

Cheng Chen  
Dr. sc.hum.

## **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated autophagy during ethanol metabolism in alcoholic liver disease**

Fach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. Sebastian Mueller

Obwohl die alkoholische Lebererkrankung (ALD) die häufigste Lebererkrankung weltweit darstellt, sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen im Detail immer noch nicht gut verstanden. Zudem bestehen widersprüchliche Daten über eine möglicherweise protektive Rolle der Autophagie, der Fähigkeit von Leberzellen, fehlgefaltete Proteine über intrazelluläre Verdauungsmechanismen zu entfernen. Außerdem ist die Rolle von ethanol-metabolisierenden Enzymen und insbesondere die Beteiligung von sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unklar.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Modelle sowohl tierexperimentell als auch in der Zellkultur untersucht insbesondere auch mit Blick auf ein besseres Verständnis der ethanol-vermittelten Autophagie und der Rolle von ROS für die Modulation dieser Autophagie. Die Expression von LC3B, CYP2E1 und NOX4 wurde in einem Mausmodell mit akuter Alkoholexposition mittels Westernblotting und Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz untersucht. Autophagie wurde außerdem in primären Maushepatozyten und der humanen Hepatomazelllinie Huh7 untersucht, insbesondere die Wirkung von Ethanol und seines wichtigsten Folgemetaboliten Azetaldehyd. Es wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, in denen die wichtigen ROS-generierenden Enzyme CYP2E1 und NOX4 moduliert wurden. Dies geschah einerseits durch Überexpression oder aber auch durch siRNA knock down. Die Reaktion auf externes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde mit Hilfe eines enzymatischen Systems (GOX/CAT), der Autophagieflux mittels eines dualen Expressionsplasmids (mRFP-GFP-LC3) untersucht. Rapamycin und Chlorochin dienten als positive bzw. negative Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Akutgabe von Ethanol innerhalb von 24 Stunden in Mäusen signifikant die mittels LC3B erfasste Autophagie induziert. Ebenfalls konnte eine deutliche Induktion der ROS-bildenden Enzyme NOX4

und CYP2E1 beobachtet werden. Diese Induktion wurde mit dem starken Antioxidanz N-Azetylcystein (NAC) wirksam blockiert. Schließlich konnte gezeigt werden, dass konstante und nichttoxische  $H_2O_2$ -Konzentrationen ebenfalls LC3B induzieren können. Die intrazellulären  $H_2O_2$ - Spiegel wurden dabei durch eine erhöhte Expression von Peroxiredoxin (Prx2) validiert. Auch diese  $H_2O_2$ -vermittelten Effekte konnten wirksam durch NAC blockiert werden. Schließlich wurde in Transfektionsexperimenten mit dem mRFP-GFP-LC3 Plasmid demonstriert, dass  $H_2O_2$  auch den Autophagiefluss deutlich steigert. Zusammenfassend kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bereits eine kurze Ethanolexposition von Hepatozyten sowohl *in vitro* also auch *in vivo* zu einer gesteigerten Autophagie führt und ROS dabei essentiell beteiligt sind. Die Daten legen ebenfalls nahe, dass eine gelegentlich beobachtete ethanolvermittelte Suppression der Autophagie wahrscheinlich auf eine chronische Alkoholexposition zurückgeführt werden muss, am ehesten durch fehlgefaltete Proteine