

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Campus Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Einfluss des HIV-Medikaments Efavirenz auf die Physiologie
von Endothelzellen und Einsatzmöglichkeiten in der
Tumorthherapie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marlene Weiß

aus

München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Marcus Hentrich
Prof. Dr. med. Christian Schindlbeck

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. A. Brüning

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Endoplasmatisches Retikulum.....	1
1.2 ER-Stress und multifunktionale Stressantwort.....	3
1.2.1 UPR	3
1.2.2 Autophagie und Apoptose	5
1.2.3 Die Funktion der Mitochondrien in der ER-Stressreaktion – Verbindungswege zwischen ER und Mitochondrien	13
1.2.4 Koexistenz von ER- und oxidativem Stress	13
1.3 Hitzeschockproteine und weitere relevante Marker der Stressreaktion	14
1.3.1 Hitzeschockproteine	15
1.3.2 XBP1	16
1.3.3 p53 und p-p53	17
1.3.4 Sestrin 2	17
1.3.5 CHOP.....	17
1.3.6 PARP	18
1.3.7 Hsp32.....	18
1.3.8 HIF-1 α	18
1.4 Endothelzellmarker.....	18
1.5 Housekeeping-genes GAPDH und β -Aktin.....	19
1.6 Antioxidantien	19
1.7 HIV-Infektion und antiretrovirale Therapie	20
1.7.1 Der NNRTI Efavirenz	22
1.7.2 Der Proteaseinhibitor Nelfinavir	25
1.8 Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Zellkultur	26
2.2 Endotheliale Quervernetzung	27
2.3 MTT-Assay.....	27
2.4 Western Blot Analyse.....	28
2.5 RNA-Isolierung	29
2.6 Generierung von cDNA.....	30
2.7 PCR.....	30

2.8	DNA-Gelelektrophorese	32
2.9	Zellfärbung und Immunfluoreszenzmikroskopie.....	32
2.10	FACScan Analyse.....	33
2.11	Statistische Analyse	33
3.	Ergebnisse	33
3.1	Endothelzellen.....	33
3.1.1	Inhibierung der endothelialen Quervernetzung und Vakuolisierung.....	33
3.1.2	Induktion von Autophagie, oxidativem und ER-Stress durch Efavirenz....	35
3.1.3	Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in EA.hy926 Zellen	38
3.1.4	Zellüberleben und –proliferation der EA.hy926-Zellen bei mehrtägiger Inkubation mit Efavirenz	40
3.1.5	Die Kombination von Efavirenz mit dem Antioxidans N-Acetylcystein ...	41
3.1.6	Verstärkte Stressreaktion durch die Kombination von Efavirenz mit Nelfinavir	43
3.1.7	Induktion von Zelltod und Verhinderung der endothelialen Quervernetzung durch Efavirenz in Kombination mit Nelfinavir.....	45
3.2	Tumorzellen	46
3.2.1	Induktion von Sestrin 2 durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir	46
3.2.2	Verstärktes XBP1-Splicing durch die Inkubation mit Efavirenz und Nelfinavir	47
4.	Diskussion	48
5.	Zusammenfassung	59
6.	Literaturverzeichnis	61
7.	Abkürzungsverzeichnis	74
8.	Abbildungsverzeichnis.....	77
9.	Tabellenverzeichnis.....	78
10.	Publikationen	78
11.	Anhang	79
11.1	Vollständige Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien	79
11.2	Danksagung.....	86
11.3	Eidesstattliche Versicherung.....	87

1. Einleitung

Die Einleitung beschäftigt sich mit den zellbiologischen und biochemischen Grundlagen, die für das Verständnis der Wirkungsweise von Efavirenz sowie der eingesetzten Kombinationssubstanzen erforderlich sind. Efavirenz verursacht, wie auch teilweise in anderen Publikationen beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit dargestellt, vor allem ER-Stress, oxidativen Stress und Autophagie. Wie diese Zellmechanismen als Reaktion auf die Substanz zusammenhängen und wann sie zur Schädigung der Zelle führen, ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

Darüber hinaus wird auf die Geschichte der HIV-Therapie und die Entwicklung der Substanz Efavirenz in diesem Kontext eingegangen. Dabei liegt der Fokus insbesondere auf den aktuellen Indikationskriterien für ihren Einsatz in der Kombinationstherapie.

Als abschließender Teil der Einleitung wird die Zielsetzung der Arbeit erläutert. In diesem Zusammenhang werden die Aspekte der Fragestellung pointiert dargestellt.

1.1 Endoplasmatisches Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) liegt dem Zellkern an und besteht aus zwei Anteilen: dem glatten und dem rauen ER. Der Teil, der mit Ribosomen besetzt ist, heißt raues ER und ist für die Synthese sekretorischer Proteine zuständig. Im glatten ER hingegen finden unterschiedliche biochemische Reaktionen statt. Neben der Phospholipidbiosynthese werden dort auch Cholesterin und Steroidhormone hergestellt. Eine weitere wichtige Funktion kommt dem glatten ER als Kalzium-Speicher zu (Rassow, 2012, S.366).

Die mit der Regulierung des Proteinhaushalts zusammenhängende Balancierung der ER-Homöostase, sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei ER-Stress, wird als Proteostase bezeichnet. Die Mechanismen der Proteostase umfassen die Synthese von Proteinen (durch Ribosomenaktivität und kotranslationale Kontrolle), die passende Reaktion auf fehlgefaltete Proteine (im Sinne von Chaperonaktivität und Unfolded protein response (UPR)) sowie den Abbau von funktionslosen Proteinen (im Ubiquitin-Proteasom-System, durch Autophagie oder Apoptose) (Diaz-Villanueva et al., 2015).

Übersteigt die Menge der fehlgefalteten Proteine die Kapazität des ER, sie durch Chaperonaktivität und die UPR wieder in einen funktionstüchtigen Zustand zu bringen, werden Mechanismen des Proteinabbaus aktiviert, um Zellschaden zu vermeiden und die ER-Homöostase zu erhalten. Dazu gehören der ER-assoziierte Proteinabbau (ER-associated protein degradation (ERAD)) über eine ATP-abhängige Protease (Proteasom) sowie die Autophagie. Während das Proteasom mit Ubiquitin markierte oder Chaperon-gebundene ungefaltete Proteine nach ihrem retrograden Transport ins

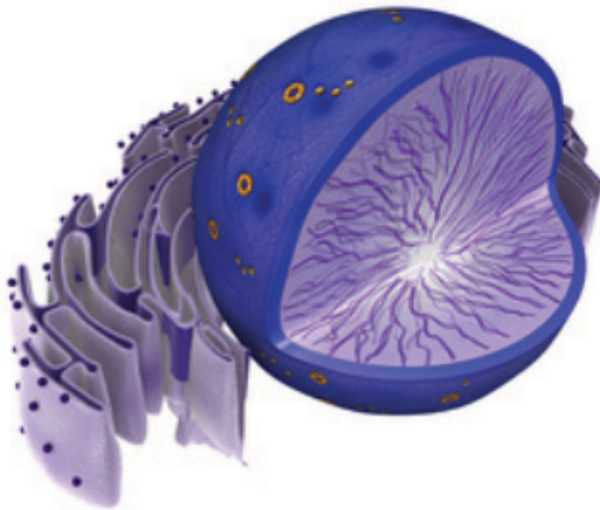


Abbildung 1: Nucleus und Endoplasmatisches Retikulum der eukaryotischen Zelle. Die Abbildung zeigt einen Zellkern (blau), dessen Membran mit dem endoplasmatischen Retikulum in Verbindung steht und fließend in dieses übergeht. Die äußere Kernmembran ist somit eine spezialisierte Form des ER. Die mit Ribosomen besetzten Zisternen stellen das raue ER dar, wohingegen die ribosomenfreien Zisternen zum glatten ER gehören. (Urheber: 7activestudio, Quelle: fotolia.com)

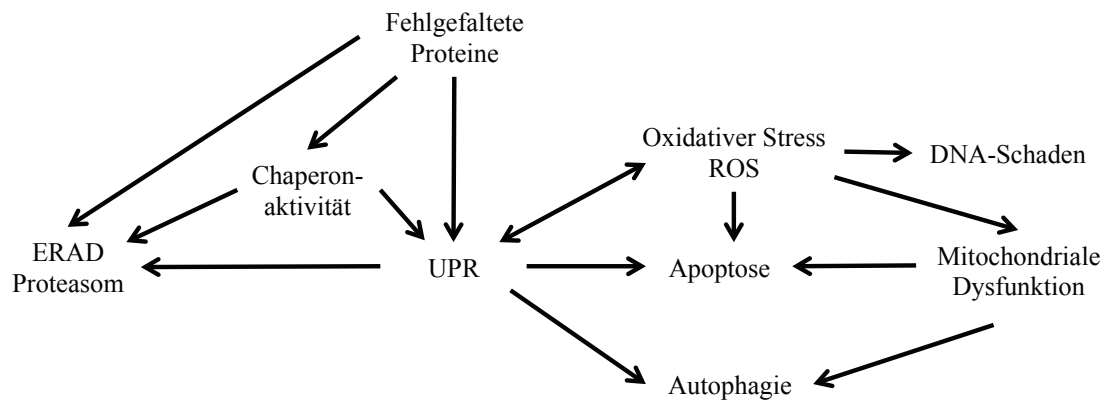


Abbildung 2: Proteostase und Zusammenhänge der adaptiven Mechanismen bei Zellstress. In dieser Abbildung sind Reaktionswege der Zelle dargestellt, die eingeleitet werden, wenn es zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine kommt. Die Pfeile signalisieren, wie sie sich gegenseitig beeinflussen. Eine tragende Rolle bei der Erhaltung der Homöostase spielt die Unfolded Protein Response (UPR). Häufig werden als Folge der UPR oxidativer Stress, Apoptose oder Autophagie ausgelöst. Im Rahmen der oxidativen Stressreaktion kommt es zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine kann bei Überschreiten der Kapazitäten zur UPR auch zum ER-assoziierten Proteinabbau (ERAD) führen. Chaperone üben eine essentielle Funktion aus, indem sie einerseits Proteine in ihrer Konfiguration stabilisieren, auf der anderen Seite aber auch für den Transport von fehlgefalteten Proteinen zuständig sind.

Zytosol abbaut, können durch Autophagie auch fehlgefaltete Proteine oder ganze dysfunktionale Zellorganellen abgebaut werden (Diaz-Villanueva et al., 2015).

Letztendlich kann es bei der Überladung der Zelle mit fehlgefalteten Proteinen und einem Versagen der zuvor genannten Mechanismen auch zur Apoptose kommen. Diese kann sowohl durch Signalwege der UPR als auch direkt durch oxidativen Stress, der unter anderem bei Akkumulation fehlgefalteter Proteine entsteht, initiiert werden.

Einen groben Überblick über die Mechanismen der Proteostase und darüber, wie sich oxidativer Stress, Apoptose und Autophagie in Zusammenschau mit der UPR gegenseitig bedingen, gibt **Abbildung 2**. Die einzelnen Aspekte werden in den folgenden Abschnitten detailliert beleuchtet.

1.2 ER-Stress und multifunktionale Stressantwort

1.2.1 UPR

ER-Stress bezeichnet eine Dysfunktion des ER bei Akkumulation von misgefalteten und ungefalteten Proteinen, die durch verschiedene pathogene Signale hervorgerufen wird (Jheng et al., 2014). Dieser Zustand tritt ein, wenn die drei Hauptfunktionen des ER zur Aufrechterhaltung der Homöostase beeinträchtigt sind: Proteinfaltung, Calciumspeicherung und Synthese von ungesättigten Fettsäuren, Steroiden und Phospholipiden (Schroder, 2008). Auslösende Faktoren für eine Dysbalance der ER-Homöostase können somit unter anderem Hypoxie, oxidativer Stress, Glucosemangel, Störungen des Calciumhaushalts, Entzündungen, virale Infektionen sowie eine vermehrte Proteinsynthese sein (Jheng et al., 2014, Cao and Kaufman, 2014).

Eine Akkumulation von misgefalteten Proteinen und damit einhergehender ER-Stress führen zur sogenannten UPR. Die UPR erhöht die Kapazität des ER zur Proteinfaltung, hemmt die globale Proteinsynthese und fördert die ERAD von misgefalteten Proteinen (Cao and Kaufman, 2014, Diaz-Villanueva et al., 2015). Die Signalwege der UPR werden durch drei verschiedene ER-assoziierte Transmembranproteine initiiert. Activating transcription factor 6 (ATF6), Inositol-requiring protein 1 (IRE-1) und die PERK (protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase) sind in stressfreien Situationen an das Chaperon Bip (GRP78) gebunden. Ihre Signalkaskaden werden durch die Dissoziation von GRP78 als Reaktion auf ER-Stress ausgelöst. Durch die Endoribonukleaseaktivität von IRE-1 gespleißtes XBP1 sowie durch Proteasen im Golgi-Apparat aktiviertes ATF6 sind maßgeblich an der Synthese von Chaperonen und Proteinen der ER-Stressantwort auf Transkriptionsebene beteiligt. Der aktive Transkriptionsfaktor XBP1s führt außerdem zur Expression von Genen, die für die ERAD wichtig sind (Diaz-Villanueva et al., 2015).

Die globale Proteinsynthese wird durch phosphoryliertes eIF2 α , einem downstream-target der PERK, herunterreguliert. Es kommt jedoch gleichzeitig zur selektiven

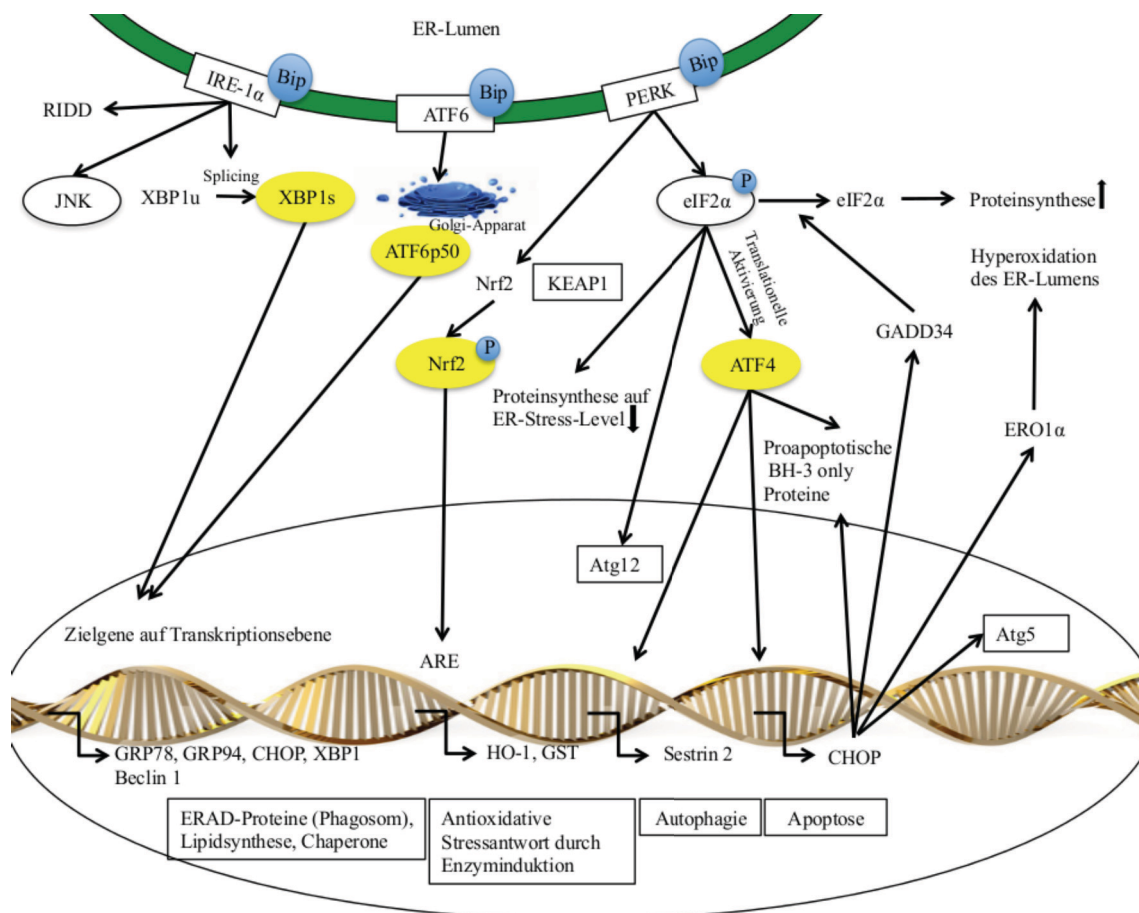


Abbildung 3: Unfolded Protein Response (UPR): Die drei Arme der UPR bei ER-Stress.

Die ER-assoziierten Transmembranproteine Inositol-requiring protein (IRE-1 α), Activating transcription factor 6 (ATF6) und die Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) werden im Rahmen der ER-Stressreaktion aktiviert und können daraufhin ihre Signalkaskaden initiieren. Dabei lösen sie sich von Bip, welches die Proteine im stressfreien Zustand der Zelle in der ER-Membran verankert. Alle durch die UPR aktivierten Transkriptionsfaktoren sind gelb hinterlegt. Sie üben ihre Funktion im Nucleus aus, indem sie dort bestimmte Zielgene induzieren. Die Endoribonukleaseaktivität von IRE-1 α spaltet das ungespleißte XBP1u, woraufhin der aktive Transkriptionsfaktor XBP1s entsteht. Außerdem kann IRE-1 α die c-jun N-terminale Kinase (JNK) aktivieren oder einen Proteinabbau im Rahmen des regulated IRE-1 dependent decay of mRNA (RIDD) initiieren. ATF6 wird durch Proteasen im Golgi-Apparat aktiviert. Die Proteinkinase PERK vermittelt über Nrf2 eine antioxidative Stressantwort, wohingegen der translationell durch den eukaryotischen Initiierungsfaktor 2 (eIF2 α) aktivierte Transkriptionsfaktor ATF4 Autophagie- und Apoptosegene induziert. Die transkriptionelle Aktivierung des "C/EBP homologous protein" (CHOP) führt über die durch das "growth arrest and DNA damage-inducible protein" (GADD34) vermittelte Dephosphorylierung von eIF2 α zur Wiederherstellung der Proteintranslation.

- | | |
|---|--|
| Atg5/Atg12 | autophagy-related 5/12; mit Autophagievorgängen assoziierte Gene |
| ARE | antioxidant response element |
| GRP78/GRP94 | Glucose-regulated protein 78/94; GRP78=Bip |
| GST/HO-1 | Glutathion-S-Transferase/Hsp32; Teile der antioxidativen Stressantwort |
| KEAP1 | kelch like ECH associated protein 1 |
| DNA: Urheber Spectral-Design; Golgi-Apparat: Urheber Russi & Morelli; Quelle: fotolia.com | |

Induktion spezifischer Transkriptionsfaktoren. Hierzu gehören das antioxidativ wirksame Nrf2 (Nuclear factor-like 2) und ATF4. Das durch PERK phosphorylierte Nrf2 fördert durch Bindung an das antioxidant response element (ARE) die antioxidative

Stressantwort; ATF4 führt zur Aktivierung von CHOP (C/EBP homologous protein). CHOP wiederum initiiert über das „growth arrest and DNA damage-inducible protein“ GADD34 die Dephosphorylierung von eIF2 α und die damit verbundene Wiederherstellung der mRNA Translation (Novoa et al., 2001, Tabas and Ron, 2011, Verfaillie et al., 2012). ATF4 und CHOP interagieren miteinander und haben gemeinsame Zielgene. Sie fördern zusammen die Wiederherstellung der Proteinsynthese. Kann die Proteostase nicht aufrecht erhalten werden, kommt es dadurch zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie zur Induktion von Apoptose (Han et al., 2013).

Auch durch IRE-1 wird der Abbau von mRNA im Rahmen des RIDD (regulated IRE-1 dependent decay of mRNA) gefördert (Walter and Ron, 2011). Es sind sowohl Proteine, die zur Fehlfaltung tendieren als auch Chaperone wie GRP78 von diesem Abbau betroffen (Urrea et al., 2013). RIDD kann somit die Weichenstellung Richtung Zelltod oder Zellüberleben beeinflussen.

Die einzelnen Arme der UPR beeinflussen und aktivieren sich gegenseitig, beispielsweise indem ATF6 die Expression von XBP1 auf Transkriptionsebene fördert (Ron and Walter, 2007). Eine Übersicht über die Reaktionswege der UPR gibt **Abbildung 3**.

1.2.2 Autophagie und Apoptose

Als Folge der ER-Stressreaktion und der UPR können Autophagie- und Apoptose-Vorgänge ausgelöst werden. Dies sind zwei zelluläre Prozesse, die interagieren. So blockiert Autophagie die Induktion von Apoptose, vermittelt durch die Reduktion proapoptotischer Proteine im Zytosol. Eine Caspase-Aktivierung im Rahmen der Apoptose verhindert wiederum die Autophagie, indem Caspasen Autophagie-assoziierte Proteine wie Atg3 und Beclin 1 abbauen oder spalten (Marino et al., 2014). Beclin 1 kann, wenn es durch Caspase 3 gespalten wird, zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien führen und so eine Funktion als Schaltstelle zwischen Autophagie und Apoptose einnehmen (Benbrook and Long, 2012). In seiner ungespaltenen, phosphorylierten Form wirkt Beclin 1 allerdings Autophagie-induzierend und antiapoptotisch (Kang et al., 2011). Bcl-2 hat als antiapoptotisches Protein ebenfalls eine regulative Funktion.

p38 ist ein weiteres Protein, das als Teil der PERK-eIF2 α -ATF4-Achse abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus eine regulative Funktion für den Wechsel zwischen apoptotischen und autophagischen Signalwegen einnimmt (Liu et al., 2015). Bei ER-Stress wird durch PERK die Aktivität von Hsp90 vermindert und so die Autophosphorylierung von p38 gefördert. Hierdurch wird gleichermaßen die Phosphorylierung von eIF2 α initiiert, die über CHOP zu Apoptose führt, aber auch die Expression von Autophagiegenen induziert.

Autophagie

Autophagie, die bei persistierendem Zellstress zumeist vor apoptotischen Prozessen einsetzt, kann sowohl ein „rescue“-Mechanismus der Zelle als auch ein Initiator von Zelltod und Apoptose sein. Ob Autophagie zytoprotektiv wirkt oder zum Zelltod führt, hängt entscheidend von der Stress-induzierenden Substanz, dem Mechanismus der Autophagie-Induktion sowie dem Zelltyp ab (Verfaillie et al., 2010).

Es existieren drei verschiedene Mechanismen der Autophagie: Makro-, Mikro- und Chaperon-vermittelte Autophagie. Bei der im Folgenden näher beleuchteten Makroautophagie wird ein sogenanntes Autophagosom gebildet, indem sich eine Membran um das abzubauen Zellmaterial schließt. Dieses Membranvesikel fusioniert anschließend mit einem primären Lysosom. Dadurch entsteht ein sekundäres Lysosom, dessen Inhalt durch Hydrolasen abgebaut wird (Benbrook and Long, 2012, Fimia and Piacentini, 2010).

Autophagie ist ein Schutzmechanismus der Zelle bei metabolischem Stress. Durch den Abbau zelltoxischer, oxidiertes Proteine sowie geschädigter Mitochondrien sorgt Autophagie für das Aufrechterhalten der Zellhomöostase und damit für das Zellüberleben (Diaz-Villanueva et al., 2015). So lässt sich erklären, dass es bei dysfunktionalen Autophagievorgängen zu Infektion, Inflammation, Neurodegeneration und Krebsentstehung kommen kann (Liang, 2010). Auslösende Faktoren der Autophagie sind unter anderem Hypoxie, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Nährstoffmangel mit daraus resultierenden niedrigen ATP- und Glucoseleveln. Nährstoffmangel führt meistens über die Bildung von ROS zu Autophagie (Scherz-Shouval et al., 2007). Viele der Autophagie-auslösenden Mechanismen funktionieren über die Hemmung von mTOR (mechanistic target of rapamycin).

Im Rahmen der durch ER-Stress ausgelösten UPR führen JNK, XBP1, PERK über CHOP und ATF4 sowie ATF6 zur Aktivierung der Autophagie (Jheng et al., 2014).

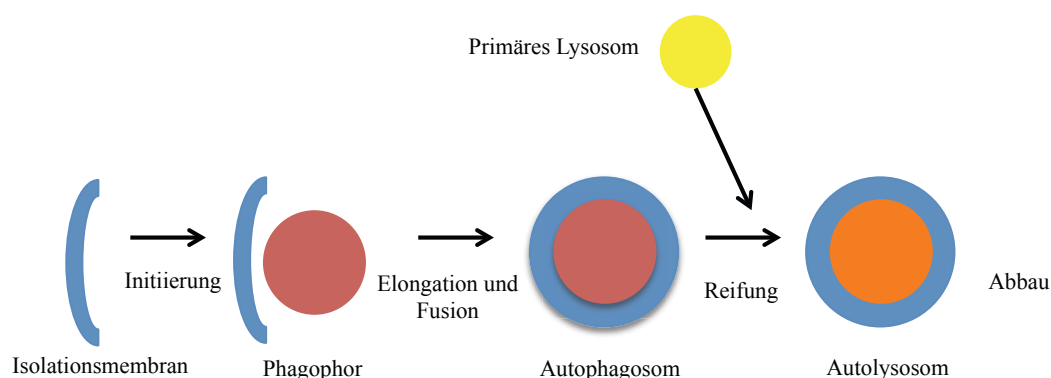


Abbildung 4: Makroautophagie. In dieser Abbildung sind die einzelnen Phasen des Makroautophagie-Prozesses dargestellt. Durch verschiedene Stimuli der Zelle bildet sich eine Isolationmembran (blau). Diese elongiert, um sich daraufhin um das abzubauen Zellmaterial (rot) zu schließen. Das so entstandene Autophagosom fusioniert nun mit einem primären Lysosom (gelb). Im Inneren des Autolysosoms (orange) kommt es schließlich zum Abbau des Zellmaterials.

CHOP hemmt Bcl-2 und fördert damit die durch Beclin 1 vermittelte Initiierung von Autophagie (Kania et al., 2015). ATF6 aktiviert als Heterodimer mit C/EBP- β , einem Mitglied der bZIP-Familie, die DAPK, die Beclin 1 phosphoryliert (Liu et al., 2015, Jheng et al., 2014). Die DAPK kann auch durch zytosolisches Calcium aktiviert werden (Kania et al., 2015). Die durch IRE-1 aktivierte JNK spielt eine entscheidende Rolle, indem sie das sonst negativ regulierende Bcl-2 hemmt (Benbrook and Long, 2012, Ogata et al., 2006). Zusätzlich induzieren einzelne Proteine der UPR die Bildung von für die Autophagie wichtigen Genen auf Transkriptionsebene: eIF2 α führt zur Aktivierung von Atg12, welches an der Elongation beteiligt ist; CHOP induziert Atg5 (Kania et al., 2015). Ein aus Atg5, Atg 12 und Atg 16 gebildeter Komplex sowie aktiviertes Beclin-1 führt daraufhin zur Konversion von LC3 zu LC3II und zur Förderung der Autophagie (Kourokou et al., 2007, Liu et al., 2015). ATF4 induziert bei Hypoxie die Bildung von LC3B und ist somit ebenfalls an der Regulation der Autophagie beteiligt (Rzyski et al., 2010). Es fungiert außerdem als Verbindungsglied zwischen der ER-Stressreaktion und Autophagie, indem es bei mitochondrialer Dysfunktion oder durch bestimmte Substanzen ausgelöstem Zellstress Sestrin 2 induziert (Garaeva et al., 2016, Bruning et al., 2013).

In stressfreien Situationen interagieren Beclin 1 und Bcl-2 miteinander. Die Phosphorylierung von Beclin 1 und Bcl-2 durch JNK oder DAPK sowie die Bindung von proapoptischen BH3-only Proteinen an Bcl-2 führt zur Dissoziation der beiden Proteine (Verfaillie et al., 2012, Liang, 2010, Wei et al., 2008). So wird die Inhibierung von Beclin 1 aufgehoben und es kann ungehemmt autophagische Prozesse induzieren. Eine transkriptionelle Aktivierung von Beclin 1 durch das zweite downstream-target von IRE-1, gespleißtem XBP1, konnte in Endothelzellen und Makrophagen nachgewiesen werden (Margariti et al., 2013, Tian et al., 2015). Außerdem kam es zur Steigerung der Expression von C/EBP- β durch XBP1 (Chen et al., 2004).

Kroemer et al. konnten 2010 jedoch eine hemmende Wirkung von IRE-1 und XBP1 auf Autophagie-Prozesse nachweisen (Kroemer et al., 2010).

Die Akkumulation von Calcium im Zytoplasma, z.B. nach vermehrtem Austritt aus dem ER im Rahmen der Stressreaktion, führt durch mTOR-Hemmung zur Induktion von Autophagie (Kania et al., 2015). Dies geschieht über die durch CaMKK β vermittelte Aktivierung der AMP-Kinase (AMPK) (Hoyer-Hansen and Jaattela, 2007). CaMKK β fördert allerdings wie DAPK und JNK die Dissoziation von Beclin 1 von inhibierenden Proteinen (Hoyer-Hansen et al., 2007). Der ligandenaktivierte Calciumrezeptor IP3-R ist durch seine Interaktion mit Beclin 1 ebenfalls an der Regulation von Autophagie beteiligt, da er so Autophagievorgänge hemmt (Vicencio et al., 2009). Bcl-2 wiederum reguliert das Calciumlevel im ER durch Beeinflussung des IP3-Rezeptors (Hoyer-Hansen and Jaattela, 2007). Das zytoplasmatische Calcium kann daraufhin je nach Zustand der Zelle Autophagie oder Apoptose auslösen (Decuyper et al., 2013).

Eine Verbindung besteht zusätzlich zwischen Proteasom und Autophagie: Proteasominhibitoren können Autophagie induzieren (Ding et al., 2007, Ravikumar et

al., 2010). Umgekehrt kann Autophagie vor Zelltod durch Proteasominhibitoren schützen (Benbrook and Long, 2012).

Reaktive Sauerstoffspezies initiieren Autophagie vor allem bei Nährstoffmangel mittels Hemmung von mTOR; direkt oder indirekt über Vermittlung durch das DNA-Reparaturenzym PARP1 (Kroemer et al., 2010). Insbesondere Wasserstoffperoxid (H₂O₂) kann eine Mediatorfunktion in der Signalübertragung einnehmen (Scherz-Shouval et al., 2007). ROS oxidieren DNA und zelluläre Moleküle irreversibel. Als antioxidativer Schutzmechanismus der Zelle werden Autophagie-Prozesse aktiviert. So können durch ROS geschädigte Organellen und Biomoleküle abgebaut werden (Filomeni et al., 2015). ROS können im Rahmen der oxidativen Stressreaktion allerdings auch zu Zelltod im Zusammenhang mit Autophagie (autophagic cell death (ACD)) führen (Chen et al., 2008). An Krebszellen wurde hierbei die Aktivierung von Beclin 1 durch ROS nachgewiesen. Das Hitzeschockprotein Hsp32 ist ebenfalls an der Induktion von Autophagie beteiligt (s. 1.3.7).

Neben diesem von apoptotischen Vorgängen unabhängigem Zelltod ist als Folge von Autophagie auch eine Aktivierung der Apoptose möglich (Marino et al., 2014).

Kürzlich wurde durch Liu et al. der Begriff der Autosis eingeführt, der ein neues Erklärungsmodell für den durch Autophagie vermittelten Zelltod darstellt (Liu and Levine, 2015).

Eine Sonderform der Autophagie stellt der Abbau von stark geschädigten, dysfunktionalen und permeabilisierten Mitochondrien (Mitophagie) dar (Kroemer et al., 2010). Die Hauptquelle der ROS-Produktion wird so ausgeschaltet und die Zelle vor oxidativer Schädigung geschützt (Filomeni et al., 2015).

Die Verbindungswege zwischen den Armen der UPR und Autophagie sind in **Abbildung 5** dargestellt. Einen Überblick über die auslösenden Faktoren der Autophagie gibt **Abbildung 6**. Negative Regulatoren sind in **Tabelle 1** gelistet.

Tabelle 1: Negative regulative Faktoren der Autophagie (nach Liang, 2010)

Regulierender Faktor	Betreffende Phase des Autophagie-Prozesses
mTOR	Induktion
Bcl-2	Nukleation
tBeclin-1	Nukleation; Caspase-gespaltenes Beclin-1
P53 (zytoplasmatisch)	Induktion

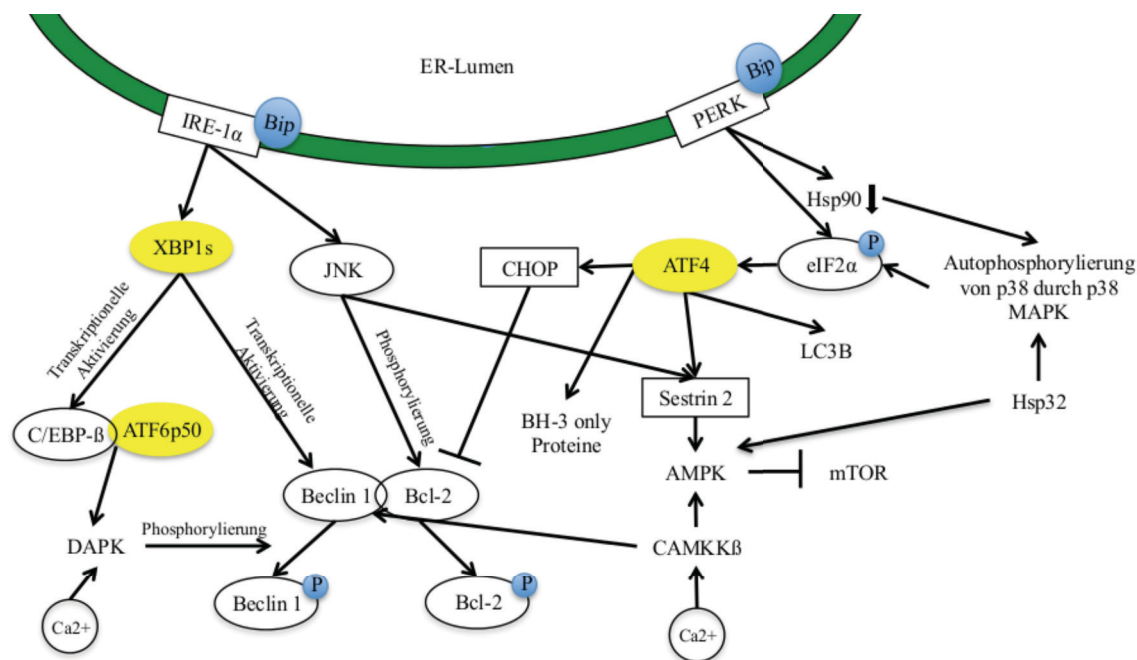


Abbildung 5: Initiierung von Autophagie über die UPR bei langanhaltendem ER-Stress - die Rolle von Beclin 1 und XBP1 bei der Autophagie-Induktion. In dieser Abbildung sind der IRE-1 α - und der PERK-Arm der UPR sowie ihre downstream-targets dargestellt, welche zur Autophagie-Induktion führen. Gelb hinterlegt sind die aktivierten Transkriptionsfaktoren der UPR. Eine tragende Rolle bei der Autophagie-Induktion spielt Beclin 1, welches seine Funktion nur nach Dissoziation von B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ausüben kann. XBP1 ist für die transkriptionelle Aktivierung von Beclin 1 verantwortlich, vermittelt aber auch die Phosphorylierung von Beclin 1, da das CCAAT-enhancer-binding protein β (C/EBP β) gemeinsam mit dem aktiven Transkriptionsfaktor ATF6p50 die death-associated protein kinase (DAPK) aktiviert. Die Dissoziation von Bcl-2 erfolgt nach dessen Phosphorylierung durch die c-jun N-terminale Kinase (JNK) oder indem das „C/EBP homologous protein“ (CHOP) Bcl-2 hemmt. Der aktive Transkriptionsfaktor ATF4 induziert neben CHOP Sestrin 2, das über die Hemmung des „mechanistic target of rapamycin“ (mTOR) zu Autophagie führt. Sestrin 2 kann auch durch die JNK aktiviert werden. Calcium fördert sowohl durch Aktivierung der DAPK als auch der „Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase- β “ (CAMKK β) die Dissoziation von Beclin 1. Das Hitzeschockprotein Hsp32 induziert Autophagie über die Aktivierung der p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase (p38 MAPK) sowie der AMP-Kinase (AMPK).

BH-3 only Proteine

Untergruppe der Bcl-2 Familie; Proteine mit proapoptischer Funktion

LC3B

am Prozess der Autophagosombildung beteiligtes Protein

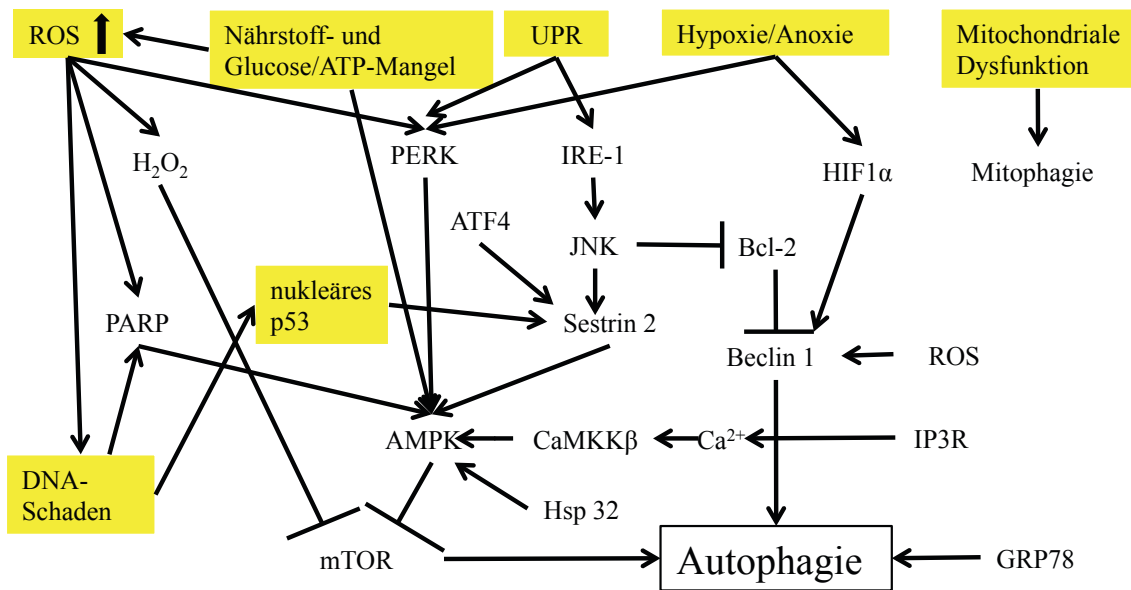


Abbildung 6: Induktoren von Autophagie. Diese Abbildung gibt eine Übersicht über Faktoren, die Autophagie induzieren. Es sind die durch Veränderungen der Zellphysiologie ausgelösten Reaktionswege und Signalmoleküle dargestellt. Die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Nährstoffmangel, Wege der Unfolded Protein Response (UPR), Hypoxie und DNA-Schäden spielen bei der Autophagie-Induktion eine tragende Rolle. Aber auch Hitzeschockproteine wie Hsp32 und GRP78 sowie Calcium sind daran beteiligt. Mitochondriale Dysfunktion kann zum Abbau ganzer Mitochondrien (Mitophagie) führen. Häufig wird die Autophagie-Induktion durch die Hemmung des mechanistic target of rapamycin (mTOR) vermittelt.

AMPK	AMP-Kinase; überwacht den Energiestatus der Zelle
ATF4	activating transcription factor 4, Transkriptionsfaktor der UPR
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, antiapoptotisches Protein
Ca ²⁺	Calcium
CAMKKβ	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase kinase-β
GRP78	glucose-regulated protein; Synonym: Bip
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1alpha
IP3R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
IRE-1	Inositol-requiring protein 1; Teil der UPR
JNK	c-jun N-terminale Kinase
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase; an der DNA-Reparatur beteiligtes Protein
PERK	Protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; Teil der UPR

Apoptose:

Bei diesem programmierten Zelltod lässt sich die extrinsische und intrinsische Apoptose unterscheiden. Die extrinsische Apoptose wird durch Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren (wie Tumornekrosefaktor (TNF)) auf der Zellmembran aktiviert und deshalb auch als rezeptorvermittelte Apoptose bezeichnet (Rassow, 2012, S.508). Die intrinsische Apoptose wird durch Störung der Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen auf der mitochondrialen Membran und konsekutiver Freisetzung von Mediatoren der Apoptose ausgelöst. Die Oligomerisierung

proapoptotischer Proteine wie Bax, Bak und Bid wird ohne vorhandenes Stresssignal durch Bcl-2 verhindert (Rassow, 2012, S.509). Kommt es zur Oligomerisierung, wird eine sogenannte „mitochondrial permeability transition pore“ (MPTP) gebildet und das mitochondriale Membranpotential verändert sich. In der Folge kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c. Caspase 8 stellt eine Verbindung zwischen extrinsischer und intrinsischer Apoptose dar, da sie neben der Aktivierung von Caspase 3 an der Spaltung des proapoptotischen Bcl-2 Moleküls Bid beteiligt ist.

Bei prolongiertem ER-Stress und Versagen der Mechanismen der UPR zur Wiederherstellung der Homöostase werden proapoptotische Vorgänge initiiert; entweder über Transkriptionsfaktoren der UPR oder durch Aktivierung mitochondrialer Signalwege (Chaudhari et al., 2014). Dies geschieht unter anderem über die Regulation proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bax, Bak, Bid) oder durch Calcium-Freisetzung aus dem ER (Urta et al., 2013). Bei der über mitochondriale Signalwege vermittelten Apoptose handelt es sich zumeist um die intrinsische Apoptose.

Der Induktion von CHOP im Rahmen der UPR kommt eine entscheidende Rolle als Wendepunkt zwischen Signalwegen des Zellüberlebens und der Initiierung proapoptotischer Signalwege zu (Urta et al., 2013). Neben seiner Aktivierung als downstream-target von ATF4 im PERK-Signalweg wird CHOP auch über ATF6 und IRE-1 α auf Transkriptionsebene induziert (Benbrook and Long, 2012). ATF4 und CHOP vermitteln gemeinsam Signale für den ER-Stress-induzierten Zelltod (Han et al., 2013). CHOP hemmt das antiapoptotische Bcl-2 und führt durch ERO1 α (endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 α) vermittelt über die Freisetzung von Calcium aus dem ER sowie mittels ROS-Generierung zur Induktion der intrinsischen Apoptose (Urta et al., 2013). Auch durch die eIF2 α -vermittelte Wiederherstellung der Proteinsynthese mit konsekutiver Proteinakkumulation kommt es zur ROS-Generierung (Song et al., 2008, Han et al., 2013). CHOP induziert die intrinsische Apoptose außerdem über die Bildung von BH3-only Proteinen, die Bax aktivieren (Verfaillie et al., 2012).

Die Veränderung des Calciumlevels im ER durch den Abbau der Vorräte bei ER-Stress und die konsekutive Anreicherung von Calcium im Zytosol sind maßgeblich an der Regulation der Apoptoseaktivierung beteiligt (Pinton et al., 2008). Im ER wird durch den Calcium-Mangel die Kapazität zur Proteinfaltung herabgesetzt. Somit kann es durch Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen zum Zelltod kommen (Sano and Reed, 2013). Eine erhöhte zytosolische Calciumkonzentration fördert ebenfalls die Oligomerisierung von Bax und Bak und die damit verbundene Permeabilitätssteigerung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP). Auch die MPTP wird geöffnet (Deniaud et al., 2008, Urta et al., 2013). Es kommt zur Fragmentierung der Mitochondrien sowie zur Induktion der intrinsischen Apoptose über Cytochrom c. Auslösende Faktoren der intrinsischen Apoptose bei ER-Stress sind in **Abbildung 7** dargestellt.

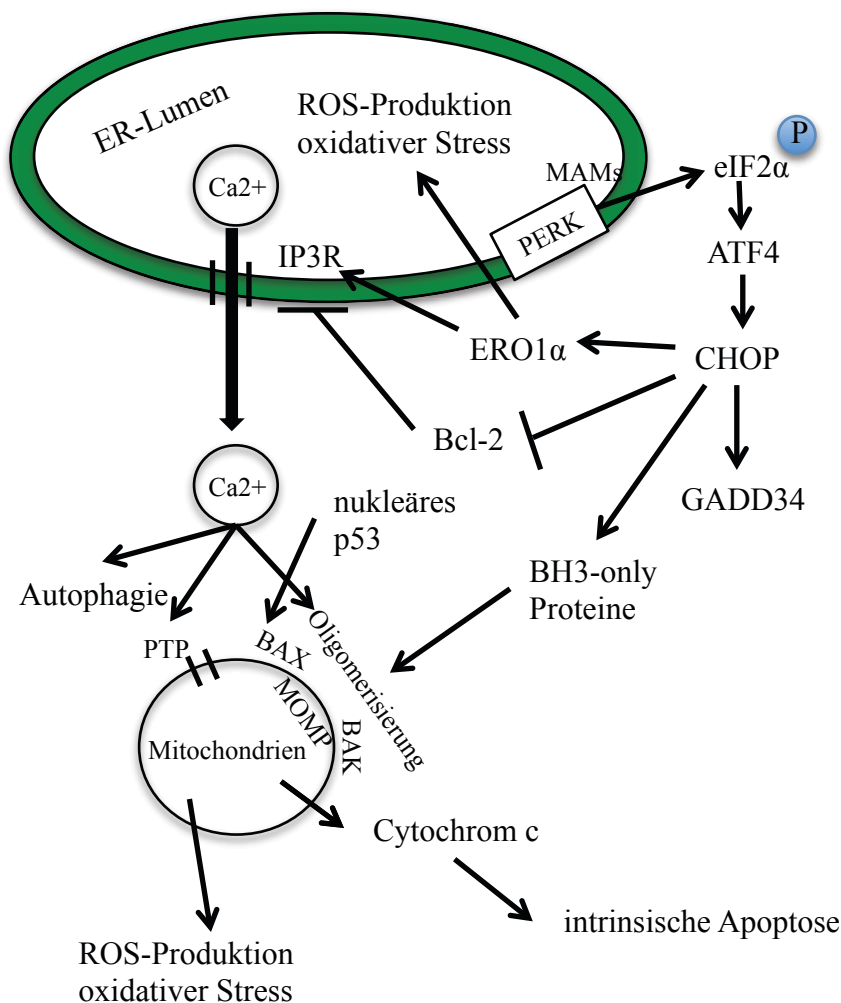


Abbildung 7: Auslösende Faktoren der intrinsischen Apoptose bei ER-Stress - die Rolle von Calcium und PERK mit seinen downstream-targets in der Kommunikation zwischen ER und Mitochondrien. Hier dargestellt sind Verbindungswege zwischen ER und Mitochondrien, die im Rahmen der UPR etabliert oder verstärkt werden. Außerdem sind die Faktoren skizziert, die in diesem Zusammenhang zur Auslösung der intrinsischen Apoptose führen. Der Fokus liegt dabei insbesondere auf der Rolle von Calcium und der Proteinkinase PERK als Teil der UPR, die an den Mitochondrien-assoziierten ER-Membranen (MAMs) vermehrt vorkommt. Das durch downstream-targets der PERK aktivierte „endoplasmic reticulum oxidoreductin-1alpha“ (ERO1 α) bewirkt eine Ausschüttung von Calcium aus dem ER. Calcium, nukleäres p53 sowie proapoptotische BH3-only Proteine führen zur Permeabilisierung der Mitochondrien durch Öffnung der „mitochondrial permeability transition pore“ (PTP) sowie durch die „mitochondrial outer membrane permeabilization“ (MOMP), welche durch Oligomerisierung der proapoptotischen BAX und BAK-Proteine der Bcl-2 Familie initiiert wird. Die darauf folgende Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien initiiert die intrinsische Apoptose.

GADD34 growth arrest and DNA damage-inducible protein; dephosphoryliert eIF2 α
 IP3R Inositoltriphosphat-Rezeptor; ligandenaktivierter Calciumkanal
 ROS reaktive Sauerstoffspezies

1.2.3 Die Funktion der Mitochondrien in der ER-Stressreaktion – Verbindungswege zwischen ER und Mitochondrien

ER und Mitochondrien stehen über zahlreiche Mechanismen und Signalwege miteinander in Verbindung. So wird die ER-Stressreaktion an die Mitochondrien übermittelt (Vannuvel et al., 2013). In Abschnitt 1.2.2 wurde bereits die besondere Rolle von Calcium dargelegt.

Außerdem gehört zu diesen funktionellen Verbindungswegen der durch PERK vermittelte Weg der UPR. PERK ist an der Regulation der Proteostase in den Mitochondrien und dem Erhalt ihrer Funktion beteiligt. Von Bedeutung sind zum einen die Mitochondrien-assoziierten ER-Membranen (MAMs), die in der Signalübertragung, vor allem von ROS- Signalen, eine entscheidende Rolle spielen und ein vermehrtes Vorkommen der PERK aufweisen (Rainbolt et al., 2014, Verfaillie et al., 2012). PERK beeinflusst dort über die durch seine downstream-targets vermittelte Kontrolle des Calciumhaushalts und die ROS-Produktion die intrinsische Apoptose (Urta et al., 2013, Rainbolt et al., 2014).

Die Funktion der PERK ist abhängig von der Stärke des ER-Stresses. Die Übertragung der Stressreaktion auf die Mitochondrien kann entweder Signalwege auslösen, die zum Zellüberleben führen, oder solche, die Apoptose initiieren (Rainbolt et al., 2014). Zunächst übt PERK eine stabilisierende Wirkung auf die Kontakte zwischen ER und Mitochondrien aus und sorgt für vermehrte Interaktion zwischen den beiden Organellen. So wird unter anderem der Transfer von Calcium gefördert. Wie in Abschnitt 1.2.2 bereits erläutert, kommt dabei CHOP, dessen Expression als downstream-target von PERK über ATF4 vermittelt wird, eine entscheidende Funktion bei der Induktion proapoptotischer Signalwege in Bezug auf die Mitochondrien zu. Bei chronischem ER-Stress kommt es zu einer Verschlechterung des zellulären Metabolismus und interorganell vermittelt zu einer mitochondrialen Dysfunktion über die Hemmung der Atmungskette sowie die Senkung des ATP-Levels in den Mitochondrien (Rainbolt et al., 2014).

1.2.4 Koexistenz von ER- und oxidativem Stress

Als oxidativer Stress wird der Zustand einer Zelle bezeichnet, in der ein Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies vorhanden ist. Die antioxidativen Mechanismen der Zelle versagen oder sind nicht ausreichend, um die Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auszugleichen (Farooqi et al., 2015). Es sind zwei Mechanismen bekannt, die an der Bildung von ROS beteiligt sind. 25% der freien Radikale werden über die UPR durch das ER gebildet. Hierbei kommt es zwecks Abbau der Proteinüberladung zur oxidativen Proteinfaltung, die ROS als Nebenprodukt generiert. Der übrige Anteil entsteht vor allem in durch ER-Stress geschädigten Mitochondrien. Die mitochondriale Atmungskette stellt dabei die Hauptquelle von ROS dar (Filomeni et al., 2015).

Die Vorgänge in der Zelle bei ER-Stress und oxidativem Stress stehen in engem Zusammenhang miteinander und entscheiden interaktiv über das Zellüberleben. Gelingt die Wiederherstellung der Homöostase nicht, werden apoptotische Signalwege initiiert (Cao and Kaufman, 2014).

Die einzelnen mit der Bildung von ROS zusammenhängenden Signalwege der ER-Stress-Reaktion werden im Folgenden dargestellt:

Zum einen ist die Akkumulation misgefalteter Proteine im ER mit Disulfidbrückenbildung assoziiert. Dabei kommt es bei dem Versuch, die Fehlfaltung rückgängig zu machen, zum Verbrauch von antioxidativem Glutathion sowie reaktiv, durch die Änderung des Redoxstatus im ER, zur Synthese von ROS (Cao and Kaufman, 2014). Die vermehrte Disulfidbrückenbildung und deren Bruch bei Proteinüberladung des ER führen außerdem zu einem hohen Energieverbrauch der Zelle. Der ATP-Mangel aktiviert die mitochondriale Atmungskette, wodurch es wiederum zu ROS-Bildung kommt.

Außerdem spielt die Calcium-Freisetzung aus dem ER bei ER-Stress eine wichtige Rolle. Zusätzlich zu der durch Calcium vermittelten Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien kommt es zur ROS-Produktion.

CHOP führt neben seiner Rolle als proapoptotischer Faktor in der UPR durch die Aktivierung von ERO1 α zu oxidativem Stress, da ERO1 α mittels oxidativer Proteinfaltung zur Hyperoxidation des ER-Lumens und ROS-Generierung beiträgt (Zito, 2015). Außerdem stimuliert es den IP3-Rezeptor und fördert somit den Calciumausstrom aus dem ER (Li et al., 2009).

Umgekehrt können ROS Komponenten der UPR aktivieren (Cao and Kaufman, 2014). So führt oxidativer Stress durch die Induktion verschiedener Kinasen zur Phosphorylierung von eIF2 α (Rainbolt et al., 2014, Wek et al., 2006).

Um die Überproduktion von ROS einzudämmen, werden verschiedene Signalwege der ER-Stressreaktion aktiviert. Für die Hochregulation antioxidativer Enzyme wie Hsp32 und GST (Glutathion-S-Transferase) auf Transkriptionsebene ist die durch PERK vermittelte Phosphorylierung von Nrf2 verantwortlich. PERK übt somit sowohl bei der UPR als auch bei der antioxidativen Stressantwort eine entscheidende Funktion aus (Farooqi et al., 2015).

1.3 Hitzeschockproteine und weitere relevante Marker der Stressreaktion

Für die Charakterisierung und Quantifizierung der durch Efavirenz hervorgerufenen Reaktion in der Zelle analysierten wir verschiedene Marker der Zellphysiologie sowie stressinduzierter Vorgänge. Hierzu gehörten neben Hitzeschockproteinen Marker der ER- und oxidativen Stressreaktion sowie mit Apoptose und Autophagie assoziierte Proteine, deren Erläuterung und Charakterisierung in den folgenden Abschnitten vorgenommen wird.

1.3.1 Hitzeschockproteine

Die Hitzeschockproteine (Hsp70, Hsp90, Hsp60 und Hsp40) werden auch als Chaperone (englisch: Anstandsdamen) bezeichnet. Sie wurden ursprünglich an Bakterien entdeckt und molekularbiologisch untersucht. Hitzeschockproteine spielen eine Rolle bei der Qualitätskontrolle der Zelle, indem sie Fehlfaltungen von Proteinen und Aggregatbildungen verhindern. Einige der Hitzeschockproteine werden konstitutiv exprimiert, andere nur, wenn die Zelle unter Stress gerät (Rassow, 2012, S.467 ff.). Hitzeschockproteine mit großem Molekulargewicht üben ihre Funktion ATP-abhängig aus, die Kleineren arbeiten ohne Energiebedarf (Bruning and Juckstock, 2015).

Hsp90AA1 (Hsp90 α)

Die Proteine der Hsp90 Familie kommen in eukaryotischen Zellen ubiquitär und von allen Chaperonen am häufigsten vor. Von diesen konstitutiv exprimierten Proteinen existieren verschiedene Isoformen. Hsp90 α 1, Hsp90 α 2 und Hsp90 β sind spezifisch für das Zytosol. Hsp90 kann andere Proteine in ihrer Konfiguration stabilisieren sowie den Prozess der Proteinfaltung aufhalten. Außerdem hat es einen Einfluss auf Signaltransduktionswege. Zu den durch Hsp90 stabilisierten Proteinen gehören unter anderem auch Protoonkogene wie p53, die so in ihrer Funktion geschützt werden. Aus diesem Grund sind die Chaperone der Hsp90-Familie seit einiger Zeit Angriffspunkt in der Tumorforschung (Bruning and Juckstock, 2015).

Hsp90B1 (GRP94)

GRP94 ist die im Endoplasmatischen Retikulum residente Isoform der Hsp90 Familie.

Hsp70 Familie

Chaperone der Hsp70 Familie arbeiten sowohl mit Hsp90 Proteinen zusammen als auch eigenständig. Sie sind unter anderem für den Transport sowie die korrekte Faltung von Proteinen und das Vermeiden von Fehlfaltung verantwortlich (Daugaard et al., 2007). Neben Hsp90 interagieren auch Hsp70-Moleküle mit p53, indem sie für dessen korrekte Faltung sorgen. Es existieren verschiedene Formen, die ihre Funktion in den unterschiedlichen Zellkompartimenten ausüben. Hsp70, Hsp72 und Hsc70 sind in Zytosol und Zellkern resident, wohingegen GRP78 im ER zu finden ist.

Die Regulation der Hsp70-Proteine durch das Co-Chaperon Hsp40 verhindert die Aggregation ungefalteter Proteine (Diaz-Villanueva et al., 2015).

HspA1 (Hsp72)

HspA1 gehört nicht zu den konstitutiv exprimierten Chaperonen, sondern wird bei Stressreaktionen der Zelle und vor allem in Krebszellen induziert.

HspA4 (Hsp70)

Hsp70 übt im Wesentlichen zwei Funktionen aus. Es sorgt einerseits mithilfe von Hsp40 schon während der Translation für eine korrekte Proteinfaltung. Durch die Bindung an hydrophobe Bereiche der Polypeptidkette kann Hsp70 außerdem die Aggregation von Proteinen verhindern. So gewährleistet das Hitzeschockprotein unter anderem den Transport von Proteinen durch die mitochondriale Membran hindurch.

HspA5 (Bip/GRP78)

GRP78 verankert die drei Proteine der UPR in stressfreien Situationen in der ER-Membran. Die Dissoziation des stabilisierenden GRP78 von IRE-1 α , PERK und ATF6 erfolgt bei Aktivierung der UPR durch Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen. Neben seiner Rolle bei der Proteinfaltung ist GRP78 am Transport von Proteinen über die ER-Membran sowie an der Regulation von Tumorprogression, Autophagie und Apoptose beteiligt (Kania et al., 2015)

Zudem führt eine vermehrte Expression von GRP78 zur Initiierung der Autophagie mittels Vesikelbildung (Benbrook and Long, 2012).

HspA8 (Hsc70)

Hsc 70 (heat shock cognate protein 70) gehört zur Hsp70 Familie. Es wird konstitutiv exprimiert und ist an der Proteinhomöostase beteiligt. Neben seiner unterstützenden Funktion bei der Proteinfaltung spielt es eine wichtige Rolle bei der Chaperon-vermittelten Autophagie, indem es für den Transport der abzubauenen Proteine zum Lysosom sorgt (Benbrook and Long, 2012). Außerdem ist Hsc70 an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt, die für den Abbau im Proteasom bestimmt sind.

DNAJB1 (Hsp40)

Hsp40 fungiert als unterstützendes Co-Chaperon von Hsp70.

HspD1 (Hsp60)

Hsp60 führt seine Funktion erst nach beendeter Proteinsynthese aus, indem es Fehlfaltungen unter ATP-Verbrauch korrigiert.

1.3.2 XBP1

XBP1 ist ein ER-Stress spezifisches Protein (Liu et al., 2009). Es induziert in seiner aktivierten Form auf Transkriptionsebene die Expression einer Vielzahl von Genen, die für die Proteinfaltung im ER, deren Sekretion, die Qualitätskontrolle und die ERAD von Bedeutung sind (Cao and Kaufman, 2014).

Seine Aktivierung spielt eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen, wie z.B. bei Entzündung, Tumorentstehung oder Neurodegeneration. XBP1 wird neben seiner Funktion in der ER-Stressreaktion eine Rolle in der immunologischen Abwehr und der Plasmazelldifferenzierung sowie eine protektive Rolle bei oxidativem Stress zugeschrieben, indem es die Schädigung von Mitochondrien vermindert (Glimcher, 2010, Liu et al., 2009).

1.3.3 p53 und p-p53

p53 ist ein bedeutsames Tumorsuppressorgen, welches die Intaktheit der DNA überwacht (Rassow, 2012, S.516). Verschiedene Stressoren wie DNA-Schaden, Ischämie-Reperfusion und Nahrungsmangel führen zur Aktivierung von p53 (Marino et al., 2014). Stellt es DNA-Schäden fest, wird der Zellzyklus inhibiert. Gegebenenfalls führt eine nicht erfolgreiche Reparatur der Schäden zur Apoptose der Zelle mittels Aktivierung proapoptotischer Proteine wie bax (Vousden and Lane, 2007). Eine entscheidende Rolle spielt p53 auch bei der Regulation der Autophagie. Durch seine Wirkung auf Transkriptionsebene im Zellkern wird diese positiv, durch die zytoplasmatische Funktion negativ reguliert (Kroemer et al., 2010, Tasdemir et al., 2008). So hemmt physiologisch und konstitutiv exprimiertes p53 autophagische Prozesse, während durch Stress induziertes nukleäres p53 die Autophagie fördert, beispielsweise durch die Induktion von Genen wie Sestrin 2 (Liang, 2010).

Durch die Phosphorylierung des p53 Gens wird seine Funktion reguliert und stabilisiert.

1.3.4 Sestrin 2

Sestrin 2 wird durch p53 induziert und spielt eine wichtige Rolle in der Signalkaskade von mTOR. Indem Sestrin 2 die AMPK aktiviert, wird mTOR gehemmt. Durch die Inaktivierung von mTOR kommt es konsekutiv zur Initiierung von Autophagie.

1.3.5 CHOP

Die Induktion von CHOP führt durch die Dephosphorylierung von eIF2 α zu einer vermehrten Proteinsynthese und zu oxidativem Stress. Durch diese Mechanismen sowie durch die Aktivierung zahlreicher proapoptotischer Faktoren kommt es in der Folge zur Apoptose. Allerdings werden auch Autophagiegene induziert. Eine detaillierte Analyse der Rolle von CHOP in der ER-Stressreaktion findet sich in Abschnitt 1.2.

1.3.6 PARP

PARP ist die Abkürzung für Poly (ADP-ribose) Polymerase. Diese sich im Zellkern befindende Proteingruppe ist für die Detektion und Signalübertragung von DNA-Einzelstrangbrüchen verantwortlich. PARP wird durch Caspasen-Spaltung inaktiviert. Dies geschieht vor allem in Zellen mit erheblichen DNA-Schäden und signalisiert das Vorhandensein von Apoptose.

1.3.7 Hsp32

Hsp32, auch HMOX-1 oder HO-1 genannt, ist ein essentielles Protein im Häm-Katabolismus. Es baut durch seine enzymatische Aktivität Häm ab und führt dadurch zur Bildung von Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und Eisen (Durante, 2010). Hsp32 hat sich als Marker für oxidativen Stress etabliert.

Hsp32 ist unter anderem Teil der adaptiven zellulären Antwort auf ER-Stress. Es wird durch downstream-Moleküle des PERK-Astes der Stressreaktion wie Nrf2 aktiviert und erhält die Replikation der mitochondrialen DNA sowie die Funktion der Mitochondrien durch Übertragung von Signalen des Zellüberlebens aufrecht. So wird unter anderem die ATP-Produktion erhalten und die Zelle durch die Integrität der Mitochondrien vor oxidativem Stress in Folge von ER-Stress geschützt (Zheng et al., 2012). Die Integrität der Mitochondrien spielt eine tragende Rolle für das Zellüberleben im Rahmen der ER-Stressreaktion. Hsp32 stimuliert außerdem Autophagie-Prozesse, um die Zelle vor Stress-induziertem Schaden zu schützen (Ryter and Choi, 2013). Carchman et al. konnten zeigen, dass durch Sepsis induziertes Hsp32 Autophagie über die Aktivierung der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) induziert (Carchman et al., 2011). Eine andere, an Podozyten durchgeführte Studie wies die Aktivierung von AMPK durch Hsp32 nach (Dong et al., 2015)

1.3.8 HIF-1 α

HIF-1 α spielt eine entscheidende Rolle in der Hypoxie-induzierten Autophagie (Ryter and Choi, 2013). Es führt zur Dissoziation von Beclin 1 (Bellot et al., 2009). Die Resistenz gegenüber apoptotischen Vorgängen wird durch sein Vorkommen gefördert (Green et al., 2014).

1.4 Endothelzellmarker

eNOS

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase eNOS ist ein Enzym, das konstitutiv exprimiert wird und Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin

synthetisiert. Sie ist ein spezifischer Marker für Endothelzellen. NO wiederum sorgt unter anderem für die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur sowie die Hemmung der Thrombozytenaggregation (Rassow, 2012, S.634).

VEGF

„Vascular endothelial growth factor“ ist ein vaskulärer Wachstumsfaktor und somit an der Progression von stark vaskularisierten Tumoren beteiligt.

1.5 Housekeeping-genes GAPDH und β -Aktin

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β -Aktin haben sich als Referenzgene etabliert. Sie sind essentiell für die Zellaktivität und zeigen eine weitestgehend gleichbleibende Expression. Daher eignen sie sich gut für die Berechnung von Genexpressionen unter besonderen Bedingungen.

1.6 Antioxidantien

Im Rahmen der Versuche testeten wir den Einsatz von Antioxidantien, um eine mögliche Verminderung der durch oxidativen Stress verursachten Zellschädigung nachzuweisen.

Quercetin:

Quercetin ist eine pflanzliche Chemikalie, die insbesondere mit molekularen Vorgängen in den Mitochondrien interagiert und so beispielsweise unter Beeinflussung der Atmungskette eine antioxidative und schützende Wirkung entfaltet (de Oliveira et al., 2015).

N-Acetylcystein:

Das Thiol N-Acetylcystein (NAC) ist eine sehr vielseitige Substanz mit antioxidativen Eigenschaften. Es fungiert unter anderem als Vorläufer von Cystein für die Glutathion-Synthese. N-Acetylcystein hat diverse biologische Funktionen und wurde deshalb seit seiner Entdeckung vor einigen Jahrzehnten in vielfältiger Weise, z.B. als Mukolytikum und als Antidot für Paracetamolintoxikationen, eingesetzt (Samuni et al., 2013). Es nimmt unter anderem Einfluss auf die Signaltransduktion und den Zellzyklus und ist immunmodulatorisch wirksam (Samuni et al., 2013). Bei durch oxidativen Stress ausgelöstem ER-Stress kann NAC seine antioxidative Wirkung entfalten, um die Stressreaktion einzudämmen. So kommt es durch den Einsatz des Antioxidans konsekutiv zur Suppression der UPR. Dies konnte bereits durch die suppressive

Wirkung von NAC an mit 7-Dehydrocholesterol behandelten Zellen gezeigt werden (Cao and Kaufman, 2014).

1.7 HIV-Infektion und antiretrovirale Therapie

Die antiretrovirale Therapie wurde seit ihrer Entdeckung in den 1980er Jahren stetig weiterentwickelt und hat die Morbidität und Mortalität der HIV-Infektion stark vermindert (Department of Health and Human Services, 2015, S.14). Die verschiedenen Medikamente bieten diverse unterschiedliche pharmakologische Wirkungsmechanismen und wurden hinsichtlich ihrer Potenz, Aktivität, Verträglichkeit und Dosierungsmöglichkeiten verbessert. Durch die Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten kann die Therapie auch multiresistente Viruserkrankungen in den Griff bekommen (Department of Health and Human Services, 2015, S.14). Patienten mit HIV-Infektion können unter Therapie heutzutage eine normale Lebenserwartung erreichen. Durch die daraus resultierende deutlich verlängerte Therapiedauer der in der heutigen Zeit als chronisch anzusehenden Erkrankung liegt der Fokus der Forschung mittlerweile primär bei den Nebenwirkungen und Risikofaktoren der antiretroviralen Substanzen und der Fragestellung, wie diese durch unterschiedliche Kombinationen oder Weiterentwicklung von Wirkstoffen vermindert werden können. Zu den beobachteten Nebenwirkungen gehören Störungen des Fettstoffwechsels (Moyle, 2007) sowie ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Zwischenfälle (Gresele et al., 2012). Für diese wird vor allem die Schädigung von Endothelzellen durch oxidativen Stress verantwortlich gemacht (Mondal et al., 2004). Leber- und Nierenversagen gehören ebenfalls zu den zu erwartenden Langzeiteffekten der Therapie (de Gaetano Donati et al., 2004, Kovari and Weber, 2011, Calza, 2012, Gresele et al., 2012).

Bei vergleichbarer Effektivität weisen die verschiedenen Therapieregimes deutliche Unterschiede im Hinblick auf Nebenwirkungen, Interaktionen mit anderen Medikamenten und Dosierungen auf (Department of Health and Human Services, 2015, S.44-45). Daher muss die Therapie auf jeden einzelnen Patienten individuell ausgerichtet und unter anderem mit seinen Begleiterkrankungen und Medikamentenresistenzen abgestimmt werden. Auch die Schwere der Infektion, die Medikamentenverträglichkeit, das Vorliegen einer Schwangerschaft und die Verfügbarkeit der Medikamente nehmen Einfluss darauf, welche Substanzklassen für die Initialtherapie kombiniert werden (Kryst et al., 2015). Bei bestimmten Begleiterkrankungen bestehen relative Kontraindikationen für den Einsatz einiger Substanzen. So wird von dem Einsatz nicht-nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) bei aktivem Drogenkonsum oder unter Substitutionstherapie abgeraten. Bei replikativer Hepatitis B und C sollte es nicht zum Einsatz von Nevirapin und geboosterten Proteaseinhibitoren (PI) kommen (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.194).

Für die initiale antiretrovirale Therapie einer HIV-Infektion gibt es drei verschiedene empfohlene Kombinationsmöglichkeiten der unterschiedlichen Substanzklassen. In

Tabelle 2 und **Tabelle 3** sind die bevorzugten Kombinationen aus den aktuellen Leitlinien (Stand April 2015) dargestellt (Department of Health and Human Services, 2015, S.71).

Alternative Therapieregimes, die unter bestimmten Voraussetzungen einen Evidenzgrad B aufweisen, sind in **Tabelle 4** dargestellt (Department of Health and Human Services, 2015, S.73). Die noch im Juni 2014 in Anlehnung an die Deutsch-österreichischen Leitlinien aus dem Jahr 2012 (Karow and Lang-Roth, 2015, S.844) in der Primärtherapie gleichwertig empfohlene Kombination zweier nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) mit einem NNRTI (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.188) gilt in den aktuellen Leitlinien aufgrund ihres höheren Nebenwirkungsprofils als alternative Therapiemöglichkeit für Patientengruppen mit bestimmten Vorerkrankungen oder bereits bestehenden Therapien (Department of Health and Human Services, 2015, S.73, 83).

Eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse konnte jedoch zeigen, dass alle dort genannten Therapieregimes eine vergleichbare Effektivität im Hinblick auf die Verhinderung einer Krankheitsprogression sowie auf die Mortalität haben (Kryst et al., 2015).

Vorteile der Kombinationstherapie von zwei NRTI mit einem NNRTI ergeben sich aus der guten Wirksamkeit, einfacher Applikationsweise und einem niedrigen Risiko kardiovaskulärer Komplikationen (Karow and Lang-Roth, 2015, S.844)

Tabelle 2: „Initial Combination Regimens for the Antiretroviral-Naive Patient“ aus: Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents

2 Nukleosidanaloga	+	1 geboosterter Protease-Inhibitor (Proteaseinhibitor plus ein pharmakokinetischer Enhancer wie Ritonavir/Cobicistat)
2 Nukleosidanaloga	+	1 NNRTI
2 Nukleosidanaloga	+	1 Integraseinhibitor

Tabelle 3: Empfohlene Substanzkombinationen in der initialen ART

Nukleosidkombination		Kombinationspartner
Abacavir + Lamivudin	+	Integraseinhibitor: Dolutegravir
Tenofovir + Emtricitabine	+	Integraseinhibitor: Dolutegravir Raltegravir Elvitegravir/Cobicistat
Tenofovir + Emtricitabine	+	Geboosterter PI: Darunavir/Ritonavir

Tabelle 4: Alternative Therapieregimes

Nukleosidkombination		Kombinationspartner
Tenofovir + Emtricitabine	+	NNRTI: Efavirenz Rilpivirin
Tenofovir + Emtricitabine	+	PI: Atazanavir/Cobicistat (PK-Enhancer) Atazanavir/Ritonavir Darunavir/Cobicistat
Abacavir + Lamivudin	+	PI: Darunavir/Cobicistat Darunavir/Ritonavir

1.7.1 Der NNRTI Efavirenz

Efavirenz kam 1998 als dritte Substanz der Erstgenerations-NNRTI auf den Markt und gehört seitdem zur Erstlinientherapie der HIV-Infektion (Best and Goicoechea, 2008, Maggiolo, 2009, Rakhmanina and van den Anker, 2010, Fortin and Joly, 2004, Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.85). Es ist eines der am häufigsten verschriebenen Medikamente der ART weltweit (Kryst et al., 2015).

Efavirenz bindet direkt an die Reverse Transkriptase des Virus und hemmt das Enzym dadurch nicht-kompetitiv über eine Komplexbildung in der Nähe der Bindungsstelle für Nukleoside. Dessen katalytisch aktive Funktion wird gehemmt, die Bindung von Nukleosiden wird blockiert und als Folge die Virusreplikation inhibiert (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.83, Karow and Lang-Roth, 2015, S.799).

Efavirenz wird in der Dreifachtherapie bevorzugt mit Tenofovir und Emtricitabine eingesetzt, um mit maximaler Effektivität zu wirken (Kryst et al., 2015).

In Kombination mit NRTI sind NNRTI hinsichtlich ihrer immunologisch-virologischen Wirkung, das heißt der Suppression der Viruslast, sehr effektiv (Karow and Lang-Roth, 2015, S.799) und bei therapienaiven Patienten mindestens gleichwertig verglichen mit PIs (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.85, 101). Insbesondere bei Unverträglichkeit von PI aufgrund der Nebenwirkungen wie metabolischen Störungen im Sinne eines Lipodystrophie- und metabolischen Syndroms eignet sich eine Therapieumstellung auf NNRTI in der Kombinationstherapie mit zwei NRTI (Karow and Lang-Roth, 2015, S.842, 844).

Die Kombinationstherapie mit Efavirenz stellte bis vor kurzem eine der bevorzugten Therapieoptionen dar (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.188). Dass sie nunmehr Teil eines alternativen Therapieregimes in der HIV-Therapie ist, liegt unter anderem an den teils ausgeprägten Nebenwirkungen, die das zentrale Nervensystem (ZNS) betreffen (Department of Health and Human Services, 2015, S.73,79). Es wurden Schwindel,

Benommenheit und Schlafstörungen sowie Alpträume beobachtet (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.86). Auch Depressionen können auftreten. In kürzlich durchgeführten Studien konnte zudem ein erhöhtes Vorkommen von Suizidalität bei Patienten unter Efavirenz-Therapie nachgewiesen werden (Department of Health and Human Services, 2015, S.86).

Aufgrund dieses ausgeprägten neuropsychiatrischen Nebenwirkungsprofils bei bis zu zwei Drittel der Patienten (Karow and Lang-Roth, 2015, S.799) wird der Einsatz von Efavirenz nicht bei Psychosen oder anderen ZNS-Erkrankungen empfohlen. Zusätzlich zu den ZNS-Nebenwirkungen kann es zum Auftreten einer Gynäkomastie kommen (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.86, 194). Ein Arzneimittelexanthem entsteht in bis zu 5% der Fälle (Karow and Lang-Roth, 2015, S.799). Bei schwerer Leberinsuffizienz ist der Einsatz von Efavirenz kontraindiziert (Karow and Lang-Roth, 2015, S.800). Eine weitere wichtige Kontraindikation stellt das erste Trimester einer Schwangerschaft dar, da in verschiedenen Studien die Teratogenität der Substanz nachgewiesen wurde (Department of Health and Human Services, 2015, S.86). Zudem gehört die schnelle Resistenzentwicklung zu den Nachteilen der Therapie (Fortin and Joly, 2004, Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.85).

Im Gegensatz zu der in den aktuellen Leitlinien eingeschränkten Empfehlung des Einsatzes von Efavirenz in der Initialtherapie, kommt die kürzlich von Kryst et al. durchgeführte Metaanalyse zu dem Ergebnis, dass die Kombinationstherapie mit Efavirenz als Primärtherapie unter Berücksichtigung der ZNS-Nebenwirkungen und Kontraindikationen weiterhin empfehlenswert ist (Kryst et al., 2015). Die Empfehlung basiert auf verschiedenen im Folgenden erläuterten Faktoren.

Vorteile in der Kombinationstherapie mit einem NNRTI wie Efavirenz ergeben sich durch die geringe Pillenzahl mit der Möglichkeit der einmal täglichen Gabe durch die lange Halbwertszeit (Rakhmanina and van den Anker, 2010) sowie die starke, effektive Suppression der Viruslast (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.79, 198). Zudem konnte im Gegensatz zu Integrase-Inhibitoren bereits eine gute Langzeitverträglichkeit nachgewiesen werden, da die Letzteren erst 2007 auf den Markt kamen (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.102, Fortin and Joly, 2004). Der Einsatz von Efavirenz-basierten Therapieregimes erfolgt nach wie vor häufig dort, wo die finanziellen Mittel beschränkt sind (Nanzigu et al., 2012).

Ein großes und wichtiges Patientenkollektiv, bei dem die Gabe von Efavirenz indiziert ist, stellen mit Tuberkulose koinfizierte Patienten dar. Die Interaktion zwischen Efavirenz und dem in der tuberkulostatischen Therapie eingesetzten Rifampicin über das CYP3A4-Abbausystem der Leber ist geringer als bei Proteaseinhibitoren (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.78). Allerdings ist Efavirenz ein Substrat von CYP2B6 sowie zu einem geringen Anteil auch von CYP3A4 (Stahle et al., 2004) und daher potentiell anfällig für Interaktionen mit anderen Medikamenten, die durch die gleichen Enzyme abgebaut werden (Department of Health and Human Services, 2015, S.86). Die Metabolisierung über das CYP2B6-Enzym ist einer der Hauptgründe für die großen interindividuellen Unterschiede hinsichtlich Plasmakonzentration und Toxizität

(Stahle et al., 2004, Rakhmanina and van den Anker, 2010, Damronglerd et al., 2015). Die Standarddosis von Efavirenz beträgt 600 mg pro Tag. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die Applikation einer geringeren Dosis von 400 mg im Vergleich zur bisherigen Standarddosis getestet. Dabei ergab sich unter anderem ein selteneres Vorkommen von mit Efavirenz in Zusammenhang stehenden Nebenwirkungen (Dickinson et al., 2015). Hinsichtlich der virologischen Antwort ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Derzeit wird an der Weiterentwicklung des Wirkstoffs gearbeitet, um eine langwirksame Substanz zu generieren. Diese Nanodispersion brächte bei besserer Zellakkumulation Vorteile für die Patienten durch eine noch seltenere Gabe und könnte auch weniger toxisch sein als die Ursprungssubstanz (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.139).

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die zu den oben genannten Nebenwirkungen führen, sind Bestandteil dieser Doktorarbeit und werden im Diskussionsteil erörtert.

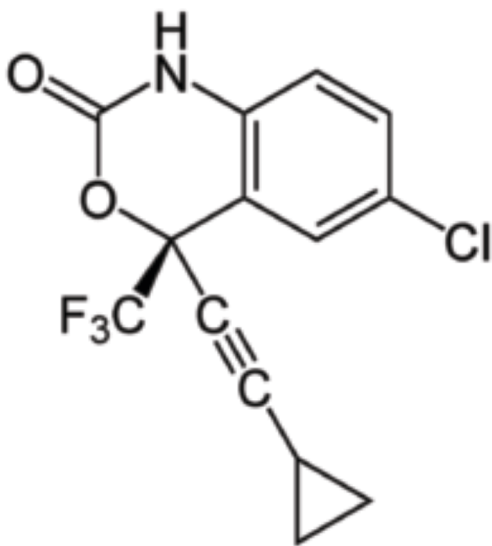


Abbildung 8: Strukturformel von Efavirenz

1.7.2 Der Proteaseinhibitor Nelfinavir

Nelfinavir kam 1998 als vierter Proteaseinhibitor auf den Markt, wird jedoch aufgrund des hohen Nebenwirkungsprofils heute kaum noch eingesetzt. Die Zulassung als Medikament in der ART ist seit Januar 2013 erloschen (Hoffmann and Rockstroh, 2014, S.97). Es treten vor allem gastrointestinale Nebenwirkungen wie Diarrhoe auf (Karow and Lang-Roth, 2015, S.800).

Seit einiger Zeit wird die Substanz allerdings off-label in der Tumorthherapie eingesetzt (Koltai, 2015). Neben dem zytotoxischen Effekt auf Brustkrebszellen konnte eine wachstumshemmende und chemosensitivierende Wirkung an Ovarial- und Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Bruning et al., 2010, Bruning et al., 2013). Auf die Repositionierung von Nelfinavir in der Tumorthherapie wird im Diskussionsteil weiter eingegangen.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die molekularbiologisch-onkologische Arbeitsgruppe in der Frauenklinik Maistraße der LMU München, wo diese Doktorarbeit angefertigt wurde, forscht seit längerem mit dem Schwerpunkt der Medikamentenrepositionierung. Dabei wird vorrangig der Effekt von nicht-onkologischen Medikamenten auf Tumorzellen untersucht, bei denen das Nebenwirkungsspektrum auf mögliche antitumorale Eigenschaften hinweist. Vor dem Beginn der vorliegenden Arbeit an Efavirenz beschäftigte sich die Arbeitsgruppe beispielsweise mit der Repositionierung von Nelfinavir in der Tumorthherapie, welches zurzeit aufgrund vielversprechender vorklinischer Daten in mehreren klinischen Studien auf seine Nutzbarkeit als Krebsmedikament getestet wird.

Für den nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI) Efavirenz, der einen häufigen Kombinationspartner in der medikamentösen Behandlung HIV-Infizierter darstellt, wurden in der Vergangenheit generell zellschädigende Effekte, aber auch speziell kardiovaskuläre und endotheliale Dysfunktion als Nebenwirkung nachgewiesen. In unserem Labor wurden zunächst Versuche mit Efavirenz an Mammakarzinomzellen durchgeführt, um die Wirkmechanismen der Substanz auf Tumorzellen zu testen. Endothelzellen wurden für diese Versuche als Kontrollzellen herangezogen. Tatsächlich konnte an den malignen Mammakarzinomzellen Beeinträchtigungen durch Efavirenz gezeigt werden, jedoch fiel während der Untersuchungen auf, dass die als nicht-maligne Kontrollzellen hinzugezogenen Endothelzellen viel sensitiver auf Efavirenz reagierten als die eigentlichen Krebszellen. Somit wurde das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die endothelschädigende Wirkung von Efavirenz gelegt, wobei einerseits zellbiologische Untersuchungen zum Nebenwirkungsprofil von Efavirenz durchgeführt wurden, andererseits aber auch mögliche antiangiogene Aspekte für die Tumorthherapie berücksichtigt werden konnten.

Zur methodischen Analyse machten wir uns nach Kultivierung der Zellen vor allem Methoden wie Western Blot, RT-PCR, Real-time PCR und Immunfluoreszenz zu Nutze. Wissenschaftlich wurde hauptsächlich der Aspekt des Zellstresses, der Apoptose und der Autophagie untersucht.

Als Kernpunkte der Fragestellung ergaben sich somit:

- Welche molekular- und zellbiologischen Mechanismen liegen der Endothelzellschädigung durch Efavirenz zugrunde?
- Ab welcher Konzentration der Substanz und unter welchen Umständen erfolgt der Übergang von durch Efavirenz induzierten adaptiven Mechanismen des Zellüberlebens zu einer zellschädigenden Wirkung?
- Welche therapeutischen Möglichkeiten können in Erwägung gezogen werden, um das Nebenwirkungsprofil und die Toxizität von Efavirenz zu vermindern?
- Inwiefern verstärkt sich die zytotoxische und prooxidative Wirkung auf Endothel- und Tumorzellen durch den gleichzeitigen Einsatz einer Kombinationssubstanz wie Nelfinavir?
- Durch welche zugrundeliegenden Mechanismen und in welchem Ausmaß könnte die endothelzellschädigende Wirkung von Efavirenz beim Einsatz der Substanz in der antiangiogenen Therapie von stark vaskularisierten Tumoren von Nutzen sein?
- Wie könnte durch den Einsatz einer Kombinationssubstanz die Effektivität von Efavirenz in der Tumorthherapie gesteigert werden?

2. Material und Methoden

Aus Gründen der Übersichtlichkeit findet sich die detaillierte tabellarische Auflistung der verwendeten Geräte, Materialien und Reagenzien sowie ihrer jeweiligen Bezugsquelle im Anhang dieser Arbeit.

2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen in Kultur gehalten (37°C, 5% CO₂, 100% relative Luftfeuchtigkeit). EA.hy926 und MCF-7-Zellen wurden in DMEM mit 10 % Rinderserumalbumin (Biochrom, Berlin), die HUVEC-Zellen in speziellem Endothelzellmedium (Provitro, Berlin) kultiviert.

In den Kammern der Zellkulturplatten wurden jeweils 5×10^5 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden konnte der Mediumwechsel mit Applikation der Chemikalien erfolgen.

Verwendete Zelllinien

HUVEC: Provitro, Berlin

Nabelschnurvenenendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells)

EA.hy926: immortalisierte Endothelzelllinie, zur Verfügung gestellt von G. Multhoff, Universitätsklinik der TU München, Radiologische Onkologie

Diese humane Endothelzelllinie wurde 1983 von Dr. Edgell in North Carolina (USA) durch die Fusion von Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) und Adenokarzinomzellen der Lunge (A549, alveoläre basale Epithelzellen) etabliert (Aranda and Owen, 2009).

Die Zelllinie besitzt endothelzellspezifische Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Angiogenese, Homeostase, Blutdruckregulation und Entzündungsreaktion. Sie exprimiert den von-Willebrand-Faktor (vWF).

MCF-7: epitheliale Brustkrebszelle, über atcc.org (Informationen: mcf7.com)

MCF-7 steht für Michigan Cancer Foundation 7. Diese Zelllinie stammt ursprünglich von einer 69-jährigen Frau und wurde im Jahr 1970 aus amputiertem adenokarzinomatösen Brustgewebe isoliert und kultiviert. Die Zellen besitzen typische Eigenschaften des weiblichen Brustepithels wie Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Zytoplasma.

2.2 Endotheliale Quervernetzung

Zur Testung der sogenannten Tube formation oder Pseudotube-Bildung von Endothelzellen wurden in einen Teil der Vertiefungen der Angiogenese-Objektträger 10 µl des Geltrex® gegeben. Anschließend wurden die Endothelzellen mit einer Konzentration von 500 Zellen pro Vertiefung sowohl auf die mit extrazellulären Matrixproteinen ausgekleideten Vertiefungen als auch auf diejenigen mit Glasoberfläche ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit zur Anheftung und zum Anwachsen der Zellen wurde Efavirenz durch den Austausch des Mediums appliziert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation konnten die Zellen mit dem Immunfluoreszenzmikroskop fotografiert werden.

2.3 MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde jeweils dreifach zur Ermittlung des Zellüberlebens im zeitlichen Verlauf nach der Applikation von Chemikalien in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Messbare Ergebnisse erhält man durch die Reduktion des MTT zu

Formazan, die sich in einem Farbumschlag von gelb zu blau-violett äußert. Die Analyse erfolgt mithilfe eines ELISA Analysegerätes.

Zunächst wurden 1×10^4 Zellen in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät. Nach 72-stündiger Inkubation der Zellen unter Standardbedingungen wurden 20 μ l einer MTT-Stammlösung (enthält 5mg/ml PBS) in 200 μ l Medium hinzugegeben. Das nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit entstandene, nicht wasserlösliche Sediment wurde in 100 μ l DMSO aufgelöst, um es mithilfe des ELISA-Verfahrens bei einer Wellenlänge von 595 nm zu analysieren.

Die Mittelwerte der drei Ergebnisse sowie die jeweilige Standardabweichung wurden berechnet. Die statistische Auswertung in Form des Mann-Whitney U Tests erfolgte mithilfe des SPSS 21 Programms.

2.4 Western Blot Analyse

Zunächst werden die Proteinlysate hergestellt. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Efavirenz unter Standardbedingungen wurde das Medium abpipetiert, um RIPA-Puffer dazuzugeben. Anschließend wurden die Schalen für zwanzig Minuten eingefroren. Durch mehrmaliges Pipettieren konnten die Zellen nun von der Schale abgelöst und in leere Zentrifugenröhrchen (1,7 ml Volumen) überführt werden. Bei 13.000-20.000 Umdrehungen/min wurden diese zentrifugiert, um den Überstand schließlich mit dem Roti®-Load Puffer zu mischen. 13-30 μ l dieser Lysate wurden nun in die einzelnen Taschen der Elektrophorese-Gele pipetiert, die bereits in das Tank-Blotting-System eingespannt und mit dem im Verhältnis 1:10 verdünnten SDS-haltigem Puffer umgeben waren. Der Elektrophorese-Vorgang dauerte ca. 40 Minuten. Danach wurden die Gele herausgetrennt, zwischen Polster und Filterpapier auf eine PVDF-Membran gelegt und in die Blotting-Kammer gesteckt. Durch erneuten Anschluss an die Stromquelle wurden so innerhalb einer Stunde die Proteine von dem Gel auf die Membran übertragen.

Im nächsten Schritt mussten die Gele 3 bis 4 Stunden in Milchpulver geblockt werden, bevor die primären Antikörper, ebenfalls in Milchpulver gelöst, auf die Membranen gegeben werden konnten. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurde daraufhin am nächsten Tag der Primärantikörper entfernt, die Membran zweimalig mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper (Mouse/Rabbit) appliziert. Nach etwa 2 Stunden wurden die Membranen erneut mit PBS gewaschen und die Elektrophorese-Banden schließlich mit der Färbelösung durch das Hervorheben der in den Sekundärantikörpern enthaltenen alkalischen Phosphatase entwickelt.

Tabelle 5: Primärantikörper

Name	Herkunft	Klonnummer	Firma
Hsp32	Mouse	MAB3776	RnD systems, Darmstadt
Hsp70	Mouse	W27	SantaCruz Biotech, Heidelberg
Hsp90 α/β	Mouse	F8	SantaCruz Biotech, Heidelberg
Bip/GRP78	Rabbit	H-129	SantaCruz Biotech, Heidelberg
phospho-p53 (Ser-15)	Mouse	#9284	Cell Signaling Technology, NEB, Frankfurt
p53	Mouse	DO1	SantaCruz Biotech, Heidelberg
PARP	Rabbit	#9542	Cell Signaling Technology, NEB, Frankfurt
eNOS	Rabbit	#9572	Cell Signaling Technology, NEB, Frankfurt
GAPDH	Mouse	0411	SantaCruz Biotech, Heidelberg

Sekundärantikörper (AP-gekoppelt): Cell Signaling, Frankfurt, über cellsignal.com

2.5 RNA-Isolierung

Die jeweiligen Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubationszeit folgte die Applikation der Medikamente, die für sieben Stunden belassen wurden um Veränderungen in der Expression der mRNA zu induzieren.

Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des Nucleo-Spin RNA Clean-ups. Diese Methode der RNA-Präparation zeichnet sich durch ihre kurze Dauer und unkomplizierte Einzelschritte aus und war mit Hilfe der Herstelleranleitung problemlos durchzuführen.

Zunächst wurden $2,5 - 5 \times 10^5$ Zellen in 6-well-Zellkulturschalen ausgesät und 24 Stunden lang inkubiert, um das Anwachsen in der Schale zu gewährleisten. Nach Applikation des jeweiligen Medikamentes folgte eine weitere Inkubationszeit von 6 bis 8 Stunden, bevor die RNA-Präparation laut Handbuch des RNA extraction kit begann.

Im ersten Schritt wurden die Zellen durch das Hinzupipettieren von 300 μ l RA1-Puffer und darauffolgendes mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von den einzelnen Schalen abgelöst. Im zweiten Schritt wurden 300 μ l Ethanol dazu pipetiert, um dann das gemischte Lysat in eine RNA-Bindungssäule zu übertragen. Diese wurde bei $8000 \times g$ für 30 s zentrifugiert und in ein neues Sammelgefäß überführt. Im ersten Waschvorgang wurden 250 μ l des RA2-Puffers auf die Membran gegeben und erneut bei $8000 \times g$ für 30 s zentrifugiert. Der zweite Waschvorgang bestand in der Applikation von 700 μ l des

RA3-Puffers und nochmaliger Zentrifugation bei 8000 x g für 30 s. Im abschließenden Waschvorgang wurden 350 µl des RA3-Puffers hinzugegeben und die Säulen für 2 min bei 8000 x g zentrifugiert. Zur Elution der RNA erfolgte die Gabe von 30-50 µl RNase-freiem Wasser auf die Membran und eine erneute Zentrifugation bei 8000 x g für eine Minute.. Die gewonnene RNA wurde sofort auf Eis gestellt.

2.6 Generierung von cDNA

Für die Umschreibung der RNA zu cDNA nutzte ich das Protokoll aus dem Kapitel „Analysis of Nelfinavir-Induced Endoplasmic Reticulum Stress“ in „Methods in Enzymology“ (Bruning, 2011).

Nach Zugabe von 0,75 µl der OligodT-Lösung zu 16,5 µl der gewonnenen RNA wurde dieser Mix zunächst für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend sofort mit Eis gekühlt. Im nächsten Schritt wurden 5µl Reaktionspuffer, 1,25 µl Nukleotidmix, 0,5 µl Ribonukleaseinhibitor und 0,5 µl Reverse Transkriptase hinzupipetiert. Die Umschreibung wurde durch erneute einstündige Inkubation bei 42°C fertiggestellt.

Gesamtvolumen cDNA: $16,5 + 1,75 + 7,25 = 25,5 \mu\text{l}$

2.7 PCR

Real-time PCR

Die Methode der Real-time PCR wurde zur quantitativen Erfassung der gewonnenen DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz mit der zu analysierenden cDNA wurde wie folgt hergestellt: In je eine Vertiefung der Real-time PCR Analyse-Platte wurden 10 µl „Fast Supermix“, 8 µl Wasser, 1 µl des jeweiligen Primermixes sowie 1 µl der cDNA gegeben, gemischt und anschließend mit Folie abgedeckt, um das Verdunsten der Lösung zu verhindern. Nach der Messung im Real-time PCR-Gerät mit zeitgleicher Detektion von PCR-Produkten durch FAM und TAMRA Farbsonden in 40 Zyklen erfolgte die Analyse der einzelnen Kurven mithilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode und mithilfe der β -Aktin-Werte als Referenz.

Gesamtvolumen Real-time PCR-Reaktionsansatz: $10 \mu\text{l} + 8 \mu\text{l} + 1 \mu\text{l} + 1 \mu\text{l} = 20 \mu\text{l}$

RT-PCR

Um den Reaktionsansatz zu erhalten, wurden in einem Reaktionsgefäß die für die Vervielfältigung der cDNA notwendigen Substanzen gemischt. 1 µl der gewonnenen cDNA wurde zu einem Reaktionsansatz aus 12,5 µl des PCR Master Mixes, 10 µl Wasser und 1 µl Primer Mix gegeben. Im Thermocycler wurden die Reaktionsgefäße

2. Material und Methoden

anschließend entsprechend der Vorgaben für die zu untersuchenden Primer amplifiziert. Für die Mehrzahl der untersuchten Primer waren 29 Zyklen und eine Annealingtemperatur von 57°C vorgeschrieben.

Gesamtvolumen RT-PCR-Reaktionsansatz: 12,5 µl + 10 µl + 1 µl + 1 µl = 24,5 µl

Tabelle 6: Primersequenzen. Etabliert von Dr. rer. nat. Ansgar Brüning, synthetisiert über biomers.net; standardisierte Konzentration durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser. Nomenklatur: <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>

Gen	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (3'-5')	PCR Produkt (bp)	Zyklen/ Annealing-Temperatur
HspA1A	GTGACCTTCGACA TCGATGCCAACG	CTGACCCAGACCCT CCCTTGGGAC	475	29/57°C
HspA1 short	GACAAGTGTCAAG AGGTCAT	CTGACCCAGACCCT CCCTTGGGAC	187	
HspA4	GAGGACCAGTATG ATCATTGG	GTCTGAATCCGAAG GCACAGCTG	336	32/57°C
HSPA5	GCTGTAGCGTATG GTGCTGC	ATCAGTGTCTACAA C TCATC	794	29/57°C
HspA8	CAACCATGTCCAA GGGACCTG	CCAAGGTAGGCTTC TGCAATTTC	412	25/57°C
Hsp90AA1	AACTCAGCCTTTG TGGAACG	GTCTACTTCTTCCAT GCGTG	687	29/57°C
Hsp90B1	GGCTGTGGTGTCT CAGCGCC	CAGGATCCAAATGG TGAGAG	540	29/57°C
HSPD1	AGACAGAGTTACA GATGCCC	GAACATGCCACCTC CCATAC	466	29/57°C
HMOX1	GGCCGGATGGAGC GTCCGCAAC	CATGGCATAAAGCC CTGCAGC	870	29/57°C
DNAJB1	CAACGTGAACTTT GGCCGCTC	GTGGGGACGTTTAC TGTGCAGC	399	29/57°C

2. Material und Methoden

TP53	TGGTAATCTACTG GGACGGA	GTCTGAGTCAGGCC CTTCTG	397	29/57°C
CYP2B6	GCCATACACAGAG GCAGTCATC	GCAGGTCTCTCAGA GGCAG	545	29/57°C
XBP1	GAAGAGGAGGCG GAAGCCAAG	CTGATATCCTGTTG GGCATTC	163	
Sestrin 2	CCAGGCAGCCTAT AGCCTCAC	CCGTGCCATCACCC GCTACATGACC	340	32/57°C
β-Aktin	GGAGAAGCTGTGC TACGTCG	CGCTCAGGAGGAGC AATGAT	366	29/57°C

Tabelle 7: Probe-Sequenzen

Gen	Sequenz
HspA1	GAGCTGGAGCAGGTGTGTAAC
β-Aktin	CCTTCCTGGGCATGGAGTC
XBP1	GCTGAGTCCGCAGCAGGTG
Hsp32	GGTCCTTACACTCAGCTTTC

2.8 DNA-Gelelektrophorese

Für die Auswertung der PCR wurden je 16 µl der Probe mit der amplifizierten cDNA nach Hinzumischen des Ladepuffers (5% Glycerol, 10 mM Tris, pH 7.5, 0.05% Bromophenolblau) in die Taschen des Elektrophoresegels pipettiert. Nachdem die Elektrophoresebanden 15 Minuten unter Stromfluss durch das Gel gewandert waren, konnte die optische Analyse erfolgen. Dies geschah mithilfe des „Molecular Imagers“ sowie der dazugehörigen Software.

2.9 Zellfärbung und Immunfluoreszenzmikroskopie

Zum optischen Nachweis der durch Efavirenz induzierten Autophagievorgänge in EA.hy926 und HUVEC Zellen wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie genutzt. Die Zellen wuchsen zunächst 24 Stunden auf Deckgläsern an, bevor sie für weitere 24 Stunden mit Efavirenz inkubiert wurden. Es schloss sich eine 15-minütige

Inkubationszeit mit 1 µg/ml MDC in Zellkulturmedium an. Nach zweifachem Waschvorgang mit Zellkulturmedium konnten die Zellen mithilfe eines DAPI-Filters in der Fluoreszenzmikroskopie fotografiert werden. Der Phasenkontrast wurde ebenfalls dargestellt.

Eine Alternative zum Nachweis von Autophagie in der Spätphase stellte die Färbung der Zellen mit dem „Cyto-ID Autophagy staining kit“ dar. Hierfür wurden die Zellen 20 Minuten in Zellkulturmedium mit der Cyto-ID Autophagy Staining kit Lösung in 1:1000-facher Verdünnung inkubiert, bevor die mikroskopische Analyse erfolgte.

2.10 FACSscan Analyse

Die FACSscan Analyse und der fluoreszierende Farbstoff DCFH-DA dienten der Detektion von ROS. Die EA.hy926 Zellen wurden zunächst für 24 Stunden in 6-Kammer-Zellkulturschalen mit 250000 Zellen pro Vertiefung bebrütet. Anschließend erfolgte die Applikation von Efavirenz oder Nelfinavir zum Nährmedium für 4 oder 24 Stunden. Nach 45-minütiger Inkubation mit 1µg/ml DCFH-DA wurden die Zellen mittels Trypsinisierung von der Schale abgelöst und der Analyse zugeführt. Ein 575 nm Filter detektierte das grüne Fluoreszenzsignal.

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei Martina Rahmeh für die Durchführung der FACSscan Analyse bedanken.

2.11 Statistische Analyse

Die MTT-Analysen wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Es folgte die Berechnung der Mittelwerte inklusive der Standardabweichung, bevor die berechneten Werte der statistischen Analyse (Mann-Whitney U test) durch das SPSS 21 Programm zugeführt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Endothelzellen

3.1.1 Inhibierung der endothelialen Quervernetzung und Vakuolisierung

Um den Effekt von Efavirenz auf die endothelzellspezifischen Eigenschaften zu testen, wurden Zellen sowohl in Angiogenesekammern mit Glasoberfläche als auch in mit extrazellulären Matrixproteinen ausgekleideten Angiogenesekammern ausgesät.

3. Ergebnisse

Endothelzellen und immortalisierte Endothelzellen bilden auf extrazellulären Matrixproteinen pseudokapilläre Strukturen, sogenannte Pseudotubes aus. Durch das Aussäen von HUVEC- und EA.hy926-Zellen auf Matrigel konnte dieses Phänomen sowie die Auswirkungen von steigenden Efavirenz-Konzentrationen auf die Strukturausbildung untersucht werden. Während bei einer Applikation von 5 µg/ml die netzartige Pseudotube-Struktur der HUVEC-Zellen weitgehend bestehen blieb, wurde sie bei 10 µg/ml bereits teilweise und bei 15 µg/ml vollständig zerstört (**Abbildung 9A**). Die Durchführung des Versuchs mit der immortalisierten HUVEC-Zelllinie EA.hy926 erbrachte ähnliche Ergebnisse.

Ein zytotoxischer Effekt von Efavirenz wurde an den gleichen Zelllinien nachgewiesen, nachdem sie unter Standard-Zellkulturbedingungen auf der Glasoberfläche der Angiogenesekammern ausgesät und behandelt worden waren.

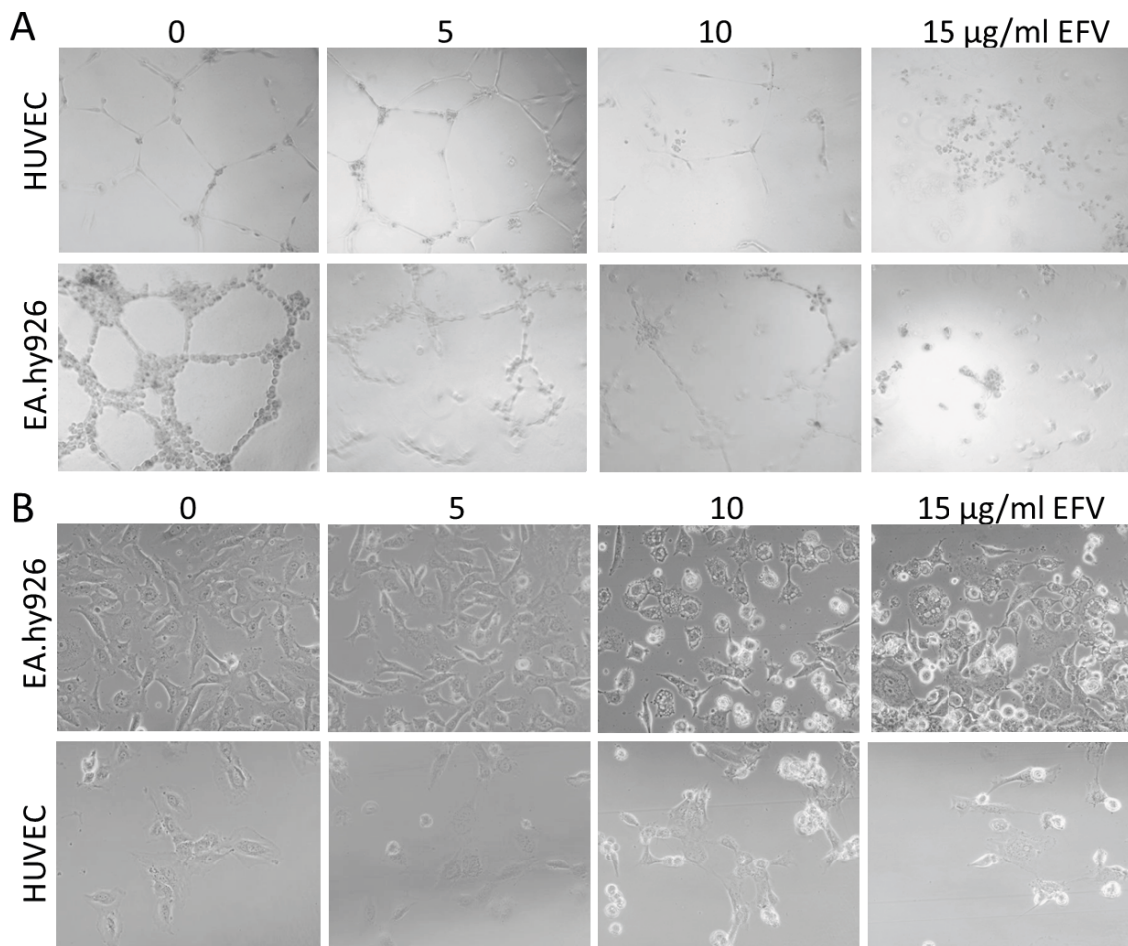


Abbildung 9: Inhibition der für Endothelzellen typischen Pseudotube-Bildung durch Efavirenz. HUVEC und EA.hy926 Zellen wurden in Angiogenesekammern mit einer Konzentration von 500 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Im ersten Teil des Versuchs auf extrazellulären Matrixproteinen (10 µl Geltrex basement membrane matrix-coated surfaces pro Vertiefung; LifeTechnologies, Karlsruhe) (**A**), im zweiten Teil des Versuchs auf einer unbeschichteten Plastikoberfläche (**B**). Nach 24 Stunden Inkubation unter Standard-Zellkulturbedingungen wurden die verschiedenen Efavirenz-Konzentrationen durch Wechsel des Nährmediums appliziert. Die Phasenkontrastmikroskopie erfolgte nach weiterer 24-stündiger Inkubation. (**A**: 10x Objektiv; **B**: 40x Objektiv)

In Zusammenhang mit dem stärker adhäsiven Wachstum auf der Glasoberfläche wurde intrazelluläre Vakuolisierung bei den mit 10 und 15 µg/ml EFV bebrüteten Zellen sichtbar (**Abbildung 9B/ Abbildung 10**). Der zytotoxische Effekt von Efavirenz spiegelte sich bei diesen Konzentrationen außerdem in der partiellen Ablösung der Zellen von der Glasoberfläche wider (**Abbildung 9B**).

3.1.2 Induktion von Autophagie, oxidativem und ER-Stress durch Efavirenz

Autophagie

Da intrazelluläre Vakuolisierung ein deutliches Zeichen für Makroautophagie ist und um die durch Efavirenz hervorgerufenen Zellveränderungen genauer beschreiben zu können, untersuchten wir die HUVEC und EA.hy926 Zellen mithilfe des fluoreszierenden Autophagie-Markers MDC sowie in der Phasenmikroskopie. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml Efavirenz wurde die deutlich intensivere Färbung der Zellstrukturen mit MDC im Fluoreszenzmikroskop sichtbar, wodurch die Induktion von Autophagie durch die Applikation erhöhter Konzentrationen von Efavirenz bestätigt wird. Im Gegensatz zu den in der Phasenmikroskopie (**Abbildung 10A**) durch die Vakuolisierung erkennbaren großen Autophagosomen in der Spätphase wurden durch den Farbstoff MDC primär Autophagosomen in einer früheren Phase detektiert.

Die durch exzessive Autophagievorgänge entstandenen Autophagosomen in der Spätphase konnten durch die Applikation von Cyto-ID Autophagie Färbelösung als alternativem Farbstoff dargestellt werden, indem große intrazelluläre Vakuolen sichtbar gemacht wurden (**Abbildung 10D**).

ER-Stress

EA.hy926

Wir testeten das Vorkommen von Markern des ER-Stresses, oxidativen Stresses sowie der UPR an EA.hy926 Zellen. Da die höchste Serumkonzentration von Efavirenz standardmäßig bei ca. 4 µg/ml liegt, testeten wir Konzentrationen von 2-10 µg/ml, um so interindividuelle Schwankungen mit einzuschließen. Diese Schwankungen beruhen auf der unterschiedlich schnellen Metabolisierung der Substanz durch das CYP2B6-Enzym der Leber. Als Methoden boten sich die Western Blot Analyse sowie die semiquantitative RT-PCR an.

Das Hitzeschockprotein Hsp90 und die Stickstoffmonoxid-Synthase eNOS werden konstitutiv in Endothelzellen exprimiert und zeigten daher keine Hochregulation im Western Blot (**Abbildung 11A**). Dahingegen waren der oxidative Stress-Marker Hsp32, der ER-Stress-Marker Bip (GRP 78) sowie das Hitzeschockprotein Hsp70 bereits bei

3. Ergebnisse

pharmakologisch relevanten Serumkonzentrationen erhöht. Bei Serumkonzentrationen von 4 $\mu\text{g/ml}$ und höher konnte eine Induktion von p53 und dessen durch Phosphorylierung aktivierter Form nachgewiesen werden. Bei hohen Efavirenz-Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ wurde im Western Blot eine PARP-Spaltung als Hinweis auf Apoptose-Vorgänge in der Zelle sichtbar.

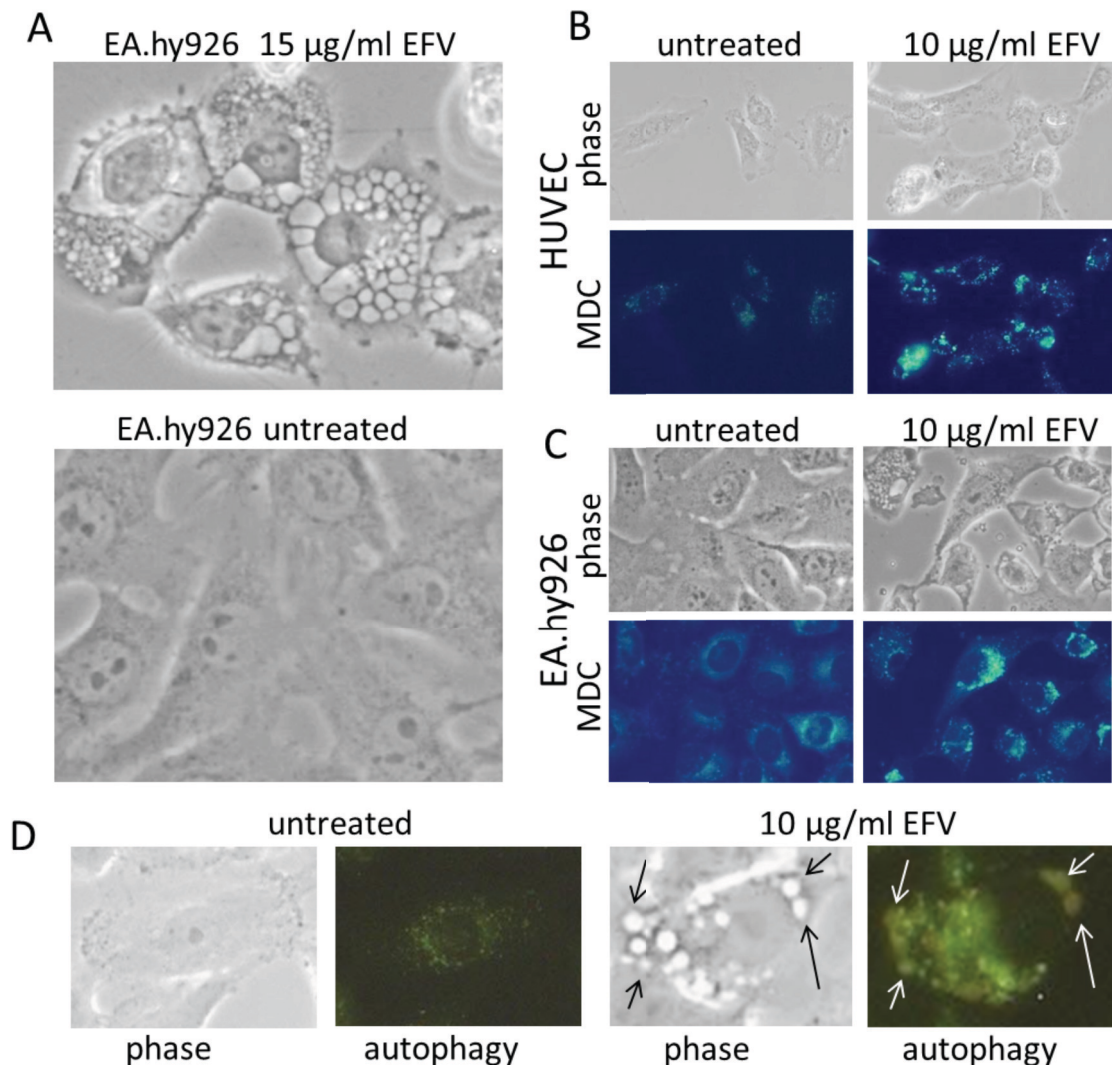


Abbildung 10: Induktion von Autophagie durch Efavirenz. **A:** Phasenkontrastmikroskopie von auf Deckgläsern ausgesäten EA.hy926 Zellen, mit und ohne Zugabe von 15 $\mu\text{g/ml}$ Efavirenz über 24 Stunden. **B/C:** HUVEC und EA.hy926 Zellen wurden in einer Dichte von 5000 Zellen pro Vertiefung in Zellkulturschalen mit 8 Vertiefungen ausgesät. Nach 24 Stunden folgte eine 15-minütige Inkubationszeit mit 1 $\mu\text{g/ml}$ MDC in Zellkulturmedium, um die Zellen anschließend in der Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen (40x Objektiv). In der Abbildung sind die Fluoreszenz- und die Phasenkontrastmikroskopie gegenübergestellt. **D:** Hier wurden die mit Efavirenz behandelten Zellen anschließend mit Cyto-ID Autophagie Färbelösung in Zellkulturmedium für 30 Minuten inkubiert. In der Fluoreszenzmikroskopie wurden dadurch große intrazelluläre Vakuolen (Pfeile) sichtbar, die durch exzessive Autophagievorgänge gebildete Autophagosomen darstellen.

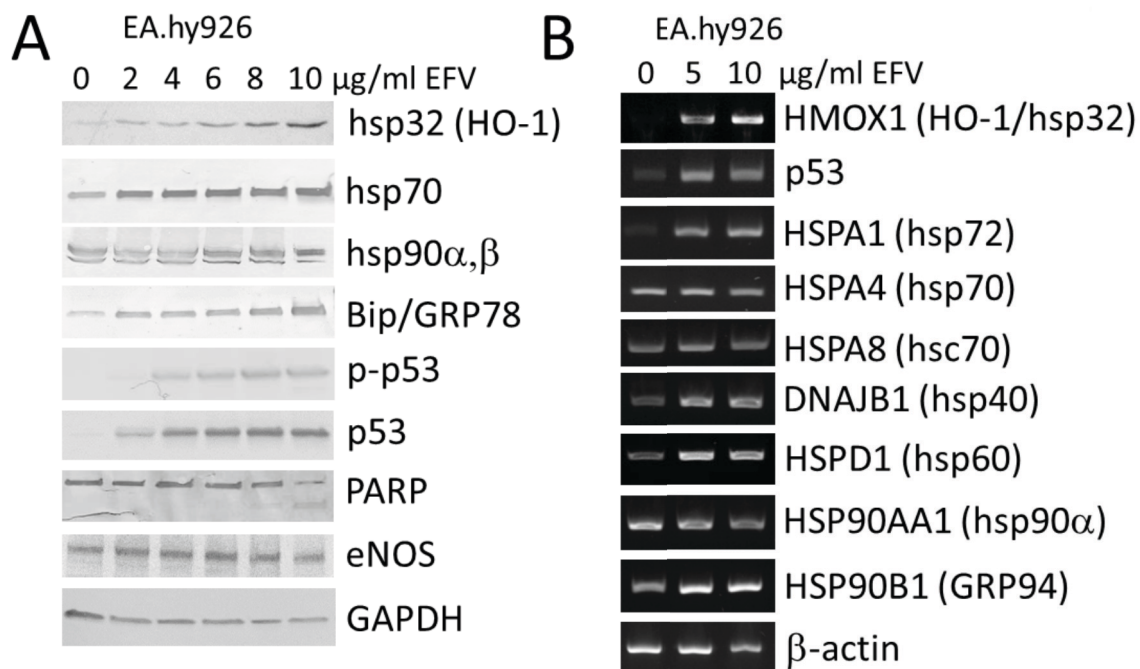


Abbildung 11: Induktion der Gene der UPR in Endothelzellen durch Efavirenz. Nach der Aussaat der EA.hy926-Zellen in 6-kammrigen Zellkulturschalen (5×10^4 Zellen/Vertiefung) wuchsen sie 24 Stunden lang an. Der Effekt der Zugabe von 0-10 $\mu\text{g/ml}$ Efavirenz wurde anschließend entweder durch Western Blot Analyse (24-stündige Inkubationszeit, **A**) oder RT-PCR Analyse (7-stündige Inkubationszeit, **B**) quantifiziert. Die Bezeichnung richtet sich nach der offiziellen Gennomenklatur für Hitzeschockproteine (<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>).

In der semiquantitativen RT-PCR konnte die Hochregulation von HspA1 und Hsp32 auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (**Abbildung 11B**). Konstitutiv in EA.hy926 exprimierte Hitzeschockproteine wie Hsp70 und Hsp90 α sowie die Referenz-Gene GAPDH und β -Aktin zeigten auch hier mit der Konzentrationserhöhung von Efavirenz keine Veränderung.

HUVEC

Parallel zu den Testungen an der immortalisierten Endothelzelllinie EA.hy926 wurden Versuche an HUVEC-Zellen durchgeführt. Leider reichte das Material nicht, um sämtliche Ergebnisse der EA.hy926-Testungen auf diese Zelllinie zu übertragen und somit vergleichen zu können.

In der semiquantitativen RT-PCR (**Abbildung 12**) war eine Induktion von Hsp32 und HspA1 klar erkennbar. Die konstitutiv in der Zelle exprimierten Hitzeschockproteine HspA4 (Hsp70), HspA8 und Hsp90 zeigten keine wesentlichen Signalveränderungen. DNAJB1 (Hsp40) wies eine Signalerhöhung nach Inkubation der Zellen mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Efavirenz auf. Das Tumorsuppressorgen p53 sowie der Hypoxiesensitive Faktor HIF1 α blieben unverändert.

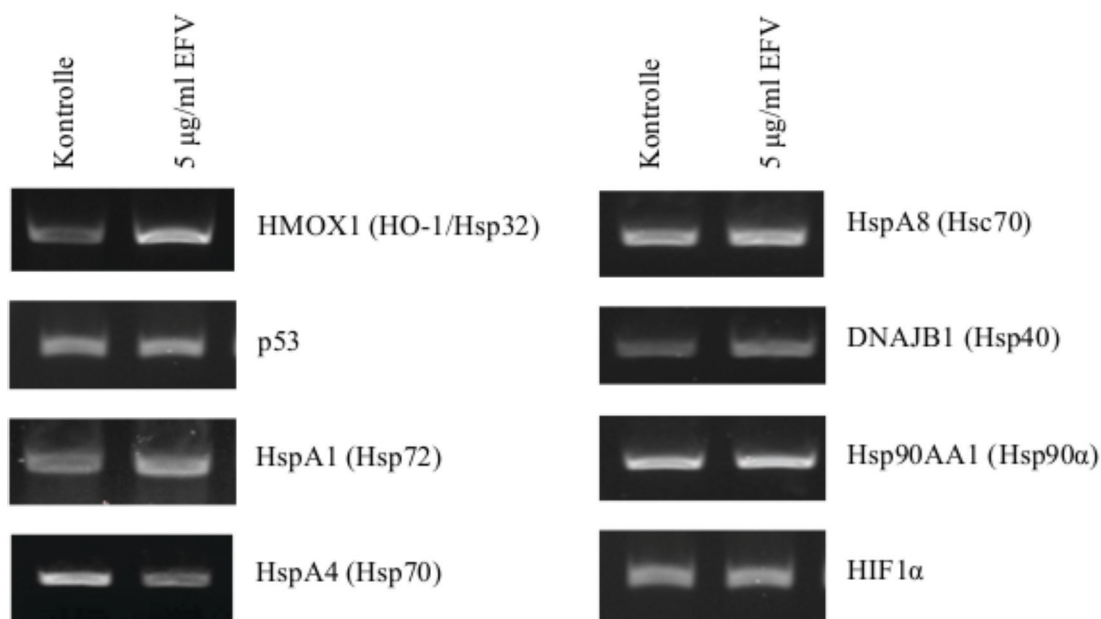


Abbildung 12: Induktion von Hsp32 und HspA1 durch Efavirenz in HUVEC-Zellen. Die HUVEC-Zellen wurden mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in 6-kammrigen Zellkulturschalen ausgesät, um dort über 24 Stunden anzuwachsen. Daraufhin erfolgte die Applikation von 5 µg/ml Efavirenz. Nach 7-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen der RT-PCR-Analyse unterzogen, um die Expression von Markern der Stressreaktion wie Hitzeschockproteinen, p53 und HIF1 α zu evaluieren. Eine Expressionsvermehrung nach Inkubation der Endothelzellen mit Efavirenz zeigte sich für Hsp32 und HspA1. Analog zu den Analysen an EA.hy926 Zellen (Abbildung 11) wurde die offizielle Gennomenklatur für Hitzeschockproteingene verwendet (<http://genatlas.medicine.univ-paris5.fr>). Die spezifischen PCR Primer wurden in unserem Labor von Dr. rer. nat. Ansgar Brüning etabliert.

3.1.3 Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in EA.hy926 Zellen

Um die Induktion von oxidativem Stress durch Efavirenz zu beweisen, wiesen wir die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach. Hierfür wurden die EA.hy926 Zellen mit DCFH-DA inkubiert. Nach Deacetylierung der Substanz wird sie durch ROS in grün fluoreszierendes Dichlorofluoreszein umgewandelt und dadurch sichtbar gemacht. Die vermehrte Abgabe von Fluoreszenzfarbstoff wurde visuell durch Fluoreszenzmikroskopie (**Abbildung 13A**) und durch FACScan Analyse (**Abbildung 13B**) dargestellt.

3. Ergebnisse

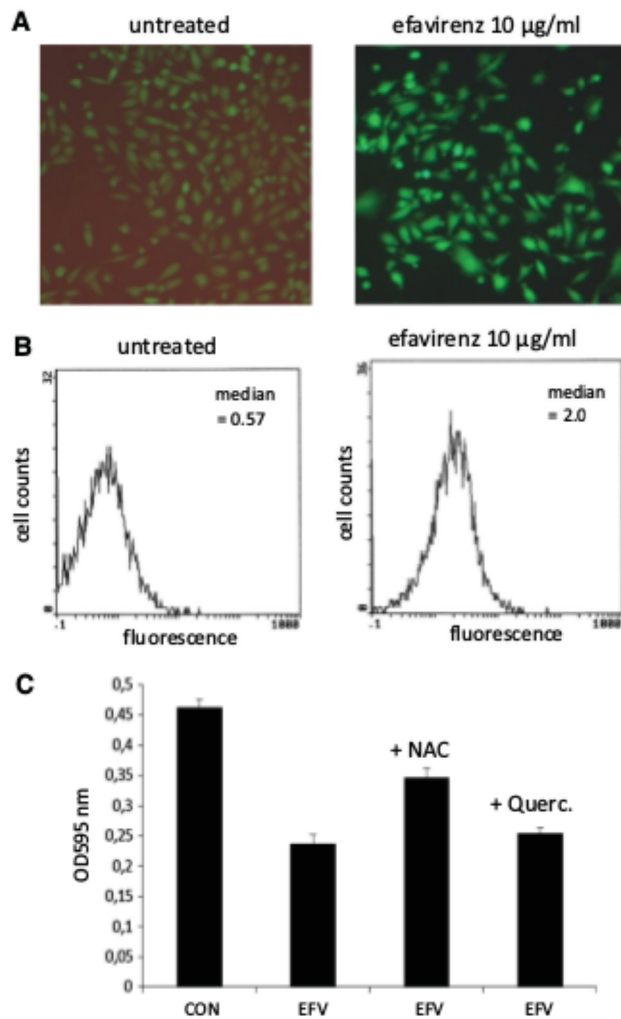


Abbildung 13: Induktion von oxidativem Stress durch Efavirenz in EA.hy926 Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml Efavirenz und Applikation der ROS detection probe DCFH-DA (Sigma, München) erfolgte die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss Axiophot, Zeiss, **A**) und FACScan (**B**). Die Zunahme der grün fluoreszierenden Zellen bei den mit 10 µg/ml Efavirenz behandelten Zellen spricht für die Induktion von ROS-Bildung durch Efavirenz. Die FACScan-Analyse erfolgte zweifach. **C** Die EA.hy926 Zellen wurden 72 h mit 10 µg/ml EFV, EFV+5mM NAC und EFV+10 µM Quercetin inkubiert und anschließend mittels MTT-Assay analysiert. Eine statistische Signifikanz des antioxidativen Effektes von NAC und Quercetin auf das Zellüberleben konnte nicht nachgewiesen werden.

3.1.4 Zellüberleben und –proliferation der EA.hy926-Zellen bei mehrtägiger Inkubation mit Efavirenz

Da Zellstress das Zellüberleben gefährden und herabsetzen kann, untersuchten wir die Effekte einer mehrtägigen Behandlung der EA.hy926 Zellen mit Efavirenz. Die Quantifizierung des Zellüberlebens nach 72 h mittels MTT-Assay ergab eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl (**Abbildung 14A**). Die Hemmung der Zellproliferation durch Efavirenz wurde insbesondere durch die optische Darstellung des Zellüberlebens nach einer längeren, 6-tägigen Inkubationszeit deutlich (**Abbildung 14B**).

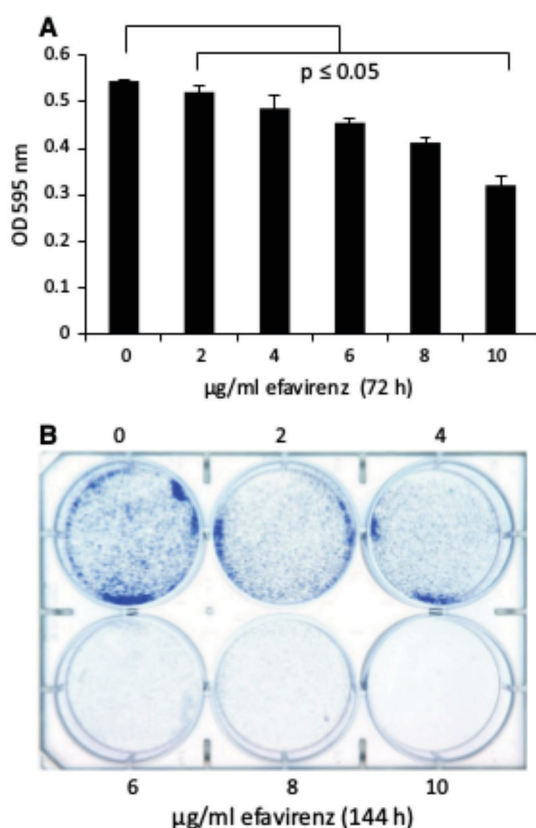


Abbildung 14: Inhibition der Zellproliferation durch Efavirenz. **A:** Der MTT-Assay wurde nach einer 72-stündigen Inkubationszeit an EA.hy926-Zellen durchgeführt, die in dreifacher Ausführung auf Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen (1×10^4 Zellen/Vertiefung) ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Efavirenz behandelt worden waren. Die Detektion erfolgte bei einer optischen Dichte von 595 nm in zweifacher Ausführung. **B:** Die in den dargestellten Zellkulturschalen ausgesetzten EA.hy926-Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^3 Zellen pro Vertiefung wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Efavirenz behandelt und anschließend sechs Tage unter Zellkulturbedingungen bebrütet. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten mit 80-prozentigem Ethanol fixiert und daraufhin mit 0,5% Coomassie Brilliant Blue Lösung (Sigma, München) gefärbt. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt.

3.1.5 Die Kombination von Efavirenz mit dem Antioxidans N-Acetylcystein

Durch die im Laufe der Datenerhebung nachgewiesene erhebliche Endothelzellschädigung durch Efavirenz ergab sich die Frage nach einer möglichen Kombinationssubstanz zum Schutz der Zelle vor den durch oxidativen und ER-Stress verursachten Schäden. Hierfür eignete sich insbesondere N-Acetylcystein (NAC), dessen antioxidative Eigenschaft wir uns zu Nutzen machten. Wir analysierten sowohl den Einfluss von NAC in Kombination mit Efavirenz auf das Zellüberleben mittels MTT-Assay (**Abbildung 13C**) als auch auf die Induktion von Markern des ER-Stresses wie XBP1 und oxidativen Stresses wie Hsp32.

In der nachfolgenden **Abbildung 15** sind die Ergebnisse der Real-time PCR Analyse dargestellt. Der spezifische ER-Stress Marker XBP1 erfuhr durch die Kombination von Efavirenz mit NAC eine Herunterregulation (ca. 20fach) seiner Genprodukte. Die Graphen von HspA1 als induzierbarer Zellstressmarker und Hsp32 als Marker für oxidativen Stress spiegeln ebenfalls wider, dass NAC die prooxidativen Effekte von Efavirenz zumindest teilweise zu verhindern vermag.

In der RT-PCR wird eine Hochregulation von Hsp32 und CHOP durch die Inkubation der Zellen mit 15 µg/ml Efavirenz deutlich (**Abbildung 16**). Die zusätzliche Gabe von NAC vermindert das Stresssignal minimal.

Die Analyse des Zellüberlebens der mit Efavirenz und den antioxidativen Substanzen inkubierten EA.hy926 Zellen mittels MTT-Assay ergab den Nachweis eines leicht protektiven Effektes von NAC im Hinblick auf die zytotoxische Wirkung von Efavirenz. Die Applikation von Quercetin als weiterer antioxidativ wirksamer Substanz führte zu keinem sichtbaren positiven Effekt. Eine statistische Signifikanz für den protektiven Effekt konnte bei keiner der beiden antioxidativen Substanzen nachgewiesen werden.

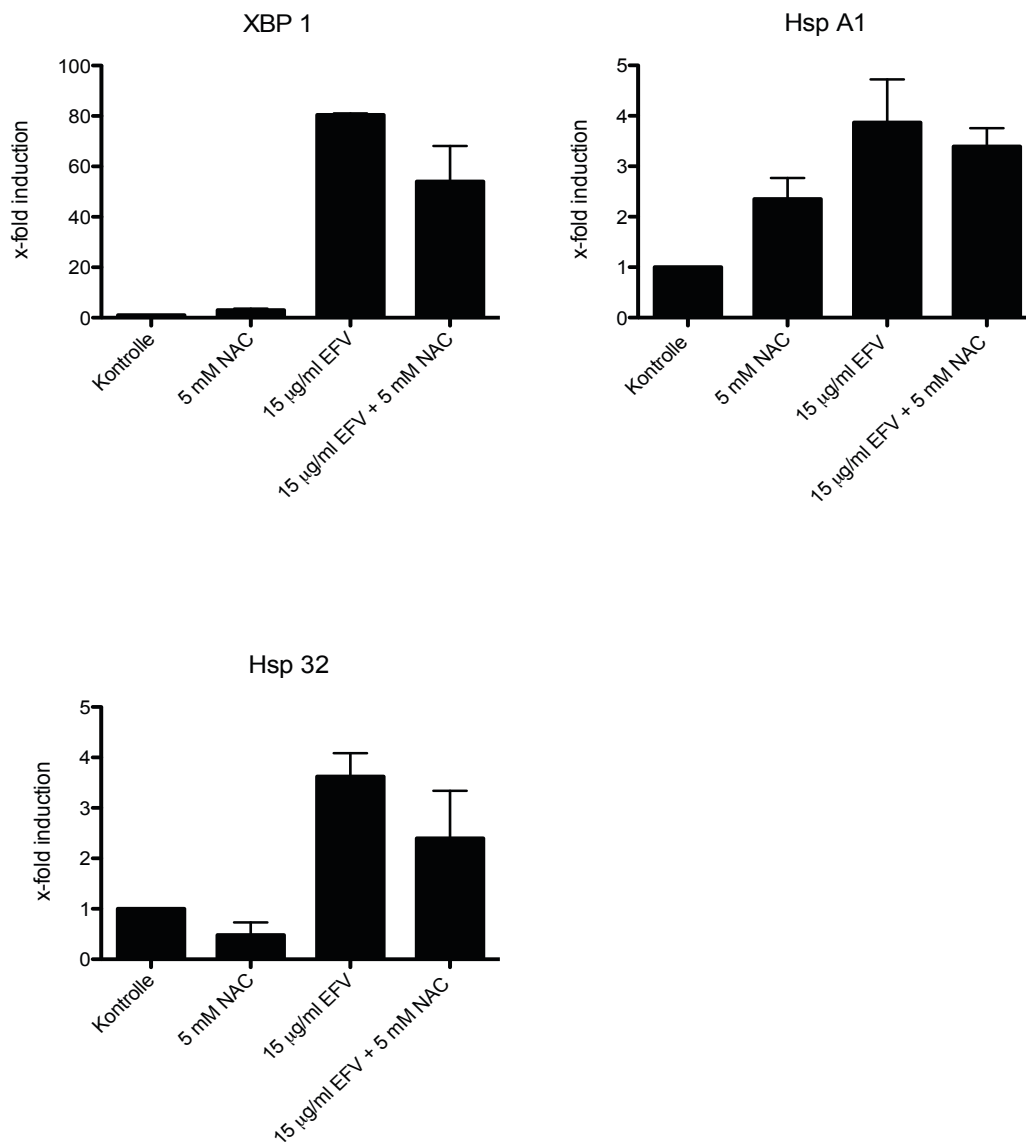


Abbildung 15: Verminderung der durch Efavirenz induzierten Stressreaktion in EA.hy 926 Zellen durch N-Acetylcystein. Die EA.hy926 Zellen wurden nach dem Anwachsen in 6-kammrigen Zellkulturschalen mit 15 µg/ml Efavirenz, 5 mM NAC oder einer Kombination der beiden Substanzen (EFV + NAC) inkubiert. Nach 7 Stunden erfolgte die Analyse der Expression von ER-Stress und oxidativen Stressmarkern mithilfe der quantitativen Real-time PCR. Die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode mit β -Aktin als Referenzwert wurde verwendet, um die Induktion der Genexpression zu berechnen.

Nach Inkubation der Endothelzellen mit einer Kombination aus Efavirenz und N-Acetylcystein zeigte sich eine Verminderung der durch Efavirenz induzierten Genprodukte von XBP1, HspA1 und Hsp32. Dies zeigt, dass N-Acetylcystein in der Lage ist, die durch Efavirenz induzierte Stressreaktion leicht abzuschwächen

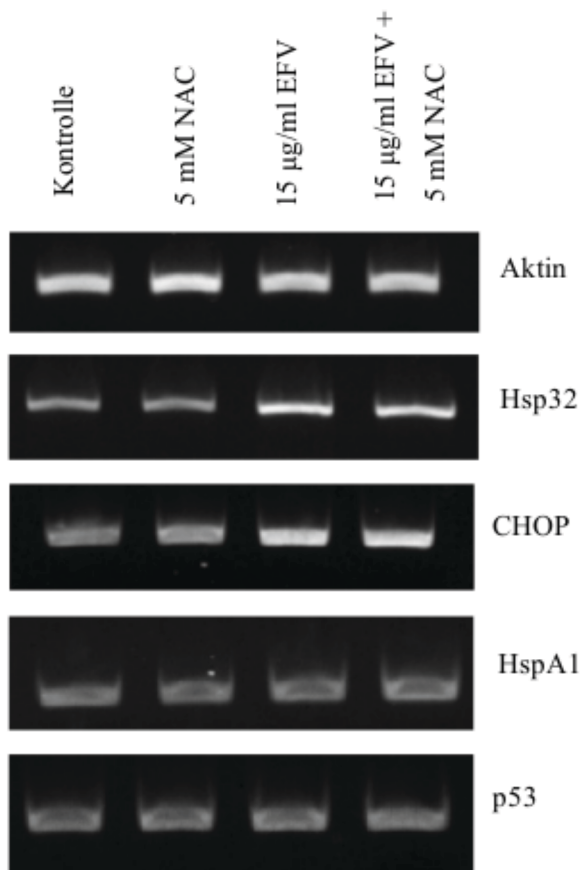


Abbildung 16: Minimale Signalminderung der durch Efavirenz induzierten Hsp32- und CHOP-Expression durch N-Acetylcystein. Nach 24-stündigem Anwachsen der EA.hy926 Zellen in Zellkulturschalen mit 5×10^4 Zellen pro Kammer wurde 5 mM NAC, 15 µg/ml EFV oder eine Kombination der beiden Substanzen (EFV + NAC) appliziert. Die Analyse anhand des RT-PCR Protokolls erfolgte nach 7-stündiger Inkubationszeit. Es zeigte sich eine minimale Signalminderung der durch die alleinige Applikation von Efavirenz induzierten Expressionsvermehrung von Hsp32 und CHOP nach gleichzeitiger Zugabe von N-Acetylcystein.

3.1.6 Verstärkte Stressreaktion durch die Kombination von Efavirenz mit Nelfinavir

In Western Blot- sowie Real-time PCR-Analyse wurde der Kombinationseffekt von Efavirenz und dem Proteaseinhibitor Nelfinavir untersucht. Es wurde eine verstärkte Stressreaktion durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir in pharmakologisch relevanten Serumkonzentrationen (4µg/ml) apparent; im Western Blot durch das erhöhte Signal des oxidativen Stress-Markers Hsp32 sowie des ER-Stress-Markers Bip (**Abbildung 17A**) und in der Real-time PCR durch verstärkte Induktion von Hsp32, dem ER-Stress spezifischen XBP1s sowie HspA1 (**Abbildung 17B-D**) auf Transkriptionsebene.

In der semiquantitativen RT-PCR (**Abbildung 18**) ließ sich eine deutliche Induktion von Hsp32 und HspA1 beobachten; bereits bei einer Inkubation der Zellen mit 4 µg/ml EFV bzw. NFV, sowie in erhöhtem Maße bei der Kombination der beiden Substanzen.

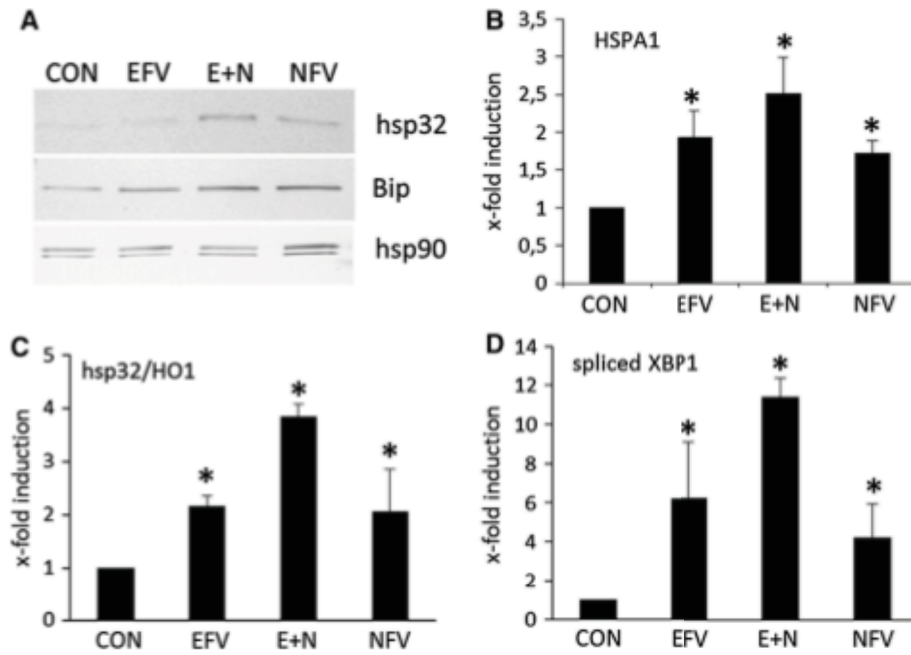


Abbildung 17: Verstärkung des durch Efavirenz induzierten ER-Stresses durch Nelfinavir. Die mit 4 µg/ml EFV, 4 µg/ml NFV oder einer Kombination der beiden Substanzen inkubierten EA.hy926 Zellen wurden mittels Western Blot Analyse (24 h Inkubation, **A**) und quantitativer Real-time PCR Analyse (7 h Inkubation, **B-D**) im Hinblick auf die Expression von Markern der oxidativen und ER Stressreaktion untersucht. β-Aktin diente für die Berechnung der Genexpression mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode als Referenzwert. * $p < 0,05$

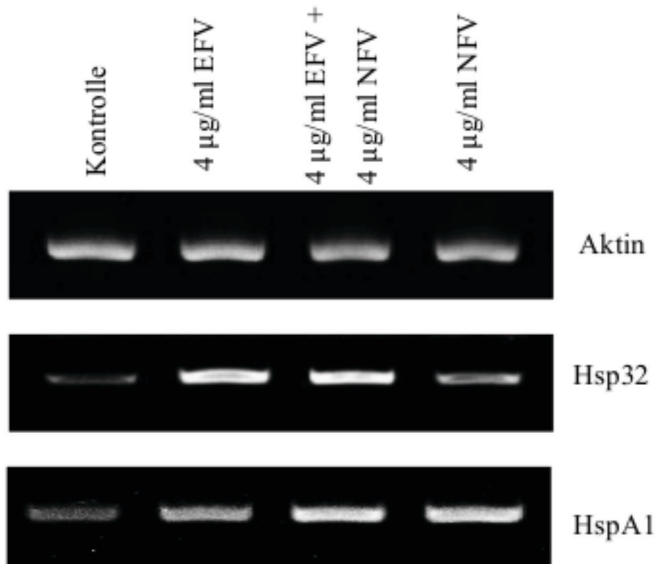


Abbildung 18: Verstärktes Signal von Hsp32 und HspA1 in EA.hy 926 Zellen durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir. Die EA.hy926 Zellen wuchsen mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro Kammer für 24 Stunden in Zellkulturschalen an, bevor 4 µg/ml Efavirenz, 4 µg/ml Nelfinavir oder eine Kombination der beiden Substanzen (EFV + NFV) hinzugegeben wurde. Nach weiteren 7 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Analyse der Expression von Hitzeschockproteinen mithilfe der semiquantitativen RT-PCR. Die Induktion von Hsp32 und HspA1 durch Efavirenz und Nelfinavir zeigte sich bereits nach Inkubation der Endothelzellen mit den Einzelsubstanzen sowie in erhöhtem Maße nach Kombination der beiden Substanzen.

3.1.7 Induktion von Zelltod und Verhinderung der endothelialen Quervernetzung durch Efavirenz in Kombination mit Nelfinavir

Die Kombination von Nelfinavir mit Efavirenz wurde beispielhaft untersucht, um den sich potenzierenden schädigenden Effekt zweier prooxidativer Substanzen zu zeigen. Hier zeigte sich, dass die bereits durch den Einsatz von Efavirenz verursachte endotheliale Dysfunktion durch die Zugabe einer weiteren prooxidativen Substanz wie Nelfinavir gravierend verschlimmert wird. Wir untersuchten den zytotoxischen Effekt von Efavirenz, Nelfinavir sowie der Kombination der beiden Substanzen auf die EA.hy926 Zellen.

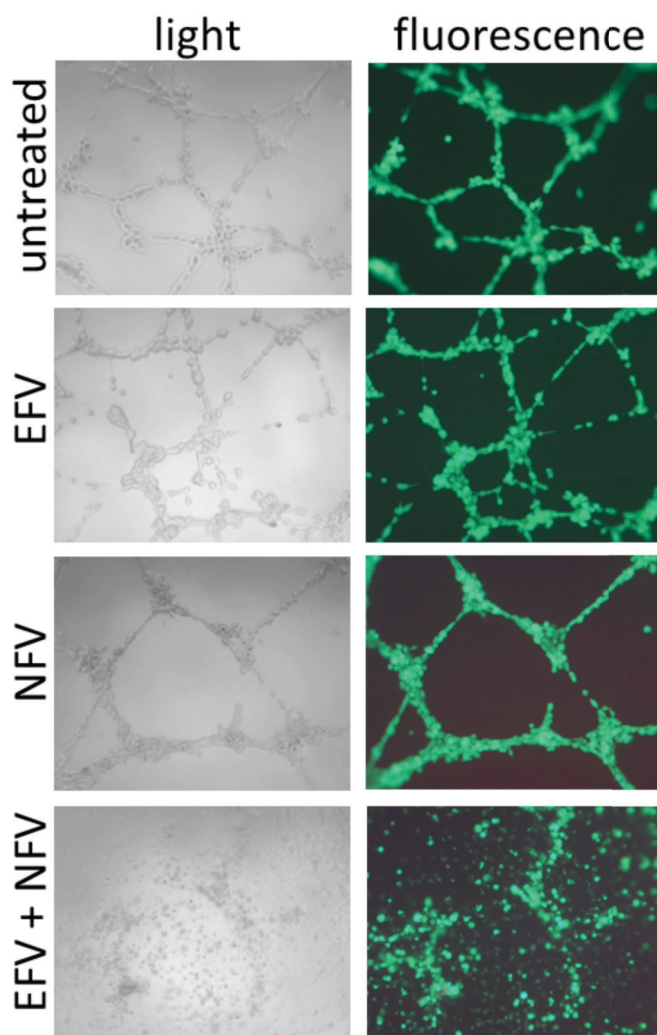


Abbildung 19: Zerstörung der Pseudotube-Bildung durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir in hoher Konzentration. Die EA.hy926 Zellen wurden in Angiogenesekammern auf extrazellulärem Matrixgel ausgesät. Nach Ausbildung der endotheltypischen Netzstruktur (24 h Inkubationszeit) erfolgte die Zugabe von 10 µg/ml EFV, NFV oder der Kombination der beiden Substanzen für weitere 24 Stunden. Die fluoreszierende Calcein-AM Färbesubstanz wurde appliziert, um vitale Zellen in der anschließend durchgeführten mikroskopischen Untersuchung deutlicher sichtbar zu machen.

Die netzartige Struktur der Endothelzellen blieb bei applizierten Konzentrationen der einzelnen Substanzen von 10µg/ml erhalten, wohingegen eine Kombination von EFV und NFV zu einem starken zytotoxischen Effekt mit sichtbarer Zerstörung der Pseudotube-Struktur führte (**Abbildung 19**). Allerdings sandten auch die aus der ursprünglichen Struktur herausgelösten Zellen weiterhin ein fluoreszierendes Signal mittels des vitalen Zellmarkers Calcein-AM aus. Dies spricht für einen selektiven Verlust der Interaktions- und Verkettungsfähigkeit der Zellen und gegen einen stattgefundenen unspezifischen Zelltod.

3.2 Tumorzellen

Wie eingangs erwähnt, fokussierte sich diese Arbeit auf die Wirkung von Efavirenz auf Endothelzellen, da die ursprünglich von uns getesteten Mammakarzinomzellen deutlich schlechter auf Efavirenz reagierten. Da der zellschädigende Effekt von Efavirenz jedoch durch Nelfinavir verstärkt werden kann, und Nelfinavir in aktuellen Studien für die Tumorthherapie getestet wird, untersuchten wir zusätzlich, ob durch die Kombination der beiden Substanzen auch der Zellstress und somit die Effektivität von Efavirenz gegenüber Mammakarzinomzellen gesteigert werden kann.

3.2.1 Induktion von Sestrin 2 durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir

In der semiquantitativen RT-PCR Analyse der MCF-7-Tumorzelllinie (**Abbildung 20**) zeigt sich eine Hsp32-Induktion bei den jeweils einzeln mit NFV und EFV behandelten Zellen. Allerdings wurde durch die Kombination der Substanzen kein potenziertes Effekt sichtbar. Bei dem endogenen mTOR-Inhibitor und Autophagie-Induktor Sestrin 2 zeigt sich eine deutliche Signalvermehrung durch die Applikation der Medikamente.

Bip, Grp94 und CYP2B6 werden konstitutiv exprimiert und zeigen ein weitestgehend konstantes Signal.

Ein potenziertes Effekt durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir wurde bei der Induktion von Sestrin 2 sichtbar. Hsp32 zeigte eine Expressionsvermehrung sowohl nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen als auch nach kombinierter Applikation von Efavirenz und Nelfinavir. Die Expression von Aktin, Bip, Grp94 und CYP2B6 blieb, verglichen mit den Kontrollzellen, weitestgehend unverändert.

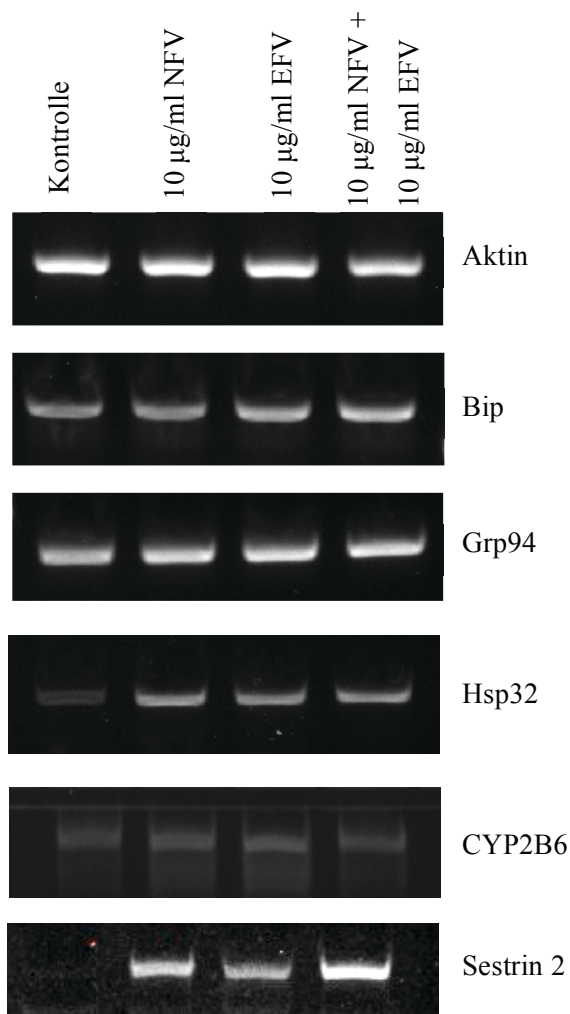


Abbildung 20: Induktion von Sestrin 2 in MCF-7-Zellen durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir. Die MCF-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und für 24 Stunden bebrütet. Daraufhin erfolgte die Applikation von 10 µg/ml Efavirenz, 10 µg/ml Nelfinavir oder einer Kombination der Substanzen (EFV + NFV). Die Analyse der Expression von Hitzeschockproteinen, CYP2B6 und Sestrin 2 wurde mithilfe der semiquantitativen RT-PCR nach 7-stündiger Inkubationszeit durchgeführt.

CYP2B6 ist ein Enzym der Cytochrom P450-Familie in der Leber und am Abbau von Efavirenz beteiligt.

3.2.2 Verstärktes XBP1-Splicing durch die Inkubation mit Efavirenz und Nelfinavir

ER-Stress konnte für die maligne Brustkrebszelllinie in der Real-time PCR Analyse über den spezifischen Marker XBP1 nachgewiesen werden. In den mit beiden Substanzen behandelten Proben kam es zu einer ca. vierzigfachen Induktion des aktiven Spaltproduktes (**Abbildung 21**).

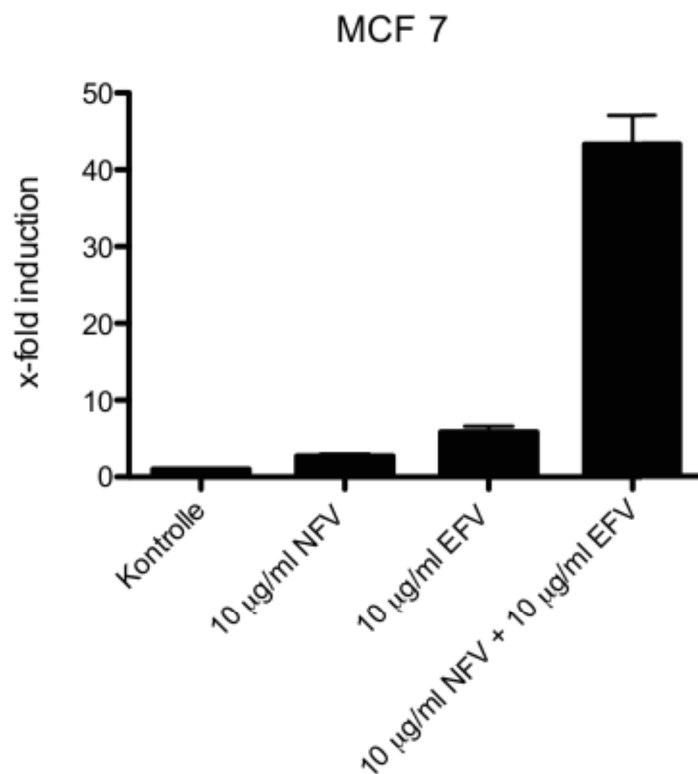


Abbildung 21: Erhöhung des XBP1-Spaltproduktes in MCF-7-Zellen durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir. Nach Aussaat und 24-stündiger Bebrütung der MCF-7-Zellen in Zellkulturschalen wurde 10 µg/ml Nelfinavir, 10 µg/ml Efavirenz oder eine Kombination der beiden Substanzen (NFV + EFV) hinzugegeben. Daraufhin wurden die Zellen für weitere 7 Stunden inkubiert, bevor die quantitative Analyse der Expression von XBP1 mithilfe der quantitativen Real-time PCR-Methode erfolgte. Für die Berechnung der Genexpression anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode diente β -Aktin als Referenzwert. Nach Inkubation der MCF-7-Zellen mit einer Kombination von Efavirenz und Nelfinavir zeigte sich eine ca. vierzigfache Erhöhung des Spaltproduktes von XBP1.

4. Diskussion

Im Rahmen der durchgeführten Studie zeigte sich eine durch Efavirenz hervorgerufene Veränderung der Endothelzellphysiologie von EA.hy926 und HUVEC-Zellen.

Es konnten diverse von der applizierten Efavirenz-Konzentration abhängige Folgen für die untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Es kam zu ER Stress, oxidativem Stress, Autophagie sowie einer Abnahme des Zellüberlebens. In Kombination mit Nelfinavir verstärkte sich der Effekt. Wie in der Einleitung dargelegt, stehen diese verschiedenen Mechanismen der Zelle, mit Stress umzugehen, in engem Zusammenhang.

In vorhergehenden Publikationen wurden bereits die Auswirkungen von Efavirenz auf andere Zellreihen wie Hepatozyten, Gliazellen und Neuroblastomzellen untersucht (Apostolova et al., 2015b, Apostolova et al., 2013, Purnell and Fox, 2014). Die

Erforschung der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke im Hinblick auf die durch Efavirenz verursachten Schädigungsmechanismen fand ebenso großes Interesse (Bertrand and Toborek, 2015, Mondal et al., 2004). Dies lässt sich durch das teils ausgeprägte und häufig den Einsatz limitierende zentralnervöse Nebenwirkungsprofil bei mit Efavirenz behandelten HIV-Patienten erklären. Eine durch Efavirenz ausgelöste endotheliale und kardiovaskuläre Dysfunktion konnte in diversen weiteren Studien beobachtet werden (Gupta et al., 2012, Mondal et al., 2004, Jamaluddin et al., 2010). Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ein besonderer Fokus auf die molekulare Wirkungsweise von Efavirenz auf Endothelzellen gelegt, die im Folgenden detailliert erläutert wird.

Das Ziel, durch Erkenntnisse auf dem Gebiet mögliche Targets zur Vermeidung von Nebenwirkungen bei chronisch exponierten Patienten zu finden war dabei im Verlauf der Studie ebenso von Bedeutung wie die Frage, inwiefern Efavirenz als antiangiogenes Medikament indiziert sein könnte.

Bis zu welchem Ausmaß ER-Stress und Autophagie eine zellprotektive Funktion ausüben und ab wann sie als Indikatoren für Zellstress und –schaden zu werten sind, stellte dabei einen wichtigen Aspekt dar. Eine deutliche Hemmung der Zellproliferation beobachteten wir erst nach einer sechstägigen Inkubation der Endothelzellen mit Efavirenz. Dies bestärkt die Hypothese, dass die Zellen bis dahin durch Autophagie und andere „rescue“-Mechanismen die Toxizität der Substanz weitestgehend abwenden können.

Nach Inkubation der EA.hy926 und HUVEC Zellen mit 10 bzw. 15 µg/ml EFV wurden in der Immunfluoreszenzmikroskopie mit und ohne Zusatz von MDC bzw. Cyto-ID Autophagy staining reagent Autophagie-Prozesse sowohl im Früh- als auch im Spätstadium apparent. Diese auch von Apostolova et al. und Purnell et al. an Hepatozyten bzw. Neuronen nachgewiesene Beobachtung steht im Kontrast mit einer kürzlich von Bertrand et al. an Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke durchgeführten Studie, die zwar eine ER-Stress-Induktion aber eine Verminderung von Autophagie-Prozessen durch die Applikation von Efavirenz zeigte (Apostolova et al., 2011, Purnell and Fox, 2014, Bertrand and Toborek, 2015).

In Abhängigkeit vom Zelltyp übernehmen Autophagie-Prozesse verschiedene Funktionen. So bietet Autophagie Schutz vor zentralnervösen Erkrankungen bei chronischem ER-Stress und kann Onkogene wie p53 abbauen (Marino et al., 2014). Ob Autophagie zur Rettung der Zelle vor dem Zelltod führt oder schädlich ist, hängt von den auslösenden Faktoren und dem betroffenen Zelltyp ab. Zelluntergang durch Autophagie ist schädlich, wenn er zum irreversiblen Verlust von Zellen mit essentieller Funktion führt, wie z.B. Kardiomyozyten (Liang, 2010). In Krebszellen wurde nachgewiesen, dass ein durch Wasserstoffperoxid induzierter Zelltod durch Hemmung von Autophagie-Prozessen verhindert werden kann (Ryter and Choi, 2013). Chen et al. zeigten 2008, dass oxidativer Stress in Tumorzellen zu ACD führen kann (Chen et al., 2008). Autophagie kann je nach Zellart sowohl für oxidativen Stress sensitivieren und zum Zelltod führen als auch die Stressresistenz fördern.

Welchen Effekt Autophagie auf Tumorgewebe hat, hängt unter anderem vom Tumorstadium ab (Bhutia et al., 2013). Dieser Aspekt und inwieweit man sich die zusätzliche Modulation von Autophagie-Prozessen beim Einsatz von Efavirenz in der Tumorthherapie zu Nutze machen könnte, wird in einem späteren Abschnitt diskutiert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch nach Applikation von hohen Efavirenz-Konzentrationen bis 15 µg/ml Autophagie-Vorgänge. Dies spricht dafür, dass Autophagie in Endothelzellen primär als adaptiver „rescue“-Mechanismus zu sehen ist, um die Toxizität der Substanz zu vermindern. Der Abbau von dysfunktionalen Mitochondrien spielt dabei im Hinblick auf Efavirenz eine große Rolle (Apostolova et al., 2011). Die protektive Funktion von Autophagie in Endothelzellen konnten Luo et al. auch im Bezug auf Arteriosklerose-Entstehung nachweisen (Luo et al., 2015). Der zytotoxische Effekt von Autophagie im Sinne einer Induktion von ACD zeigt sich insbesondere bei gegenüber Apoptose resistenten oder defizienten Zellen (Liu et al., 2016). Calcium kann als Signalmolekül in der durch Efavirenz ausgelösten Stressreaktion sowohl zur Förderung als auch zur Inhibierung von Autophagie führen (Kania et al., 2015, Apostolova et al., 2013, Engedal et al., 2013). Dabei spielt der Zustand der Zelle eine Rolle: In Stresssituationen kommt es eher zu Autophagie; über den IP3-Rezeptor vermittelte Signalwege haben meist eine inhibierende Funktion (Decuypere et al., 2011).

Eine wichtige Entdeckung machten Nardacci et al., indem sie die Limitierung der viralen Pathogenese bei HIV-Infizierten durch Autophagie nachwiesen. Der Einsatz von Efavirenz und Nelfinavir verhindert folglich zusätzlich über die durch die Substanzen induzierten Autophagie-Prozesse die Progression der Erkrankung (Nardacci et al., 2014).

Neben der beobachteten Autophagie kam es zu massiver ER-Stress-Induktion durch Efavirenz. Als deutlicher Hinweis auf durch Efavirenz ausgelösten ER-Stress, bereits bei physiologischen Plasmakonzentrationen, imponierte sowohl in EA.hy926 als auch in HUVEC-Zellen die Expression von XBP1 und induzierbaren Hitzeschockproteinen. Es zeigte sich an den EA.hy926-Zellen eine Hochregulation von Proteinen der Hsp70-Familie. Wir wiesen für HspA4 (Hsp70), das ER-residente Bip (GRP78) sowie das durch Zellstress induzierbare HspA1 (Hsp72) verstärkte Signale nach.

HspA1 wird gehäuft in Krebszellen exprimiert und korreliert mit einem hohen Tumorgrading sowie einer schlechten Prognose. (Murphy, 2013, Daugaard et al., 2007). Seine Expression scheint eine wichtige Rolle für den Erhalt der genomischen Stabilität zu spielen (Murphy, 2013). Hinsichtlich der Hochregulation in den untersuchten Endothelzellen spricht dies für einen durch HspA1 vermittelten adaptiven Schutzmechanismus der Zelle. Das Co-Chaperon DNAJB1 (Hsp40) wurde vermehrt in HUVEC-Zellen exprimiert und spiegelt einen hohen Bedarf an Chaperonen im Rahmen von Proteinfaltungsprozessen wider. Bip (GRP78) fördert die Autophagie (Li et al., 2008) Auch p-53 ist als Tumorsuppressorgen in seiner nukleären Form an der Induktion von Autophagie beteiligt. Die Expression dieser beiden Proteine, aber auch die Hochregulation von XBP1 als Reaktion auf Efavirenz, verdeutlichen die

Verbindungswege zwischen ER-Stress und Autophagie. Das im Rahmen der UPR gespleißte XBP1 spielt eine Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung von Beclin 1, einem für Autophagie essentiellen Molekül (Tian et al., 2015). Außerdem schützt es die Zelle vor ROS und damit vor Zelltod durch oxidativen Stress (Liu et al., 2009).

ER-Stress wird, da das ER sehr sensitiv auf Veränderungen des Redoxstatus der Zelle reagiert, häufig als Folge von oxidativem Stress ausgelöst (Alfadda and Sallam, 2012). Der enge Zusammenhang zwischen ER- und oxidativem Stress wurde im Rahmen der Studie durch die simultane Hochregulation von Hsp32 deutlich. In der Vergangenheit konnte an Hepatozyten gezeigt werden, dass Hsp32 über ROS-Bildung und deren Signalfunktion Wege des Zellüberlebens initiiert (Carchman et al., 2011). Über die durch Hsp32 vermittelte Phosphorylierung von p38 MAPK wird wiederum eine Verbindung zu Autophagie hergestellt. Hsp32 hat eine zytoprotektive und antiapoptotische Funktion (Jozkowicz et al., 2007). Apoptotische Prozesse werden gehemmt, indem Hsp32 für die Autophagie dysfunktionaler Mitochondrien sorgt. Die vasoprotektive Wirkung von Hsp32 hinsichtlich der Vermeidung von vaskulären Erkrankungen wie Artherosklerose und Thrombose konnte bereits nachgewiesen werden (Durante, 2010). Die weiterführende Untersuchung der protektiven, antioxidativen Funktion des durch den Abbau von Häm entstehenden Biliverdins wäre als Gegenstand zukünftiger Forschung sinnvoll.

In gesundem Gewebe verhindert Hsp32 die Karzinogenese (Was et al., 2010). Es kann jedoch durch seine vasoprotektive Wirkung auch zur Tumorprogression beitragen. Hsp32 ist somit eines der Proteine, die hinsichtlich der Wirkung auf Endothelzellen ein zweischneidiges Schwert darstellen. Die Möglichkeit einer medikamentösen Hemmung in Krebszellen, um ein effektiveres Therapieansprechen zu gewährleisten, wird in einem späteren Abschnitt im Zusammenhang mit der Wirkung von Efavirenz auf Tumorzellen diskutiert.

Oxidativer Stress, wie er durch die Hochregulation von Hsp32 nachgewiesen wurde, sowie Nährstoffmangel als Folge einer allgemeinen Stressreaktion der Zelle führen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Der optische Nachweis von ROS in mit 10 µg/ml Efavirenz behandelten EA.hy926 Zellen erfolgte mithilfe des Zusatzes von DCFH-DA (Dichloro-dihydro-fluorescein Diacetat) als fluoreszierendes Mittel (Aranda et al., 2013). In Endothelzellen der Koronararterien wurde in der Vergangenheit ebenfalls die Induktion von oxidativem Stress und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität durch Efavirenz nachgewiesen (Jamaluddin et al., 2010). Die Atmungskette der Mitochondrien ist in der Zelle der Hauptbildungsort von ROS (Zhang and Gutterman, 2007, Quijano et al., 2015). ROS wie H₂O₂ sind nicht nur als toxisches Nebenprodukt zu sehen, sondern nehmen eine entscheidende Funktion in der Signalübertragung ein. Die Mitochondrien können durch die ROS-Produktion Veränderungen der Zellfunktion und des Zellwachstums anzeigen. So fördern sie unter anderem die Proliferation von Gefäßendothelzellen und schützen vor ischämischem Zellschaden (Gutterman, 2005). Insbesondere in Gefäßendothelzellen fördern ROS diverse adaptive Mechanismen, die zum Erhalt der Zellfunktion beitragen. Dazu gehören die Aktivierung von eNOS und anderen Transkriptionsfaktoren sowie die

Modulation des Calciumhaushaltes (Gutterman, 2005). Allerdings kommt es durch Interaktion von ROS mit NO zu dessen Hemmung und zur Produktion von toxischen Nebenprodukten, die zur Zellschädigung und damit zur endothelialen Dysfunktion beitragen (Gresele et al., 2012). ROS fungieren als Signalmoleküle zur Initiierung von Autophagie-Prozessen bei vermehrtem Zellstress (Quijano et al., 2015). Versagen die Autophagiemechanismen, kommt es wiederum zu einem Anstieg der ROS-Produktion. Erst bei exzessiver ROS-Produktion führt ein Versagen der Kompensationsmechanismen der Zelle zur mitochondrialen Dysfunktion (Zhang and Gutterman, 2007).

Die Mitotoxizität im Sinne einer Einschränkung der mitochondrialen Funktion in Wechselwirkung mit der ER-Stressreaktion konnte in der Vergangenheit als für die Hepatotoxizität von Efavirenz verantwortlicher Mechanismus herausgestellt werden (Apostolova et al., 2010, Apostolova et al., 2013, Gomez-Sucerquia et al., 2012, Polo et al., 2015). In dem Zusammenhang spielt die Mitophagie als Überlebensstrategie der Zelle durch Abbau der dysfunktionalen Mitochondrien eine Rolle. Bei Übersteigen der Kapazität der normalerweise zum Zellüberleben beitragenden Autophagie kann es folglich zu starker Zellschädigung kommen (Apostolova et al., 2011). Im Vergleich zu mit Proteaseinhibitoren behandelten Zellen zeigten sich bei den mit Efavirenz behandelten Zellen deutliche Zeichen der Mitotoxizität (Apostolova et al., 2013). Studien über die Wirkung auf das ZNS zeigen gleichsam eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion im Sinne einer Blockade der Atmungskette (Apostolova et al., 2015a). Neben der Veränderung der Mitochondrien konnte die Induktion von Autophagie in Neuronen nachgewiesen werden (Purnell and Fox, 2014).

Oxidativer Stress, ROS-Bildung und Mitotoxizität sind demnach in essentieller Art und Weise für die Manifestation von Nebenwirkungen beim therapeutischen Einsatz von Efavirenz verantwortlich. Um Zellschaden durch Akkumulation von ROS bei dysfunktionalen Mitochondrien zu vermeiden, gilt es in zukünftigen Studien herauszufinden, bei welcher Konzentration von ROS in der Zelle der Übergang zwischen seiner Funktion als Signalmolekül bei Mechanismen des Zellüberlebens zu durch ROS ausgelöster Zellschädigung und Zelltod stattfindet. Der Einsatz antioxidativer Substanzen zum Schutz der Zelle vor oxidativer Schädigung wurde im Rahmen dieser Arbeit erprobt und wird im nächsten Absatz diskutiert.

Cullinan et al. entdeckten 2004, dass die Inhibierung von ROS eine Verminderung von Apoptosevorgängen als Reaktion auf ER-Stress zur Folge hatte. Allerdings schrieben die Autoren die vermehrt schädliche Wirkung von ER-Stress im Sinne einer Apoptose-Induktion dem gestörten Redox-Status der Zelle zu und sahen die ROS nicht als direkt verantwortlich für den Zelltod. Es geht vielmehr um das Sensitivieren der Zelle für ER-Stress-getriggerte Apoptose durch ihren prooxidativen Zustand. Andere Faktoren seien, unabhängig von ROS, entscheidend für das direkte Auslösen der Apoptose (Cullinan and Diehl, 2004). Oxidativer Stress führt somit zunächst zu Zell- und DNA-Schäden, bevor bei persistierender Stressreaktion und Überschreitung der Kompensationsmechanismen der Zelle Apoptose ausgelöst wird. In Übereinstimmung damit zeigten sich apoptotische Vorgänge in der Zelle im Rahmen dieser Studie erst bei

einer massiven Stressreaktion. Eine PARP-Spaltung wurde ab Konzentrationen von 10 µg/ml sichtbar.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Forschungsergebnisse untermauern im Besonderen die durch Efavirenz in Endothelzellen hervorgerufene ER-Stressreaktion. ER-Stress und die bereits beschriebenen assoziierten Reaktionen der Zelle fungieren als adaptiver Bewältigungsmechanismus bei vermehrter Proteinladung. Es ist essentiell, die Schaltstellen und Faktoren zu kennen, die zu einer Überlastung der UPR führen – da es so zur Apoptose kommen kann. Wo ist die Balance zwischen Homöostase-erhaltendem und übermäßigem ER-Stress? Wann und durch welche Mechanismen chronischer ER-Stress eine toxische Wirkung auf die Zelle ausübt, ist ebenfalls eine Frage, die es in zukünftigen Studien zu klären gilt (Chambers and Marciniak, 2014). Um Apoptose durch pathologischen ER-Stress zu verhindern, könnte die Blockade von einzelnen Komponenten der Stressreaktion effektiv sein. Es bieten sich dabei hemmende Substanzen des PERK-CHOP-Signalwegs an; PERK-Inhibitoren und IRE-1-Endoribonukleaseinhibitoren wurden bereits entwickelt. Auf die Rolle von PERK wird im nächsten Abschnitt im Zusammenhang mit oxidativem Stress genauer eingegangen. Auch die Inhibierung von Bcl-2 oder JNK könnte von Nutzen sein, da sie in diverse Signalwegen, insbesondere der Autophagie, involviert sind (Tabas and Ron, 2011). JNK wurde in einer Studie für den in Hepatozyten durch Efavirenz induzierten Zelltod verantwortlich gemacht (Bumpus, 2011).

Die Inhibierung von durch Efavirenz ausgelöstem oxidativem Stress zur Toxizitätsminderung hat jedoch höhere Relevanz. Die Endothelschädigung könnte mithilfe einer antioxidativ wirksamen Substanz verringert werden. So zeigten auch Apostolova et al. 2010 eine teilweise Reversibilität des Zellschadens durch den Einsatz von Antioxidantien, was wiederum das Vorhandensein von ROS bewies (Apostolova et al., 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein leicht zytoprotektiver, antioxidativer Effekt von N-Acetylcystein im Hinblick auf das Zellüberleben von mit Efavirenz behandelten EA.hy926 Zellen gezeigt werden. Leider ergab sich weder für NAC noch für die ebenfalls getestete Substanz Quercetin eine statistische Signifikanz.

Da es das vorrangige Ziel der Grundlagenforschung in unserem Labor ist, Sachverhalte zu erforschen, die Patienten helfen und ihre Beschwerden lindern können, maßen wir der Entdeckung einer antioxidativ wirksamen Substanz zur Leidensminderung der betroffenen Patienten eine essentielle Bedeutung und hohe Priorität im Rahmen des Projektes bei. Wir testeten vor diesem Hintergrund zahlreiche weitere Substanzen wie Vitamin E, Dexamethason, Hydralazin, Disulfiram, Auranorfin, Procainamid, Biliverdin, Primaquin, Chloroquin und ASS. Letzendlich konzentrierten wir uns auf NAC, da dessen antioxidative Wirkung bereits in zahlreichen anderen Studien zur ART herausgestellt werden konnte und daher als vielversprechend galt (Mondal et al., 2004, Manda et al., 2011).

Es ergibt sich aufgrund der nicht zufriedenstellenden antioxidativen Wirkung der getesteten Substanz die Frage nach der Ausschöpfung alternativer Wirkmechanismen. Dabei bieten die Arme der UPR mit den durch sie aktivierten Transkriptionsfaktoren

zahlreiche Ansatzpunkte. Laut Malhotra et al. ist, wie auch im vorherigen Absatz angedeutet, durch die Deletion von CHOP hinsichtlich dem Funktionserhalt des ER ein ähnlicher Effekt wie beim Einsatz von Antioxidantien zu erwarten (Malhotra et al., 2008). Die Förderung und Verstärkung der über Nrf2 und ATF4 vermittelten antioxidativen Stressantwort im Rahmen der UPR wäre ein weiterer Ansatzpunkt (Cao and Kaufman, 2014). Wie oben erwähnt, weist auch XBP1 antioxidative Eigenschaften auf. Nrf2 schützt die Zelle unter anderem über die Induktion von Hsp32 vor ROS-bedingtem Schaden (Cullinan and Diehl, 2004). ATF4 wird als downstream-target von PERK als physiologische Antwort der Zelle auf oxidativen Stress aktiviert (Harding et al., 2003). PERK hat, abgesehen von der Aktivierung von CHOP und dessen downstream-targets im Rahmen der UPR, eine wichtige Funktion an den MAMs hinsichtlich der Vermittlung von Stresssignalen zwischen ER und Mitochondrien. Sein Vorkommen an den MAMs ist dabei, mehr als im Rahmen der UPR, entscheidend für die Übermittlung von Apoptose-induzierenden Signalen als Reaktion auf ROS verantwortlich (Verfaillie et al., 2012). In Abwesenheit oder bei Blockierung von PERK können die Mitochondrien vor der Schädigung durch ROS bewahrt werden. Dies steht im Gegensatz zu der ebenfalls über PERK in der UPR vermittelten antioxidativen Stressantwort. Kouroku et al. konnten 2007 wiederum zeigen, dass Zellen mit phosphoryliertem eIF2 α eine Resistenz gegenüber oxidativem Stress entwickelten, da dieses downstream-target von PERK die globale Proteintranslation hemmt. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde der Focus auf die Unterstützung von mitochondrialen, antioxidativ wirksamen Enzymen gelegt, da sie wesentlich an der Reduzierung der Schädlichkeit von aus katabolen Stoffwechselwegen entstandenen ROS beteiligt sind (Quijano et al., 2015). Auch die initiale Vermeidung der ROS-Generierung durch Efavirenz wäre ein möglicher therapeutischer Ansatz. Der exakte molekulare Mechanismus dahinter ist noch nicht erforscht; er wäre jedoch ein sinnvoller Gegenstand zukünftiger Studien.

Der Einsatz von Antioxidantien als Zusatzmedikation für Patienten unter ART zur Reduktion der zahlreichen Nebenwirkungen sollte in klinischen und Tierstudien erprobt werden.

Zusätzlich zur medikamentös möglichen Eindämmung der oxidativen Stressantwort ist bei Patienten unter ART die Vermeidung einer kombinierten Gabe prooxidativer Substanzen wichtig. Bereits nach alleiniger Applikation von Efavirenz ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich in der Immunfluoreszenz ein Verlust von endothelspezifischen Eigenschaften wie der Fähigkeit zur Ausbildung von Pseudotubes. Die vollständige Zerstörung der Struktur manifestierte sich bei Konzentrationen von 15 $\mu\text{g/ml}$. Außerdem wurde ER-Vakuolisierung sichtbar, die als Zeichen der Zytotoxizität der Substanz zu werten ist und sich typischerweise im Rahmen von Vorgängen der Makroautophagie präsentiert. Da die hier aufgetretene Vakuolisierung in vorausgegangenen Studien bereits in mit Nelfinavir behandelten Tumorzellen als Folge von ER-Stress beobachtet wurde (Bruning et al., 2009), testeten wir die Kombination der beiden Substanzen. Die kumulativ schädliche Wirkung zeigte sich bereits in

niedriger Dosierung von 4 µg/ml. Es kam es zur Induktion von Hsp32, HspA1, Bip und XBP1s (Bruning, 2011).

Letztendlich stellt sich in diesem Zusammenhang auch die Frage nach der interindividuell unterschiedlichen optimalen Dosierung der Substanz. Während hohe Plasmakonzentrationen vermehrt zu ZNS-Nebenwirkungen führen, kommt es bei niedrigem EFV-Level im Plasma häufiger zu Therapieversagen durch vermindertes virologischen Ansprechen (Pfister et al., 2003). Dies gilt insbesondere für Plasmakonzentration von <1,1 µg/ml (Leth et al., 2006, Pfister et al., 2003). Einfluss auf die interindividuellen Unterschiede nehmen Faktoren wie das Geschlecht, die ethnische Zugehörigkeit sowie der genetische Polymorphismus (Nanzigu et al., 2012). In einer 2011 von Sanchez et al. durchgeführten Studie wurde eine Schwankung der Efavirenz-Plasmakonzentration von 0,84 bis 15,16 µg/ml erfasst, mit einem Mittelwert von 3,18 (+1,61 µg/ml). Die empfohlene Efavirenz-Plasmakonzentration zwölf Stunden nach Applikation liegt derzeit bei 1-4 µg/ml (Marzolini et al., 2001, Solas and Gagnieu, 2011).

Zur Anpassung der Dosis im Hinblick auf die Minimierung der Toxizität kann unter anderem die Erfassung des CYP2B6-Genotyps von essentieller Bedeutung sein (Damronglerd et al., 2015). Neben einem Mangel des Enzyms spielt auch Autoinduktion eine Rolle (Zhu et al., 2009). Patienten mit einem Genotyp, der für eine verminderte Expression des Enzyms verantwortlich ist, müssten dementsprechend eine geringere Dosis erhalten (Martin et al., 2014). Die Assoziierung der Efavirenz-Konzentration mit dem CYP2B6-Polymorphismus ist somit für eine individuell optimale Dosierung der Substanz von Bedeutung.

Abgesehen von der Toxizitätsminderung von Efavirenz beim Einsatz im Rahmen der ART ist die Repositionierung in der Tumorthherapie eine interessante Perspektive, die in der Zukunft weiter geprüft werden sollte. Die vielversprechendsten Ergebnisse sind mit Sicherheit die durch Efavirenz induzierten Veränderungen der Endothelzellphysiologie, mit denen ein Antiangiogenese-Effekt postuliert werden kann.

Wir beobachteten durch die Inkubation der EA.hy926 Zellen mit Efavirenz und Nelfinavir eine Inhibierung der endotheltypischen Netzbildung. Dass die Zellen trotz Verlust der Interaktions- und Verkettungsfähigkeiten weiterhin ein Signal aussandten, spricht gegen das Stattfinden eines unspezifischen Zelltodes und für einen selektiven Funktionsverlust der endothelspezifischen Eigenschaften. Der Einsatz der Kombination von Efavirenz und Nelfinavir könnte daher in der Therapie von stark vaskularisierten Tumoren von Bedeutung sein und sollte weitere Studien nach sich ziehen. Besonders interessant wäre die Kombinationstherapie deshalb, weil die zu applizierenden Dosen der Einzelsubstanzen deutlich geringer sein müssten als bei alleiniger Gabe eines Medikamentes. Dabei ist die Gratwanderung zwischen der Notwendigkeit zur Applikation einer gewissen Dosis, um den gewünschten Antiangiogeneseeffekt zu erzielen und des möglichst minimalen Auslösens von Nebenwirkungen, vor allem auf kardiovaskulärer Ebene, von essentieller Wichtigkeit. Für den Einsatz einer Kombination der beiden Substanzen wären weitergehende Studien notwendig.

Xenograft-Modelle, die sowohl das Zellüberleben der Tumorzellen sowie den Einfluss auf die Tumovaskularisierung erforschen, würden eine konsequente Fortführung der vorliegenden Ergebnisse darstellen.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die zusätzliche Hemmung von Faktoren, die die Endothelproliferation fördern.

Zeng et al. zeigten 2013, dass gespleißtes XBP1 neben seiner Funktion als Signalmolekül in der ER-Stressreaktion an der Endothelzellproliferation und somit an der Angiogenese beteiligt ist. Dies trifft insbesondere auf ischämisches Gewebe zu und geschieht über durch VEGF induzierte Signalwege (Zeng et al., 2013). Daher könnte eine medikamentöse Blockade von XBP1 zur Proliferationshemmung von stark vaskularisierten Tumoren beitragen. Hierzu wäre beispielsweise der Einsatz eines IRE-1-Endoribonukleaseinhibitor möglich (Hetz et al., 2013, Cross et al., 2012). XBP1 hat somit hinsichtlich seiner möglichen Rolle in Endothelzellen, ähnlich wie Hsp32, eine zweigeteilte Bedeutung. Bei chronisch durch den Einsatz von Efavirenz im Rahmen der ART exponierten Patienten scheint XBP1 als reaktiv hochreguliertes, antioxidativ wirksames Protein eine positive und erwünschte Funktion auszuüben. Bei stark vaskularisierten Tumoren hingegen wäre eine Hemmung der durch XBP1 geförderten Angiogenese und Endothelzellproliferation anzustreben.

Ein weiterer möglicher Kombinationspartner wäre ein VEGF-Inhibitor. In einer Studie von Karali et al. wurde die Aktivierung der UPR durch VEGF unter physiologischen Bedingungen beschrieben. Dies deutet auf eine positive Beeinflussung des Zellüberlebens durch die UPR hin, um endothelspezifische Eigenschaften und Funktionen wie Differenzierung, Angiogenese und Vaskulogenese zu fördern (Karali et al., 2014). Eine Inhibierung dieses endothelproliferierenden Faktors könnte die Wirksamkeit von Efavirenz erhöhen bzw. die gewünschte Wirkung bereits durch geringere Dosierungen erzielen. Liu et al. identifizierten den IRE-1 und ATF6-Arme der UPR als mögliche Targets zur Verhinderung pathologischer Angiogenese (Liu et al., 2013). Die Hemmung der UPR war in der dargestellten Studie besonders wirksam bei gleichzeitiger Gabe eines VEGF-Antikörpers.

Hsp32 konnte ebenfalls als proliferationsfördernder, proangiogener Faktor von Tumoren identifiziert werden, der speziell die Angiogenese und Metastasierung vorantreibt (Was et al., 2010, Jozkowicz et al., 2007). Auch hierfür wäre die Erprobung des Einsatzes einer hemmenden Substanz in Kombination mit Efavirenz im Rahmen zukünftiger Studien sinnvoll.

An Krebszellen, den Mammakarzinomzellen MCF-7, führten wir nur wenige Versuche durch, da die Effekte an Endothelzellen nach Applikation deutlich geringerer Dosen so eindrücklich waren. Es zeigte sich in den Tumorzellen ein vierzigfach erhöhtes Spaltprodukt von XBP1 nach kombinierter Applikation von Efavirenz und Nelfinavir; folglich eine massive Stressreaktion. Allerdings sahen wir den Effekt nur bei der Kombination von hohen Dosen der beiden Substanzen (10µg/ml) und konzentrierten uns daher maßgeblich auf die Versuchsreihen an Endothelzellen. Die observierte Hochregulation von ER-Stress- und Autophagiemarkern wie Sestrin 2 und XBP1

müssten konsequenterweise Untersuchungen zum Zellüberleben und zu Zellproliferation nach sich ziehen. Es ist nicht abschließend geklärt, ob diese Marker Kompensationsmechanismen der Tumorzellen zu ihrem Erhalt widerspiegeln oder bereits Vorgänge andeuten, die zu Zelluntergang führen.

Zahlreiche Forschungsergebnisse erfassen die Bedeutung von Nelfinavir als potenzielles Krebsmedikament (Gills et al., 2007, Bruning et al., 2009, Koltai, 2015). Die Induktion von ER-Stress durch Nelfinavir und die Möglichkeit des Nutzens eines zytotoxischen Effekts in der Tumorthherapie bei der Applikation höherer Konzentrationen, als sie für die Virussuppression in der ART notwendig sind, wurde beschrieben (Bruning, 2011). In Kombination mit Tamoxifen wurde bereits bei einer Konzentration von 6µg/ml ein zytotoxischer, Apoptose-induzierender Effekt auf Brustkrebszellen nachgewiesen. Die Induktion von über die UPR vermitteltem Zelltod und Apoptose konnte auch an sonst chemoresistenten ovariellen Krebszellen gezeigt werden (Bruning et al., 2009, Bruning et al., 2010). Der toxischen Wirkung von Nelfinavir liegt unter anderem die Akkumulation von misgefalteten Proteinen im Rahmen der ER-Stressreaktion mit konsekutiver Apoptoseinduktion zugrunde (Schonthal, 2013). Mahoney et al. beschrieben 2013 eine durch Nelfinavir ausgelöste Induktion von über die UPR vermittelter Autophagie. Dabei wurde ein verbessertes Therapieansprechen unter anderem durch den Nachweis einer deutlich vermehrten Toxizität von Nelfinavir auf Krebszellen in der Kombination mit einer Autophagiehemmenden Substanz deutlich (Mahoney et al., 2013). Der synergistische Effekt der Kombination zweier Medikamente konnte für Nelfinavir mit Bortezomib bzw. Nelfinavir mit Chloroquin nachgewiesen werden (Driessen et al., 2015, Johnson et al., 2015). Die Erkenntnis, dass Nelfinavir in der Vergangenheit insbesondere in Kombination mit einer anderen Substanz in niedriger Konzentration die gewünschte antitumorale Wirkung erzielen konnte, führte zu dem Entschluss, die Kombination von Nelfinavir und Efavirenz zu testen.

Die antitumorale Wirkung von Efavirenz wurde bislang noch nicht im gleichen Ausmaß erforscht. Es gibt jedoch aus anderen Studien einige Beispiele für die antitumorale bzw. zytotoxische Wirkung von Efavirenz auf unterschiedliche Karzinomgewebe (Hecht et al., 2013, Houede et al., 2014, Hecht et al., 2015). Von besonderem Interesse vor dem Hintergrund der vorliegenden Studie ist die Tatsache, dass Efavirenz für den regressionsfördernden Effekt der ART auf Kaposi-Sarkome mitverantwortlich gemacht werden konnte (Servato et al., 2013).

Für den Einsatz von Efavirenz in der Tumorthherapie könnte die zusätzliche gezielte Inhibierung einzelner, in die ausgelöste Stressreaktion involvierter, Proteine sowie der Autophagievorgänge von Bedeutung sein. Die „pro-survival“ Funktion der reaktiv ausgelösten Mechanismen in der Zelle soll so inhibiert werden. Da die als Reaktion auf Efavirenz ausgelösten Vorgänge in MCF-7 und Endothelzellen Gemeinsamkeiten aufweisen, wird ihre Bedeutung und Implikation als mögliches Target in der Tumorthherapie im Folgenden für beide Zelllinien gemeinsam erörtert.

Sie gelten jedoch insbesondere für Endothelzellen im Sinne einer Antiangiogenese-Therapie und stellen eine Ergänzung der bereits erwähnten Möglichkeiten zur Hemmung der Endothelzellproliferation dar.

Die medikamentöse Beeinflussung von Komponenten der ER-Stressreaktion und der UPR hat in der Krebstherapie an Bedeutung gewonnen (Luo and Lee, 2013, Manie et al., 2014). Auf die Abgrenzung zur oben erwähnten potenziellen Hemmung von Komponenten einer massiven ER-Stressreaktion, um Schäden an Endothelzellen im Rahmen der ART einzudämmen, sei hier hingewiesen.

Die UPR initiiert über CHOP Signalwege des Zelltodes; die funktionelle Gegenseite stellen GRP78 sowie andere Autophagie-induzierende Faktoren dar (Schonthal, 2013). Durch die Inhibierung der UPR wird das Eintreten zytotoxischer Autophagie-Prozesse verhindert (Jheng et al., 2014). Die medikamentöse Hemmung von PERK, um die antioxidative Stressantwort einzudämmen, stellt eine zusätzliche Perspektive in der Tumorthherapie dar (Bobrovnikova-Marjon et al., 2010). Die Förderung der Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Rahmen einer massiven ER-Stressreaktion könnte wiederum im Sinne eines proteotoxischen Effekts auf die Zelle genutzt werden (Bruning and Juckstock, 2015). In einer von Manie et al. durchgeführten Studie wurde XBP1 als proliferationsfördernder Faktor für triple-negative Brustkrebszellen beschrieben, indem er die Glucoseaufnahme in die Zellen erleichtert (Manie et al., 2014). Eine zusätzliche Hemmung von XBP1 wäre folglich in der Tumorthherapie möglich, um seine „pro-survival“ Funktion auszuschalten.

Sowohl bei den Versuchen an Endothelzellen als auch an den MCF-7-Zellen wiesen wir Autophagie-Vorgänge nach. Autophagie-Modulation erlangt in der Tumorthherapie einen immer höheren Stellenwert. Ob Autophagie durch Erhaltung der zellulären Integrität und Regulation von Prozessen des Zelltodes zur Tumorprogression führt oder durch Verhinderung von Zelltod und Förderung des Zellüberlebens von Tumorzellen onkogen wirkt, hängt vom Zelltyp sowie der Entwicklungsphase der Tumorzelle bzw. dem Tumorstadium ab (Bhutia et al., 2013). Eine Herunterregulation von Autophagievorgängen durch Mangel des Autophagie-regulierenden Beclin 1 konnte als progressionsfördernder Faktor bei Prostata-, Brust- und ovariellen Krebszellen nachgewiesen werden, wohingegen massive Autophagievorgänge in Tumoren mit Ras-Aktivierung gezeigt wurden (Lozy and Karantza, 2012). Autophagie spielt demnach in der Tumorentwicklung eine duale Rolle (Kania et al., 2015). Als Tumorphylaxe bietet sich die Förderung von Autophagie an, da so dysfunktionale Strukturen und Organellen abgebaut werden und die zelluläre Integrität erhalten werden kann, bevor es zu massivem Schaden kommt. Bei bereits bestehenden Tumoren ist vielmehr die Hemmung von Autophagie-Prozessen essentiell, da die Tumorzellen in diesem Stadium Autophagie als Überlebensstrategie nutzen, insbesondere auch zum Abbau von applizierten Medikamenten während der Therapie (Ravikumar et al., 2010, Kania et al., 2015, Guo et al., 2013, Liu et al., 2016). Autophagiemodulation könnte hier bestimmte Wirkungsprofile von Medikamenten verstärken und Chemoresistenzen vermindern (Macintosh and Ryan, 2013, Bhutia et al., 2013). Außerdem wäre eine Toxizitätsminderung durch Dosisreduktion des initial eingesetzten Medikaments

möglich (Verfaillie et al., 2010). Als Zielstruktur bieten sich beispielsweise mTor-Inhibitoren wie Sestrin 2 an (Budanov and Karin, 2008).

Efavirenz könnte somit in Kombination mit einer Autophagie-hemmenden Substanz eingesetzt werden um die Wirksamkeit der stressinduzierenden Substanz zu erhöhen und die Apoptose von Tumorzellen zu fördern. Eine Förderung des ACD für einen antitumoralen Effekt stellt im Gegensatz dazu eine weitere Möglichkeit dar. Dabei scheint die Kombination zweier verschiedener Therapieansätze, die Autophagie über unterschiedliche Mechanismen aktivieren, die Sensitivität der Zelle für den ACD besonders zu erhöhen (Bhutia et al., 2013). In Krebszellen konnte der durch oxidativen Stress ausgelöste und von apoptotischen Vorgängen unabhängige ACD nachgewiesen werden (Chen et al., 2008). Von Beclin-1 unabhängige Autophagie-Vorgänge, die durch ROS initiiert werden, scheinen mitunter dafür verantwortlich sein, Wege des Zelltodes einzuleiten (Al Dhaheri et al., 2014). Unter welchen Bedingungen und mittels welcher Targets Efavirenz den ACD auslösen kann, wäre ein sinnvoller Gegenstand zukünftiger Forschung. Apostolova et al. wiesen an Hepatozyten nach, dass es bei massiver Autophagie-Induktion durch Efavirenz zu einer Erschöpfung der protektiven Wirkung mit konsekutiver Stressreaktion kam (Apostolova et al., 2011). Die Grenze zu ermitteln, ab der Autophagie-Prozesse nicht mehr protektiv wirken, sondern Zelltod induzieren, ist von essentieller Bedeutung, um deren Modulation in der Tumorthherapie nutzen zu können.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigte sich schwerpunktmäßig mit der Wirkungsweise von Efavirenz auf Endothelzellen und der damit verbundenen Veränderung der Zellphysiologie.

Es zeigten sich massive Zellschädigungen und Autophagievorgänge ab Konzentrationen von 10 µg/ml Efavirenz in der Immunfluoreszenz und der Phasenkontrastmikroskopie. Im Western Blot und in der PCR konnte dabei bereits bei noch niedrigeren und auch pharmakologisch relevanten Konzentrationen eine korrespondierende Erhöhung von Hitzeschockproteinen und Markern von ER- und oxidativem Stress nachgewiesen werden. Die Zellproliferation sowie das Zellüberleben wurden durch den induzierten ER-Stress, in Korrelation zur applizierten Konzentration, eingeschränkt.

Durch die Kombination von Efavirenz mit dem Proteaseinhibitor Nelfinavir konnten wir verstärkte Reaktionen von ER- und oxidativem Stress nachweisen. Die kumulative Wirkung der beiden prooxidativen Substanzen wurde somit herausgestellt.

Dies unterstreicht die Wichtigkeit, eine Substanz zu finden, die die toxischen Effekte von Efavirenz zu verhindern bzw. zu vermindern vermag, um die Nebenwirkungen für chronisch exponierte Patienten zu minimieren. Mit den antioxidativen Substanzen NAC und Quercetin konnten wir zwar leicht abschwächende Effekte, aber keinen wirklichen

Schutz vor den zellschädigenden Wirkungen von Efavirenz erreichen. Die Fortführung der Forschung auf diesem Gebiet ist essentiell; ein Fokus liegt dabei auf der Minimierung des kardiovaskulären Risikos von HIV-Patienten unter ART insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Zahl der von Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose oder Diabetes mellitus betroffenen Patienten in unserer Gesellschaft stetig zunimmt. Dies könnte durch den Einsatz einer antioxidativ wirksamen Substanz und konsekutiv verminderter ROS-Produktion gelingen.

Zum anderen führten die observierten Marker für oxidativen, ER-Stress und Autophagie zu der Hypothese, Efavirenz möglicherweise als antiangiogene Substanz in der Therapie von stark vaskularisierter Tumoren einsetzen zu können. Die in der Immunfluoreszenz deutlich erkennbaren Autophagievorgänge, Vakuolisierung und der Verlust von Pseudotube-Bildung spiegelten die Zellschädigung und den Verlust endothelspezifischer Eigenschaften und Strukturen wider.

Die Repositionierung des Medikaments sollte im Rahmen von Studien zu Tumorerkrankungen hinsichtlich seiner antitumoralen Wirkung weitergehend geprüft werden.

Die kombinierte Applikation von Efavirenz mit einer weiteren Substanz könnte die Wirksamkeit deutlich erhöhen. Hierzu gehören Autophagie-hemmende Medikamente, um Autophagievorgänge als möglichen „rescue“-Mechanismus der Zelle auszuschalten.

Die weitere Evaluierung möglicher Kombinationssubstanzen von Efavirenz sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Dabei spielen antioxidative Substanzen zur Toxizitätsminderung beim Einsatz im Rahmen der ART ebenso eine Rolle wie mögliche Substanzen zur Effektivitätssteigerung von Efavirenz in der Antiangiogenesetherapie von hoch vaskularisierten Tumoren.

6. Literaturverzeichnis

- AL DHAHERI, Y., ATTOUB, S., RAMADAN, G., ARAFAT, K., BAJBOUJ, K., KARUVANTEVIDA, N., ABUQAMAR, S., EID, A. & IRATNI, R. 2014. Carnosol induces ROS-mediated beclin1-independent autophagy and apoptosis in triple negative breast cancer. *PLoS One*, 9, e109630.
- ALFADDA, A. A. & SALLAM, R. M. 2012. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 936486.
- APOSTOLOVA, N., FUNES, H. A., BLAS-GARCIA, A., ALEGRE, F., POLO, M. & ESPLUGUES, J. V. 2015a. Involvement of nitric oxide in the mitochondrial action of efavirenz: a differential effect on neurons and glial cells. *J Infect Dis*, 211, 1953-8.
- APOSTOLOVA, N., FUNES, H. A., BLAS-GARCIA, A., GALINDO, M. J., ALVAREZ, A. & ESPLUGUES, J. V. 2015b. Efavirenz and the CNS: what we already know and questions that need to be answered. *J Antimicrob Chemother*, 70, 2693-708.
- APOSTOLOVA, N., GOMEZ-SUCERQUIA, L. J., ALEGRE, F., FUNES, H. A., VICTOR, V. M., BARRACHINA, M. D., BLAS-GARCIA, A. & ESPLUGUES, J. V. 2013. ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: mitochondria again. *J Hepatol*, 59, 780-9.
- APOSTOLOVA, N., GOMEZ-SUCERQUIA, L. J., GORTAT, A., BLAS-GARCIA, A. & ESPLUGUES, J. V. 2011. Autophagy as a rescue mechanism in efavirenz-induced mitochondrial dysfunction: a lesson from hepatic cells. *Autophagy*, 7, 1402-4.
- APOSTOLOVA, N., GOMEZ-SUCERQUIA, L. J., MORAN, A., ALVAREZ, A., BLAS-GARCIA, A. & ESPLUGUES, J. V. 2010. Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells. *Br J Pharmacol*, 160, 2069-84.
- ARANDA, A., SEQUEDO, L., TOLOSA, L., QUINTAS, G., BURELLO, E., CASTELL, J. V. & GOMBAU, L. 2013. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol In Vitro*, 27, 954-63.
- ARANDA, E. & OWEN, G. I. 2009. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol Res*, 42, 377-89.
- BELLOT, G., GARCIA-MEDINA, R., GOUNON, P., CHICHE, J., ROUX, D., POUYSSEGUR, J. & MAZURE, N. M. 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*, 29, 2570-81.

- BENBROOK, D. M. & LONG, A. 2012. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol*, 34, 286-97.
- BERTRAND, L. & TOBOREK, M. 2015. Dysregulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagic Responses by the Antiretroviral Drug Efavirenz. *Mol Pharmacol*, 88, 304-15.
- BEST, B. M. & GOICOECHEA, M. 2008. Efavirenz--still first-line king? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4, 965-72.
- BHUTIA, S. K., MUKHOPADHYAY, S., SINHA, N., DAS, D. N., PANDA, P. K., PATRA, S. K., MAITI, T. K., MANDAL, M., DENT, P., WANG, X. Y., DAS, S. K., SARKAR, D. & FISHER, P. B. 2013. Autophagy: cancer's friend or foe? *Adv Cancer Res*, 118, 61-95.
- BOBROVNIKOVA-MARJON, E., GRIGORIADOU, C., PYTEL, D., ZHANG, F., YE, J., KOUMENIS, C., CAVENER, D. & DIEHL, J. A. 2010. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*, 29, 3881-95.
- BRUNING, A. 2011. Analysis of nelfinavir-induced endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol*, 491, 127-42.
- BRUNING, A., BURGER, P., VOGEL, M., RAHMEH, M., GINGELMAIERS, A., FRIESE, K., LENHARD, M. & BURGESS, A. 2009. Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis. *Cancer Biol Ther*, 8, 226-32.
- BRUNING, A., FRIESE, K., BURGESS, A. & MYLONAS, I. 2010. Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of nelfinavir in breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 12, R45.
- BRUNING, A. & JUCKSTOCK, J. 2015. Misfolded proteins: from little villains to little helpers in the fight against cancer. *Front Oncol*, 5, 1-12.
- BRUNING, A., RAHMEH, M. & FRIESE, K. 2013. Nelfinavir and bortezomib inhibit mTOR activity via ATF4-mediated sestrin-2 regulation. *Mol Oncol*, 7, 1012-8.
- BUDANOV, A. V. & KARIN, M. 2008. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134, 451-60.
- BUMPUS, N. N. 2011. Efavirenz and 8-hydroxyefavirenz induce cell death via a JNK- and BimEL-dependent mechanism in primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 257, 227-34.
- CALZA, L. 2012. Renal toxicity associated with antiretroviral therapy. *HIV Clin Trials*, 13, 189-211.
- CAO, S. S. & KAUFMAN, R. J. 2014. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21, 396-413.

- CARCHMAN, E. H., RAO, J., LOUGHRAN, P. A., ROSENGART, M. R. & ZUCKERBRAUN, B. S. 2011. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice. *Hepatology*, 53, 2053-62.
- CHAMBERS, J. E. & MARCINIAK, S. J. 2014. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 2. Protein misfolding and ER stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307, C657-70.
- CHAUDHARI, N., TALWAR, P., PARIMISETTY, A., LEFEBVRE, C. & RAVANAN, P. 2014. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 1-15.
- CHEN, C., DUDENHAUSEN, E. E., PAN, Y. X., ZHONG, C. & KILBERG, M. S. 2004. Human CCAAT/enhancer-binding protein beta gene expression is activated by endoplasmic reticulum stress through an unfolded protein response element downstream of the protein coding sequence. *J Biol Chem*, 279, 27948-56.
- CHEN, Y., MCMILLAN-WARD, E., KONG, J., ISRAELS, S. J. & GIBSON, S. B. 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ*, 15, 171-82.
- CROSS, B. C., BOND, P. J., SADOWSKI, P. G., JHA, B. K., ZAK, J., GOODMAN, J. M., SILVERMAN, R. H., NEUBERT, T. A., BAXENDALE, I. R., RON, D. & HARDING, H. P. 2012. The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E869-78.
- CULLINAN, S. B. & DIEHL, J. A. 2004. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 279, 20108-17.
- DAMRONGLERD, P., SUKASEM, C., THIPMONTREE, W., PUANGPETCH, A. & KIERTIBURANAKUL, S. 2015. A pharmacogenomic prospective randomized controlled trial of CYP2B6 polymorphisms and efavirenz dose adjustment among HIV-infected Thai patients: a pilot study. *Pharmacogenomics Pers Med*, 8, 155-62.
- DAUGAARD, M., ROHDE, M. & JAATTELA, M. 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*, 581, 3702-10.
- DE GAETANO DONATI, K., RABAGLIATI, R., IACOVIELLO, L. & CAUDA, R. 2004. HIV infection, HAART, and endothelial adhesion molecules: current perspectives. *Lancet Infect Dis*, 4, 213-22.
- DE OLIVEIRA, M. R., NABAVI, S. M., BRAIDY, N., SETZER, W. N., AHMED, T. & NABAVI, S. F. 2015. Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. *Biotechnol Adv*.

- DECUYPERE, J. P., BULTYNCK, G. & PARYS, J. B. 2011. A dual role for Ca(2+) in autophagy regulation. *Cell Calcium*, 50, 242-50.
- DECUYPERE, J. P., KINDT, D., LUYTEN, T., WELKENHUYZEN, K., MISSIAEN, L., DE SMEDT, H., BULTYNCK, G. & PARYS, J. B. 2013. mTOR-Controlled Autophagy Requires Intracellular Ca(2+) Signaling. *PLoS One*, 8, e61020.
- DENIAUD, A., SHARAF EL DEIN, O., MAILLIER, E., PONCET, D., KROEMER, G., LEMAIRE, C. & BRENNER, C. 2008. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, 27, 285-99.
- DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES 2015. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents.
- DIAZ-VILLANUEVA, J. F., DIAZ-MOLINA, R. & GARCIA-GONZALEZ, V. 2015. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 17193-230.
- DICKINSON, L., AMIN, J., ELSE, L., BOFFITO, M., EGAN, D., OWEN, A., KHOO, S., BACK, D., ORRELL, C., CLARKE, A., LOSSO, M., PHANUPHAK, P., CAREY, D., COOPER, D. A. & EMERY, S. 2015. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Comparison of Once-Daily Efavirenz (400 mg vs. 600 mg) in Treatment-Naive HIV-Infected Patients: Results of the ENCORE1 Study. *Clin Pharmacol Ther*, 98, 406-16.
- DING, W. X., NI, H. M., GAO, W., YOSHIMORI, T., STOLZ, D. B., RON, D. & YIN, X. M. 2007. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*, 171, 513-24.
- DONG, C., ZHENG, H., HUANG, S., YOU, N., XU, J., YE, X., ZHU, Q., FENG, Y., YOU, Q., MIAO, H., DING, D. & LU, Y. 2015. Heme oxygenase-1 enhances autophagy in podocytes as a protective mechanism against high glucose-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 337, 146-59.
- DRIESSEN, C., KRAUS, M., JOERGER, M., ROSING, H., BADER, J., HITZ, F., BERSET, C., XYRAFAS, A., HAWLE, H., BERTHOD, G., OVERKLEEF, H. S., SESSA, C., HUITEMA, A., PABST, T., VON MOOS, R., HESS, D. & MEY, U. J. 2015. Treatment with the HIV protease inhibitor Nelfinavir triggers the unfolded protein response and may overcome proteasome inhibitor resistance of multiple myeloma in combination with bortezomib: a phase I trial (SAKK 65/08). *Haematologica*.
- DURANTE, W. 2010. Targeting heme oxygenase-1 in vascular disease. *Curr Drug Targets*, 11, 1504-16.

- ENGEDAL, N., TORGERSEN, M. L., GULDVIK, I. J., BARFELD, S. J., BAKULA, D., SAETRE, F., HAGEN, L. K., PATTERSON, J. B., PROIKAS-CEZANNE, T., SEGLEN, P. O., SIMONSEN, A. & MILLS, I. G. 2013. Modulation of intracellular calcium homeostasis blocks autophagosome formation. *Autophagy*, 9, 1475-90.
- FAROOQI, A. A., LI, K. T., FAYYAZ, S., CHANG, Y. T., ISMAIL, M., LIAW, C. C., YUAN, S. F., TANG, J. Y. & CHANG, H. W. 2015. Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Tumour Biol.*
- FILOMENI, G., DE ZIO, D. & CECCONI, F. 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*, 22, 377-88.
- FIMIA, G. M. & PIACENTINI, M. 2010. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 67, 1581-8.
- FORTIN, C. & JOLY, V. 2004. Efavirenz for HIV-1 infection in adults: an overview. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2, 671-84.
- GARAEVA, A. A., KOVALEVA, I. E., CHUMAKOV, P. M. & EVSTAFIEVA, A. G. 2016. Mitochondrial dysfunction induces SESN2 gene expression through Activating Transcription Factor 4. *Cell Cycle*, 15, 64-71.
- GILLS, J. J., LOPICCOLO, J., TSURUTANI, J., SHOEMAKER, R. H., BEST, C. J., ABU-ASAB, M. S., BOROJERDI, J., WARFEL, N. A., GARDNER, E. R., DANISH, M., HOLLANDER, M. C., KAWABATA, S., TSOKOS, M., FIGG, W. D., STEEG, P. S. & DENNIS, P. A. 2007. Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 13, 5183-94.
- GLIMCHER, L. H. 2010. XBP1: the last two decades. *Ann Rheum Dis*, 69 Suppl 1, i67-71.
- GOMEZ-SUCERQUIA, L. J., BLAS-GARCIA, A., MARTI-CABRERA, M., ESPLUGUES, J. V. & APOSTOLOVA, N. 2012. Profile of stress and toxicity gene expression in human hepatic cells treated with Efavirenz. *Antiviral Res*, 94, 232-41.
- GREEN, D. R., GALLUZZI, L. & KROEMER, G. 2014. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science*, 345, 1250256.
- GRESELE, P., FALCINELLI, E., SEBASTIANO, M. & BALDELLI, F. 2012. Endothelial and platelet function alterations in HIV-infected patients. *Thromb Res*, 129, 301-8.
- GUO, J. Y., XIA, B. & WHITE, E. 2013. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell*, 155, 1216-9.

- GUPTA, S. K., SHEN, C., MOE, S. M., KAMENDULIS, L. M., GOLDMAN, M. & DUBE, M. P. 2012. Worsening endothelial function with efavirenz compared to protease inhibitors: a 12-month prospective study. *PLoS One*, 7, e45716.
- GUTTERMAN, D. D. 2005. Mitochondria and reactive oxygen species: an evolution in function. *Circ Res*, 97, 302-4.
- HAN, J., BACK, S. H., HUR, J., LIN, Y. H., GILDERSLEEVE, R., SHAN, J., YUAN, C. L., KROKOWSKI, D., WANG, S., HATZOGLOU, M., KILBERG, M. S., SARTOR, M. A. & KAUFMAN, R. J. 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*, 15, 481-90.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y., ZENG, H., NOVOA, I., LU, P. D., CALFON, M., SADRI, N., YUN, C., POPKO, B., PAULES, R., STOJDL, D. F., BELL, J. C., HETTMANN, T., LEIDEN, J. M. & RON, D. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11, 619-33.
- HECHT, M., ERBER, S., HARRER, T., KLINKER, H., ROTH, T., PARSCH, H., FIEBIG, N., FIETKAU, R. & DISTEL, L. V. 2015. Efavirenz Has the Highest Anti-Proliferative Effect of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors against Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One*, 10, e0130277.
- HECHT, M., HARRER, T., BUTTNER, M., SCHWEGLER, M., ERBER, S., FIETKAU, R. & DISTEL, L. V. 2013. Cytotoxic effect of efavirenz is selective against cancer cells and associated with the cannabinoid system. *Aids*, 27, 2031-40.
- HETZ, C., CHEVET, E. & HARDING, H. P. 2013. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 703-19.
- HOFFMANN, C. & ROCKSTROH, J. 2014. *HIV 2014/2015*, Medizin Fokus Verlag.
- HOUEDE, N., PULIDO, M., MOUREY, L., JOLY, F., FERRERO, J. M., BELLERA, C., PRIOU, F., LALET, C., LAROCHE-CLARY, A., RAFFIN, M. C., ICHAS, F., PUECH, A. & PIAZZA, P. V. 2014. A phase II trial evaluating the efficacy and safety of efavirenz in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncologist*, 19, 1227-8.
- HOYER-HANSEN, M., BASTHOLM, L., SZYNIAROWSKI, P., CAMPANELLA, M., SZABADKAI, G., FARKAS, T., BIANCHI, K., FEHRENBACHER, N., ELLING, F., RIZZUTO, R., MATHIASSEN, I. S. & JAATTELA, M. 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell*, 25, 193-205.
- HOYER-HANSEN, M. & JAATTELA, M. 2007. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ*, 14, 1576-82.

- JAMALUDDIN, M. S., LIN, P. H., YAO, Q. & CHEN, C. 2010. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*, 208, 104-11.
- JHENG, J. R., HO, J. Y. & HORNG, J. T. 2014. ER stress, autophagy, and RNA viruses. *Front Microbiol*, 5, 388.
- JOHNSON, C. E., HUNT, D. K., WILTSHIRE, M., HERBERT, T. P., SAMPSON, J. R., ERRINGTON, R. J., DAVIES, D. M. & TEE, A. R. 2015. Endoplasmic reticulum stress and cell death in mTORC1-overactive cells is induced by nelfinavir and enhanced by chloroquine. *Mol Oncol*, 9, 675-88.
- JOZKOWICZ, A., WAS, H. & DULAK, J. 2007. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal*, 9, 2099-117.
- KANG, R., ZEH, H. J., LOTZE, M. T. & TANG, D. 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 18, 571-80.
- KANIA, E., PAJAK, B. & ORZECZOWSKI, A. 2015. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *Biomed Res Int*, 2015, 352794.
- KARALI, E., BELLOU, S., STELLAS, D., KLINAKIS, A., MURPHY, C. & FOTSIS, T. 2014. VEGF Signals through ATF6 and PERK to promote endothelial cell survival and angiogenesis in the absence of ER stress. *Mol Cell*, 54, 559-72.
- KAROW, T. & LANG-ROTH, R. 2015. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Pulheim, Karow.
- KOLTAI, T. 2015. Nelfinavir and other protease inhibitors in cancer: mechanisms involved in anticancer activity. *FI000Res*, 4, 9.
- KOUROKU, Y., FUJITA, E., TANIDA, I., UENO, T., ISOAI, A., KUMAGAI, H., OGAWA, S., KAUFMAN, R. J., KOMINAMI, E. & MOMOI, T. 2007. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ*, 14, 230-9.
- KOVARI, H. & WEBER, R. 2011. Influence of antiretroviral therapy on liver disease. *Curr Opin HIV AIDS*, 6, 272-7.
- KROEMER, G., MARINO, G. & LEVINE, B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40, 280-93.
- KRYST, J., KAWALEC, P. & PILC, A. 2015. Efavirenz-Based Regimens in Antiretroviral-Naive HIV-Infected Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One*, 10, e0124279.
- LETH, F. V., KAPPELHOFF, B. S., JOHNSON, D., LOSSO, M. H., BORON-KACZMARSKA, A., SAAG, M. S., LIVROZET, J. M., HALL, D. B., LEITH, J., HUITEMA, A. D., WIT, F. W., BEIJNEN, J. H. & LANGE, J. M. 2006. Pharmacokinetic parameters of nevirapine and efavirenz in relation to antiretroviral efficacy. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 22, 232-9.

- LI, G., MONGILLO, M., CHIN, K. T., HARDING, H., RON, D., MARKS, A. R. & TABAS, I. 2009. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol*, 186, 783-92.
- LI, J., NI, M., LEE, B., BARRON, E., HINTON, D. R. & LEE, A. S. 2008. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ*, 15, 1460-71.
- LIANG, C. 2010. Negative regulation of autophagy. *Cell Death Differ*, 17, 1807-15.
- LIU, J., FAN, L., WANG, H. & SUN, G. 2016. Autophagy, a double-edged sword in anti-angiogenesis therapy. *Med Oncol*, 33, 10.
- LIU, L., QI, X., CHEN, Z., SHAW, L., CAI, J., SMITH, L. H., GRANT, M. B. & BOULTON, M. E. 2013. Targeting the IRE1alpha/XBP1 and ATF6 arms of the unfolded protein response enhances VEGF blockade to prevent retinal and choroidal neovascularization. *Am J Pathol*, 182, 1412-24.
- LIU, Y., ADACHI, M., ZHAO, S., HAREYAMA, M., KOONG, A. C., LUO, D., RANDO, T. A., IMAI, K. & SHINOMURA, Y. 2009. Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ*, 16, 847-57.
- LIU, Y. & LEVINE, B. 2015. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ*, 22, 367-76.
- LIU, Z., LV, Y., ZHAO, N., GUAN, G. & WANG, J. 2015. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Dis*, 6, e1822.
- LOZY, F. & KARANTZA, V. 2012. Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 395-401.
- LUO, B. & LEE, A. S. 2013. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*, 32, 805-18.
- LUO, Y., LU, S., ZHOU, P., AI, Q. D., SUN, G. B. & SUN, X. B. 2015. Autophagy: an Exposing Therapeutic Target in Atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*.
- MACINTOSH, R. L. & RYAN, K. M. 2013. Autophagy in tumour cell death. *Semin Cancer Biol*, 23, 344-51.
- MAGGIOLO, F. 2009. Efavirenz: a decade of clinical experience in the treatment of HIV. *J Antimicrob Chemother*, 64, 910-28.
- MAHONEY, E., MADDOCKS, K., FLYNN, J., JONES, J., COLE, S. L., ZHANG, X., BYRD, J. C. & JOHNSON, A. J. 2013. Identification of endoplasmic reticulum stress-inducing agents by antagonizing autophagy: a new potential strategy for identification of anti-cancer therapeutics in B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma*, 54, 2685-92.

- MALHOTRA, J. D., MIAO, H., ZHANG, K., WOLFSON, A., PENNATHUR, S., PIPE, S. W. & KAUFMAN, R. J. 2008. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 18525-30.
- MANDA, K. R., BANERJEE, A., BANKS, W. A. & ERCAL, N. 2011. Highly active antiretroviral therapy drug combination induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in immortalized human blood-brain barrier endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 50, 801-10.
- MANIE, S. N., LEBEAU, J. & CHEVET, E. 2014. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307, C901-7.
- MARGARITI, A., LI, H., CHEN, T., MARTIN, D., VIZCAY-BARRENA, G., ALAM, S., KARAMARITI, E., XIAO, Q., ZAMPETAKI, A., ZHANG, Z., WANG, W., JIANG, Z., GAO, C., MA, B., CHEN, Y. G., COCKERILL, G., HU, Y., XU, Q. & ZENG, L. 2013. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J Biol Chem*, 288, 859-72.
- MARINO, G., NISO-SANTANO, M., BAEHRECKE, E. H. & KROEMER, G. 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 81-94.
- MARTIN, A. S., GOMEZ, A. I., GARCIA-BERROCAL, B., FIGUEROA, S. C., SANCHEZ, M. C., CALVO HERNANDEZ, M. V., GONZALEZ-BUITRAGO, J. M., VALVERDE MERINO, M. P., TOVAR, C. B., MARTIN, A. F. & ISIDORO-GARCIA, M. 2014. Dose reduction of efavirenz: an observational study describing cost-effectiveness, pharmacokinetics and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, 15, 997-1006.
- MARZOLINI, C., TELENTI, A., DECOSTERD, L. A., GREUB, G., BIOLLAZ, J. & BUCLIN, T. 2001. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *Aids*, 15, 71-5.
- MONDAL, D., PRADHAN, L., ALI, M. & AGRAWAL, K. C. 2004. HAART drugs induce oxidative stress in human endothelial cells and increase endothelial recruitment of mononuclear cells: exacerbation by inflammatory cytokines and amelioration by antioxidants. *Cardiovasc Toxicol*, 4, 287-302.
- MOYLE, G. 2007. Metabolic issues associated with protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 45 Suppl 1, S19-26.
- MURPHY, M. E. 2013. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34, 1181-8.
- NANZIGU, S., ERIKSEN, J., MAKUMBI, F., LANKE, S., MAHINDI, M., KIGUBA, R., BECK, O., MA, Q., MORSE, G. D., GUSTAFSSON, L. L. & WAAKO, P.

2012. Pharmacokinetics of the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz among HIV-infected Ugandans. *HIV Med*, 13, 193-201.
- NARDACCI, R., AMENDOLA, A., CICCOSANTI, F., CORAZZARI, M., ESPOSITO, V., VLASSI, C., TAIBI, C., FIMIA, G. M., DEL NONNO, F., IPPOLITO, G., D'OFFIZI, G. & PIACENTINI, M. 2014. Autophagy plays an important role in the containment of HIV-1 in nonprogressor-infected patients. *Autophagy*, 10, 1167-78.
- NOVOA, I., ZENG, H., HARDING, H. P. & RON, D. 2001. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*, 153, 1011-22.
- OGATA, M., HINO, S., SAITO, A., MORIKAWA, K., KONDO, S., KANEMOTO, S., MURAKAMI, T., TANIGUCHI, M., TANII, I., YOSHINAGA, K., SHIOSAKA, S., HAMMARBACK, J. A., URANO, F. & IMAIZUMI, K. 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26, 9220-31.
- PFISTER, M., LABBE, L., HAMMER, S. M., MELLORS, J., BENNETT, K. K., ROSENKRANZ, S. & SHEINER, L. B. 2003. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of efavirenz, nelfinavir, and indinavir: Adult AIDS Clinical Trial Group Study 398. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 130-7.
- PINTON, P., GIORGI, C., SIVIERO, R., ZECCHINI, E. & RIZZUTO, R. 2008. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27, 6407-18.
- POLO, M., ALEGRE, F., FUNES, H. A., BLAS-GARCIA, A., VICTOR, V. M., ESPLUGUES, J. V. & APOSTOLOVA, N. 2015. Mitochondrial (dys)function - a factor underlying the variability of efavirenz-induced hepatotoxicity? *Br J Pharmacol*, 172, 1713-27.
- PURNELL, P. R. & FOX, H. S. 2014. Efavirenz induces neuronal autophagy and mitochondrial alterations. *J Pharmacol Exp Ther*, 351, 250-8.
- QUIJANO, C., TRUJILLO, M., CASTRO, L. & TROSTCHANSKY, A. 2015. Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol*, 8, 28-42.
- RAINBOLT, T. K., SAUNDERS, J. M. & WISEMAN, R. L. 2014. Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 528-37.
- RAKHMANNINA, N. Y. & VAN DEN ANKER, J. N. 2010. Efavirenz in the therapy of HIV infection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6, 95-103.
- RASSOW, J. 2012. *Biochemie*, Stuttgart, Thieme.
- RAVIKUMAR, B., SARKAR, S., DAVIES, J. E., FUTTER, M., GARCIA-ARENCEBIA, M., GREEN-THOMPSON, Z. W., JIMENEZ-SANCHEZ, M., KOROLCHUK, V. I., LICHTENBERG, M., LUO, S., MASSEY, D. C.,

- MENZIES, F. M., MOREAU, K., NARAYANAN, U., RENNA, M., SIDDIQI, F. H., UNDERWOOD, B. R., WINSLOW, A. R. & RUBINSZTEIN, D. C. 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90, 1383-435.
- RON, D. & WALTER, P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-29.
- RYTER, S. W. & CHOI, A. M. 2013. Regulation of autophagy in oxygen-dependent cellular stress. *Curr Pharm Des*, 19, 2747-56.
- RZYMSKI, T., MILANI, M., PIKE, L., BUFFA, F., MELLOR, H. R., WINCHESTER, L., PIRES, I., HAMMOND, E., RAGOISSIS, I. & HARRIS, A. L. 2010. Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene*, 29, 4424-35.
- SAMUNI, Y., GOLDSTEIN, S., DEAN, O. M. & BERK, M. 2013. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 4117-29.
- SANO, R. & REED, J. C. 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3460-70.
- SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., FASS, E., SHORER, H., GIL, L. & ELAZAR, Z. 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo j*, 26, 1749-60.
- SCHONTHAL, A. H. 2013. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer. *Biochem Pharmacol*, 85, 653-66.
- SCHRODER, M. 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci*, 65, 862-94.
- SERVATO, J. P., LOYOLA, A. M., SPINI, P. H., SPINI, T. H., DE FARIA, P. R. & CARDOSO, S. V. 2013. Regression of oral Kaposi's sarcoma after combination antiretroviral therapy. *Infection*, 41, 1201-2.
- SOLAS, C. & GAGNIEU, M. C. 2011. [Evidence-based therapeutic drug monitoring for efavirenz]. *Therapie*, 66, 197-205.
- SONG, B., SCHEUNER, D., RON, D., PENNATHUR, S. & KAUFMAN, R. J. 2008. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest*, 118, 3378-89.
- STAHL, L., MOBERG, L., SVENSSON, J. O. & SONNERBORG, A. 2004. Efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients: inter- and intraindividual variability and clinical effects. *Ther Drug Monit*, 26, 267-70.
- TABAS, I. & RON, D. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, 13, 184-90.
- TASDEMIR, E., CHIARA MAIURI, M., MORSELLI, E., CRIOLLO, A., D'AMELIO, M., DJAVAHERI-MERGNY, M., CECCONI, F., TAVERNARAKIS, N. &

- KROEMER, G. 2008. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy*, 4, 810-4.
- TIAN, P. G., JIANG, Z. X., LI, J. H., ZHOU, Z. & ZHANG, Q. H. 2015. Spliced XBP1 promotes macrophage survival and autophagy by interacting with Beclin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 463, 518-23.
- URRA, H., DUFEY, E., LISBONA, F., ROJAS-RIVERA, D. & HETZ, C. 2013. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3507-17.
- VANNUVEL, K., RENARD, P., RAES, M. & ARNOULD, T. 2013. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J Cell Physiol*, 228, 1802-18.
- VERFAILLIE, T., RUBIO, N., GARG, A. D., BULTYNCK, G., RIZZUTO, R., DECUYPERE, J. P., PIETTE, J., LINEHAN, C., GUPTA, S., SAMALI, A. & AGOSTINIS, P. 2012. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ*, 19, 1880-91.
- VERFAILLIE, T., SALAZAR, M., VELASCO, G. & AGOSTINIS, P. 2010. Linking ER Stress to Autophagy: Potential Implications for Cancer Therapy. *Int J Cell Biol*, 2010, 930509.
- VICENCIO, J. M., ORTIZ, C., CRIOLLO, A., JONES, A. W., KEPP, O., GALLUZZI, L., JOZA, N., VITALE, I., MORSELLI, E., TAILLER, M., CASTEDO, M., MAIURI, M. C., MOLGO, J., SZABADKAI, G., LAVANDERO, S. & KROEMER, G. 2009. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ*, 16, 1006-17.
- VOUSDEN, K. H. & LANE, D. P. 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 275-83.
- WALTER, P. & RON, D. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081-6.
- WAS, H., DULAK, J. & JOZKOWICZ, A. 2010. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr Drug Targets*, 11, 1551-70.
- WEI, Y., PATTINGRE, S., SINHA, S., BASSIK, M. & LEVINE, B. 2008. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell*, 30, 678-88.
- WEK, R. C., JIANG, H. Y. & ANTHONY, T. G. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*, 34, 7-11.
- ZENG, L., XIAO, Q., CHEN, M., MARGARITI, A., MARTIN, D., IVETIC, A., XU, H., MASON, J., WANG, W., COCKERILL, G., MORI, K., LI, J. Y., CHIEN, S., HU, Y. & XU, Q. 2013. Vascular endothelial cell growth-activated XBP1 splicing in endothelial cells is crucial for angiogenesis. *Circulation*, 127, 1712-22.

- ZHANG, D. X. & GUTTERMAN, D. D. 2007. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H2023-31.
- ZHENG, M., KIM, S. K., JOE, Y., BACK, S. H., CHO, H. R., KIM, H. P., IGNARRO, L. J. & CHUNG, H. T. 2012. Sensing endoplasmic reticulum stress by protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase promotes adaptive mitochondrial DNA biogenesis and cell survival via heme oxygenase-1/carbon monoxide activity. *Faseb j*, 26, 2558-68.
- ZHU, M., KAUL, S., NANDY, P., GRASELA, D. M. & PFISTER, M. 2009. Model-based approach to characterize efavirenz autoinduction and concurrent enzyme induction with carbamazepine. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 2346-53.
- ZITO, E. 2015. ERO1: A protein disulfide oxidase and H₂O₂ producer. *Free Radic Biol Med*, 83, 299-304.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACD	autophagic cell death
AK	Antikörper
AMPK	AMP-Kinase; überwacht den Energiestatus der Zelle durch Wahrnehmung des AMP:ATP-Verhältnisses
ARE	antioxidant response element
ART	hochaktive antiretrovirale Therapie
ATF4	activating transcription factor 4
ATF6	activating transcription factor 6
Atg 3/5/12/16	autophagy-related 3/5/12/16; mit Autophagievorgängen assoziierte Gene
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2 assoziiertes X-protein; proapoptotisch
BAK	Bcl-2 Antagonist /- Killer; proapoptotisch
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BH3-only Proteine	Untergruppe der Bcl-2-Familie; Proteine mit proapoptotischer Funktion
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bip	Binding immunoglobulin Protein (Chaperon); Synonym: GRP78
Bp	Basenpaare (base pairs)
bZIP-Familie	Transkriptionsfaktoren mit einer Basic Leucin Zipper Domäne
Ca	Calcium
CaMKK β	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase kinase- β
cDNA	complementary DNA
C/EBP β	CCAAT-enhancer-binding protein β
CHOP	C/EBP homologous protein
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP3A4/CYP2B6	Enzyme der Cytochrom P450-Familie in der Leber
DAPK	Death associated protein kinase
DCFH-DH	Dichloro-dihydro-fluorescein Diacetat

7. Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAJB1	Co-Chaperon von Hsp70; Synonym: Hsp40
EFV	Efavirenz
eIF2 α	α -Untereinheit des eukaryotischen Initiierungsfaktors 2
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-associated protein degradation
ERO1 α	endoplasmic reticulum oxidoreductin-1alpha
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GRP78/94	glucose-regulated protein
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1alpha
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HspA1	induzierbares Hitzeschockprotein; Synonym: Hsp72
HspA4	Synonym: Hsp70
HspA5	ER-residentes Hitzeschockprotein; Synonyme: Bip, GRP78
HspA8	Synonym: Hsc70
HspD1	Synonym: Hsp60
Hsp70/90/60/40/72	Hitzeschockproteine mit einer Größe von 70 kDa, 90kDa, etc.
IP3-R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
IRE-1	Inositol-requiring protein 1
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KEAP1	kelch like ECH associated protein 1
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LC3-II	LC3-Phosphatidylethanolamine conjugate
LC3B	Ubiquitin-ähnliches Protein; am Prozess der Autophagosombildung beteiligt
MAM	Mitochondrien-assoziierte ER-Membran

7. Abkürzungsverzeichnis

Mg	Magnesium
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
mTOR	mechanistic target of rapamycin; Protein mit Kernfunktion in der Autophagie-Induktion
NFV	Nelfinavir
NRTI	Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NNRTI	Nicht-nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric oxide)
NRF2	Nuclear factor-like 2
OD	optical density
P38 MAPK	p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase
p53	Tumorsuppressorgen
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI	Protease-Inhibitor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERK	Protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
pelF2 α	phosphorylierte α -Untereinheit des eukaryotischen Initiierungsfaktors 2
PK-Enhancer	Pharmakokinetik-Enhancer
Ras	(Rat sarcoma), Protoonkogen
RIDD	regulated IRE1-dependent decay of mRNA
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
TNF	Tumornekrosefaktor

UPR	Unfolded protein response
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrand Faktor
XBP 1	x-box-binding protein 1
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nucleus und Endoplasmatisches Retikulum der eukaryotischen Zelle.....	2
Abbildung 2: Proteostase und Zusammenhänge der adaptiven Mechanismen bei Zellstress.....	2
Abbildung 3: Unfolded Protein Response (UPR): Die drei Arme der UPR bei ER-Stress	4
Abbildung 4: Makroautophagie.....	6
Abbildung 5: Initiierung von Autophagie über die UPR bei langanhaltendem ER-Stress - die Rolle von Beclin 1 und XBP1 bei der Autophagie-Induktion	9
Abbildung 6: Induktoren von Autophagie.....	10
Abbildung 7: Auslösende Faktoren der intrinsischen Apoptose bei ER-Stress - die Rolle von Calcium und PERK mit seinen downstream-targets in der Kommunikation zwischen ER und Mitochondrien	12
Abbildung 8: Strukturformel von Efavirenz.....	24
Abbildung 9: Inhibierung der für Endothelzellen typischen Pseudotube-Bildung durch Efavirenz	34
Abbildung 10: Induktion von Autophagie durch Efavirenz	36
Abbildung 11: Induktion der Gene der UPR in Endothelzellen durch Efavirenz	37
Abbildung 12: Induktion von Hsp32 und HspA1 durch Efavirenz in HUVEC-Zellen..	38
Abbildung 13: Induktion von oxidativem Stress durch Efavirenz in EA.hy926 Zellen.	39
Abbildung 14: Inhibierung der Zellproliferation durch Efavirenz	40
Abbildung 15: Verminderung der durch Efavirenz induzierten Stressreaktion in EA.hy 926 Zellen durch N-Acetylcystein	42
Abbildung 16: Minimale Signalminderung der durch Efavirenz induzierten Hsp32- und CHOP-Expression durch N-Acetylcystein.....	43
Abbildung 17: Verstärkung des durch Efavirenz induzierten ER-Stresses durch Nelfinavir	44

Abbildung 18: Verstärktes Signal von Hsp32 und HspA1 in EA.hy 926 Zellen durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir.....	44
Abbildung 19: Zerstörung der Pseudotube-Bildung durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir in hoher Konzentration.....	45
Abbildung 20: Induktion von Sestrin 2 in MCF-7-Zellen durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir.....	47
Abbildung 21: Erhöhung des XBP1-Spaltproduktes in MCF-7-Zellen durch die Kombination von Efavirenz und Nelfinavir.....	48

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Negative regulative Faktoren der Autophagie.....	8
Tabelle 2: „Initial Combination Regimens for the Antiretroviral-Naive Patient“ aus: Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents.....	21
Tabelle 3: Empfohlene Substanzkombinationen in der initialen ART.....	21
Tabelle 4: Alternative Therapieregimes.....	22
Tabelle 6: Primärantikörper.....	29
Tabelle 6: Primersequenzen.....	31
Tabelle 7: Probe-Sequenzen.....	32

10. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden vorab im Rahmen der folgenden Publikation veröffentlicht:

Weiß, M., B. Kost, I. Renner-Müller, E. Wolf, I. Mylonas, A. Brüning (2016). „Efavirenz causes oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy in endothelial cells.“ Cardiovascular Toxicology **16**: 90-99.

Außerdem beteiligte ich mich in unserer Forschungsgruppe an einem weiteren Projekt über Borrelidin als potenzielles antitumorales Medikament, aus dem die folgende Publikation entstanden ist:

Gafiuc, D., M. Weiß, I. Mylonas, A. Brüning (2014). „Borrelidin has limited anti-cancer effects in bcl-2 overexpressing breast cancer and leukemia cells and reveals toxicity in non- malignant breast epithelial cells.“ Journal of Applied Toxicology **34**: 1109-1113.

11. Anhang

11.1 Vollständige Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

Geräte

CO2 Inkubator	HERACELL 150i
Zentrifugen:	
Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge	Thermo Scientific
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Vakuumzentrifuge Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope:	
Elektronenmikroskop Zeiss Axiophot	Zeiss, Jena
Leitz DIAVERT Mikroskop	Leitz, Wetzlar
PCR:	
Thermocycler „Mastercycler Gradient“	Eppendorf, Hamburg
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Gelelektrophorese:	
E-Gel® Power-Base™	invitrogen™ (Ethrog Biotechnologies Ltd.)
Molecular Imager® Gel Doc™+ mit ImageLab™ Software	Biorad, München
Western Blot:	
Tank-Blotting-System Biorad Model No. Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blotting-Kammer Mini Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CONSORT Electrophoresis Power Supply, 1200V-500mA E815	CONSORT, Turnhout, Belgien
Rüttler Vibrax	Serono Diagnostics
FACScan-Analyse:	
Beckman Coulter Epics XL-MCL flow cytometer	Beckman Coulter, München
Pipetten:	
Zellkultur: Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg

11. Anhang

2,5/10/200/1000 µl	
PCR Arbeitsplatz: 10, 20, 200, 1000 µl Pipetman 2,5 µl Eppendorf Research	Gilson, Frankreich (über ABIMED Langenfeld)
Pipettierhelfer accu-jet®	Brand, Wertheim
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik/IKA-COMBIMAG RCH
Vortex MS1 Minishaker	IKA
Waage	Mettler PM460

Verbrauchsmaterialien

50 ml Konische Röhren, Polypropylen BD Falcon™	BD Biosciences, Durham, USA/ Erembodegem, Belgien
Zentrifugenröhrchen Eco 15 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen CentriStar™ Cap 15 ml	Corning Incorporated, München
Microcentrifuge tubes volume 1,7 ml	Sigma-Aldrich, München
PCR SoftTubes 0,2 ml (DNase-, RNasefrei)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen „Safeseal Tips Premium“ 2,5/10/20/200/1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Parafilm „M“ Laboratory Film	Neenah, WI

Zellkultur

Zellkulturflasche 50ml Falcon®	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Sterile Zellkulturschalen 100 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-well-Zellkulturschalen „Nunclon Delta Surface“	Fisher Scientific - Germany GmbH, Schwerte
24-well Zellkulturplatte Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
µ-Slide Angiogenese (15-well)	Ibidi, Martinsried
Geltrex® basement membrane matrix	Life Technologies, Karlsruhe
8-well Zellkulturkammern (Millicell® EZ Slide)	Millipore, Darmstadt
Serologische Pipette 2 ml/ 5ml	Sarstedt, Nümbrecht

11. Anhang

Serologische Pipette 10ml Costar® Stripette	Corning Incorporated, München
---	-------------------------------

Western Blot Analyse

Elektrophorese-Gele: Mini-PROTEAN® TGX™ Gels 10/12/15 Mulden	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Polster (Fiber Pads)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Filter Papier Model 583 Gel Dryer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PVDF-Membranen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Real-time PCR

96er PCR-Platte (farblos, DNase-, RNasefrei)	Applied Biosystems, über lifetechnologies.com
Optical Adhesive Covers (PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free)	Applied Biosystems

DNA-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese: BioRad Mini Protean II Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
E-Gel® 2 % with SYBR Safe™(# G5218-02)	Invitrogen GmbH, Darmstadt

Immunfluoreszenzmikroskopie

Objektträger Marienfeld	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen
Deckgläser (24x24 mm): Menzel-Gläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
DAPI-Filter	Zeiss Axiophot, Zeiss, Jena
Cyto-ID Autophagy staining kit	Enzo Life Sciences, Lörrach

Reagenzien

Zellkultur

Medium:	
Dulbecco's MEM Zusatz: Rinderserumalbumin (10%)	Biochrom AG, Berlin
Endothelzellmedium	Provitro, Berlin
PBS (Phosphate buffered saline)	
Dulbecco's PBS (ohne Ca und Mg)	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung nach Gill II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol ROTIPURAN® >=99,8%, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie brilliant blue solution	Sigma-Aldrich, München

MTT-Assay

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, München
MTT-Stammlösung: 5mg MTT/ml PBS	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Western Blot Analyse

RIPA-Puffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% Doxycholin, 0.1% SDS)	Cell Signal, München
Roti@Load 1 (LDS) (reduzierend, 4x konzentriert) Probenpuffer für Proteingelektrophorese	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti@Load 2/3 (LDS) (nicht reduzierend, 4x konzentriert) Probenpuffer für Proteingelektrophorese	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
10 x Tris/Glyzin Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, pH 8.3)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
10 x Tris/Glyzin/SDS Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1% SDS, pH 8.3)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

11. Anhang

Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium-Azid	Sigma-Aldrich, München
Polysorbat-20 (Tween®) 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinmarker	
peqGOLD Protein-Marker V 11-250 kDA (blau)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671	Fisher Scientific - Germany GmbH, Schwerte
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
4% Milchpulver: + Azid und 0,05% Tween	
Färbelösungspuffer (alkalischer Phosphatase Puffer): 100 mM: Tris pH 9,5	
NaCl	
MgCl ₂	

RNA-Isolierung

Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH, Pfullingen
Nuclease-Free Water	Promega, Mannheim
96-100% Ethanol	

Säulenbasiertes RNA extraction kit (Silica-Membran Technologie)

NucleoSpin RNA Clean-up Puffer RA1: Guanidiniumthiocyanat 30-60% Puffer RA2: Guanidiniumthiocyanat 30-60% + Ethanol 20-35% Puffer RA3	Macherey-Nagel, Düren
---	-----------------------

Generierung von cDNA

MMLV-reverse transcriptase system Reverse transcriptase 5X reaction buffer (# M531A) M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (# M1701)	Promega, Mannheim
---	-------------------

11. Anhang

dNTP-Mix 'Long Range' (jeweils 10 mM einer Lösung aus dATP, dDTP, dGTP und dCTP)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Oligo(dT) Primer 100 µg/l Stratagene®	biomers.net
RiboLock RI – peqGOLD RNase Inhibitor	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Real-time PCR

Real-time PCR iTaq™ Universal Probes Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RNase-freies Wasser	

Primermix: 5 µl Vorwärtsprimer + 5 µl Rückwärtsprimer + 5 µl Probe + 85 µl H₂O

RT-PCR

PCR Master Mix: Taq Polymerase, dNTP	Promega, Mannheim
--------------------------------------	-------------------

Primermix: 5 µl Vorwärtsprimer + 5 µl Rückwärtsprimer + 90 µl H₂O

DNA-Gelelektrophorese

10 x Blue Juice™ Gel Loading Buffer	Invitrogen GmbH, Darmstadt
pBR 328 Mix I DNA-Marker	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nukleasefreies Wasser	#P1193, Promega, Mannheim

Immunfluoreszenzmikroskopie

MDC (Monodansylcadaverin)	Sigma-Aldrich, München
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), im VECTASHIELD Antifade Mounting Medium enthalten	Biozol, Eching
IMM ibidi Mounting Medium	ibidi, Martinsried
Calcein-AM Lösung, Verdünnung 1:1000	Sigma-Aldrich, München

11. Anhang

FACScan-Analyse:

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate substrate	DCFH-DA; Sigma, München
--	-------------------------

Medikamente/Chemikalien

Efavirenz 50 mg Kapseln	Bristol Myers Squibb, München
Wiederholte Ethanolextraktion und Speed-vac-Konzentrierung Auflösung in 1 ml Ethanol Stammlösung von 50 mg/ml in Ethanol	
Nelfinavir (Nelfinavir mesylate hydrate) Stammlösung 50 mg/ml in Ethanol	Sigma-Aldrich, München
N-Acetylcystein Stammlösung 100 mM in PBS	Sigma-Aldrich, München
Quercetin Stammlösung 100 mM in DMSO	Sigma-Aldrich, München

11.2 Danksagung

Ich danke dem ehemaligen Direktor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München, Herrn Professor Dr. med. Klaus Friese, für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung erstellen zu dürfen.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas, gilt mein besonderer Dank dafür, dass ich als Mitglied seiner Forschungsgruppe promovieren durfte sowie für seine stetige Unterstützung. Die experimentelle Arbeit im Labor und das Hinarbeiten auf die Verfassung der Dissertation haben mein Interesse an molekularbiologischer Grundlagenforschung geweckt und vertieft.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Ansgar Brüning, bedanken. Ohne seine kontinuierliche Anleitung, Geduld und konstruktiven Ratschläge wäre das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Die wissenschaftlichen Fähigkeiten, die ich mir mit seiner Hilfe aneignen konnte sowie die positive Grundeinstellung, die er stets vermittelte, werden mich auf meiner weiteren medizinischen Laufbahn begleiten.

11.3 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Weiß, Marlene

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss des HIV-Medikaments Efavirenz auf die Physiologie von Endothelzellen und Einsatzmöglichkeiten in der Tumorthherapie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 26.01.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand