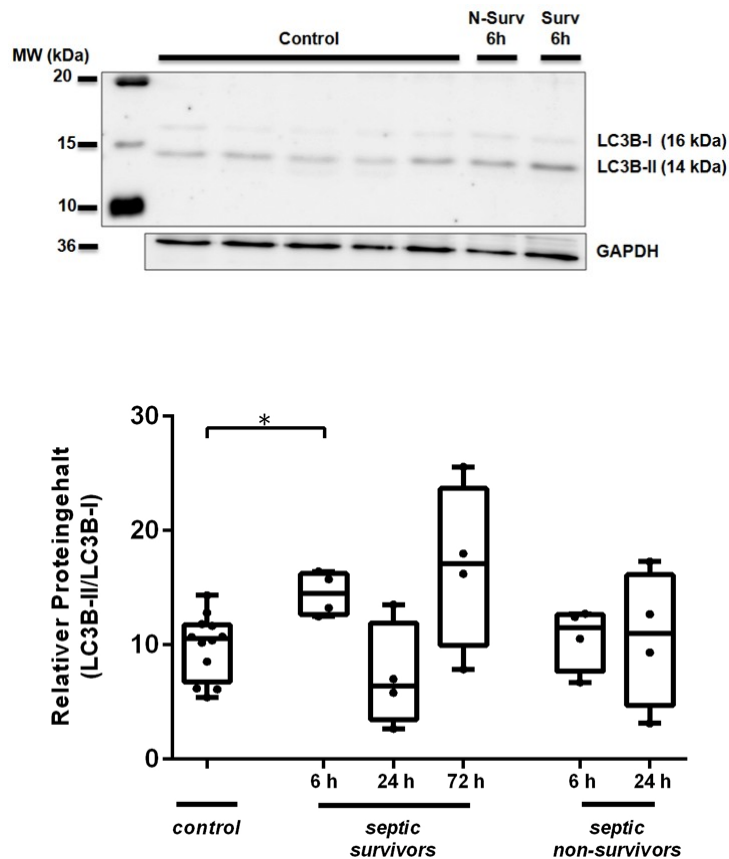
**Abb. 10: *Hmox1*-Genexpressionsniveau.**

Darstellung des *Hmox1*-Genexpressionsniveaus ( $\log_2FC$ ) in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *septic survivors*, *septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

### 4.3 Relative Proteinmengen

Nachdem die Genexpressionsmuster von den Schlüsselparametern der Autophagie untersucht wurden, sollte anschließend auf Proteinebene der autophagische Prozess weiter analysiert werden. Dafür wurde zunächst der LC3B-II-Proteingehalt betrachtet. In der *septic survivor*-Gruppe ergab sich 6 h post PCI eine signifikante Erhöhung des LC3B-II-Proteingehalts im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,0077$ ) (**Abb. 11**). Nach 24 h war eine Erniedrigung der LC3B-II-Proteinexpression in der *septic survivor*-Gruppe zu erkennen. Zum Zeitpunkt 72 h stieg die LC3B-II-Proteinexpression wieder an und zwar über den Ausgangswert von 6 h. In der *septic non-survivor*-Gruppe befand sich der Proteingehalt über den Zeitraum auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

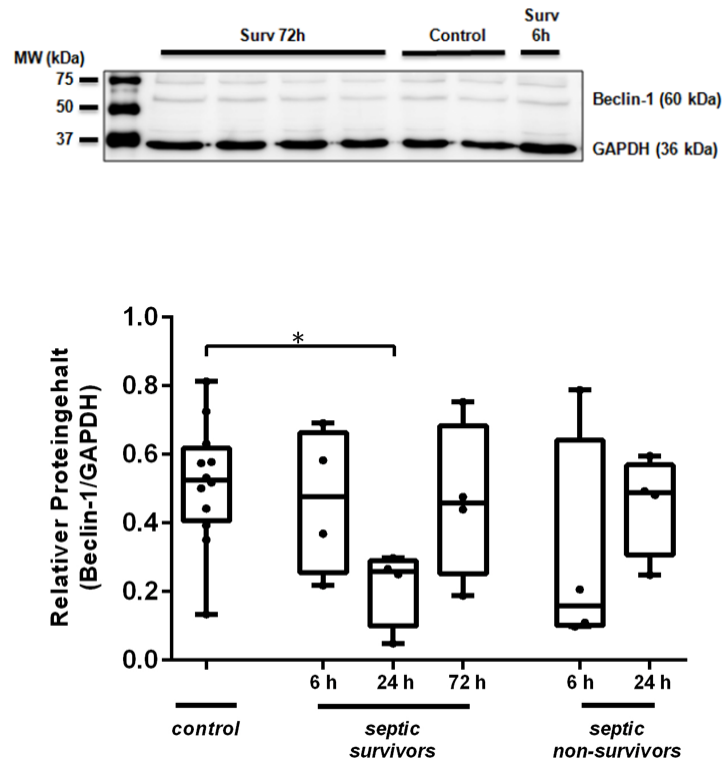




**Abb. 11: Relativer LC3B-II-Proteingehalt.**

Darstellung des relativen Proteingehalts von LC3B-II zu LC3B-I in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *predicted septic survivors* und *predicted septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

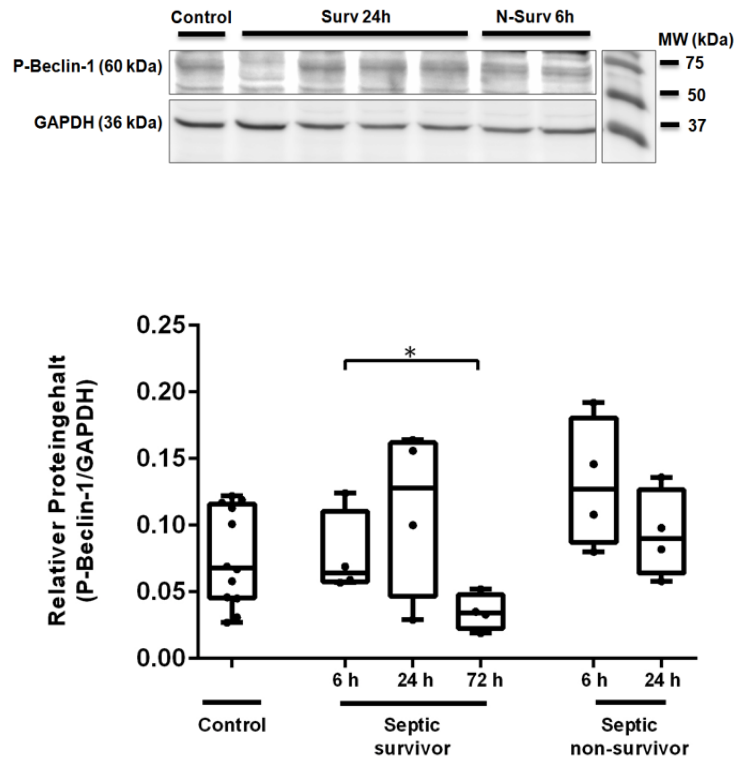
Die Proteinexpression von Beclin-1 ergab zum Zeitpunkt 6 h nach PCI-Induktion eine Erniedrigung in der *septic non-survivor*-Gruppe mit einem anschließenden Anstieg zum Zeitpunkt 24 h auf das Niveau der Kontrollgruppe (**Abb. 12**). In der *septic survivor*-Gruppe lag die Beclin-1-Proteinmenge nach 6 h etwas unterhalb der Kontrolle und fiel zum Zeitpunkt 24 h weiter signifikant ab ( $p = 0,0077$ ). Zum Zeitpunkt 72 h stieg der Proteingehalt wieder auf das Ausgangsniveau an.



**Abb. 12: Relativer Beclin-1-Proteingehalt.**

Darstellung des relativen Proteingehalts von Beclin-1 zu GAPDH in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *predicted septic survivors* und *predicted septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

Schließlich wurde der relative Proteingehalt von P-Beclin-1 ermittelt, da die phosphorylierte und aktive Form des Beclin-1 ein wesentlicher Schritt in der Induktion der Autophagie ist. In der *septic survivor*-Gruppe lag der P-Beclin-1-Proteingehalt nach 6 h auf dem Niveau der Kontrollgruppe (**Abb. 13**). Nach 24 h stieg der Proteingehalt und fiel anschließend zum Zeitpunkt 72 h signifikant ab im Vergleich zum Zeitpunkt 6 h ( $p = 0,0286$ ). In der *septic non-survivor*-Gruppe war der P-Beclin-1-Proteingehalt nach 6 h erhöht und fiel dann zum Zeitpunkt 24 h etwas ab.



**Abb. 13: Relativer P-Beclin-1-Proteingehalt.**

Darstellung des relativen Proteingehalts von P-Beclin-1 zu GAPDH in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *predicted septic survivors* und *predicted septic non-survivors* (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.4 Hierarchische Clusteranalyse

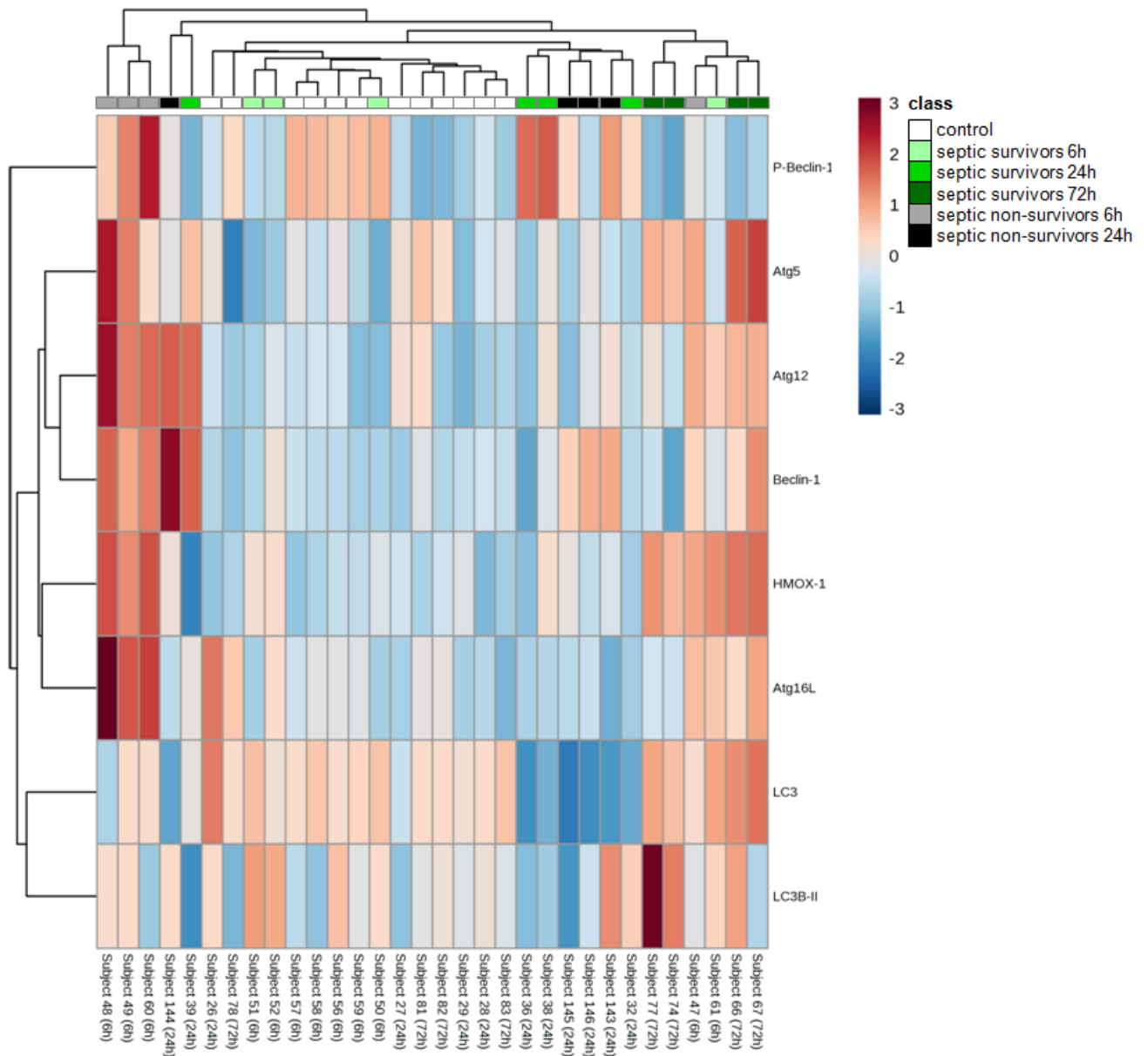
Die hierarchische Clusteranalyse beschreibt ein Verfahren zur Strukturentdeckung in einer großen Datenmenge, den sogenannten Clustern. Diese Cluster bestehen aus Objekten, die zueinander eine geringe Distanz also eine hohe Ähnlichkeit aufweisen, als zu den Objekten von anderen Clustern. Bei einer Vielzahl an unterschiedlichen Gruppen und Parametern, die zugleich noch Schwankungen in den Werten aufweisen, ist das *unsupervised clustering* eine bedeutsame Methode, um möglicherweise spezifische Muster innerhalb der Kohorten ausschließlich anhand erhobener Parameter zuerkennen und diese in Gruppen einzuteilen.

In **Abb. 14** ist eine Heatmap mit den Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit von den relativen Expressionsniveaus der ausgewählten Gene und Proteine dargestellt. Die Heatmap benutzt repräsentative Farbtöne, um in der Datenmenge unmittelbar markante Werte zu erkennen. Helle Farbtöne stellen dabei eine niedrige und dunkle Farbtöne eine hohe Expression dar. Zudem ist ein Dendrogramm dargestellt,

welches die hierarchische Zerlegung der Datenmenge in immer kleinere Teilmengen darstellt.

Die hierarchische Zerlegung des Dendrogramms zeigte, dass die einzelnen Mitglieder der Kontrollgruppen alleinig anhand ihrer Werte in einem Cluster gruppiert oder frühzeitig vereinigt wurden. Dieses repräsentiert die geringe Distanz und damit genug biologische Unterschiede zwischen den einzelnen Werten der individuellen Tiere. Die Mitglieder der *septic non-survivor*-Gruppe 6 h wurden ebenso zusammengruppiert, abgesehen von *Subject 47*, welches anhand der Werte zusammen mit einem Mitglied der *septic survivor*-Gruppe 6 h (*Subject 61*) in einem Cluster eingeordnet wurde. Das Cluster aus diesen beiden Individuen wurde folgend mit der *septic survivor*-Gruppe 72 h vereinigt. Die *septic non-survivor*-Gruppe 24 h wurde überwiegend zu einem Cluster gruppiert, abgesehen von *Subject 144*, welches mit einem Mitglied (*Subject 39*) aus der *septic survivor*-Gruppe 24 h zusammengefasst wurde. Jedoch wurde auch das Cluster der *septic non-survivor*-Gruppe 24 h frühzeitig mit den Mitgliedern der *septic survivor*-Gruppe 24 h vereinigt. Die Mitglieder der *septic survivor*-Gruppe 72 h spiegelten ähnliche Werte und wurden dadurch frühzeitig zu einem Cluster verbunden. Zwei Mitglieder aus der *septic survivor*-Gruppe 6 h (*Subjects 51* und *52*) bildeten ein Cluster und wurden frühzeitig mit einem weiteren Mitglied aus der Gruppe (*Subject 50*) und Individuen der Kontrollgruppe zu einem größeren Cluster verbunden.

Insgesamt zeigte sich, dass die Kontrollgruppe im Gegensatz zu den Untersuchungsgruppen hellere Farbtöne und dadurch geringere Expressionsniveaus der Schlüssel-moleküle der Autophagie aufwies. Zudem manifestierten sich die *septic non-survivor*-Gruppe 6 h und die *septic survivor*-Gruppe 72 h mit dunklen Farbtönen, die die hohe Gen- und Proteinexpression widerspiegeln.



**Abb. 14: Clusteranalyse der Untersuchungsgruppen mit Dendrogramm.**

Darstellung der Clusteranalyse der Untersuchungsgruppen in Abhängigkeit der betrachteten Gene und Proteine. Präsentiert ist ebenfalls ein Dendrogramm, das die Untersuchungsgruppen unabhängig von der vorgegebenen Gruppeneinteilung anhand von ähnlichen Werten gliedert. Die Heatmap verwendet verschiedene Farbtöne, um die Expression der Gene oder Proteine darzustellen. Dabei steht blau für eine verringerte und rot für eine erhöhte Expression. Je dunkler der Farbton wird, desto größer ist der Expressionsunterschied.

## 5 Diskussion

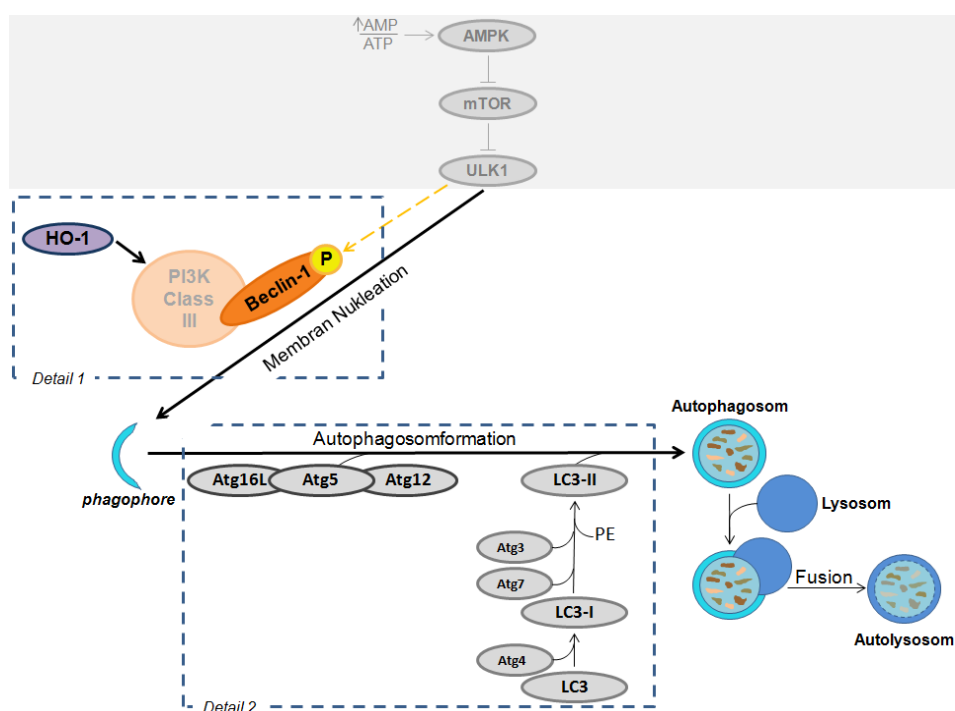
Die Autophagie spielt in diversen Krankheitsbildern eine wichtige Rolle und ist dadurch ein Schwerpunkt von zahlreichen Untersuchungen geworden. In Tierstudien konnte bereits nachgewiesen werden, dass der autophagische Prozess die Apoptoserate und irreversible Organdysfunktionen limitiert und dadurch eine schützende Funktion ausübt (Carchman et al. 2011, Nakahira et al. 2011). Sowohl in septischen Patienten (Watanabe et al. 2009) als auch in Tiermodellen konnte eine gesteigerte Autophagie in Hepatozyten demonstriert werden (Chien et al. 2011). Der autophagische Prozess während der Sepsis wurde bislang in den experimentellen Studien jedoch lediglich Endpunkt-bezogen untersucht und die gesamte Untersuchungsgruppe als weitgehend homogen betrachtet. Eine Population muss allerdings als heterogen angesehen werden, da sie auf den gleichen septischen Insult unterschiedlich reagiert (Christaki und Giamarellos-Bourboulis 2014). In dieser Arbeit wurden die Versuchstiere nach einem etablierten Verfahren (Rudiger et al. 2013) zu einem frühen Zeitpunkt (6 h) mittels der kardialen EF nach Überleben stratifiziert und in die phänotypisch unterschiedlichen Gruppen der *septic survivors* und *septic non-survivors* eingeteilt. Mit Hilfe dieser Methode konnten die Tiere anhand ihrer individuellen Wirtsreaktionen gegenüber der Infektion in zwei heterogene Phänotypen eingeteilt und der autophagische Prozess detailliert beurteilt werden. Da die Autophagie einen komplexen Prozess darstellt, wurden die Transkripte und die Proteinmodifikationen von Schrittmachermolekülen auf verschiedenen Ebenen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die hypothetisierten differenziellen Expressionsmuster zwischen den Untersuchungsgruppen bestehen.

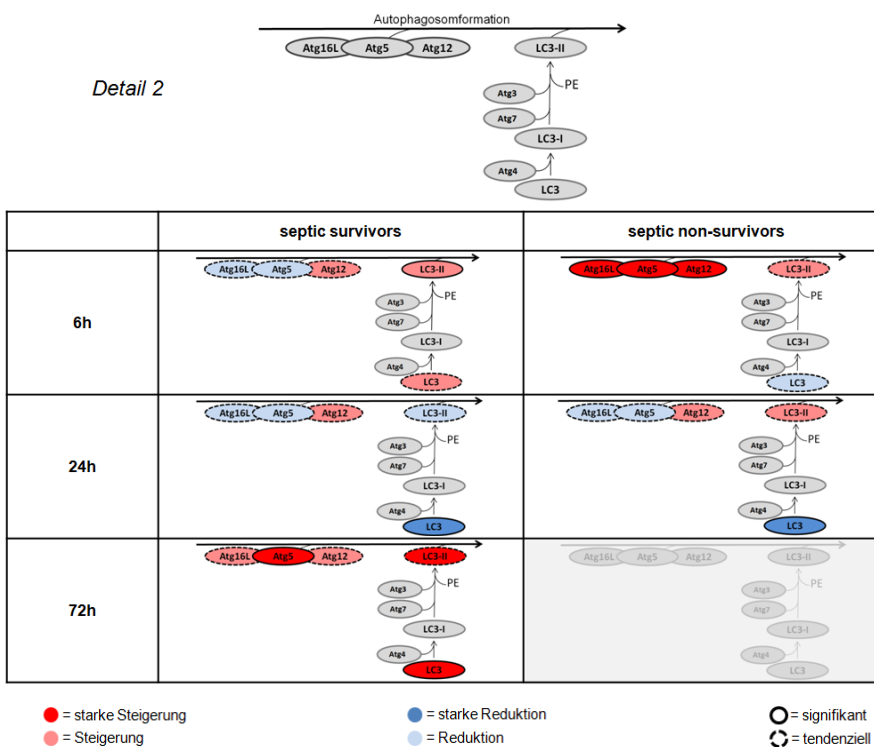
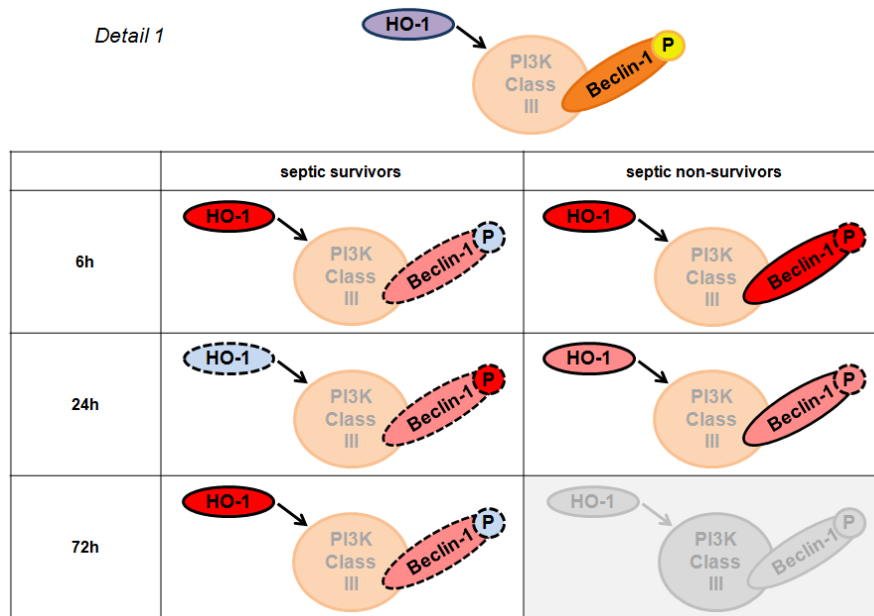
Trotz umfangreicher Forschungsanstrengungen, ist das Ausmaß und die Beteiligung der Autophagie an der Wirtsreaktion der Sepsis und ihre Wechselwirkung mit der Apoptose noch nicht vollständig geklärt. In der vorliegenden Arbeit soll erstmals anhand der stratifizierten Untersuchungsgruppen die Autophagie als adaptive Stressreaktion in der septischen Leber zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet werden.

## Autophagie als Adaptation auf unterschiedlichen Ebenen

Zur Selektion der untersuchten Parameter fokussierte sich die vorliegende Arbeit auf die zentralen Vorgänge des komplexen Prozesses der Autophagie auf verschiedenen Ebenen: die Induktion, die Reifung und die Formation des Autophagosoms. Beclin-1 hat eine zentrale Rolle für die Induktion des autophagischen Prozesses (Kang et al. 2011) und interagiert mit verschiedenen Kofaktoren (Atg14L, UVRAG, Bif-1, Rubicon, AMBRA1). Indem ULK1 Beclin-1 phosphoryliert, wird die Aktivität des VPS34-Komplexes gesteigert und der autophagische Prozess induziert. Der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex ist an der Formation des Autophagosoms beteiligt (Walczak und Martens 2013) und fungiert als E3-Ligase, indem es PE an den Glycinrest von LC3B-I konjugiert und LC3B-II entsteht. Atg5 wird auch als früher Marker der Autophagie beschrieben (Hailey et al. 2010), wogegen LC3B als später, aber wesentlicher Marker der Formation des Autophagosoms angesehen wird (Deng et al. 2013). Die HO-1 ist ein Enzym, welches unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert wird und neben seiner antiinflammatorischen Wirkung (Pae und Chung 2009) auch einen positiven Einfluss auf die Autophagie hat, indem es mit dem VPS34-Komplex direkt interagiert und dadurch den autophagischen Prozess induziert (Carchman et al. 2011).

In **Abb. 15** ist der autophagische Prozess und die untersuchten Schlüsselparameter schematisch dargestellt.





**Abb. 15: Schematische Darstellung des autophagischen Prozesses und der untersuchten Schlüsselparameter.**

Darstellung des autophagischen Prozesses in Abhängigkeit der Zeit, der Untersuchungsgruppen und der Expressionsniveauänderungen der Schlüsselparameter. Für *Detail 1* und *Detail 2* wurden die Grenzwerte in Abweichung von den dargestellten Box Plots wie folgt festgelegt: Genexpressionsänderung: Steigerung (Median Parameter > Median Kontrolle), starke Steigerung (Median Parameter > 0,5 log<sub>2</sub>FC), Reduktion (Median Parameter < Median Kontrolle) und starke Reduktion (Median Parameter < -0,5 log<sub>2</sub>FC). Proteinexpressionsänderung: Steigerung (Median Parameter > Median Kontrolle), starke Steigerung (Median Parameter > 1,5fache Median Kontrolle), Reduktion (Median Parameter < Median Kontrolle) und starke Reduktion (Median Parameter < 1,5fache Median Kontrolle).



## Die frühe Autophagosombildung als prognostischer Faktor

Die Daten der qPCR wiesen zu einem frühen Zeitpunkt (6 h) einen signifikanten Unterschied der Expressionsniveaus zwischen den Untersuchungsgruppen auf. Die *septic non-survivor*-Gruppe zeigte bei der Mehrheit der untersuchten Parameter eine signifikante Erhöhung der Genexpression in den ersten 6 h nach PCI-Induktion und anschließend eine beträchtliche Verminderung nach 24 h im Vergleich zur *septic survivor*-Gruppe. Diese Beobachtung kann durch Chien et al. bestätigt werden, die 3 h nach CLP (*cecal ligation and puncture*) einen Anstieg von LC3-II im Lebergewebe von Ratten verzeichnen (Chien et al. 2011). Der Höchstwert der LC3-II-Menge zeigt sich ebenfalls nach 6 h mit einer darauffolgenden raschen Verminderung im Zeitraum von 9 h bis 18 h nach CLP-Induktion. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass die Reduzierung der Abbaufunktion der Autophagie in einem späten Stadium der Sepsis zur Manifestation eines Leberschadens beitragen kann. Dementsprechend ist die frühzeitige Erhöhung der Autophagie eine Reflektion der Wirtsreaktion gegenüber oxidativen Stresses und Mitochondrienschädigung und spielt eine entscheidende Rolle im frühen Stadium der Sepsis (Chien et al. 2011). Im Gegensatz dazu demonstrieren Tang et al. in einem Maus CLP-Modell anhand von LC3-II eine gesteigerte Autophagie im Lebergewebe und keine Reduzierung der autophagischen Aktivität über einen Zeitraum von 24 h. Zudem weisen sie nach, dass eine erhöhte autophagische Aktivität mit einer geringeren Mortalität assoziiert ist und somit einen protektiven Mechanismus der Wirtsreaktion auf den septischen Insult darstellt (Tang et al. 2013). Diese Beobachtungen korrelierten mit der Mehrheit der Daten der *septic survivor*-Gruppe in der vorliegenden Arbeit, die eine stetige Erhöhung der Autophagie über den Beobachtungszeitraum von 72 h zeigten. Gleichermaßen demonstrieren Watanabe et al. eine deutliche Erhöhung der autophagischen Aktivität in Lebergeweben von septischen Patienten und CLP-Mäusen (Watanabe et al. 2009).

Die Erfassung des Ausmaßes der Autophagie wurde bislang in experimentellen Studien lediglich Endpunkt-bezogen erforscht und die Untersuchungsgruppe als weitgehend homogen angesehen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ratten jedoch zu einem frühen Zeitpunkt der septischen Erkrankung nach prognostiziertem Überleben stratifiziert und die Autophagie wurde anschließend in den phänotypisch unterschiedlichen Gruppen beurteilt. Durch dieses Verfahren ist es möglich, die Individuen

nach dem Ausmaß ihrer Wirtsreaktion gegenüber der Sepsis zu klassifizieren und mindestens zwei Subgruppen zu bilden. Die bedarfsgerechte und gezielte therapeutische Intervention sollte auch beim Patienten perspektivisch der individuellen Variabilität der Wirtsreaktion gegenüber der Infektion angepasst sein. Allerdings ist die frühe Detektion der Sepsis immer noch ein bedeutendes Problem in der Klinik, verzögert dadurch die Diagnose/frühe Therapie und führt individualisierte Ansätze *ad absurdum*. (Liu et al. 2014).

Die im Tiermodell erhobenen Daten zeigten deutlich, dass ein signifikanter Unterschied zu einem frühen Zeitpunkt (6 h) zwischen den *septic survivors* und den *septic non-survivors* zu verzeichnen war. Dementsprechend kann die aufgestellte Hypothese bestätigt werden, dass die frühe Autophagosombildung in den ersten 6 h der Sepsis prognoseentscheidend ist. Beispielsweise demonstrierten die Expressionsdaten des frühen Autophagosommarkers *Atg5* eine signifikant reduzierte Genexpression in der *septic survivor*-Gruppe im Vergleich zur *septic non-survivor*-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h. Somit könnte die Autophagie einen neuen Ansatz der personalisierten Medizin darstellen, um Patienten frühzeitig anhand des Ausmaßes der Stressreaktion einzuteilen und das *outcome* zu bestimmen, um eine gezielte und frühzeitige therapeutische Intervention einzuleiten.

## **Autophagie und Apoptose**

In zahlreichen Organen wie z. B. im Herz (Zou et al. 2014), Pankreas (Gukovskaya und Gukovsky 2012), Niere (Takabatake et al. 2014), Skelettmuskel (Mofarrahi et al. 2012), Gehirn (Nixon 2013) und ebenfalls in der Progression von Tumorerkrankungen (Yang et al. 2011) ist nachgewiesen, dass die Autophagie als adaptive Stressreaktion für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellen entscheidend ist. In der septischen Leber ist die Autophagie besonders für die Aufrechterhaltung von Energielevel und Nährstoffen und die Eliminierung von fehlgefalteten Proteinen, subzellulären Organellen und intrazellulären Bakterien wichtig (Yin et al. 2008). Unter pathologischen Bedingungen wird die Autophagie als adaptive Stressreaktion unmittelbar hochreguliert (Grassi et al. 2015). Die Applizierung von LPS, eine Hauptkomponente von Zellwänden von Bakterien, verursacht einen endotoxämischen Leberschaden und wird mit der Hochregulierung des autophagischen Prozesses assoziiert

(Wang et al. 2010a). Zusätzlich kann im Lebergewebe von verstorbenen Sepsispatienten eine Akkumulation von Autophagosomen beobachtet werden (Watanabe et al. 2009). Chien et al. und Lin et al. zeigen, dass durch den spezifischen *knockdown* von Atg7 die basale autophagische Aktivität gestört ist. Hierbei tritt eine Akkumulation von Peroxisomen, deformierten Mitochondrien mit Cytochrom c-Freisetzung und anormalen Membranstrukturen in Hepatozyten auf und resultiert in einer Leberfunktionsstörung mit letztentlichem Organversagen (Chien et al. 2011, Lin et al. 2014). Einer der hauptsächlichen Mechanismen, durch den die Autophagie die Apoptose limitiert, ist die Mitophagie (Youle und Narendra 2011). Die Mitochondrien konstituieren das 'Schlachtfeld', wo die Überlebens- und Todes-Signale zusammenkommen und dort wird determiniert, ob die intrinsische Apoptose aktiviert werden muss (Galluzzi et al. 2012). Defekte Mitochondrien sind durch den Verlust ihres Membranpotentials an der Induktion der Apoptose wesentlich beteiligt (Ferraro und Cecconi 2007). Durch die Eliminierung von defekten Mitochondrien mittels der autophagischen Maschinerie kann der Schwellenwert des programmierten Zelltodes gesteigert und die Apoptoserate verringert werden. Diese Resultate implizieren, dass die Autophagie eine protektive Rolle in der septischen Leber einnimmt. In der Studie von Wang et al. wird der Zusammenhang zwischen der Autophagie und dem *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)/c-Jun-Signalweg erläutert. Die Inhibierung der Autophagie durch den *knockdown* von *Atg5* führt in einer *RALA255-10G*-Hepatozyten-Zelllinie aus Ratten zu einer Überaktivierung des JNK/c-Jun-Signalweges (Wang et al. 2010b). Der JNK/c-Jun-Signalweg ist ein zentraler Prozess in der chronischen sowie der durch akuten oxidativen Stress induzierten Apoptose von Hepatozyten (Liu et al. 2002, Schwabe et al. 2004). Diese Studie demonstriert, dass die Autophagie für Hepatozyten essenziell ist, um den mitochondrialen Signalweg und den darauffolgenden programmierten Zelltod zu limitieren. Dennoch bleibt der Zusammenhang zwischen Apoptose und Autophagie weiterhin kontrovers. Es gibt experimentelle Studien, die den autophagischen Prozess als einen bedeutsamen Signalweg für das Zellüberleben darstellen und auf der anderen Seite zeigen tierexperimentelle Studien, dass die deregulierte Autophagie die Apoptose induziert:

Die Daten dieser Arbeit zeigten deutlich, dass die *septic non-survivor*-Gruppe zum Zeitpunkt 6 h im Gegensatz zur *septic survivor*-Gruppe überwiegend eine zweifach gesteigerte Genexpression aufwies. Diese übermäßige Aktivierung der Autophagie

könnte in der *septic non-survivor*-Gruppe eine Selbstzerstörung der Hepatozyten bewirken und zum Zelltod beitragen, da beispielsweise nicht nur alternde und defekte Mitochondrien und Proteine eliminiert werden, sondern auch funktionsfähige Organellen. Tierexperimentelle Studien weisen darauf hin, dass die Autophagie bei den überwiegenden Formen des zellulären Stresses eine zytoprotektive Rolle einnimmt, da der *knockdown* von Atg-Genen den Zelltod eher beschleunigt, als ihn zu limitieren (Maiuri et al. 2007). Allerdings kann eine unkontrollierte Hochregulierung der Autophagie möglicherweise zum Zelltod führen, indem es einerseits die Apoptose induziert oder zytoplasmatische Komponenten unspezifisch eliminiert (Gump und Thorburn 2011). Die Untersuchungen von Scott et al. zeigen, dass durch die Überexpression von *Atg1* die Autophagie induziert werden kann und dadurch der Zelltod ausgelöst und das Zellwachstum eingeschränkt wird (Scott et al. 2007). Vergleichbar demonstrieren Patingre et al., dass ebenfalls durch die Hochregulierung von Beclin-1 der autophagische Signalweg aktiviert und der Zelltod induziert wird (Patingre et al. 2005). Die Wechselwirkung zwischen der Autophagie und der Apoptose ist ein komplexer Prozess, da sie durch gemeinsame Faktoren reguliert werden und ihre Aktivitäten gegenseitig beeinflussen können (Hsieh et al. 2009). Die rasche Induktion der Autophagie reflektiert die adaptive Reaktion der Zelle auf Stress (Pietrocola et al. 2013). Wenn jedoch die Intensität oder die Dauer des Stresses den Schwellenwert der Zelle überschreitet, ist die Autophagie als adaptive Stressreaktion erschöpft (Rubinstein und Kimchi 2012). Demzufolge wird der programmierte Zelltod und die dazugehörigen Caspasen aktiviert. Diese Caspasen bauen diverse essentielle Autophagieproteine ab, z. B. Beclin-1, welches in einer Inaktivierung des autophagischen Prozesses resultiert (Luo und Rubinsztein 2010, Wirawan et al. 2010). Zudem zeigen Pagliarini et al. auf, dass AMBRA1 durch Caspasen und Calpainen irreversibel abgebaut wird und das Zellen, die eine mutierte Caspasen-Spaltungsstelle in AMBRA1 haben, relativ resistent gegenüber der Apoptose sind (Pagliarini et al. 2012). Neuste tierexperimentelle Studien bestätigen, dass die Autophagie einen protektiven oder schädlichen Einfluss auf die Homöostase der Zelle haben kann, abhängig vom Stadium der Krankheit, der zellulären Umgebung und der therapeutischen Interventionen (Chien et al. 2011). Insbesondere aber spielt wahrscheinlich die Intensität des zellulären Stresses mit dem anschließenden Ausmaß und Dauer der autophagischen Aktivität eine Rolle. Das Zusammenwirken von Autophagie und Apoptose ist sehr komplex und noch nicht vollständig erforscht und

könnte in der Zukunft neue therapeutische Ansätze für die Detektion und Behandlung von septischen Patienten darstellen.

### **Beeinflussung des autophagischen Prozesses**

Wie bereits beschrieben, war das Ausmaß der Autophagie als adaptive Stressreaktion bezüglich des zellulären Stresses zwischen der *septic survivor*-Gruppe und der *septic non-survivor*-Gruppe unterschiedlich, trotz ähnlicher, wenn nicht sogar identischer Einflussgrößen wie genetischer Hintergrund, Geschlecht, Alter, Gewicht, Umgebung und septischer Insult. Transkriptionsfaktoren könnten ein möglicher Mechanismus sein, welcher bei pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise Nährstoff- und Energiemangel, die spezifischen Gene der Autophagie hochregulieren und damit die Homöostase der Zelle erhalten. In dieser Arbeit werden zwei Transkriptionsfaktoren beispielhaft erläutert, die die Induktion der Autophagie regulieren.

Der Transkriptionsfaktor EB (TFEB) ist nicht nur ein Hauptregulator der lysosomalen Biogenese, sondern kontrolliert zudem die wichtigsten Schritte des autophagischen Signalweges, einschließlich der Formation, Fusion und Degradierung der Makromoleküle und der inneren Membran des Autolysosoms (Spampanato et al. 2013). Eine TFEB-Überexpression in HeLa-Zellen resultiert mit einer Zunahme an Autophagosomen in einer signifikant erhöhten Autophagie (Settembre et al. 2011). Zudem zeigen Decressac et al. in Neuronen des Mittelhirns, die Dopamin als Neurotransmitter benutzen, dass eine TFEB-Überexpression zu einer deutlichen Steigerung der lysosomalen und autophagischen Marker führt (Decressac et al. 2013). In einem LPS-induzierten Sepsis-Modell verbessert der Transfer des TFEB-Gens den *autophagic flux* und verlangsamt somit die Progression des systemischen inflammatorischen Krankheitsbildes (Uchida et al. 2014). In HeLa-Zellen führt die RNA-Interferenz (RNAi) von TFEB in normalen wie auch in nährstoffarmen Bedingungen zu einer Reduzierung der LC3-II-Level. Diese Verminderung des LC3-II-Levels korreliert mit der Herunterregulierung von TFEB (Settembre und Ballabio 2011). Die Degradierung von Proteinen mit langer Halbwertszeit kann durch eine Überexpression von TFEB erhöht werden und ist in TFEB-*knockdown*-Mäusen verringert (Settembre et al. 2011). Pastore et al. zeigen, dass ein TFEB-Gentransfer in der Leber zu einer Verbesserung von Lebererkrankungen führt, indem der Abbau durch

die autophagische Maschinerie von *serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 1* (SERPINA1) gesteigert wird (Pastore et al. 2013a, Pastore et al. 2013b). Der Gentransfer von TFEB demonstriert potentielle Behandlungsmöglichkeiten für ein weites Spektrum an Funktionsstörungen, die auf einer intrazellulären Akkumulation von toxischen Proteinen beruhen. Zusammenfassend ist der Transkriptionsfaktor TFEB ein signifikanter Regulator, welcher die Induktion der Autophagie stark hochregulieren kann. Er spielt eine entscheidende Rolle in verschiedenen wichtigen Schritten des autophagischen Signalweges und durch die Regulierung der Expression von TFEB mit der anschließenden Hochregulierung der Autophagie, weisen die Ergebnisse tierexperimenteller Studien auf einen neuen therapeutischen Ansatz hin.

Bei der Progression der schweren Sepsis und der Organdysfunktionen spielt die Gewebhypoxie eine wesentliche Rolle. Zahlreiche Studien belegen, dass die Autophagie als adaptive Stressreaktion durch Hypoxie induziert wird (Bhattacharya und Eissa 2015, Wu et al. 2015). Ein wesentlicher Transkriptionsfaktor, der für die starke Hochregulierung von Autophagie-Genen verantwortlich sein könnte, ist der *hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 alpha). Aktuelle Studien zeigen, dass eine positive Korrelation zwischen den Expressionsniveaus von HIF-1 alpha und LC3-II bei anoxischen Bedingungen besteht (Thongchot et al. 2014). Eine Überexpression von HIF-1 alpha in kortikalen Neuronen löst eine signifikante Veränderung der Autophagie, v. a. der Mitophagie, aus (Gong et al. 2014). Die Inhibierung von HIF-1 alpha führt zu einer deutlich supprimierten Zellproliferation und einer verringerten mitochondrialen Autophagie. Die HIF-1 alpha-induzierte Autophagie geht mit der Inhibierung des mTOR-Signalweges einher (Gong et al. 2014). Belibi et al. demonstrieren ebenfalls, dass der Anstieg von LC3-II und Beclin-1 mit der Überexpression von HIF-1 alpha korreliert (Belibi et al. 2011). Sun et al. zeigen, dass die Hochregulierung von *BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3* (BNIP3), vermittelt durch HIF-1 alpha, die Aktivierung der Autophagie fördert, indem der mTOR-Signalweg inhibiert wird (Sun et al. 2014). Zhao et al. bestätigen dies, indem sie zeigen, dass die Induktion der Autophagie bei hypoxischen Bedingungen durch die Hochregulierung der HIF-1 alpha-abhängigen BNIP3-Expression bedingt ist. Insbesondere zeigt der *knockdown* von HIF-1 alpha eine aufgehobene Hypoxie-induzierte Autophagie (Zhao et al. 2012). Diese Studien bestätigen die beträchtliche

Rolle von HIF-1 alpha in der transkriptionellen Regulation der Autophagie und demonstrieren, dass eine HIF-1 alpha-Aktivierung die Induktion der Autophagie bei Hypoxie stark hochreguliert.

Ein weiterer Mechanismus, der die autophagische Aktivität ebenfalls steigern kann, ist die posttranslationale Proteinmodifikation (PTM). Tierexperimentelle Studien zeigen, dass die autophagische Maschinerie innerhalb von Minuten nach Stress-induktion aktiviert werden kann (Morselli et al. 2010). Dadurch können die Zellen die potentiell zytotoxische Situation schneller bewältigen, bevor wesentliche zelluläre Bestandteile irreversibel geschädigt werden. Diese vorübergehende und rasche Aktivierung innerhalb von Minuten wird durch die PTM vermittelt (Pietrocola et al. 2013) und hat eine zentrale Rolle in der Bestimmung der Struktur, Lokalisation, Aktivität und Funktion von Proteinen der Autophagie. Diese Modifikation beinhalten beispielsweise die Phosphorylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung und Lipidierung von Proteinen (Bononi et al. 2011, Moremen et al. 2012, Finley et al. 2004, Resh 2012).

### **Validierung mittels Western Blot**

Wie einleitend bereits beschrieben, wird für die Ausführung der Autophagie die Funktion von mehreren Signalwegen und Proteinkomplexen benötigt. Zur Validierung der qPCR-Daten wurden auf Proteinebene ausgesuchte Schrittmacherproteine untersucht, die eine aktive Rolle in der Regulation der Autophagie während der Sepsis einnehmen. Beclin-1 ist die primäre Untereinheit des *class III* VPS34-Komplexes und wird aufgrund von verschiedenen intrazellulären oder extrazellulären Signalen, wie z. B. Aminosäure- oder Energiemangel, von der aktivierten ULK1 phosphoryliert. Dadurch findet eine Aktivitätserhöhung des *class III* VPS34-Komplexes statt und die Autophagie wird induziert (Russell et al. 2013). In den *septic non-survivors* war eine Abnahme der relativen Proteinmenge von P-Beclin-1 innerhalb der 24 h zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der *septic survivor*-Gruppe ein Anstieg der relativen Proteinmenge von 6 h zu 24 h mit einer anschließenden signifikanten Verminderung. Diese Daten zeigen auf, dass die autophagische Aktivität in der *septic survivor*-Gruppe zum Zeitpunkt 24 h am stärksten induziert wurde, wohingegen bei den Tieren mit der schlechten Prognose eine stetige Abnahme der Induktion zu erkennen war. Die relativen Proteinmengen von Beclin-1 korrelierten mit diesen

Ergebnissen und demonstrierten in der *septic survivor*-Gruppe eine Abnahme im Zeitraum von 6 h zu 24 h mit einem anschließenden Anstieg zum Zeitpunkt 72 h. Dieselbe Wechselbeziehung war ebenfalls zwischen den relativen Proteinmengen von P-Beclin-1 und Beclin-1 in der *septic non-survivor*-Gruppe zu beobachten (Abschnitt 4.3). Zudem wurde das Protein LC3B-II untersucht, welches als LC3B-I in einer ubiquitinähnlichen Reaktion von dem Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex (E3-Ligase) mit PE konjugiert wird, um LC3B-II zu bilden (Wani et al. 2015). Die relativen Proteinmengen von LC3B-II waren in der *septic non-survivor*-Gruppe über den Zeitraum von 24 h auf dem Niveau der Kontrollgruppe. In der *septic survivor*-Gruppe zeigte sich zum Zeitpunkt 6 h eine signifikante Erhöhung der relativen Proteinmenge von LC3B-II im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt 24 h war eine Reduktion der Proteinmenge zu verzeichnen mit einem anschließenden Anstieg zum Zeitpunkt 72 h. Diese Daten demonstrierten, dass die *septic survivor*-Gruppe eine gesteigerte autophagische Aktivität im Gegensatz zur *septic non-survivor*-Gruppe aufzeigten. Die relativen Proteinmengen von LC3B-II der *septic survivor*-Gruppe korrelierten zudem mit den Ergebnissen der qPCR-Daten und zeigten übereinstimmende Expressionsmuster (Abschnitt 4.3).

### **Wertung der Modelle und der Methodik**

In der vorliegenden Arbeit wurde als Sepsismodell das PCI-Modell gewählt. Dieses Modell simuliert eine polymikrobielle Infektion in der Peritonealhöhle mit anschließender Ausbreitung der Bakterien in die Blutbahn und konsekutiver systemischer Inflammation und Multiorganversagen. Kein Modell der intra-abdominellen Infektion kann den komplexen klinischen Verlauf in seiner Gesamtheit darstellen. Es gibt viele Einflussfaktoren, wie z. B. Umweltfaktoren, genetischer Hintergrund und eventuelle Komorbiditäten, die die Übertragbarkeit von murinen Modellen auf den Menschen erschweren (Fink 2014). Ein weiterer Nachteil von murinen Sepsismodellen ist das Fehlen einer antibiotischen und supportiven Therapie, die die septischen Patienten auf der Intensivstation erhalten. In dieser Arbeit wurde keine antibiotische Therapie angewandt, weil in klinischen Studien und in Tiermodellen gezeigt werden konnte, dass eine klinisch relevante Dosis an bakteriziden Antibiotika nicht nur nephro- und hepatotoxisch wirken, sondern auch eine mitochondriale Dysfunktion und einen



erhöhten oxidativen Stress mit Gewebeschädigung hervorrufen können (Kalghatgi et al. 2013, Singer 2014).

Ein Vorteil des PCI-Modells ist, dass es, durch die Verwendung einer Faecessuspension mit Gram-positiven und Gram-negativen Keimen (Abschnitt 3.2.2.1) eine eminente Nähe zur klinischen Fragestellung der Wirtsreaktion bei polymikrobieller intra-abdomineller Sepsis aufzeigt. Es ist allgemein anerkannt, dass je mehr ein Tiermodell dem menschlichen Krankheitsbild ähnelt, desto zuverlässiger die Exploration der Ergebnisse erlaubt (Tracey und Abraham 1999, Opal 2003). Zudem kann mit diesem Modell ein hoher Standardisierungsgrad und eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden. Dieses resultiert u. a. aus der Tatsache, dass die Aliquots der gepoolten Stuhlprobe über einen längeren Zeitraum bei -80 °C konserviert werden können und dadurch die Verwendung derselben Faecessuspension in einer Vielzahl von Experimenten ermöglicht wird (Acha et al. 2005). Des Weiteren kann die Dosierung der Faecessuspension gewichtsadaptiert durchgeführt werden, wodurch einheitliche Schweregrade der Sepsis erreicht werden und somit Messreihen vergleichbar sind. Diese kontrollierten Bedingungen zur Elimination möglicher Störgrößen sind wesentlich für die experimentelle Arbeit, entsprechen jedoch in anderer Hinsicht nicht der klinischen Realität.

Ein weiterer Vorteil des PCI-Modells ist der minimale chirurgische Eingriff, der im Gegensatz zum CLP-Modell nur aus einer Injektion besteht. Dieser Aspekt hat v. a. in der vorliegenden Arbeit einen hohen Stellenwert, da der Stress eines chirurgischen Eingriffes und die Modell-immanente Ischämie des Coecums die Autophagie induziert und dadurch die Ergebnisse verfälscht. In einer tierexperimentellen Arbeit von Takahashi et al. wird die Autophagie mit dem CLP-Modell anhand von LC3 untersucht. Es zeigt sich ein stetiger Anstieg von LC3-II in der *sham*-Gruppe nach CLP-Induktion mit einem Höhepunkt nach 12 h (Takahashi et al. 2013). Diese Daten demonstrieren den bedeutenden Einfluss des CLP-Modells bezüglich der Autophagie.

Die gewählten Zeitpunkte (6 h, 24 h und 72 h) in dieser Studie basieren auf bereits etablierten Verfahren und vorherigen Untersuchungen (Rudiger et al. 2013). In erster Linie werden diese durch die biologische Relevanz des septischen Geschehens bestimmt. Die ersten 6 h werden als das Stadium der frühen Sepsis bezeichnet, nach 24 h hat sich die Sepsis etabliert und zum Zeitpunkt 72 h ist die Erholungs- und

Regenerationsphase erreicht. Festgelegte Zeitpunkte sind in einer Studie besonders für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wichtig. Zudem ermöglicht der Vergleich zwischen den Zeitpunkten die Beurteilung des Entwicklungsprozesses und den Verlauf der untersuchten Schlüssel-moleküle.

Die klinischen Daten wurden in Kooperation mit Prof. Mervyn Singer (UNIVERSITY COLLEGE HOSPITAL, LONDON) erhoben, um den Krankheitszustand der Tiere der phänotypisch heterogenen Untersuchungsgruppen zu beurteilen. Häufige klinische Anzeichen und Symptome eines septischen Geschehens sind Fieber ( $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), Tachykardie (Herzfrequenz  $\geq 90/\text{min}$ ), Tachypnoe (Frequenz  $\geq 20/\text{min}$ ), Hyperventilation ( $\text{pCO}_2 \leq 4,3\text{ kPa} / \leq 33\text{ mmHg}$ ), arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck  $< 90\text{ mmHg}$ ) und Organfunktionsstörungen (Reinhart und Brunkhorst 2011). Die kardiale Dysfunktion ist eine anerkannte Manifestation während der Sepsis. Echokardiographische Studien legen nahe, dass 40 % bis 50 % der Patienten mit einem septischen Schock eine reduzierte EF haben und somit eine kardiale Dysfunktion entwickeln (Rudiger und Singer 2007). In einer Studie von Parker et al. weisen septische Patienten eine signifikante Reduktion des Schlagvolumens (SV) und der EF im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Parker et al. 1984). In der vorliegenden Arbeit zeigten die kardiovaskulären Daten eine signifikant erhöhte Herzfrequenz (*heart rate*, HR) zum Zeitpunkt 6 h bei den *septic non-survivors* im Vergleich zu den *septic survivors* und der Kontrollgruppe auf (Abschnitt VI.3). Zudem war das SV nach 6 h in der *septic non-survivor*-Gruppe signifikant reduziert und die Temperatur war im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

Des Weiteren kann das septische Geschehen zu einer Hyperventilation als Kompensation der Laktatazidose mit darauffolgender respiratorischer Alkalose führen. In diesem Stadium kommt es zu einer Verminderung des  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes ( $\text{pCO}_2$ ), zu einem Anstieg des arteriellen pH-Wertes und zu einer kompensatorischen Reduktion der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Plasma. Zudem führt die respiratorische Insuffizienz zur Hypoxämie mit einem erniedrigten  $\text{O}_2$ -Partialdruck ( $\text{pO}_2$ ) (Singh et al. 2013, Mortelliti und Manning 2002). Die klinischen Daten dieser Arbeit wiesen zum Zeitpunkt 6 h in der *septic non-survivor*-Gruppe eine erhöhte Atemfrequenz (*respiration rate*, RR), einen reduzierten  $\text{pCO}_2$  und  $\text{pO}_2$ , eine Erniedrigung des pH-Wertes im Blut und eine kompensatorische Reduktion der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Vergleich zu den *septic survivors* auf (Abschnitt VI.3).

Insgesamt belegten der klinische Score und die untersuchten Parameter, dass beide Untersuchungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe über den untersuchten Zeitraum die charakterisierenden Merkmale einer Sepsis aufwiesen. Dieses spiegelte sich auch in den Nierenwerten, der Zytokinantwort und dem Gewicht zum Zeitpunkt 6 h wider, wobei die *septic survivors* und die *septic non-survivors* eine Erhöhung von IL-6, IL-10, Kreatinin, Harnstoff und eine Reduktion des Gewichtes im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen (Abschnitt VI.3). Zusätzlich zeigte die *septic non-survivor*-Gruppe anhand der kardiovaskulären und respiratorischen Daten einen signifikant schlechteren Krankheitszustand als die *septic survivors*.

Zur Genexpressionsanalyse wurde die qPCR als Verfahren eingesetzt, um hypothesengetrieben selektierte mRNAs des autophagischen Prozesses zu untersuchen. Die biologische Relevanz und die Interpretation der Genexpressionsveränderungen ist ein wesentlicher Aspekt, der beachtet werden sollte. In der Literatur wird kein allgemein gültiger Grenzwert beschrieben, von dem eine mRNA-Genexpressionsänderung für die Hepatozyten oder den Organismus als bedeutsam angesehen wird. Einige Autoren listen ihre Ergebnisse ohne jeglichen Bezug zu einem Grenzwert und andere legen diesen mehr oder weniger willkürlich fest. Der allgemein angesehene Grenzwert in der Wissenschaft liegt bei einer zweifachen Genexpressionsveränderung, welches bei  $\log_2$ -transformierten Daten einer Änderung von  $\pm 1$  entspricht. In dieser Arbeit wurde somit ein  $\log_2$ -Grenzwert von  $\pm 1$  als biologisch relevant angenommen. Parallel wurden die Daten mit dem Mann-Whitney-U-Tests analysiert.

Bei der Auswertung des qPCR-Daten ist ebenfalls zu beachten, dass lediglich Modifikationen auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden. Dadurch lässt sich nur bedingt auf die Proteintranslation oder -sekretion, gerade bei einem so fein justierten Prozess wie der Autophagie, schließen. Demzufolge wurden, auf Grundlage der nachgewiesenen Differenzen der mRNA-Genexpressionen zwischen den Untersuchungsgruppen anschließend proteinbiochemische Methoden durchgeführt. In dieser Arbeit wurde der Western Blot als Verfahren genutzt, um Schlüsselproteine des autophagischen Prozesses spezifisch nachzuweisen. Das untersuchte Protein LC3B ist nicht nur ein zuverlässiger Marker für vollständig gereifte Autophagosomen, sondern ist auch an der *phagophore* lokalisiert. Methodisch ist hierbei kritisch anzumerken, dass LC3B-I vermutlich weniger sensitiv für die Detektion von anti-LC3B-Antikörpern ist als LC3B-II. Zudem ist LC3B-I anfälliger gegenüber den Prozessen

des Einfrierens und Auftauens und der Degradierung im SDS-Ladepuffer (Klionsky et al. 2012). Infolgedessen wurde bei den Experimenten darauf geachtet, dass die Proben jeweils nur einmalig erhitzt wurden, keinen wiederholten Einfrier-Auftau Zyklen ausgesetzt waren und unter der Verwendung von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren bearbeitet wurden (Abschnitt 3.2.4.1).

Außerdem ist zu beachten, dass der Western Blot ein gewisses Maß an Stress, z. B. durch den mechanischen Stress der Lyse, der Zentrifuge und der Temperaturbelastung durch die Erhitzung der Proben, ausübt und dadurch die Autophagie induziert werden könnte (King et al. 2011). Dieser Aspekt soll die Methode nicht limitieren, sondern hervorheben, dass keine perfekten Untersuchungen existieren und ein sorgfältiger und präziser Umgang mit den Proben erforderlich ist, um möglichst akkurate und realitätsnahe Ergebnisse zu erhalten.

Da die Autophagie ein hochdynamischer und mehrstufiger Prozess ist, kann sie an verschiedenen Schritten positiv oder negativ beeinflusst werden. Eine Akkumulation von Autophagosomen könnte, z. B. die Induktion der Autophagie, die Reduktion des *turnovers* oder die Unfähigkeit des *turnovers* mit der hohen Anzahl an Autophagosomen mitzuhalten, reflektieren (Chu 2006, Ren und Taegtmeyer 2015). Durch eine ineffiziente Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom oder einer Perturbation des Transportsystems der Zelle (Fass et al. 2006) würde keine Formation des Autolysosoms erfolgen und dadurch eine Akkumulation von Autophagosomen resultieren. Somit kann eine Erhöhung der Anzahl von Autophagosomen nicht den kompletten Umfang des *autophagic flux* darstellen. In weiterführenden Studien zu diesem Thema sollte, um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, der komplette *autophagic flux* untersucht werden, einschließlich der Formation des Autolysosoms und der Degradierung der Makromoleküle und ihrer Freisetzung in das Zytoplasma. Entsprechend müssten autophagische Substrate in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet werden, um nachzuweisen, dass sie das Lysosom oder Endosom erreicht haben und abgebaut wurden. U. a. könnte das Protein p62/SQSTM1 untersucht werden, welches als spezifisches Substrat der autophagischen Maschinerie identifiziert ist und somit durch die Induktion der Autophagie abnimmt (Pankiv et al. 2007, Ichimura et al. 2008). Zudem könnte der *turnover* von autophagischen Kompartimenten mittels

Transmissionselektronenmikroskopie dargestellt und dadurch der *autophagic flux* beurteilt werden (Yla-Anttila et al. 2009).

Insgesamt gesehen ist diese Arbeit als eine Pilotstudie angelegt, die auf einer relativ geringen Anzahl von Versuchstieren basiert und somit ausschließlich der Grundlagenforschung dient. Die statistische Analyse sowie die Interpretation der Ergebnisse sind eingeschränkt. Um einen signifikanten Unterschied in den Expressionsmustern zwischen *septic survivors* und *septic non-survivors* festzustellen, eignete sie sich dennoch. Des Weiteren sind in der *septic non-survivor*-Gruppe nach 72 h alle Tiere verstorben und infolgedessen sind keine Parameter der Autophagie vorhanden. In weiterführenden Studien sollten deshalb eine größere Anzahl an Versuchstieren eingesetzt und mehrere kurze Zeitintervalle integriert werden.

Wie bereits beschrieben, kann eine rasche Induktion mit einer darauffolgenden überschießenden Autophagie zu einer Aktivierung der Apoptose führen. Diese beiden Prozesse interagieren während der Sepsis eng miteinander (Hsieh et al. 2011). Infolgedessen sollten weiterführende Experimente durchgeführt werden, die die Wechselbeziehung zwischen der Apoptose und der Autophagie untersuchen. Das Enzym Caspase 3 ist ein früher Apoptosemarker und fungiert als eines der wichtigsten Caspasen in dem Prozess des programmierten Zelltodes (Elmore 2007) und ist dadurch ein optimaler Parameter, um die Apoptoserate zu beurteilen. Zudem kann die TUNEL-Methode (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling*) angewandt werden, um die Zellkerne der apoptotischen Zellen darzustellen.

Ein Merkmal der zellulären Schädigung während der Sepsis ist eine steigende Apoptoserate, begleitet von einer verringerten Autophagie. Tierstudien demonstrieren eine Abnahme von essentiellen Autophagieproteinen nach Sepsis, wie etwa LC3B-II und Atg5, und suggerieren damit eine Suppression des autophagischen Prozesses (Yen et al. 2013). Carbamazepin ist ein Arzneimittel aus der Klasse der Antikonvulsiva und verstärkt die Autophagie und reduziert in einem Maus-Modell mit einem Alpha-1-Antitrypsin-Mangel den Leberschaden. (Hidvegi et al. 2010). Lin et al. Zeigen in einem murinen CLP-Modell, dass durch die Administration von Carbamazepin der vollständige autophagische Prozess aktiviert und die CLP-Überlebensrate verbessert wird (Lin et al. 2014). In einer weiteren Studie von Puls et al. wird der Einfluss der

Autophagie auf das *Fibrinogen storage disease* (FSD) untersucht. FSD ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit mit Hypofibrinogenämie und einer Akkumulation von Fibrinogenaggregaten im hepatozellulären ER und der Entwicklung einer progressiven Leberfibrose oder -zirrhose. Durch die Stimulation der Autophagie mittels Carbamazepin wird die Toxizität der Proteinaggregate und die Caspaseaktivität herabgesetzt und die Leberfunktion der Patienten normalisiert sich wieder (Puls et al. 2013).

Eine weitere pharmakologische Behandlungsmethode ist Rapamycin, ein Medikament aus der Gruppe der Immunsuppressiva, welches häufig für die Induktion der Autophagie genutzt wird, da es den mTOR-Komplex inhibiert (Takeuchi et al. 2005, Zhang et al. 2015). Yen et al. untersuchten die Hochregulierung der Autophagie in einem Sepsis induzierten *acute lung injury* (ALI) und zeigen, dass durch die Administration von Rapamycin die Suppression der Autophagie während der Sepsis aufgehoben wird. Dieses resultiert in einer Inhibierung der LPS-vermittelten Inflammation, reduziert die Apoptoserate und steigert die 7-Tage-Überlebenswahrscheinlichkeit. Es könnte argumentiert werden, dass die immunsuppressive Wirkung von Rapamycin und nicht die Autophagie die reduzierte Inflammation im Lungengewebe der septischen Mäuse mit Administration von Rapamycin hervorruft. Die IL-6-Werte sind jedoch im Vergleich zur CLP-Kontrollgruppe nicht signifikant reduziert (Yen et al. 2013). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die vorteilhafte Wirkung von Rapamycin nicht ausschließlich von der immunmodulierenden Aktivität, sondern auch von der Eigenschaft der Steigerung der Autophagie abhängig ist. Die Resultate dieser Studien bestätigen, dass Carbamazepin und Rapamycin potentielle Behandlungsstrategien darstellen könnten, um die Autophagie unter pathologischen Stress-Situationen zu steigern. Ein Aspekt für weitere klinische Untersuchungen zu diesen Medikamenten wäre eine retrospektive Studie, anhand derer der Einfluss von Carbamazepin und Rapamycin auf die Überlebensrate von septischen Patienten ermittelt wird. Zudem könnten ebenfalls die klinischen Parameter während des septischen Prozesses evaluiert und die Folgen und Auswirkungen einer stattgehabten Sepsis betrachtet werden.

## Wechselwirkung zwischen Autophagie und den TLR2/MyD88- und JAK/STAT-Signalwegen

Die kardiale Dysfunktion während der Sepsis ist eine anerkannte Manifestation und ein wichtiger prognostischer Faktor (Levy und Deutschman 2004, Vieillard-Baron et al. 2008). In der Publikation von Rudiger et al. wird in einem vergleichbaren Studiendesign untersucht, ob eine verminderte Myokardfunktion in der frühen Phase der Sepsis festgestellt werden kann und ob der Grad der Verminderung das letztendliche *outcome* vorhersagt (Rudiger et al. 2013). In der kardialen Genexpressionsanalyse werden 527 Transkripte identifiziert, die während des septischen Geschehens signifikant reguliert werden. In erster Linie wird die prognostizierte Mortalität mit den inflammatorischen Signalwegen TLR2/MyD88 (*Toll-like receptor 2/myeloid differentiation factor 88*) und JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) assoziiert. Diese Signalwege stehen auch mit der Autophagie im Zusammenhang.

Die Signaltransduktion der TLRs wird zum Teil durch das TLR-Adapterprotein MyD88 vermittelt. MyD88 kann an die *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR)-Domäne binden und dadurch Signalproteine rekrutieren, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- $\kappa$ B und AP-1 (*activator protein 1*), und zur Expression von Genen der Entzündungsreaktion führen (Castoldi et al. 2012). In den Untersuchungen von Delgado et al. wurden Schlüsselmoleküle und Signalwege untersucht, die die Autophagie als Reaktion auf invadierende Pathogene aktiviert. Das Homopolysaccharid Zymosan, welches TLR2 aktiviert, ist ein starker Induktor von LC3. Dadurch wird die autophagische Maschinerie stimuliert und die intrazellulären Pathogene werden eliminiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass u. a. die Aktivierung von TLR2 ein potentieller molekularer Mechanismus für die Induktion der Autophagie, als Stressreaktion auf eindringende Pathogene, ist (Delgado et al. 2008). Des Weiteren zeigen Shi et al. in Makrophagen, dass die Mitglieder der TLR-Familie die Interaktion von MyD88 und Trif (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) mit Beclin-1 verstärken und somit die Bindung zwischen Beclin-1 und Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) reduzieren (Shi und Kehrl 2008). Bcl-2 ist ein Protein, das mit Beclin-1 interagiert und damit die Beclin-1-abhängige Autophagie inhibiert (Pattingre et al. 2005). Diese Ergebnisse demonstrieren einen Zusammenhang zwischen der

TLR-abhängigen Signalvermittlung und dem Signalweg, der zur Autophagie führt. Des Weiteren werden MyD88 und Trif als Aktivatoren der Autophagie identifiziert.

Der JAK/STAT-Signalweg ist einer der wenigen pleiotropen Signalübertragungsmechanismen, der die Informationen von extrazellulären Signalpeptiden zu intrazellulären Promotern von Zielgenen im Zellkern weiterleitet und dadurch zur Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und Homöostase beiträgt (Rawlings et al. 2004). Besonders STAT3 vermittelt die Expression von einer Vielzahl von Genen und nimmt dadurch eine Schlüsselrolle beim Zellwachstum und bei Apoptose ein (Jonchere et al. 2013). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass STAT3 einen Einfluss auf multiple Aspekte der Autophagie hat (Kroemer et al. 2010, Shen et al. 2012, Du Toit 2012). STAT3-Monomere werden im Zytosol phosphoryliert und bilden STAT3-Dimere, die anschließend in den Nukleus eingeschleust werden (Knight et al. 2012). Dort binden sie an spezifische DNA-Regionen und aktivieren oder supprimieren transkriptionell Zielgene, wie z. B. Bcl-2 und HIF-1 alpha, welche die Autophagie entweder stimulieren oder inhibieren (Zhang et al. 2015). Indem STAT3 die Bcl-2-Expression hochreguliert, wird der autophagische Prozess inhibiert (Tai et al. 2013) und durch die dominante negative Inhibierung von STAT3 wird typischerweise die Hochregulierung der Autophagie induziert (You et al. 2015). Zudem aktiviert und stabilisiert STAT3 HIF-1 alpha transkriptionell während Hypoxie und induziert dadurch die autophagische Maschinerie (Jung et al. 2008).

In der Publikation von Rudiger et al. wird eine frühe Hochregulation von den TLR2/MyD88- und JAK/STAT- abhängigen Signaltransduktionswegen mit einem Anstieg von STAT3 im Nukleus nachgewiesen. Daraus kann hergeleitet werden, dass durch die Hochregulation von TLR2/MyD88 die Autophagie aktiviert und durch die Erhöhung von JAK/STAT der autophagische Prozess eher negativ beeinflusst wird. Da diese Signalwege jedoch eine komplexe Wechselbeziehung mit dem autophagischen Prozess darstellen, kann die Autophagie als kardiale adaptive Stressreaktion und als prognostischer Faktor der Mortalität während des septischen Geschehens nur gedeutet werden.



## 6 Schlussfolgerung

Bis heute existieren keine erfolgreichen kausativen Strategien für die Behandlung der Sepsis. Es zeigte sich in jahrelanger Forschung auf diesem Gebiet, dass verschiedenste und äußerst erfolgreiche Therapieansätze in septischen Tiermodellen nicht in das klinische Umfeld übertragen werden konnten. Eine wesentliche Ursache dafür ist möglicherweise die ineffiziente Charakterisierung des Ausmaßes der Wirtsreaktion der Studienpatienten. Eine Population weist eine unterschiedliche Dynamik und Kinetik der Wirtsreaktionen als Antwort auf den septischen Insult auf und sollte daher als heterogen betrachtet werden. Zudem ist die frühe Detektion der Sepsis immer noch ein bedeutendes Problem und verzögert dadurch die Diagnose und die bedarfsgerechte und gezielte therapeutische Intervention. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere nach einem etablierten Verfahren zu einem frühen Zeitpunkt der septischen Erkrankung mittels der EF nach prognostiziertem Überleben stratifiziert. Dementsprechend wurden die Individuen nach dem Ausmaß ihrer Wirtsreaktion gegenüber der Sepsis klassifiziert und in Phänotypen unterteilt. Da die Autophagie bereits nach 6 h einen signifikanten Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen aufwies, könnte sie einen neuen Ansatz der personalisierten Medizin darstellen, um Patienten frühzeitig anhand des Ausmaßes der Wirtsreaktion einzuteilen, das *outcome* zu bestimmen und eine gezielte und frühzeitige Therapie beginnen zu können.

In dieser Arbeit wurde als Sepsismodell das PCI-Modell gewählt, welches dem klinischen Befund einer polymikrobiellen Sepsis sehr nahe kommt. Der Aspekt des minimal chirurgischen Eingriffes, spielt bei der Beurteilung der Autophagie eine entscheidende Rolle, da der Stress einer Operation und die dazugehörige Ischämie, wie im CLP-Modell, die Autophagie induziert und dadurch die Ergebnisse verfälschen kann. Zur Bestätigung oder Wiederlegung der Hypothesen, wurden die Transkripte und Proteinmodifikationen von entscheidenden Schrittmachermolekülen des autophagischen Prozesses auf verschiedenen Ebenen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die hypothetisierten differenziellen Expressionsmuster zwischen den Untersuchungsgruppen bestehen.

Die Auswertung der gewonnenen Daten machte ebenfalls deutlich, dass die *septic non-survivors* im Vergleich zu den *septic survivors* bereits nach 6 h überwiegend ein zweifach gesteigertes Expressionsniveau der Schrittmachermoleküle aufwiesen. Diese übermäßige Aktivierung der Autophagie kann zu einer unspezifischen Eliminierung von zytoplasmatischen Komponenten und somit zum programmierten Zelltod führen. Der Zusammenhang zwischen der Autophagie und der Apoptose wird jedoch heutzutage immer noch kontrovers diskutiert.

Auf der einen Seite reflektiert die rasche Induktion der Autophagie die adaptive Stressreaktion der Zellen gegenüber Stress. Durch die Eliminierung von fehlgefalteten Proteinen, subzellulären Organellen und intrazellulären Bakterien mittels der autophagischen Maschinerie kann der Schwellenwert des programmierten Zelltodes gesteigert und somit die Apoptoserate reduziert werden. Demzufolge nimmt die Autophagie eine protektive Rolle in der septischen Leber ein. Demgegenüber ist die Wechselbeziehung zwischen der Autophagie und der Apoptose komplex, da sie durch gemeinsame Faktoren reguliert werden und sich dadurch gegenseitig beeinflussen können. Wenn die Intensität oder die Dauer des Stresses den Schwellenwert der Zelle überschreitet, ist die Autophagie als adaptive Stressreaktion erschöpft und die Apoptose wird eingeleitet. Das Zusammenwirken dieser beiden Prozesse ist noch nicht vollständig erforscht und könnte in der Zukunft neue therapeutische Ansätze für die Detektion und Behandlung von septischen Patienten darstellen.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wäre als nächster Schritt die Betrachtung des vollständigen *autophagic flux* einschließlich der Formation des Autolysosoms vorzunehmen. Der komplexe Zusammenhang zwischen der Apoptose und der Autophagie in der septischen Leber wäre weiter zu untersuchen und darüber hinaus wäre eine retrospektive Studie aufschlussreich, welche die Überlebensrate von septischen Patienten beurteilt, die Autophagie-induzierende Pharmaka, wie z. B. Carbamazepin und Rapamycin, während ihres Krankheitsverlaufes erhalten haben.

## V Literatur- und Quellenverzeichnis

- Acha SJ, Kuhn I, Mbazima G, Colque-Navarro P, Mollby R. 2005. Changes of viability and composition of the Escherichia coli flora in faecal samples during long time storage. *J Microbiol Methods*, 63 (3):229-238.
- Angus DC, van der Poll T. 2013. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369 (9):840-851.
- Bauer M, Huse K, Settmacher U, Claus RA. 2008. The heme oxygenase-carbon monoxide system: regulation and role in stress response and organ failure. *Intensive Care Med*, 34 (4):640-648.
- Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW. 2009. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BIOspektrum*:1-4.
- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. 2010. Network organization of the human autophagy system. *Nature*, 466 (7302):68-76.
- Belibi F, Zafar I, Ravichandran K, Segvic AB, Jani A, Ljubanovic DG, Edelstein CL. 2011. Hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and autophagy in polycystic kidney disease (PKD). *Am J Physiol Renal Physiol*, 300 (5):F1235-1243.
- Bernal W, Wendon J. 2013. Acute liver failure. *N Engl J Med*, 369 (26):2525-2534.
- Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. 2010. Acute liver failure. *Lancet*, 376 (9736):190-201.
- Bhattacharya A, Eissa NT. 2015. Autophagy as a Stress Response Pathway in the Immune System. *Int Rev Immunol*, 34 (5):382-402.
- Bockmeyer CL, Claus RA, Budde U, Kentouche K, Schneppenheim R, Losche W, Reinhart K, Brunkhorst FM. 2008. Inflammation-associated ADAMTS13 deficiency promotes formation of ultra-large von Willebrand factor. *Haematologica*, 93 (1):137-140.
- Bolder U, Ton-Nu HT, Schteingart CD, Frick E, Hofmann AF. 1997. Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion. *Gastroenterology*, 112 (1):214-225.

- Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, Giorgi C, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Pinton P. 2011. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res*, 2011:329098.
- Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M. 2004. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286 (3):R491-497.
- Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, Group ES. 2004. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med*, 30 (4):580-588.
- Brunkhorst FM. 2015. Sepsis fordert viel mehr Todesopfer als gedacht. Bundesministerium für Bildung und Forschung, <http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/774.php>.
- Carchman EH, Rao J, Loughran PA, Rosengart MR, Zuckerbraun BS. 2011. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice. *Hepatology*, 53 (6):2053-2062.
- Carlsson SR, Simonsen A. 2015. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J Cell Sci*, 128 (2):193-205.
- Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi EJ, Correa-Silva R, Elias RM, Salvador F, Moraes-Vieira PM, Cenedeze MA, Reis MA, Hiyane MI, Pacheco-Silva A, Goncalves GM, Saraiva Camara NO. 2012. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PLoS One*, 7 (5):e37584.
- Cerra FB. 1985. The systemic septic response: multiple systems organ failure. *Crit Care Clin*, 1 (3):591-607.
- Chand N, Sanyal AJ. 2007. Sepsis-induced cholestasis. *Hepatology*, 45 (1):230-241.
- Chen D, Fan W, Lu Y, Ding X, Chen S, Zhong Q. 2012. A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate. *Mol Cell*, 45 (5):629-641.

- Chien WS, Chen YH, Chiang PC, Hsiao HW, Chuang SM, Lue SI, Hsu C. 2011. Suppression of autophagy in rat liver at late stage of polymicrobial sepsis. *Shock*, 35 (5):506-511.
- Christaki E, Giamarellos-Bourboulis EJ. 2014. The beginning of personalized medicine in sepsis: small steps to a bright future. *Clin Genet*, 86 (1):56-61.
- Chu CT. 2006. Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (5):423-432.
- Chuang LY, Cheng YH, Yang CH. 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett*, 35 (10):1541-1549.
- Claus RA, Bockmeyer CL, Budde U, Kentouche K, Sossdorf M, Hilberg T, Schneppenheim R, Reinhart K, Bauer M, Brunkhorst FM, Losche W. 2009. Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb Haemost*, 101 (2):239-247.
- Codogno P, Meijer AJ. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2:1509-1518.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 (6917):885-891.
- de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ. 2010. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun*, 2 (5):422-430.
- Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J, Bjorklund A. 2013. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (19):E1817-1826.
- Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. 2008. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J*, 27 (7):1110-1121.
- Deng Q, Wang Z, Wang L, Zhang L, Xiang X, Wang Z, Chong T. 2013. Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*, 43 (12):1261-1268.

- Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. 2001. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):S42-47.
- Dinarello CA. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118 (2):503-508.
- Du Toit A. 2012. Autophagy: STAT3 maintains order. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (12):754.
- Dundar HZ, Yilmazlar T. 2015. Management of hepatorenal syndrome. *World J Nephrol*, 4 (2):277-286.
- Ehrentraut SF, Dorr A, Ehrentraut H, Lohner R, Lee SH, Hoefft A, Baumgarten G, Knuefermann P, Boehm O, Meyer R. 2012. Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors. *PLoS One*, 7 (9):e44531.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35 (4):495-516.
- Engel C, Brunkhorst FM, Löffler M, Reinhart K. 2007. Diagnose und Epidemiologie der Sepsis. *Ärzteblatt Thüringen*, (7):414-417.
- Fahy BG, Sheehy AM, Coursin DB. 2009. Glucose control in the intensive care unit. *Crit Care Med*, 37 (5):1769-1776.
- Fan W, Nassiri A, Zhong Q. 2011. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (19):7769-7774.
- Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. 2006. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem*, 281 (47):36303-36316.
- Ferlito M, Wang Q, Fulton WB, Colombani PM, Marchionni L, Fox-Talbot K, Paolocci N, Steenbergen C. 2014. Hydrogen sulfide [corrected] increases survival during sepsis: protective effect of CHOP inhibition. *J Immunol*, 192 (4):1806-1814.

- Ferraro E, Cecconi F. 2007. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 462 (2):210-219.
- Fink MP. 2014. Animal models of sepsis. *Virulence*, 5 (1):143-153.
- Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A. 2004. Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell*, 116 (2 Suppl):S29-32, 22 p following S32.
- Furuta N, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Amano A. 2010. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol Biol Cell*, 21 (6):1001-1010.
- Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. 2012. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (12):780-788.
- Ganley IG. 2013. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem*, 55:65-78.
- Ganley IG, Wong PM, Gammoh N, Jiang X. 2011. Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. *Mol Cell*, 42 (6):731-743.
- Glanemann M, Schirmeier A, Lippert S, Langrehr JM, Neuhaus P, Nussler AK. 2005. Cobalt-protoporphyrin induced heme oxygenase overexpression and its impact on liver regeneration. *Transplant Proc*, 37 (7):3223-3225.
- Gong G, Hu L, Liu Y, Bai S, Dai X, Yin L, Sun Y, Wang X, Hou L. 2014. Upregulation of HIF-1alpha protein induces mitochondrial autophagy in primary cortical cell cultures through the inhibition of the mTOR pathway. *Int J Mol Med*, 34 (4):1133-1140.
- Gonnert FA, Recknagel P, Hilger I, Claus RA, Bauer M, Kortgen A. 2013. Hepatic excretory function in sepsis: implications from biophotonic analysis of transcellular xenobiotic transport in a rodent model. *Crit Care*, 17 (2):R67.

- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Grassi G, Di Caprio G, Santangelo L, Fimia GM, Cozzolino AM, Komatsu M, Ippolito G, Tripodi M, Alonzi T. 2015. Autophagy regulates hepatocyte identity and epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions promoting Snail degradation. *Cell Death Dis*, 6:e1880.
- Greenbaum L, Katcoff DJ, Dou H, Gozlan Y, Malik Z. 2003. A porphobilinogen deaminase (PBGD) Ran-binding protein interaction is implicated in nuclear trafficking of PBGD in differentiating glioma cells. *Oncogene*, 22 (34):5221-5228.
- Gukovskaya AS, Gukovsky I. 2012. Autophagy and pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (9):G993-G1003.
- Gump JM, Thorburn A. 2011. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol*, 21 (7):387-392.
- Guo C, Liu S, Wang J, Sun MZ, Greenaway FT. 2013. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta*, 417:39-44.
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J. 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141 (4):656-667.
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495 (7441):389-393.
- He C, Klionsky DJ. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43:67-93.
- He C, Baba M, Cao Y, Klionsky DJ. 2008. Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol Biol Cell*, 19 (12):5506-5516.



- Hetz C, Chevet E, Harding HP. 2013. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 12 (9):703-719.
- Hidvegi T, Ewing M, Hale P, Dippold C, Beckett C, Kemp C, Maurice N, Mukherjee A, Goldbach C, Watkins S, Michalopoulos G, Perlmutter DH. 2010. An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science*, 329 (5988):229-232.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 6 (11):813-822.
- Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. 2005. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol*, 174 (8):5110-5118.
- Hsieh CH, Pai PY, Hsueh HW, Yuan SS, Hsieh YC. 2011. Complete induction of autophagy is essential for cardioprotection in sepsis. *Ann Surg*, 253 (6):1190-1200.
- Hsieh YC, Athar M, Chaudry IH. 2009. When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis. *Trends Mol Med*, 15 (3):129-138.
- Hyttinen JM, Niittykoski M, Salminen A, Kaarniranta K. 2013. Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochim Biophys Acta*, 1833 (3):503-510.
- Ichimura Y, Komatsu M. 2010. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol*, 32 (4):431-436.
- Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M. 2008. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem*, 283 (33):22847-22857.

- Itoh T, Kanno E, Uemura T, Waguri S, Fukuda M. 2011. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J Cell Biol*, 192 (5):839-853.
- Itoh T, Fujita N, Kanno E, Yamamoto A, Yoshimori T, Fukuda M. 2008. Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19 (7):2916-2925.
- Jacinto E. 2008. What controls TOR? *IUBMB Life*, 60 (8):483-496.
- Jahn R, Scheller RH. 2006. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (9):631-643.
- Janz DR, Bastarache JA, Sills G, Wickersham N, May AK, Bernard GR, Ware LB. 2013. Association between haptoglobin, hemopexin and mortality in adults with sepsis. *Crit Care*, 17 (6):R272.
- Jonchere B, Belanger A, Guette C, Barre B, Coqueret O. 2013. STAT3 as a new autophagy regulator. *JAKSTAT*, 2 (3):e24353.
- Jung CH, Seo M, Otto NM, Kim DH. 2011. ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy*, 7 (10):1212-1221.
- Jung JE, Kim HS, Lee CS, Shin YJ, Kim YN, Kang GH, Kim TY, Juhn YS, Kim SJ, Park JW, Ye SK, Chung MH. 2008. STAT3 inhibits the degradation of HIF-1alpha by pVHL-mediated ubiquitination. *Exp Mol Med*, 40 (5):479-485.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19 (21):5720-5728.
- Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S, Molina A, Shirihai OS, Collins JJ. 2013. Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells. *Sci Transl Med*, 5 (192):192ra185.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 18 (4):571-580.

- Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. 2015. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*, 372 (17):1629-1638.
- Kaushik S, Cuervo AM. 2012. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*, 22 (8):407-417.
- Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y. 2008. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19 (5):2039-2050.
- Kempe DS, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, Muresanu J, Friedrich B, Dreischer P, Wolz C, Schumacher U, Peschel A, Gotz F, Doring G, Wieder T, Gulbins E, Lang F. 2007. Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med (Berl)*, 85 (3):273-281.
- Kim YM, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park JM, Bae SS, Kim DH. 2015. mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol Cell*, 57 (2):207-218.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T. 2007. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, 3 (5):452-460.
- King JS, Veltman DM, Insall RH. 2011. The induction of autophagy by mechanical stress. *Autophagy*, 7 (12):1490-1499.
- Klionsky DJ. 2012. Look people, "Atg" is an abbreviation for "autophagy-related." That's it. *Autophagy*, 8 (9):1281-1282.
- Klionsky DJ. 2013. Why just eat in, when you can also eat out? *Autophagy*, 9 (2):119.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, ..., Zuckerbraun B. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 8 (4):445-544.
- Knight RA, Scarabelli TM, Stephanou A. 2012. STAT transcription in the ischemic heart. *JAKSTAT*, 1 (2):111-117.

- Knodler LA, Celli J. 2011. Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cell Microbiol*, 13 (9):1319-1327.
- Kobayashi T, Sato Y, Yamamoto S, Takeishi T, Hirano K, Watanabe T, Takano K, Naito M, Hatakeyama K. 2005. Augmentation of heme oxygenase-1 expression in the graft immediately after implantation in adult living-donor liver transplantation. *Transplantation*, 79 (8):977-980.
- Kortgen A, Recknagel P, Bauer M. 2010. How to assess liver function? *Curr Opin Crit Care*, 16 (2):136-141.
- Kortgen A, Paxian M, Werth M, Recknagel P, Rauchfuss F, Lupp A, Krenn CG, Muller D, Claus RA, Reinhart K, Settmacher U, Bauer M. 2009. Prospective assessment of hepatic function and mechanisms of dysfunction in the critically ill. *Shock*, 32 (4):358-365.
- Kraft C, Peter M, Hofmann K. 2010. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol*, 12 (9):836-841.
- Kroemer G, Marino G, Levine B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40 (2):280-293.
- Kubulus D, Roesken F, Amon M, Rucker M, Bauer M, Bauer I, Menger MD. 2004. Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287 (5):H2332-2340.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, Mizushima N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432 (7020):1032-1036.
- Landry DW, Oliver JA. 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*, 345 (8):588-595.
- Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drenou B. 2002. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*, 18 (6):487-494.

- Lee JH, Kim K, Jo YH, Kim MA, Rim KP, Kang KW, Rhee JE, Lee MJ, Lee HS, Kwon WY, Suh GJ. 2013. Therapeutic hypothermia attenuates liver injury in polymicrobial sepsis model of rats via Akt survival pathway. *J Surg Res*, 181 (1):114-120.
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. 1995. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol*, 146 (5):1220-1234.
- Levine B, Klionsky DJ. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6 (4):463-477.
- Levy RJ, Deutschman CS. 2004. Evaluating myocardial depression in sepsis. *Shock*, 22 (1):1-10.
- Li WW, Li J, Bao JK. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 69 (7):1125-1136.
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU. 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol*, 8 (7):688-699.
- Lin CW, Lo S, Perng DS, Wu DB, Lee PH, Chang YF, Kuo PL, Yu ML, Yuan SS, Hsieh YC. 2014. Complete activation of autophagic process attenuates liver injury and improves survival in septic mice. *Shock*, 41 (3):241-249.
- Lin S, Huang Z, Wang M, Weng Z, Zeng D, Zhang Y, Zhu Y, Jiang J. 2015. Interleukin-6 as an early diagnostic marker for bacterial sepsis in patients with liver cirrhosis. *J Crit Care*, 30 (4):732-738.
- Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. 1997. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol*, 136 (1):61-70.
- Liu H, Lo CR, Czaja MJ. 2002. NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology*, 35 (4):772-778.

- Liu X, Ren H, Peng D. 2014. Sepsis biomarkers: an omics perspective. *Front Med*, 8 (1):58-67.
- Luo S, Rubinsztein DC. 2010. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ*, 17 (2):268-277.
- Ma T, Han L, Gao Y, Li L, Shang X, Hu W, Xue C. 2008. The endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signal pathway is involved in sepsis-induced abnormal lymphocyte apoptosis. *Eur Surg Res*, 41 (2):219-225.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (9):741-752.
- Mannack LV, Lane JD. 2015. The autophagosome: current understanding of formation and maturation. *Dove Medical Press Limited*, 5:39-58.
- Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. 1995. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med*, 23 (10):1638-1652.
- McKnight NC, Zhenyu Y. 2013. Beclin 1, an Essential Component and Master Regulator of PI3K-III in Health and Disease. *Curr Pathobiol Rep*, 1 (4):231-238.
- Merle U, Sieg O, Stremmel W, Encke J, Eisenbach C. 2009. Sensitivity and specificity of plasma disappearance rate of indocyanine green as a prognostic indicator in acute liver failure. *BMC Gastroenterol*, 9:91.
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. 2012. The intriguing life of autophagosomes. *Int J Mol Sci*, 13 (3):3618-3635.
- Mizushima N, Komatsu M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147 (4):728-741.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27:107-132.

- Mofarrahi M, Sigala I, Guo Y, Godin R, Davis EC, Petrof B, Sandri M, Burelle Y, Hussain SN. 2012. Autophagy and skeletal muscles in sepsis. *PLoS One*, 7 (10):e47265.
- Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F. 2009. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 84 (3):431-448.
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (7):448-462.
- Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, Palikaras K, Criollo A, Galluzzi L, Malik SA, Vitale I, Michaud M, Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. 2010. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis*, 1:e10.
- Mortelliti MP, Manning HL. 2002. Acute respiratory distress syndrome. *Am Fam Physician*, 65 (9):1823-1830.
- Muller WA. 2013. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*, 50 (1):7-22.
- Nair U, Klionsky DJ. 2011. Autophagosome biogenesis requires SNAREs. *Autophagy*, 7 (12):1570-1572.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM. 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*, 12 (3):222-230.
- Nishimura T, Kaizuka T, Cadwell K, Sahani MH, Saitoh T, Akira S, Virgin HW, Mizushima N. 2013. FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Rep*, 14 (3):284-291.
- Nixon RA. 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 19 (8):983-997.
- Noda NN, Inagaki F. 2015. Mechanisms of Autophagy. *Annu Rev Biophys*, 44:101-122.

- Oellerich M, Burdelski M, Lautz HU, Rodeck B, Dewel J, Schulz M, Schmidt FW, Brodehl J, Pichlmayr R. 1991. Assessment of pretransplant prognosis in patients with cirrhosis. *Transplantation*, 51 (4):801-806.
- Opal SM. 2003. Clinical trial design and outcomes in patients with severe sepsis. *Shock*, 20 (4):295-302.
- Oude Elferink RP, Jansen PL. 1994. The role of the canalicular multispecific organic anion transporter in the disposal of endo- and xenobiotics. *Pharmacol Ther*, 64 (1):77-97.
- Pae HO, Chung HT. 2009. Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. *Immune Netw*, 9 (1):12-19.
- Pagliarini V, Wirawan E, Romagnoli A, Ciccocanti F, Lisi G, Lippens S, Cecconi F, Fimia GM, Vandenabeele P, Corazzari M, Piacentini M. 2012. Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response. *Cell Death Differ*, 19 (9):1495-1504.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282 (33):24131-24145.
- Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, Damske BA, Parrillo JE. 1984. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*, 100 (4):483-490.
- Pastore N, Ballabio A, Brunetti-Pierri N. 2013a. Autophagy master regulator TFEB induces clearance of toxic SERPINA1/alpha-1-antitrypsin polymers. *Autophagy*, 9 (7):1094-1096.
- Pastore N, Blomenkamp K, Annunziata F, Piccolo P, Mithbaokar P, Maria Sepe R, Vetrini F, Palmer D, Ng P, Polishchuk E, Iacobacci S, Polishchuk R, Teckman J, Ballabio A, Brunetti-Pierri N. 2013b. Gene transfer of master autophagy regulator TFEB results in clearance of toxic protein and correction of hepatic disease in alpha-1-anti-trypsin deficiency. *EMBO Mol Med*, 5 (3):397-412.



- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122 (6):927-939.
- Peres Bota D, Melot C, Lopes Ferreira F, Nguyen Ba V, Vincent JL. 2002. The Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) versus the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score in outcome prediction. *Intensive Care Med*, 28 (11):1619-1624.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, Kroemer G. 2013. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol*, 23 (5):310-322.
- Pluquet O, Pourtier A, Abbadie C. 2015. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*, 308 (6):C415-425.
- Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbe S, Clague MJ, Tooze SA. 2010. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, 6 (4):506-522.
- Puissant A, Fenouille N, Auberger P. 2012. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res*, 2 (4):397-413.
- Puls F, Goldschmidt I, Bantel H, Agne C, Brocker V, Dammrich M, Lehmann U, Berrang J, Pfister ED, Kreipe HH, Baumann U. 2013. Autophagy-enhancing drug carbamazepine diminishes hepatocellular death in fibrinogen storage disease. *J Hepatol*, 59 (3):626-630.
- Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. 2014. ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes: additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 10 (1):182-184.

- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90 (4):1383-1435.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, 117 (Pt 8):1281-1283.
- Reinhart K, Brunkhorst FM. 2011. Prevention, Diagnosis, Therapy and Follow-up Care of Sepsis. Georg Thieme Verlag KG.
- Remick DG. 2007. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*, 170 (5):1435-1444.
- Ren J, Taegtmeier H. 2015. Too much or not enough of a good thing--The Janus faces of autophagy in cardiac fuel and protein homeostasis. *J Mol Cell Cardiol*, 84:223-226.
- Resh MD. 2012. Targeting protein lipidation in disease. *Trends Mol Med*, 18 (4):206-214.
- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*, 9 (5):517-524.
- RocheDiagnostics. 2012. Quantifizierungsstrategien mit dem LightCycler 480 PCR-Analysesystem.
- Ron D, Walter P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (7):519-529.
- Rubinstein AD, Kimchi A. 2012. Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci*, 125 (Pt 22):5259-5268.
- Rudiger A, Singer M. 2007. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*, 35 (6):1599-1608.

- Rudiger A, Dyson A, Felsmann K, Carre JE, Taylor V, Hughes S, Clatworthy I, Protti A, Pellerin D, Lemm J, Claus RA, Bauer M, Singer M. 2013. Early functional and transcriptomic changes in the myocardium predict outcome in a long-term rat model of sepsis. *Clin Sci (Lond)*, 124 (6):391-401.
- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 15 (7):741-750.
- Ryter SW, Choi AM. 2015. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res*.
- Sakka SG. 2007. Assessing liver function. *Curr Opin Crit Care*, 13 (2):207-214.
- Sakka SG, Reinhart K, Meier-Hellmann A. 2002. Prognostic value of the indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients. *Chest*, 122 (5):1715-1720.
- Sano R, Reed JC. 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833 (12):3460-3470.
- Schuster HP, Müller-Werdan U. 2005. Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. Springer:4.
- Schwabe RF, Uchinami H, Qian T, Bennett BL, Lemasters JJ, Brenner DA. 2004. Differential requirement for c-Jun NH2-terminal kinase in TNF $\alpha$ - and Fas-mediated apoptosis in hepatocytes. *FASEB J*, 18 (6):720-722.
- Scott RC, Juhasz G, Neufeld TP. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol*, 17 (1):1-11.
- Sculley DG, Dawson PA, Emmerson BT, Gordon RB. 1992. A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency. *Hum Genet*, 90 (3):195-207.
- Senft D, Ronai ZA. 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*, 40 (3):141-148.

- Settembre C, Ballabio A. 2011. TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy*, 7 (11):1379-1381.
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A. 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*, 332 (6036):1429-1433.
- Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H, Souquere S, Marino G, Lachkar S, Senovilla L, Galluzzi L, Kepp O, Pierron G, Maiuri MC, Hikita H, Kroemer R, Kroemer G. 2012. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. *Mol Cell*, 48 (5):667-680.
- Shi CS, Kehrl JH. 2008. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem*, 283 (48):33175-33182.
- Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. 2011. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol*, 12 (7):226.
- Singer M. 2014. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*, 5 (1):66-72.
- Singh V, Khatana S, Gupta P. 2013. Blood gas analysis for bedside diagnosis. *Natl J Maxillofac Surg*, 4 (2):136-141.
- Slama M, Susic D, Varagic J, Ahn J, Frohlich ED. 2003. Echocardiographic measurement of cardiac output in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284 (2):H691-697.
- Slobodkin MR, Elazar Z. 2013. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem*, 55:51-64.
- Spampanato C, Feeney E, Li L, Cardone M, Lim JA, Annunziata F, Zare H, Polishchuk R, Puertollano R, Parenti G, Ballabio A, Raben N. 2013. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol Med*, 5 (5):691-706.

- Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. 2011. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol*, 6:19-48.
- Sun L, Li T, Wei Q, Zhang Y, Jia X, Wan Z, Han L. 2014. Upregulation of BNIP3 mediated by ERK/HIF-1 $\alpha$  pathway induces autophagy and contributes to anoikis resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Future Oncol*, 10 (8):1387-1398.
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y. 2007. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*, 12 (2):209-218.
- Szabo G, Romics L, Jr., Frenzl G. 2002. Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Clin Liver Dis*, 6 (4):1045-1066, x.
- Tai WT, Shiau CW, Chen HL, Liu CY, Lin CS, Cheng AL, Chen PJ, Chen KF. 2013. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis*, 4:e485.
- Takabatake Y, Kimura T, Takahashi A, Isaka Y. 2014. Autophagy and the kidney: health and disease. *Nephrol Dial Transplant*, 29 (9):1639-1647.
- Takagi H, Matsui Y, Sadoshima J. 2007. The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart. *Antioxid Redox Signal*, 9 (9):1373-1381.
- Takahashi T, Shimizu H, Morimatsu H, Inoue K, Akagi R, Morita K, Sassa S. 2007. Heme oxygenase-1: a fundamental guardian against oxidative tissue injuries in acute inflammation. *Mini Rev Med Chem*, 7 (7):745-753.
- Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhisa T, Oda S, Hatano M. 2013. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care*, 17 (4):R160.
- Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, Kanzawa T, Aoki H, Mills GB, Kondo S. 2005. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res*, 65 (8):3336-3346.

- Tamion F, Richard V, Renet S, Thuillez C. 2007. Intestinal preconditioning prevents inflammatory response by modulating heme oxygenase-1 expression in endotoxic shock model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293 (6):G1308-1314.
- Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. 2004. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med*, 32 (7):1460-1469.
- Tang Z, Ni L, Javidiparsijani S, Hu F, Gatto LA, Cooney R, Wang G. 2013. Enhanced liver autophagic activity improves survival of septic mice lacking surfactant proteins A and D. *Tohoku J Exp Med*, 231 (2):127-138.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (12):2503-2518.
- Thongchot S, Yongvanit P, Loilome W, Seubwai W, Phunicom K, Tassaneeyakul W, Pairojkul C, Promkotra W, Techasen A, Namwat N. 2014. High expression of HIF-1 $\alpha$ , BNIP3 and PI3KC3: hypoxia-induced autophagy predicts cholangiocarcinoma survival and metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (14):5873-5878.
- Tooze SA. 2013. Current views on the source of the autophagosome membrane. *Essays Biochem*, 55:29-38.
- Toris GT, Bikis CN, Tsourouflis GS, Theocharis SE. 2011. Hepatic encephalopathy: an updated approach from pathogenesis to treatment. *Med Sci Monit*, 17 (2):RA53-63.
- Tracey KJ, Abraham E. 1999. From mouse to man: or what have we learned about cytokine-based anti-inflammatory therapies? *Shock*, 11 (3):224-225.
- Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. 2011. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal*, 23 (2):317-323.
- Uchida K, Unuma K, Funakoshi T, Aki T, Uemura K. 2014. Activation of Master Autophagy Regulator TFEB During Systemic LPS Administration in the Cornea. *J Toxicol Pathol*, 27 (2):153-158.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7):RESEARCH0034.
- Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, Belliard G, Page B, Jardin F. 2008. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Crit Care Med*, 36 (6):1701-1706.
- Walczak M, Martens S. 2013. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy*, 9 (3):424-425.
- Wang K, Damjanov I, Wan YJ. 2010a. The protective role of pregnane X receptor in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury. *Lab Invest*, 90 (2):257-265.
- Wang Y, Singh R, Xiang Y, Czaja MJ. 2010b. Macroautophagy and chaperone-mediated autophagy are required for hepatocyte resistance to oxidant stress. *Hepatology*, 52 (1):266-277.
- Wani WY, Boyer-Guittaut M, Dodson M, Chatham J, Darley-Usmar V, Zhang J. 2015. Regulation of autophagy by protein post-translational modification. *Lab Invest*, 95 (1):14-25.
- Watanabe E, Muenzer JT, Hawkins WG, Davis CG, Dixon DJ, McDunn JE, Brackett DJ, Lerner MR, Swanson PE, Hotchkiss RS. 2009. Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: a clinical and laboratory-based study. *Lab Invest*, 89 (5):549-561.
- Weber M, Lambeck S, Ding N, Henken S, Kohl M, Deigner HP, Enot DP, Igwe EI, Frappart L, Kiehntopf M, Claus RA, Kamradt T, Weih D, Vodovotz Y, Briles DE, Ogunniyi AD, Paton JC, Maus UA, Bauer M. 2012. Hepatic induction of cholesterol biosynthesis reflects a remote adaptive response to pneumococcal pneumonia. *FASEB J*, 26 (6):2424-2436.
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*, 29 (11):1792-1802.

- Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. 2005. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol*, 78 (2):325-337.
- Wiesel P, Patel AP, DiFonzo N, Marria PB, Sim CU, Pellacani A, Maemura K, LeBlanc BW, Marino K, Doerschuk CM, Yet SF, Lee ME, Perrella MA. 2000. Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation*, 102 (24):3015-3022.
- Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De Rycke R, Verspurten J, Declercq W, Agostinis P, Vanden Berghe T, Lippens S, Vandenabeele P. 2010. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis*, 1:e18.
- Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. 2013. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*, 9 (2):124-137.
- Wu J, Lei Z, Yu J. 2015. Hypoxia induces autophagy in human vascular endothelial cells in a hypoxia-inducible factor 1 dependent manner. *Mol Med Rep*, 11 (4):2677-2682.
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19 (8):3290-3298.
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. 2011. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*, 10 (9):1533-1541.
- Yen YT, Yang HR, Lo HC, Hsieh YC, Tsai SC, Hong CW, Hsieh CH. 2013. Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis-induced acute lung injury. *Surgery*, 153 (5):689-698.
- Yin XM, Ding WX, Gao W. 2008. Autophagy in the liver. *Hepatology*, 47 (5):1773-1785.
- Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 2009. Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods Enzymol*, 452:143-164.



- You L, Wang Z, Li H, Shou J, Jing Z, Xie J, Sui X, Pan H, Han W. 2015. The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy*, 11 (5):729-739.
- Youle RJ, Narendra DP. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12 (1):9-14.
- Yu ZQ, Ni T, Hong B, Wang HY, Jiang FJ, Zou S, Chen Y, Zheng XL, Klionsky DJ, Liang Y, Xie Z. 2012. Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy*, 8 (6):883-892.
- Zhang Z, Guo M, Zhao S, Xu W, Shao J, Zhang F, Wu L, Lu Y, Zheng S. 2015. The update on transcriptional regulation of autophagy in normal and pathologic cells: A novel therapeutic target. *Biomed Pharmacother*, 74:17-29.
- Zhao Y, Chen G, Zhang W, Xu N, Zhu JY, Jia J, Sun ZJ, Wang YN, Zhao YF. 2012. Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 signaling pathway. *J Cell Physiol*, 227 (2):639-648.
- Zou X, Xu J, Yao S, Li J, Yang Y, Yang L. 2014. Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy protects against lipopolysaccharide-induced apoptosis in HL-1 cardiomyocytes. *Exp Physiol*, 99 (10):1348-1358.

## VI Anhang

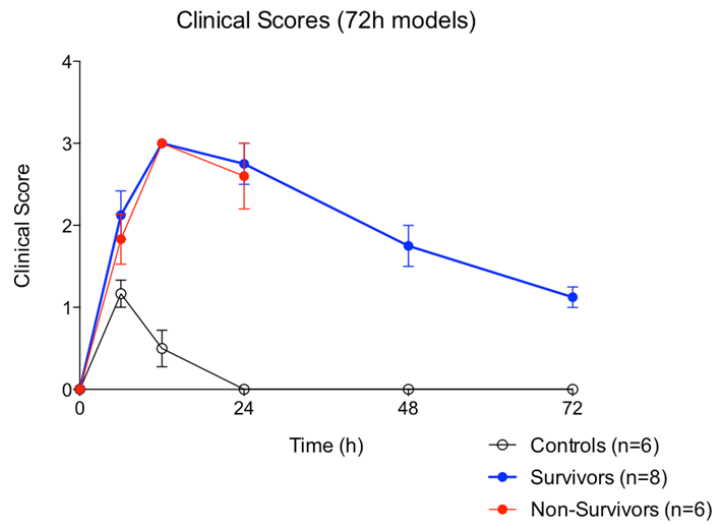
### VI.1 Mikrobiologische Analyse der gepoolten Faeces

Tab. 14: Mikrobiologische Analyse der gepoolten Faeces

| Bakterienspezies           | Keimzahl (KBE/ml)         |
|----------------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>    | 0,1 x 10 <sup>9</sup>     |
| <i>Streptococci</i>        | 0,0012 x 10 <sup>9</sup>  |
| <i>Enterococci</i>         | 0,0012 x 10 <sup>9</sup>  |
| <i>Klebsiella species</i>  | 0,00004 x 10 <sup>9</sup> |
| <i>Bifidobacterium</i>     | 7,0 x 10 <sup>9</sup>     |
| <i>Clostridium species</i> | 3,0 x 10 <sup>9</sup>     |
| <i>Bacteroides</i>         | 21,0 x 10 <sup>9</sup>    |
| <i>Prevotella</i>          | 2,9 x 10 <sup>9</sup>     |

Bestimmung der Keimlast der in dieser Studie verwendeten Stuhlcharge erfolgte wie bereits durch Gonnert et al. beschrieben (Gonnert et al. 2011).

## VI.2 Klinischer Score



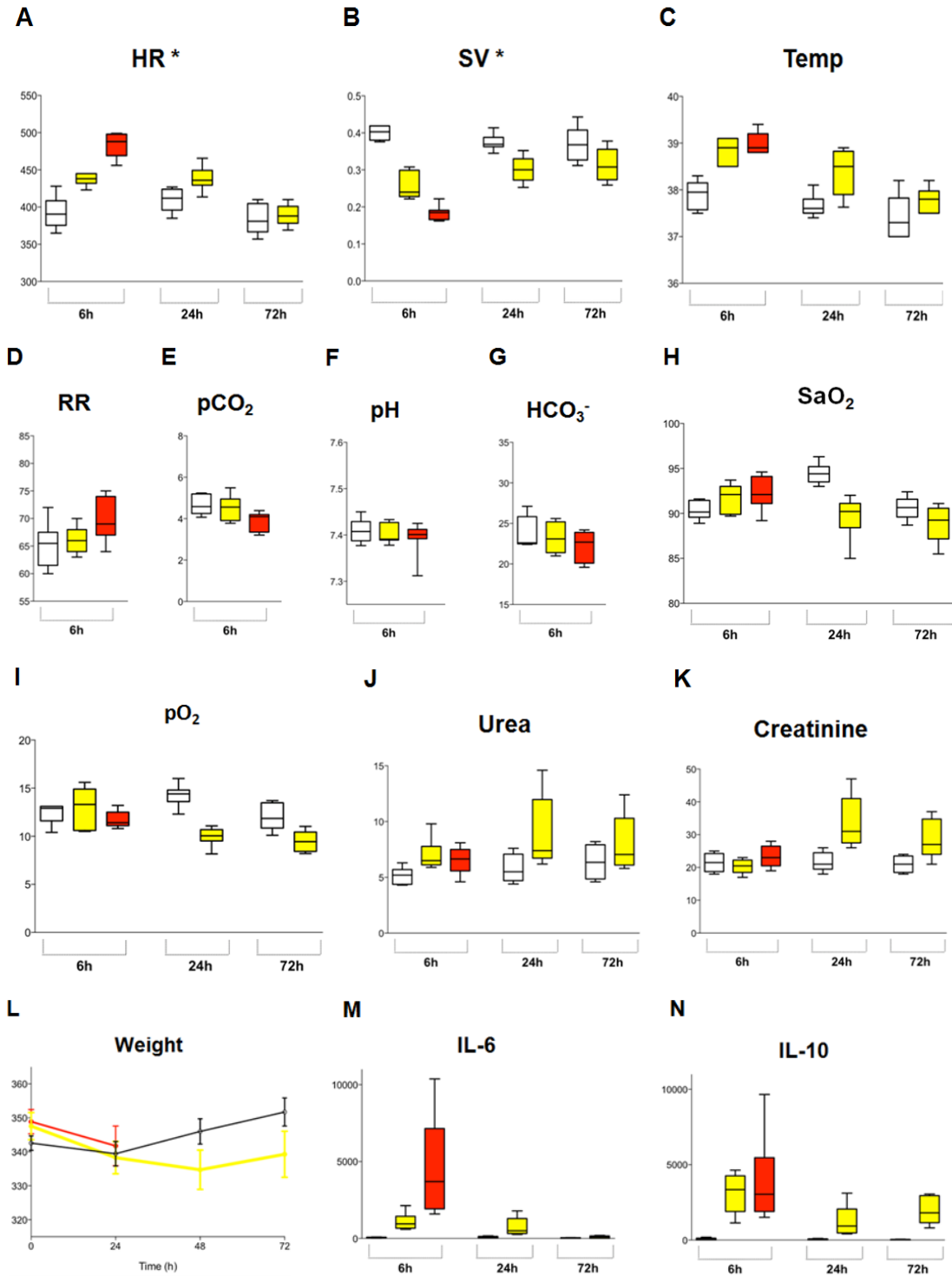
**Abb. 15: Klinischer Score.**

Darstellung des klinischen Scores in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *septic survivors*, *septic non-survivors*.

## VI.3 Klinische Daten

### Legende:

- control*
- septic survivors*
- septic non-survivors*



**Abb. 16: Darstellung der klinischen Daten.**

Darstellung von **(A)** Herzfrequenz (*heart rate*, HR), **(B)** Schlagvolumen (SV), **(C)** Temperatur (Temp), **(D)** Atemfrequenz (RR), **(E)** CO<sub>2</sub>-Partialdruck (pCO<sub>2</sub>), **(F)** pH-Wert, **(G)** HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration, **(H)** Sauerstoffsättigung (SaO<sub>2</sub>), **(I)** O<sub>2</sub>-Partialdruck (pO<sub>2</sub>), **(J)** Harnstoff (*urea*), **(K)** Kreatinin (*creatinine*), **(L)** Gewicht (*weight*), **(M)** IL-6 und **(N)** IL-10 in Abhängigkeit der Zeit und den Untersuchungsgruppen *control*, *septic survivors*, *septic non-survivors* (\* p < 0,05).

## VI.4 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1: Darstellung der Intensität der Immunantwort in der Sepsis in Abhängigkeit von der Zeit (Riedemann et al. 2003).....  | 4  |
| Abb. 2: Stadien des autophagischen Prozesses (Mannack und Lane 2015).....  | 10 |
| Abb. 3: Darstellung der Maschinerie der Autophagosombildung während nährstoffarmer Konditionen (Mannack und Lane 2015). .... | 17 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung des qPCR-Programmes.....  | 36 |
| Abb. 5: <i>Atg5</i> -Genexpressionsniveau. ....  | 45 |
| Abb. 6: <i>Atg12</i> -Genexpressionsniveau. ....   | 46 |
| Abb. 7: <i>Atg16L</i> -Genexpressionsniveau. ....  | 47 |
| Abb. 8: <i>Lc3</i> -Genexpressionsniveau.....  | 48 |
| Abb. 9: <i>Becn1</i> -Genexpressionsniveau.....  | 49 |
| Abb. 10: <i>Hmox1</i> -Genexpressionsniveau. ....  | 50 |
| Abb. 11: Relativer LC3B-II-Proteingehalt.....  | 51 |
| Abb. 12: Relativer Beclin-1-Proteingehalt.....   | 52 |
| Abb. 13: Relativer P-Beclin-1-Proteingehalt. ....  | 53 |
| Abb. 14: Clusteranalyse der Untersuchungsgruppen mit Dendrogramm.....  | 55 |
| Abb. 15: Schematische Darstellung des autophagischen Prozesses und der untersuchten Schlüsselparameter. ....                 | 58 |

## VI.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Realisierung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Herr Prof. Mervyn Singer gilt mein Dank für die Bereitstellung der Präparate und Charakterisierung des klinischen Verlaufs.

Herrn Prof. Dr. med. M. Bauer danke ich, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, die Promotion im Fachbereich Experimentelle Anästhesie durchzuführen.

Herrn PD Dr. Ralf Claus gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung des praktischen Teils meiner Arbeit, im Besonderen für die Anregungen, Ratschläge und Denkanstöße bezüglich der Auswertung und Interpretation der Daten. Außerdem möchte ich mich für die Betreuung während des Verfassens meiner Arbeit und für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Frau Bianka Wissuwa danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei jeglichen Problemen oder Fragen.

Frau Esther Fröhlich möchte ich danken, die mir mit ihrer hilfsbereiten und offenen Art immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Markus Bläß gilt mein Dank für die Einführung in die labortechnische Arbeit.

Danken möchte ich ebenso Frau Brigitte Specht, Frau Luisa Ungelenk, Frau Nadine Hechaichi, Frau Ulrike Vetterling, Herrn Mohamed Ghait, Frau Diana Peschel und Frau Marianne Butans für die hilfreiche und sehr angenehme Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt danke ich dem Fachbereich der experimentellen Neurologie für die Möglichkeit, einige Geräte mitbenutzen zu dürfen und die hilfsbereite Unterstützung.

Danken möchte ich auch dem IZKF für die Gewährung des Promotionsstipendiums.

Schließlich danke ich allen Doktoranden, Diplomanden, Praktikanten und Mitarbeitern, die in dieser Zeit im Fachbereich der experimentellen Anästhesie tätig waren und zum sehr angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben.

Am Ende gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie und Freunde, die mich immer tatkräftig unterstützt und motiviert haben.

## VI.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Herr PD Dr. rer. nat. habil. Ralf Claus (Anleitung und Auswertung)
- Herr Prof. Mervyn Singer, M.D. (Bereitstellung der Präparate und Charakterisierung des klinischen Verlaufs)
- Herr Markus Bläß (quantitative Genexpressionsanalyse)
- Frau Esther Fröhlich (quantitative Proteinexpressionsanalyse)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers