

Aus dem Institut für Immunologie  
Direktor: Herr Prof. Dr. rer. nat. A. Scheffold  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Rolle der Ferroptose im Mausmodell des myorenalen Syndromes  
und dessen therapeutische Aussichten

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Adrián Zierleyn**  
aus **Duisburg**

Kiel 2022

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam

2. Berichterstatter/in: PD Dr. med. Kevin Schulte

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel den 29.11.2022

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam

PD Dr. med. Kevin Schulte

-----  
(Vorsitzende/r der  
Prüfungskommission)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Glossar</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Akutes Nierenversagen .....	2
1.2 Crush-Niere .....	3
1.3 Regulierter Zelltod .....	3
1.3.1 Apoptose .....	5
1.3.2 Nekroptose .....	8
1.3.3 Ferroptose .....	10
1.3.4 Ferrostatine und weitere Inhibitoren der Ferroptose .....	13
1.3.5 Induktoren der Ferroptose .....	15
1.4 Fragestellungen der Forschungsarbeit.....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Materialliste .....	17
2.2 Versuchstiere.....	19
2.2.1 Maus-Wildtyp.....	19
2.2.2 Behördliche Genehmigung.....	19
2.3 Wirkstoffaufbereitung.....	20
2.4 Rhabdomyolysemodell .....	20
2.5 Laboranalytik .....	22
2.5.1 Kreatininmessung.....	22
2.5.2 Harnstoffmessung .....	22
2.5.3 Kreatinkinase-messung .....	22
2.5.4 Laktatdehydrogenase-messung .....	22
2.6 Histologie.....	22
2.6.1 PAS-Färbung.....	22
2.6.2 Tubular Injury Score .....	23
2.7 Statistik.....	24
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
3.1 Etablierung des Mausmodells der Rhabdomyolyse .....	25
3.2 Auslösung der Crush-Niere im Mausmodell .....	26
3.3 Erniedrigte Retentionsparameter nach Fer-1 Applikation .....	27
3.4 Verringerung der tubulären Schädigung durch Fer-1 Applikation .....	28
3.5 Erniedrigte Werte für CK und LDH nach Fer-1 Applikation .....	30

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>31</b>
4.1	Etablierung des Mausmodells zur verlässlichen Auslösung der Crush-Niere .....	31
4.2	Wirkung des Ferrostatin-1 .....	31
4.2.1	Nephroprotektion durch Fer-1 .....	31
4.2.2	Myoprotektive Wirkung des Ferrostatin-1 .....	32
4.3	Therapeutische Perspektiven .....	33
4.3.1	Therapeutische Möglichkeiten der Crush-Niere .....	33
4.3.2	Perspektiven im Rahmen der Organtransplantation.....	34
4.4	Potenzielle Fehlerquellen und Lösungsvorschläge .....	34
4.4.1	Ferrostatin-1 als Fehlerquelle.....	34
4.4.2	Ferroptose als Fehlerquelle.....	35
4.5	Fazit.....	36
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>37</b>
5.1	Fragestellung.....	37
5.2	Material und Methoden.....	37
5.3	Ergebnisse.....	37
5.4	Schlussfolgerung.....	38
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>Bildnachweise .....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>50</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>51</b>
<b>11</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>52</b>
11.1	Curriculum Vitae .....	52
11.2	Publikationsverzeichnis (Stand 01/22) .....	54

## Glossar

Ausdruck/Abkürzung	Erklärung
ACSL4	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4</i> – ein zur Lipidbiosynthese (z. B. PUFAs) benötigtes Enzym.
ALOX-15	<i>Arachidonate 15-lipoxygenase</i> – ein Enzym, welches u. a. PUFAs der Zellmembran oxidiert.
Apoptosom	Ein Komplex aus Cytochrom c, dATP und APAF1, welcher die Caspase-9 rekrutiert und die intrinsische Apoptose induziert
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i> – Teil der Bcl-2-Proteinfamilie mit proapoptotischer Wirkung, welches an der Porenbildung und Destabilisierung der Mitochondrienmembran beteiligt ist.
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i> – Teil der Bcl-2-Proteinfamilie mit proapoptotischer Wirkung, welches an der Porenbildung und Destabilisierung der Mitochondrienmembran beteiligt ist.
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> – Teil der Bcl-2-Proteinfamilie mit anti-apoptotischer Wirkung.
CASP-1/11	<i>CysteinyI–aspartate specific protease-1/11</i> – Cysteinproteasen, welche den Zelltodweg der Pyroptose nach Aktivierung durch das Inflammosom vermitteln.
cCASP-3/7	<i>Cleaved cysteinyI–aspartate specific protease-3/7</i> – Proteine aus der Proteinfamilie der Cysteinproteasen, welche in ihrer gespaltenen Form als Effektorcaspasen die Endstrecke der Apoptose vermitteln.
CASP-8	<i>CysteinyI–aspartate specific protease-8</i> – Cysteinprotease, welche als Initiatorcaspase der intrinsischen Apoptose an der Aktivierung der Effektorcaspasen beteiligt ist.
CD120a	Membrangebundener Rezeptor, welcher die extrinsische Apoptose nach Bindung durch Liganden vermittelt.
cGSDMD	<i>Cleaved gasdermin D</i> – ein Molekül, welches aktiviert in seiner gespaltenen Form zur Porenbildung in der

	Zellmembran führt und somit eine zentrale Rolle im Zelltodweg der Pyroptose einnimmt.
clAP1/2	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2</i> – Ubiquitinligasen, welche über das Ligieren von Ubiquitinketten, u. a. an RIPK1, anti-apoptotisch wirken.
cFLIP	<i>Cellular FLICE-like inhibitory protein</i> – Protein, welches über die Inhibierung der Caspase-8 die Nekroptose fördert
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> – Abschnitte sich wiederholender DNA.
CYLD	<i>Cylindromatosis Lysin 63 Deubiquitinase</i> – eine Deubiquitinase, welche Ubiquitinketten von Proteinen
Cytochrom c	Im Mitochondrium befindliches Protein, welches eine entscheidende Rolle in der oxidativen Phosphorylierung spielt. Im Rahmen der Apoptose gelangt dieses Protein über mitochondriale Poren in das Zytosol und wird Teil des Apoptosoms.
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i> – bei Zellstress und Zelltod freigesetzte Signalstoffe, welche auf die Immunantwort einwirken.
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i> – ein Multi-Proteinkomplex, welcher sich aus mehreren Todesrezeptoren zusammensetzt und die Apoptose induziert.
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
Erastin	Dieses <i>small molecule</i> induziert die Ferroptose über die Inhibition des System Xc.
ESCRT-III-Komplex	<i>Endosomal sorting complexes required for transport III</i> – Proteinkomplex, welcher durch Abschnürung von Vesikeln und damit erfolgreicher Entfernung von pMLKL aus der Zellmembran der Nekroptose entgegenwirkt.
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i> – ein Protein, welches die Verbindung zwischen Mitgliedern der TNF-Rezeptorsuperfamilie und Procaspase-8 herstellt und somit die Bildung des DISC ermöglicht.

Fas	Ein Todesrezeptor der TNF-Rezeptorsuperfamilie, welcher an der Signalweiterleitung im Rahmen der Apoptose beteiligt ist.
Fas-Ligand	Ligand von Fas.
Ferroptose	Eisenabhängiger regulierter Zelltod.
Ferrostatine	Chemische Inhibitoren der Ferroptose.
FIN56	Ein <i>small molecule</i> , welches über die Degradierung von GPX4 die Ferroptose induziert.
FSP1	<i>Ferroptosis suppressor protein 1</i> – ein Protein, welches unter NAD(P)H-Verbrauch Ubiquinon zu Ubiquinol reduziert und somit der Lipidperoxidation entgegensteuert.
GPX4	<i>Glutathion Peroxidase 4</i> – ein anti-ferroptotisches Enzym, welches Lipidperoxide auf Kosten von GSH reduziert. GSH wird hierdurch zu GSSG oxidiert.
GSH	<i>Glutathion</i> – ein Tripeptid, welches vom Enzym GPX4 als Redox-Äquivalent verwendet wird.
GSR	<i>Glutathiondisulfid-Reduktase</i> – eine Reduktase, welche NADPH-abhängig GSSG wieder zu GSH reduziert.
GSSG	<i>Glutathiondisulfid</i>
HWZ	Halbwertszeit
IC 50	Mittlere inhibitorische Konzentration.
iFSP1	Ein pro-ferroptotisches <i>small molecule</i> , welches über Hemmung von FSP1 die Ferroptose induziert.
IRI	<i>Ischemia reperfusion injury</i>
IVC	<i>Individually ventilated cage</i> – Versuchstiere werden in Käfigen gehalten, welche ein abgeschlossenes System darstellen.
Komplex I	Ein aus RIPK1, TRADD, cIAP1/2 und CYLD bestehender Proteinkomplex, welcher an der Induktion von Apoptose, Nekroptose oder am Zellüberleben beteiligt ist und sich nach Ligandenbindung am Todesrezeptor intrazellulär formiert.
Komplex IIa	Proteinkomplex bestehend aus Caspase 8, TRADD, FADD RIPK1 und cFLIP. An der Induktion der Apoptose beteiligt.

Komplex IIb	Proteinkomplex bestehend aus RIPK1, RIPK3, FADD, Caspase-8 und cFLIP. Ebenfalls an der Induktion der Apoptose beteiligt.
Komplex IIc (Nekrosom)	Durch Inhibierung der Caspase-Aktivität bildet sich anstatt des Komplex IIb der Komplex IIc, welcher oligomerisiertes RIPK3 enthält und nachfolgend MLKL phosphoryliert. Dies induziert den regulierten Zelltod in Form der Nekroptose.
Liproxstatin-1	Ein Inhibitor der Ferroptose.
L <sup>•</sup>	<i>Lipidradikal</i>
LO <sup>•</sup>	<i>Alkoxyradikal</i>
LOO <sup>•</sup>	<i>Lipoperoxyradikal</i>
LOOH	<i>Lipidhydroperoxid</i>
LPCAT3	<i>Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3</i> – ein Enzym, welches die durch ACSL4 veränderte PUFAs in die Zellmembran einbaut und deren Sensitivität für die pro-ferroptotische Oxidation erhöht.
L-ROS	<i>Lipid-reactive oxygen species</i> – Lipid-reaktive Sauerstoffspezies.
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> – eine Proteinkinase, welche u. a. Zellproliferation, Genexpression, Mitose und Apoptose reguliert.
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i> – Effektorprotein und Pseudokinase, welche in ihrer phosphorylierten Form (pMLKL) Teil der Endstrecke der Nekroptose ist.
ML162	Selektiver Inhibitor des GPX4.
ML210	Selektiver Inhibitor des GPX4, welcher am Selenocystein-Rest bindet.
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> – Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran im Rahmen der intrinsischen Apoptose.
MPT	<i>Mitochondriale Permeabilitätspore</i> – Pore, deren Öffnung im Rahmen der intrinsischen Apoptose zur Fortleitung des pro-apoptotischen Signals führt.
Nec-1	Ein <i>small molecule</i> , welches die Nekroptose inhibiert.
Nec-1s	Weiterentwickelte Form des Nec-1 mit verbesserter Wirkung.



Nec-1f	Weiterentwickelte Form des Nec-1, welche Nekroptose und Ferroptose hemmt.
Nekroptose	Form des regulierten Zelltodes unter Phosphorylierung von MLKL durch RIPK3-Oligomere.
Nekrose	Akzidentell oder reguliert ablaufende Form des Zelltodes.
Nekrosom (Komplex IIc)	Siehe Komplex IIc.
Nekrostatine	<i>Small molecules</i> , welche die Nekroptose inhibieren.
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> – ein Proteinkomplex, welcher die Transkription der DNA, Zytokinproduktion und Zelltod reguliert.
PAS-Reaktion	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Phosphatgepufferte Salzlösung, welche in der Biochemie und Molekularbiologie Verwendung findet.
PE	<i>Phosphatidylethanolamin</i> – Lipid der Zellmembran.
Phosphatidylserin (PS)	Phospholipid in der inneren Lipiddoppelschicht von Zellmembranen, welches nach Translokation auf die Außenseite der Membran als <i>eat-me</i> Signal wirkt und die Phagozytose einleitet.
PIP <sub>2</sub>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i> – eine Gruppe von Phospholipiden, welche in der inneren Lipiddoppelschicht der Zellmembran auftreten.
Pseudokinase	Kinasen ohne enzymatische Aktivität.
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i> – mehrfach ungesättigte Fettsäure.
Pyroptose	Form des regulierten Zelltodes mit stark immunogener Komponente.
Ras	<i>Rat sarcoma</i> – Protoonkogen und G-Protein, welches nach Bindung von GTP den Ras/Raf/MAPK-Signalweg aktiviert und das Zellwachstum fördert. Bei überschießender Aktivität kann dies Krebs verursachen.
RCD	<i>Regulated cell death</i> – regulierter Zelltod
RHIM	<i>Receptor-interacting protein homotypic interaction motif</i> – über diese Domäne interagieren die Nekroptose-Induktoren RIPK1, RIPK3, ZBP1 und TRIF.

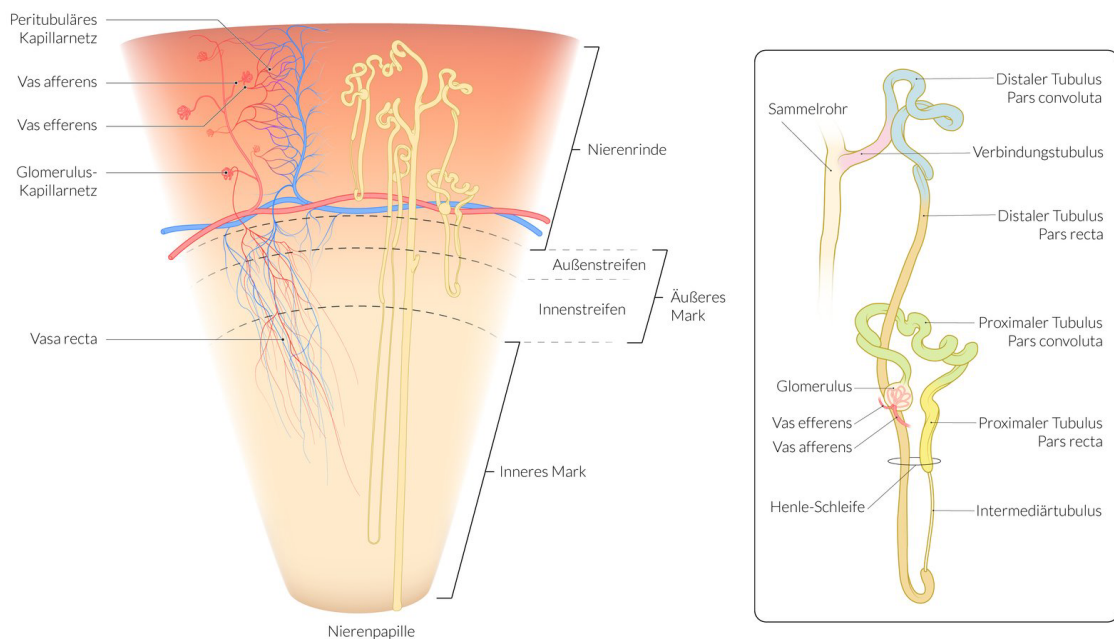
RIPK1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i> – Kinase, welche nach Aktivierung des TNFR1 die Nekroptose, Apoptose oder das Zellüberleben induziert. Hierbei spielt die aktuelle Konfiguration des RIPK1 eine zentrale Rolle.
RIPK3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i> – Kinase, welche MLKL phosphoryliert und somit zentraler Bestandteil der Nekroptose ist
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – Sauerstoffradikale.
RSL3	<i>Ras selective lethal 3 – small molecule</i> , welches GPX4 inhibiert und somit pro-ferroptotisch wirkt.
RTA	<i>Radikalfangendes Antioxidans</i>
Small molecules	Niedermolekulare Wirkstoffe, welche in den meisten Medikamenten enthalten sind.
SLC3A2/SLC7A11	Untereinheiten des System X <sub>c</sub> .
SRS 16-86	<i>Small molecule</i> , Derivat von Fer-1 und Ferroptose-Inhibitor.
SRS 11-92	<i>Small molecule</i> , Derivat von Fer-1 und Ferroptose-Inhibitor.
System X <sub>c</sub>	Cystein/Glutamat-Antiporter, welcher das für die GSH-Synthese benötigte Cystein in die Zelle transportiert. Eine Inhibition dieses Antiporters fördert die Ferroptose.
TLR	<i>Toll-like receptors</i> – eine Klasse von Mustererkennungsrezeptoren, welche Pathogene erkennen und eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunität spielen.
TNFR1/2	<i>Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1/2</i> – Rezeptor in der Zellmembran, welcher bei der Induktion der Apoptose beteiligt ist und dessen wichtigster Ligand TNF $\alpha$ ist.
TNF $\alpha$	<i>Tumornekrosefaktor <math>\alpha</math></i> – ein multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems, welcher Apoptose, Zellproliferation und Zellwachstum anregen kann.
TIS	<i>Tubular injury score</i> – ein histologisches Bewertungssystem der Schäden des Nierenmarks und der Nierenrinde.
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i> – ein Adapterprotein des TNFR1.

TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> – ein Protein, welches die Apoptose/Nekroptose über Bindung an Todesrezeptoren der Zellmembran induziert.
TRAILR1/2 (DR4/DR5)	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1/2 (death receptor 4/5)</i> – zwei Todesrezeptoren an der Zelloberfläche.
TRAF2/5	<i>TNF receptor-associated factor 2/5</i> – Enzyme, welche zusammen mit weiteren Proteinen den Komplex I im Rahmen der Caspase-abhängigen Signalwege bilden.
wt	Wildtyp
ZBP1	<i>Z-DNA-binding protein 1</i> – Protein, welches zDNA bindet und so als Indikator einer Virusinfektion fungiert und ebenfalls die Nekroptose induziert.
zDNA	Eine mögliche Strukturform der DNA mit einer linksgängigen Doppelhelix.
zRNA	Linksgängige Ribonukleinsäure.

# 1 Einleitung

Das akute Nierenversagen (AKI) ist eine häufige Erkrankung, welche mit einer ausgeprägten Morbidität und Mortalität einhergeht .

Prärenale, intrarenale und postrenale Ursachen können der Auslöser für strukturelle Schäden der funktionellen Einheiten (siehe **Abbildung 1**) sein und obwohl kausale Therapieansätze für manche Formen des AKI existieren, gestaltet sich die Unterbindung der strukturellen Schäden als schwierig. Nicht selten sind die Betroffenen jung und der Ausgang des akuten Nierenversagens letal. Dennoch kann oft nur supportiv therapiert werden und bei Versagen wird eine Dialyse oder im Langzeitverlauf sogar eine Transplantation nötig (Piper, 2007). Viele Patienten weisen bereits heute Kontraindikationen gegen eine Transplantation auf, trotzdem steigt die mediane Wartedauer auf der Transplantliste kontinuierlich (Waage et al., 2020). Somit sind neue therapeutische Möglichkeiten für das AKI weiterhin von großem medizinischem Interesse. Eine medikamentöse Abmilderung der Nierenschäden oder eine



**Abbildung 1 – Organisation der Niere** (© AMBOSS GmbH; Nephron; Niere [<https://www.amboss.com/de/wissen/Niere/>], Kapitel zuletzt aktualisiert am: 03.11.2021):

Makroskopisch lassen sich im Längsschnitt (links) bereits Nierenlappen als funktionelle Einheit abgrenzen, welche aus Nierenrinde und Nierenmark bestehen. Medulla und Cortex lassen sich wiederum auf Grund ihrer vaskulären und tubulären Architektur sichtbar voneinander unterscheiden und enthalten die kleinste funktionelle Einheit, das Nephron (rechts). Zum Nephron gehören das Nierenkörperchen (Glomerulus, Bowman-Kapsel und juxtaglomerulärer Apparat) und das Nierentubulussystem, welches im Sammelrohr mündet. Das Sammelrohr besitzt den Anschluss an das Nierenbeckenkelchsystem. Über das Nierenkörperchen kommt es zu der Bildung des Primärharns (ca. 180 l/d), welcher im Verlauf des Tubulussystems konzentriert und zum ausscheidungsfähigen Sekundärharn (ca. 1,5 l/d) umgewandelt wird.

vollständige Unterbindung des renalen Zelltodes sind mit der Hoffnung verbunden, das Outcome deutlich zu verbessern. In dieser Dissertation werden Mechanismen des renalen Zelltodes bei akutem Nierenversagen nach Rhabdomyolyse und entsprechende therapeutische Möglichkeiten untersucht. In dieser Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass hierbei ein nicht-apoptotischer, doch trotzdem regulierter und somit behandelbarer Zelltod eine zentrale pathophysiologische Rolle einnimmt.

Im Verlauf der letzten Jahre hat sich unser Verständnis von reguliertem Zelltod stark erweitert und es eröffneten sich neue Perspektiven zur Behandlung ehemals nicht-therapierbarer Krankheiten. Während die regulierte Apoptose lange Zeit diametral der unregulierten Nekrose gegenübergestellt wurde, weiß man heute, dass auch Nekrose in vielen Fällen reguliert und somit genetisch und pharmakologisch beeinflussbar abläuft. Hierbei wurden verschiedene Zelltodwege beschrieben, jedoch weckt besonders die eisenabhängige Ferroptose aktuell Hoffnung auf neue therapeutische Möglichkeiten im Bereich der Neurologie, Nephrologie, sowie Transplantationsmedizin und Endokrinologie (Tonnus & Linkermann, 2017). Besonders zu beachten ist, dass bei nekrotischem Zelltod – im Gegensatz zum apoptotischen – unkontrolliert intrazelluläre Bestandteile bei Zusammenbruch der Plasmamembran frei werden. Diese werden als DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) bezeichnet und tragen wesentlich dazu bei, aus einer lokalen Schädigung ein systemisches Geschehen mit Beteiligung weiterer Organe zu machen (Sarhan et al., 2018). Unter dem Gedanken, dass eine Eisenüberladung durch Abfallprodukte des Muskelzerfalls nach glomerulärer Filtration akute Tubulusnekrosen durch Ferroptose auslösen könnten, wird sich in dieser Arbeit speziell auf diese Form der regulierten Nekrose fokussiert.

## 1.1 Akutes Nierenversagen

Ein plötzlicher und potenziell reversibler Funktionsverlust der Niere kann mehrere Gründe haben. Die häufigste Ursache stellt das prärenale Nierenversagen durch Minderperfusion dar (Ronco et al., 2019), jedoch sind auch Abflussstörungen (postrenal) oder eine direkte Schädigung der Niere (intrarenal) als mögliche Ursachen zu bedenken. Die Vereinigung *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* definiert das akute Nierenversagen anhand einer Olig-/Anurie oder einem Anstieg des Serum-Kreatinins. Demnach handelt es sich beim Anstieg des Serumkreatinins um mindestens 0.3 mg/dL innerhalb von 48 Stunden oder einem  $\geq 1,5$  x Anstieg des Serumkreatinins innerhalb von 7 Tagen um ein akutes Nierenversagen (Thomas et al., 2015). Ein derartiger Verlust an renaler Funktion kann schwerwiegende Komplikationen auslösen, u. a. Elektrolytstörungen (Hyperkaliämie),

Entgleisungen des pH-Wertes (metabolische Azidose) und eine Überwässerung (z. B. Lungenödem).

## 1.2 Crush-Niere

Kommt es aufgrund interner (maligne Hyperthermie, Medikamente, etc.) oder externer (Trauma) Ursachen zu einer Schädigung und einem darauffolgenden Zerfall der Muskelzellen, wird von Rhabdomyolyse gesprochen (Bosch, Poch et al. 2009). Dabei werden DAMPs wie das sich im quergestreiften Muskel befindende Myoglobin freigesetzt und akkumulieren wenig später in den Nierentubuli. Bisläng ist unverständlich, wie diese Abfallprodukte zur Schädigung von Nierentubulusepithelzellen beitragen.

Das typische Bild eines akuten Nierenversagens nach Rhabdomyolyse wird als Crush-Niere bezeichnet. Hierbei spielen neben prärenalen Faktoren (Hypovolämie und Flüssigkeitsverlust) auch intrarenale Faktoren („verstopfte“ Tubuli und akute Tubulusnekrosen) eine Rolle.

Die therapeutischen Möglichkeiten bei Crush-Niere beschränken sich in der Intensivmedizin aktuell auf die rasche Behandlung der Ursache und eine forcierte Diurese durch intravenösen Flüssigkeitersatz. Bei Versagen der konservativen Maßnahmen kann den Patienten mittels Nierenersatztherapie geholfen werden. Sollte sich im Verlauf die Nierenfunktion nicht wieder erholen, bleibt die Abhängigkeit von der regelmäßigen Hämodialyse bis zu einer möglichen Nierentransplantation bestehen (Herold et al., 2020).

Die Letalität eines Crush-Syndroms ist hoch und liegt, bei 20–70 % (Better & Abassi, 2011). Dies ist hauptsächlich die Folge einer Kombination aus Hypovolämie und einer Hyperkaliämie, welche zu malignen Herzrhythmusstörungen führt. Forschung im Bereich der unterschiedlichen Mechanismen der regulierten Nekrose zeigte in den letzten Jahren mögliche Ansatzpunkte einer medikamentösen Therapie auf, welche den unbefriedigenden Status quo zumindest teilweise verbessern und kausale Therapieoptionen eröffnen könnten. Im folgenden Abschnitt sollen mehrere dieser Mechanismen dargestellt werden.

## 1.3 Regulierter Zelltod

Jahrzehntelang standen sich die programmierte Apoptose und die akzidentelle Nekrose diametral gegenüber.

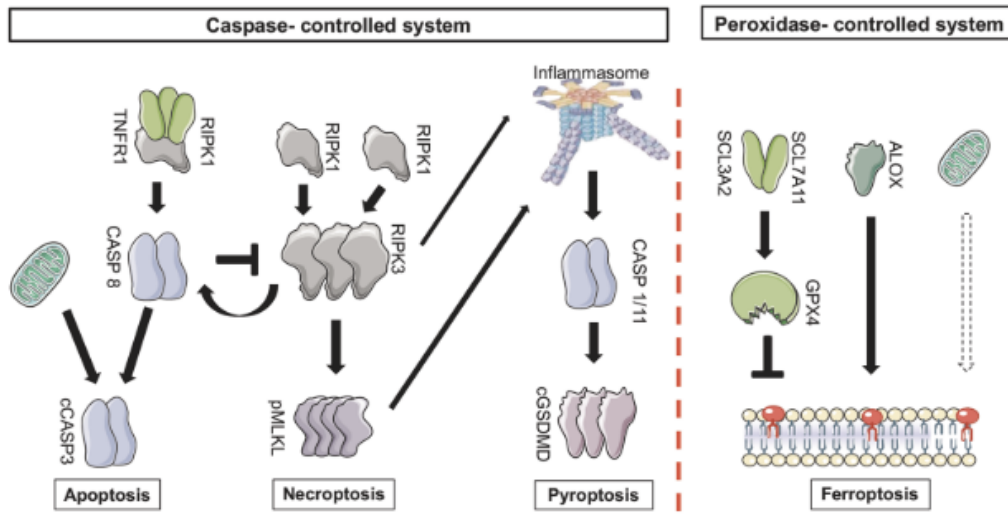
Das Wort Apoptose beschreibt ein streng reguliertes, ATP-abhängiges Programm zur Elimination einer Zelle, welche aus unterschiedlichen Gründen nicht mehr haltbar für den

Körper geworden ist. Zu den Ursachen können Schäden durch mechanischen oder toxischen Stress, aber auch physiologische Umbauvorgänge oder Veränderungen im Erbgut einer Zelle gehören. Diese Art des regulierten Zelltodes ist für das Überleben eines Organismus unerlässlich (Tonnus et al., 2019 b).

Nekrotischer Zelltod tritt beispielsweise im Rahmen schwerer ischämischer, traumatischer oder toxischer Schäden auf. Als Folge dieser Einwirkungen kommt es zur Schwellung der Zelle und ihrer Organellen. Über die Degeneration der Plasmamembran führt dies schließlich zum Bersten und nachfolgend zum Tod der Zelle, deren Komponenten in den Extrazellulärraum freigesetzt werden und in Folge das Immunsystem aktivieren und eine Entzündungsreaktion verursachen können (Land et al., 2016; Sarhan et al., 2018). Nekrotischer Zelltod ist hierbei heterogen, da er sowohl ATP-abhängig als auch ATP-unabhängig verlaufen kann.

Lange war der nekrotische Zelltod nach der gängigen Lehrmeinung nur die Folge einer Verkettung von unkoordinierten Ereignissen, denen die Zelle passiv beiwohnte. Jedoch wurden in den letzten Jahren mehrere Signalwege entdeckt, welche eine engmaschige Regulation des nekrotischen Zelltodes in vielen Situationen vermittelten, ähnlich wie in der Apoptose. Weitere Studien dieser „neuen“ Signalwege erweiterten das Wissen über den Zelltod deutlich. Eine Übersicht über die relevanten Zelltodwege und den Interaktionen zwischen diesen Wegen bietet hier **Abbildung 2**.

Im Folgenden werden die wichtigsten Formen des regulierten Zelltodes (RCD) mitsamt ihrer Relevanz genauer dargestellt. Das Wissen um den genauen Aufbau der Reaktionskaskaden ist essenziell für die Konzeption und Entwicklung neuer Medikamente, die den nekrotischen Zelltod und dessen inflammatorische Folgen lindern und vielleicht sogar vollständig verhindern könnten.



**Abbildung 2 – Signalwege des regulierten Zelltodes (Tonnus et al. 2019 a):** Grundsätzlich lassen sich die unterschiedlichen Wege des regulierten Zelltodes in Caspase-kontrollierte (Apoptose, Nekroptose und Pyroptose), sowie Peroxidase-kontrollierte Systeme einteilen (Ferroptose). Die Caspase-kontrollierten Zelltodwege sind hierbei eng miteinander verwoben. Die Apoptose wird über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1 (TNFR1) und die *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1) durch die nachfolgende Aktivierung der Caspase-8 (CASP8) und nachfolgende Spaltung der Effektorcaspase Caspase-3 (cCASP3) vermittelt. Der Ausfall bzw. die Inaktivität der Caspase-8 bedingt über die *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3* (RIPK3) die Aktivierung der Nekroptose und letztendlich die Phosphorylierung des Effektorproteins MLKL (pMLKL). Dieses ist zusätzlich an der Bildung eines als Inflammasom bezeichneten Proteinkomplexes beteiligt, welcher die kanonische Pyroptose bedingt und die inflammatorischen Caspasen-1/11 (CASP1/11) aktiviert. Letztendlich wird das Protein Gasdermin D durch CASP1/11 in seine gesplante Form (cGSDMD) überführt und dadurch aktiviert. Dem gegenüber steht die Ferroptose, welche vor allem durch die Glutathion Peroxidase 4 (GPX4) antagonisiert wird. Die katalytische Aktivität der GPX4 ist wiederum von der Bereitstellung der Aminosäure Cystein durch das System X<sub>c</sub><sup>-</sup> (Untereinheiten SLC3A2 und SLC7A11) zur Synthese von Glutathion abhängig. Ist dies nicht mehr gegeben, kommt es zu einem Ausfall des GPX4-bedingten Antagonismus und konsekutiver Ferroptose. Darüber hinaus wird die Ferroptose durch die *arachidonate 15-lipoxygenase* (ALOX) und Peroxidation der PUFAs vermittelt.

### 1.3.1 Apoptose

Der schon 1842 beschriebene Prozess des regulierten Zelltodes (Vogt, 1842), für welchen 1972 der Begriff Apoptose geprägt wurde (Kerr et al. 1972), ist heutzutage einer der mechanistisch am besten verstandenen Vorgänge. Die essentielle Rolle der Apoptose bei der Entwicklung des Organismus ist unbestritten, da Mäuse, welche defizient für die intrinsische oder extrinsische Apoptose (siehe **Abbildung 3**) sind, schwere Missbildungen aufweisen und perinatal sterben (Hakem et al., 1998; Ke et al., 2018). Zu ihren mannigfaltigen Aufgaben gehören u. a. die Entfernung gealterter, defekter oder entarteter Zellen sowie der regelrechte Ablauf der Embryonalentwicklung und somit indirekt der Erhalt der Homöostase.



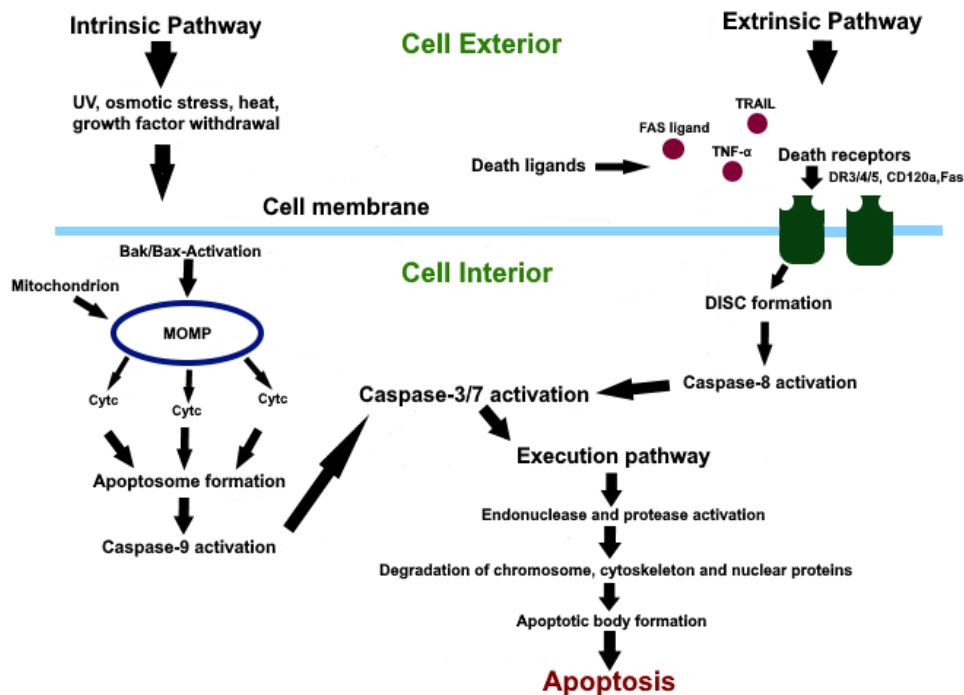
Morphologisch lässt sie sich mithilfe von Licht- und Elektronenmikroskopen (Häcker, 2000) durch das sogenannte „blebbing“ bei lange erhaltener Membranintegrität charakterisieren und unterscheidet sich hierdurch von den nekrotischen Zelltodwegen, welche vor Verlust der Membranintegrität kein solches blebbing aufweisen.

Auf molekularer Ebene lassen sich ein extrinsischer und ein intrinsischer Signalweg der Apoptose unterscheiden, welche untereinander kommunizieren und eine gemeinsame Endstrecke aufweisen. Einen schematischen Überblick bietet **Abbildung 3**. Da der Inhalt der apoptotischen Zellen im Organismus meist nicht unkontrolliert in den Extrazellularraum gelangt, weil Makrophagen und Nachbarzellen die aus der zerfallenden Zelle entstehenden apoptotischen Vesikel rasch phagozytieren, ist *in vivo* kaum ein inflammatorisches Potential vorhanden (Kurosaka et al., 2003; Savill & Fadok, 2000).

Der extrinsische Weg der Apoptose wird über Todesrezeptoren wie den Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 (TNFR1), *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1/2 (TRAILR 1/2)* oder Fas auf der Zelloberfläche vermittelt, die bei Bindung ihres respektiven Liganden *Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )*, *Fas-Ligand (FasL)* und *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)* mit Hilfe ihrer Todesdomäne eine Initiator-Caspase (Caspase-8) in mehreren Schritten rekrutieren und aktivieren (Ashkenazi & Dixit, 1998). Diese wiederum aktiviert proteolytisch die Effektorcaspasen Caspase-3 und -7.

Der intrinsische Weg wird durch verschiedene Stimuli aktiviert, welche nicht durch Todesrezeptoren vermittelt werden. Dies können abwesende Wachstumsfaktoren, Hormone oder Zytokine sein. Aber auch Strahlung, Hyperthermie und Toxine spielen hier eine wichtige Rolle. Diese Stimuli führen zur Aktivierung der Proteine *bcl-2-associated X protein (BAX)* und *bcl-2 homologous antagonist killer (BAK)* der Bcl-2-Familie, welche wiederum zu der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (MPT), Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und somit zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) führen (McArthur et al., 2018; Saelens et al., 2004). Durch die Poren gelangt das proapoptische Signalprotein Cytochrom c in das Zytosol und es bildet sich im Verlauf ein „Apoptosom“ genannter Multiproteinkomplex, welcher die Caspase-9 beinhaltet (Acehan et al., 2002; Chinnaiyan, 1999; Hill et al., 2004; Joza et al., 2001). Durch Cluster-Bildung der Caspase-9 wird diese schlussendlich aktiviert und bewirkt ihrerseits die proteolytische Aktivierung der Effektorcaspasen (Yuan et al., 2016). Die Effektorcaspasen vermitteln nachfolgend die Lyse der chromosomalen DNA und den Zerfall der Zelle in Apoptosekörper. Am Ende steht die Phagozytose der Apoptosekörper, welche durch die Externalisierung des Membranlipids Phosphatidylserin an die Oberfläche der apoptotischen Zellen als „eat-me

signal“ möglich gemacht wird (Bratton et al., 1997). Dieses dient als Erkennungszeichen und ermöglicht eine entzündungsfreie Beseitigung der Zelle.



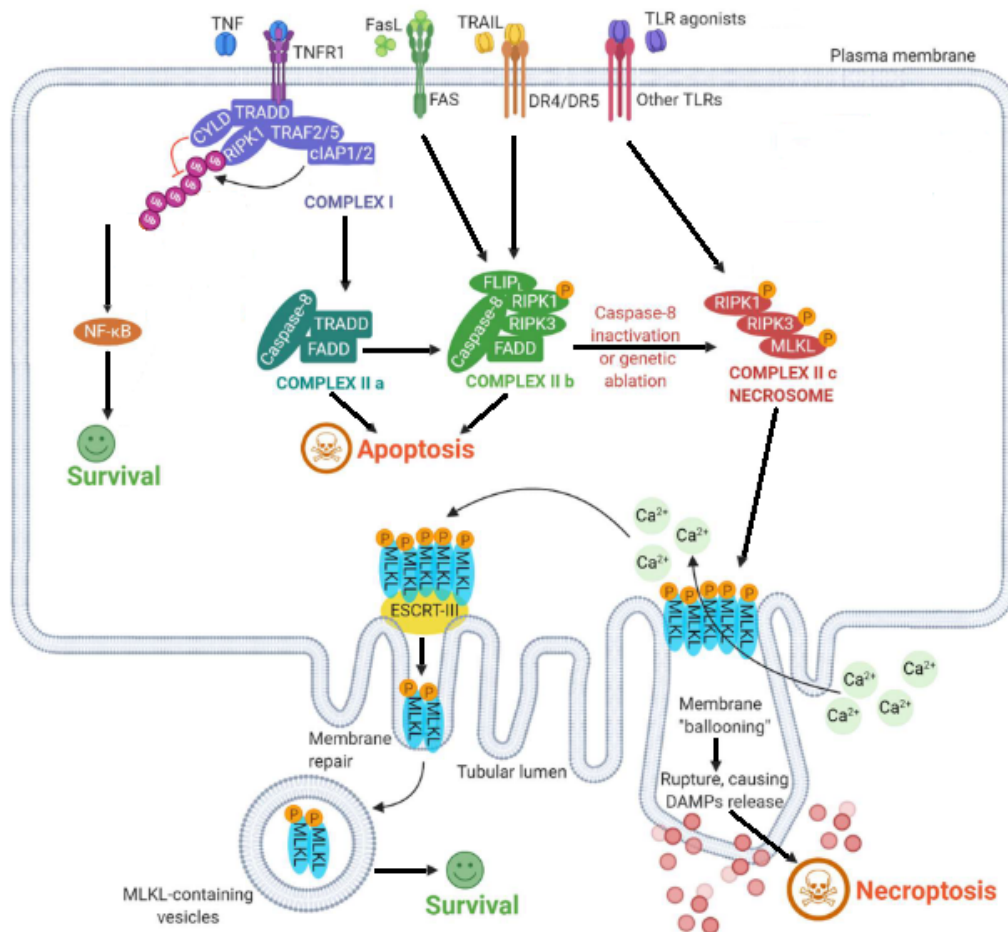
**Abbildung 3 – Signalwege der Apoptose (in Anlehnung an D’Arcy 2019):** Schädigungen der DNA durch externe Faktoren (z. B. UV-Strahlung, Hitze oder osmotischer Stress) lösen die intrinsische Apoptose über eine Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax der Bcl-2-Familie aus. Dies führt zur Ausbildung von Bak/Bax-Oligomeren, welche Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) bilden. Durch diese Poren gelangen pro-apoptotische Faktoren wie Cytochrom c (Cyt c) in das Zytosol. Cytochrom c bewirkt die Bildung eines als Apoptosom bezeichneten Proteinkomplexes, in dem Caspase-9 aktiviert wird, was nachfolgend zur Aktivierung von Effektorcaspasen wie Caspase-3 und Caspase-7 führt.

Im Gegensatz hierzu wird die extrinsische Apoptose über die Bindung von Liganden (u. a. TNF $\alpha$ , FasL, TRAIL) an Todesrezeptoren wie DR3/4/5, Fas oder TNFR1 (CD 120a) vermittelt. Es bildet sich ein rezeptorgebundener Komplex (*death inducing signaling complex*, „DISC“), welcher sich je nach dazugehörigem Rezeptor unterscheidet. Die Aktivierung des DISC führt schlussendlich zu einer Rekrutierung der Initiatorcaspase Caspase-8, welche im nächsten Schritt die Effektorcaspasen Caspase-3/-7 proteolytisch aktiviert. An diesem Punkt konvergieren der extrinsische und intrinsische Weg und führen über die Aktivierung von Endonucleasen und weiteren Proteasen in der letzten Phase zum „Blebbing“ und zur Aufspaltung der DNA. Folglich schrumpft die Zelle, zerfällt in membranumhüllte Apoptosekörper, die durch Makrophagen phagozytiert werden.

### 1.3.2 Nekroptose

Die Nekroptose ist neben der Apoptose einer der am besten verstandenen regulierten Zelltode und spielt nach dem aktuellen Forschungsstand beim akuten Myokardinfarkt, Schlaganfällen, Ischämie-/Reperfusionsschäden (IRI), Pankreatitis und Arteriosklerose eine entscheidende pathophysiologische Rolle (Degterev et al., 2008; Lin et al., 2013; Linkermann et al., 2012; Linkermann & Green, 2014; Smith et al., 2007; Tonnus & Linkermann, 2017; Vandenabeele et al., 2010). Nekroptose und Apoptose sind jedoch nicht streng voneinander getrennt, sondern teilen sich einige gemeinsame Abschnitte des Signalweges und sind Caspase-abhängig. Einen Überblick über die Interaktion dieser Signalwege bietet **Abbildung 4**.

Zur Auslösung der Nekroptose wird meist eine Ligandenbindung an einen der auf der Zelloberfläche exprimierten Todesrezeptoren wie Fas, TNFR1 oder TRAILR1/2 benötigt. Alternative Induktoren sind die Bindung von zDNA/zRNA an *z-DNA-binding protein 1* (ZBP1) oder entsprechender Liganden an *toll-like receptor 3/4* (TLR3/4). Nach Bindung von TNF $\alpha$  bildet sich im Falle des TNFR1 ein rezeptorgebundener Komplex aus TNFR1, *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1), *tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein* (TRADD), zellulären Apoptoseinhibitoren 1/2 (cIAP1/2) und einer cylindromatosis lysin 63 deubiquitinase (CYLD). Je nach humoralem Zustand der Zelle kann an diesem Punkt das RIPK1 von cIAP 1/2 polyubiquitiniert und der Zelltod somit unterbunden werden. Kommt es jedoch zu einer Deubiquitinierung durch CYLD, lösen sich RIPK1 und TRADD vom Komplex und bilden zusammen mit der Pro-Caspase-8 und *fas-associated death domain protein* (FADD) den zytosolischen Komplex IIa, in welchem Caspase-8 aktiviert und typischerweise Apoptose propagiert wird. Wird jedoch die Aktivität der Caspase-8 gehemmt, kann RIPK1 über die Interaktion der jeweiligen *receptor-interacting protein homotypic interaction motif* (RHIM)-Domänen *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3* (RIPK3) rekrutieren und bildet den Komplex IIb. Dieser bildet dann ein RIPK3 Oligomer (Nekrosom), welches das Protein mixed lineage kinase domain-like (MLKL) phosphoryliert (Cho et al., 2009; He et al., 2009), welches ebenfalls oligomerisiert. Durch die pMLKL Oligomere bilden sich Poren in der Plasmamembran und es kommt zur Auslösung der Nekroptose (Sun et al., 2012).



**Abbildung 4: Signalwege der Nekroptose (Sprooten et al., 2020)** Diese Abbildung verdeutlicht den Signalweg der Nekroptose und unterstreicht die enge Verknüpfung mit der ebenfalls Caspase-abhängigen Apoptose. Typischerweise erfolgt die Aktivierung der Nekroptose über Ligandenbindung an einen Todesrezeptor wie Fas, TNFR1 oder TRAILR1/2 (DR4/5). Im Falle des TNFR1 bildet sich hierdurch der rezeptorgebundene Komplex I bestehend aus RIPK1, TRADD, cIAP1/2, CYLD, *tnf receptor-associated factor 2/5* (TRAF2/5). Je nach Situation ist es Komplex I möglich, Apoptose, Nekroptose oder Zellüberleben zu initiieren. Das Überleben erfolgt durch eine cIAP1/2 vermittelte Polyubiquitinierung (Ub) des RIPK1 mit konsekutiver Aktivierung des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB)- und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweges. Inhibition von cIAP1/2 oder Deubiquitinierung von RIPK1 durch CYLD hingegen führen zur Dissoziation von RIPK1 und TRADD vom restlichen Komplex und ermöglichen die Bildung eines für die Apoptose wichtigen zytosolischen Komplex II a. Zu den Bestandteilen des Komplex II a gehört neben RIPK1, FADD und TRADD auch die Pro-Caspase-8, welche zu der Caspase-8 abhängigen extrinsischen Apoptose führen kann. Nach Ligandenbindung an TNFR-1, FAS oder TRAILR1/2 kann sich alternativ auch ein Komplex II b bilden, der aus FADD, RIPK1/3, Pro-Caspase-8 und *Cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP)* zusammengesetzt ist. Ohne Inhibition der Aktivität der CASP8 leiten beide Komplexe die Apoptose ein. Wird jedoch die Aktivität der Caspase-8 inhibiert, ist es RIPK1 im DISC möglich, RIPK3 zu rekrutieren, welches im Folgenden ein RIPK3-Oligomer (Nekrosom) bildet. Dieses Nekrosom phosphoryliert nun die Pseudokinase MLKL und ermöglicht somit die Bildung von pMLKL-Oligomeren. Die neu gebildeten Oligomere (pMLKL) bilden Poren in der Plasmamembran und leiten über einen massiven  $Ca^{2+}$ -Einstrom die Ruptur der Membran ein. Antagonisiert wird dies u. a. durch den *endosomal sorting complexes required for transport III* (ESCRT-III), welcher pMLKL in Vesikeln abschnürt und somit aus der Zellmembran entfernt.

### 1.3.3 Ferroptose

Die Entdeckung dieser Form der regulierten Nekrose war eher ein unerwartetes Nebenprodukt unterschiedlicher wissenschaftlicher Anstrengungen. Bereits in den 50er Jahren wurden Studien betrieben, die bestimmte Aminosäuren, Vitamine und andere Nährstoffe als essentiell für das Wachstum von Säugetieren bzw. ihrer Zellen identifizierten. Dazu gehörte die Aminosäure Cystein bzw. ihre oxidierte Form Cystin, welche als wichtiger Faktor für das Gedeihen der Zellen fungiert (Eagle 1955; Eagle 1959).

Jahrzehnte später wurden der Cystinmangel und die in Folge verminderte Bildung von intrazellulärem Glutathion, einem wichtigen Redox-Äquivalent, miteinander verknüpft (Bannai, Tsukeda, & Okumura, 1977). Durch die Abwesenheit von Glutathion können lipid-reaktive Sauerstoffspezies (L-ROS oder auch Sauerstoffradikale), die für den Zerfall einer Zelle mitverantwortlich sind, nicht mehr ausreichend detoxifiziert werden. Jedoch war damals noch nicht bewusst, dass L-ROS ein zentraler Bestandteil einer noch unbekanntem Varianten des RCD ist.

In den 2000er Jahren wurde bei der Suche nach neuen Chemotherapeutika in hochresistenten Tumorzelllinien das *small molecule* Erastin gefunden und als Inhibitor des System  $x_c^-$  charakterisiert (Dolma et al., 2003 ; Yang & Stockwell, 2008). Es zeigte sich, dass der Zelltod nach Stimulation mit diesem *small molecule* statt durch Caspase-Inhibitoren durch Eisenchelatoren zu inhibieren war, weshalb der Begriff Ferroptose geprägt wurde (Dixon et al., 2012).

Beobachtet wurde die Ferroptose bei renalen Ereignissen wie z. B. dem akuten intrarenalen Nierenversagen nach Eisenüberladung oder nach Ischämie/Reperfusionsschäden, welche u. a. im Rahmen von Transplantationen vorkommen (Linkermann et al., 2013, 2014; Friedmann Angeli et al., 2014; Tonnus et al., 2019 a). Kürzlich konnte erstmals mit genetischen Methoden eine Beteiligung der Ferroptose an der Pathophysiologie des AKI gezeigt werden (Tonnus et al., 2021).

Freies intrazelluläres Eisen ist auf Grund seiner hohen Reaktivität eine Bedrohung für das Fortbestehen der Zelle, da es in seiner reduzierten Form  $Fe^{2+}$  als Elektronendonator fungieren und somit mittels Fenton-Reaktion zur Bildung von radikalischen Sauerstoffspezies (ROS) führen kann. Dieses Redoxpotential ist u. a. im Rahmen der Lipidperoxidation durch Autooxidation von Bedeutung, da es durch die Reduktion eines Lipidhydroperoxides (LOOH) zur Bildung eines Alkoxyradikales ( $LO^\circ$ ) und  $Fe^{3+} + OH^-$  kommt.  $LO^\circ$  reagiert mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) der Zellmembran und es entsteht sowohl ein Alkohol (LOH) als auch ein Lipidradikal ( $L^\circ$ ).  $L^\circ$  geht subsequent eine Bindung mit  $O_2$  ein und es kommt zur

Bildung eines Lipoperoxyradikals ( $\text{LOO}^\circ$ ), welches als Ausgangspunkt für die weitere Fortpflanzung der Lipidperoxidation dient oder durch Bindung an ein weiteres  $\text{LOO}^\circ$  zu der Beendigung der Lipidperoxidation führen kann (Conrad & Pratt, 2019; Yin et al., 2011).

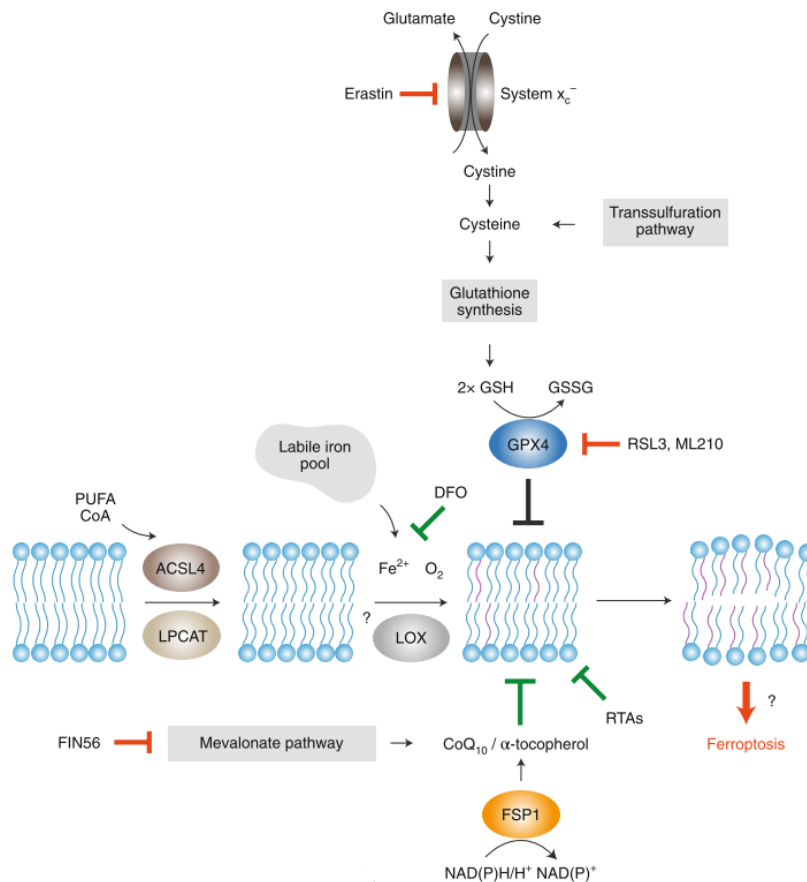
$\text{Fe}^{2+}$  ist als reduzierte Form des freien  $\text{Fe}^{3+}$  daher von zentraler Bedeutung und maßgeblich an der Auslösung der Ferroptose durch die massive Lipidperoxidation beteiligt. Dieser Autooxidation wirkt das Enzym Glutathion Peroxidase 4 (GPX4) entgegen, dessen zentrale Rolle nach Blockade durch das *small molecule ras selective lethal 3* (RSL3) erkannt wurde (Friedmann Angeli, et al., 2014; Yang et al., 2014). Zusätzlich wurde festgestellt, dass GPX4<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht lebensfähig sind und eine minimale Restaktivität des GPX4 für das Zellüberleben unerlässlich ist (Ingold et al., 2018; Yant et al., 2003). Essentieller Kofaktor der GPX4 ist das aus den Aminosäuren Glutamin, Cystein und Glycin synthetisierte Glutathion (GSH). GSH wird durch GPX4 zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert, wobei gleichzeitig Lipidperoxide reduziert werden. Im Anschluss wird GSSG durch die Glutathiondisulfid-Reduktase (GSR) NADPH-abhängig wieder zu GSH reduziert. Cystein ist bei der GSH-Synthese der limitierende Faktor und wird durch den Glutamat/Cystin Antiporter System  $x_c^-$  intrazellulär bereitgestellt. Die Expression der Komponenten des System  $x_c^-$  wird hier u. a. vom Tumorsuppressorprotein p53 reguliert und stellt das molekulare Ziel des Erastin dar (Dixon et al., 2012, 2014). Zusätzlich ist in manchen Zelltypen die Bereitstellung des Cystein über Transsulfuration unabhängig von System  $x_c^-$  möglich (Hayano et al., 2016).

Durch *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)-basierte Untersuchungen des Genoms von Ferroptose-resistenten Zelllinien wurden weitere Enzyme wie *acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (ACSL4) und *lysophosphatidylcholine acyltransferase-3* (LPCAT3) identifiziert (Dixon et al., 2015; Doll et al., 2017). ACSL4 ligiert ATP-abhängig Coenzym A (CoA) an langkettige Fettsäuren und ermöglicht so die Veresterung von PUFAs. Diese veränderten PUFAs werden im nächsten Schritt durch LPCAT3 in die Zellmembran eingebaut. So verändert weisen sie eine deutlich erhöhte Sensitivität für die proferroptotische Oxidation auf.

Neue Studien deuten auf einen weiteren GPX4-unabhängigen Mechanismus, welcher trotz Deletion der GPX4 die Lipidperoxidation und konsekutiv die Ferroptose inhibiert. Das so identifizierte Protein *ferroptosis suppressor protein 1* (FSP1, vorher bekannt als AIFM2) reduziert unter NAD(P)H -Verbrauch Ubiquinon zu Ubiquinol.

Ubiquinol wiederum konnte die Lipidperoxidation durch Bindung der  $\text{LOO}^\circ$  unterbinden und wirkte somit antiferroptotisch (Bersuker et al., 2019; Doll et al., 2019). Es konnte nun gezeigt

werden, dass sowohl GPX4 als auch FSP1 jeweils auch in Nierentubuli benötigt werden, um in der Ischämie-/Reperfusion Ferroptose zu unterdrücken (Tonnus, *et al.*, 2021).



**Abbildung 5 – Signalwege der Ferroptose (Conrad und Pratt, 2019)** Diese Form der regulierten Nekrose wird durch freies Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) katalysiert, welches zusammen mit der mitochondrialen Atmungskette zur Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) beiträgt. Teilweise vermittelt über die Lipoxygenasen (LOX) kommt es zur Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) und weiterer Membranlipide wie Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ). Die daraus resultierende Ferroptose führt zu einem Verlust der Membranintegrität und über einen noch unbekanntem Prozess zum konsekutiven Zelltod. Antagonisiert wird die Ferroptose über Glutathion Peroxidase 4 (GPX4), welche die peroxidierten Lipide wieder reduziert. Zur Funktion der GPX4 wird jedoch Glutathion benötigt, welches wiederum zur *de-novo* Synthese importiertes Cystein benötigt. Dieses wird u. a. über den Cystin/Glutamat Antiporter System  $X_c^-$ , sowie in manchen Zelltypen durch Transsulfuration bereitgestellt. Die Hemmung des System  $X_c^-$  (Erastin) oder der GPX4 (RSL3/ML210) induziert experimentell Ferroptose. Eisenchelatoren (Desferoxamin) hingegen wirken durch Bindung des  $\text{Fe}^{2+}$  der Ferroptose entgegen. Eine zusätzliche antiferroptotische Leistung wird über das *ferroptosis suppressor protein 1* (FSP1) erbracht, welches NADPH-abhängig Ubiquinol zu Ubiquinol reduziert und somit die Propagation der Lipidperoxidation durch Bindung von Lipidperoxyradikalen ( $\text{LOO}^\bullet$ ) unterdrückt. Eine ferroptotische Wirkung weist der *ferroptosis inducer 56* (FIN56) über die Hemmung des Mevalonsäure-Signalweges auf, welcher maßgeblich die GPX4-Synthese beeinflusst. Schlussendlich werden durch ACSL4 und LPCAT veränderte und mit CoA ligierte PUFAs in die Zellmembran eingebaut und somit die Sensibilität der Zellmembran für die Ferroptose gesteigert.

Schlussendlich steht die vermehrte oder verringerte Erzeugung von L-ROS durch Lipidperoxidation im Mittelpunkt, da sie den oxidativen Zerfall von Lipiden der Zellmembran in Gang setzen, welche schließlich zum Kollaps der Zelle führen und DAMPs freisetzen, sodass ein inflammatorisches systemisches Geschehen mit Beteiligung weiterer Organe ausgelöst wird. Der genaue Mechanismus des Integritätsverlustes der Zellmembran ist jedoch bislang unverstanden. Ebenfalls unverstanden ist, ob es sich um einen gerichteten oder ungerichteten stochastischen Prozess handelt. Einen schematischen Überblick bietet **Abbildung 5**.

In Zusammenschau deutet die aktuelle Studienlage darauf hin, dass die Ferroptose nicht durch ein spezifisches Signal ausgelöst, sondern über die Abwesenheit effektiver anti-peroxidativer Mechanismen vermittelt wird.

Es sollte ebenfalls noch erwähnt werden, dass sich der ferroptotische RCD nicht auf die betroffene Zelle beschränkt, sondern durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus auf die benachbarten Zellen fortpflanzt, welche dann ebenfalls ferroptotisch untergehen (Linkermann et al., 2014; Riegman et al., 2020). Bei diesem Mechanismus könnte es sich im Rahmen des akuten Nierenversagens um eine pro-ferroptotische NADPH-Depletion der gesunden Tubuluszellen handeln. Es kommt hierbei durch die massive Verminderung der Redoxkapazität der ferroptotischen Zelle zu einer freien Diffusion von NADPH aus den benachbarten, gesunden Tubuluszellen, welche konsekutiv deutlich vulnerabler der Ferroptose gegenüber sind (Tonnus & Linkermann, 2016).

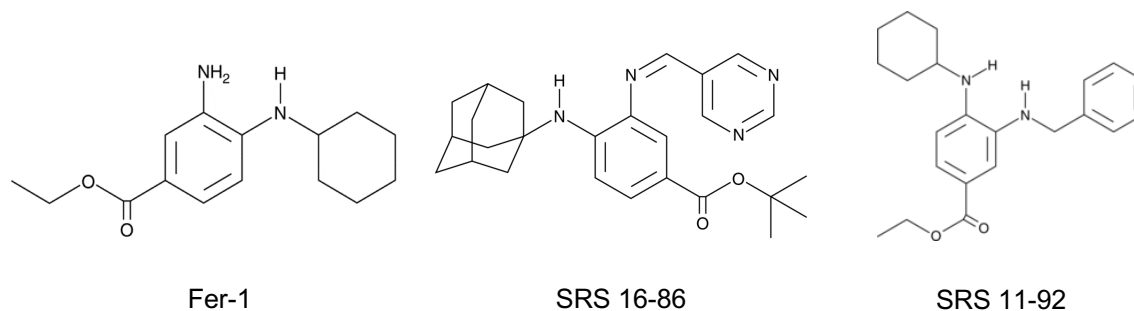
Trotz des fehlenden Verständnisses zu dem genauen Ablauf der Ferroptose wurden bereits mehrere Inhibitoren und Induktoren ausfindig gemacht, welche unterschiedliche therapeutische Möglichkeiten eröffnen und im nächsten Abschnitt behandelt werden. Besonderes Augenmerk im Rahmen dieser Dissertation gilt der Substanz Ferrostatin-1 (Fer-1). Dieses und weitere Ferrostatine werden im nächsten Abschnitt genauer behandelt.

#### 1.3.4 Ferrostatine und weitere Inhibitoren der Ferroptose

Inhibitoren können je nach Wirkungsweise in direkt und indirekt eingeteilt werden.

Zu den direkten Inhibitoren zählen die radikalfangenden Antioxidantien (RTA), die meist in Form von Phenolen oder aromatischen Aminen vorkommen. Die anti-ferroptotische Wirkung der aromatischen Amine besteht in der Abgabe ihres schwach gebundenen Wasserstoffatoms ( $H^+$ ) an  $LOO^\circ$  und somit die Bildung eines  $LOOH$  und eines Aminylradikales. Letzteres reagiert jedoch nicht mit  $O_2$ , sondern meist mit einem weiteren  $LOO^\circ$  und es entsteht kein weiteres Radikal, sondern z. B. ein  $LOO^-$ . Hierdurch wird die Propagation der Lipidperoxidation





**Abbildung 6 – Strukturformeln der Ferrostatine Fer-1, SRS 16-86 und SRS 11-92.** (©Cayman-Chemical [<https://www.caymanchem.com/product/17729/ferrostatin-1>];

[<https://www.caymanchem.com/product/26752>]; [<https://www.caymanchem.com/product/25689/srs11-92>], zuletzt besucht am: 29.12.2021). Die *small molecules* Fer-1, SRS 16-86 und SRS 11-92 sind einige der bisher entwickelten Ferroptose-Inhibitoren, deren antiferroptotisches Potential der Rolle als effektive radikalfangende Antioxidantien (RTA) zugeschrieben wird. Es handelt sich hierbei um aromatische Amine, welche über die Abgabe ihres schwach gebundenen Wasserstoffatoms an die Lipoperoxyradikale ( $\text{LOO}^\circ$ ) ihre Wirkung als entfalten und selbst zu Aminylradikalen werden. Diese Radikale reagieren jedoch meist mit einem weiteren  $\text{LOO}^\circ$  und die Radikale neutralisieren einander. Der Unterschied der *small molecules* liegt in ihrer unterschiedlichen HWZ und Plasmastabilität.

unterbrochen. Zudem binden aromatische Amine auf Grund ihrer nur schwachen Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen selten direkt an die PUFAs und bleiben somit in Nähe der Zellmembran aktiv. Phenole gehen hingegen präferentiell Wasserstoffbrückenbindungen mit den PUFAs ein, worunter auch ihre Reaktivität leidet. Zusätzlich kann sich bei der Interaktion zwischen Aminylradikalen und  $\text{LOO}^\circ$  auch ein Nitroxidradikal bilden, welches auf unterschiedliche Weise als RTA fungieren kann (Conrad & Pratt, 2019; Poon & Pratt, 2018). Das prototypische Ferrostatin 1 (Fer-1) wurde als erstes im Rahmen einer Arbeit beschrieben, in der es zur Antagonisierung des Erastin-induzierten Zelltodes verwendet wurde (Dixon et al., 2012). Es handelt sich um ein aromatisches Amin (Arylalkylamin), welches die oben beschriebenen antioxidativen Eigenschaften besitzt und die oxidative Zerstörung der Plasmamembran verhindert. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass die Ursache für die LOOH-Reduktion in der Fähigkeit des Fer-1 begründet liegt, als radikalfangendes Antioxidans (RTA) zu fungieren (Conrad & Pratt, 2019; Zilka et al., 2017). Als eine weitere Möglichkeit wurde die Hemmung der Lipoxygenase 15 (ALOX15) durch Fer-1 und der konsekutive Abfall des LOOH beschrieben (Yang et al., 2016a). Weitere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass ein knock-out der LOX15 die Ferroptose nicht blockiert (Friedmann Angeli et al., 2014). Trotz der positiven Eigenschaften des Fer-1 wurden eine metabolische Instabilität und eine kurze Plasma-HWZ erfasst. Weiterentwickelte Ferrostatine wie SRS 11-92 (Skouta et al., 2014) und SRS 16-86 (Linkermann et al., 2014) wiesen bereits

eine erhöhte Stabilität in Bezug auf die HWZ und den Metabolismus auf und werden in **Abbildung 6** dargestellt.

Indirekte Inhibitoren der Ferroptose haben einen Einfluss auf die Einleitungsrate der Lipidperoxidation und nicht direkt auf deren Fortpflanzung. Einerseits kann durch Eisenchelatoren, wie Deferoxamin, freies Eisen gebunden werden und somit die Radikalbildung reduziert werden (Dixon et al., 2012). Andererseits kann durch die Hemmung der ACSL4 die Aktivierung der PUFAs verhindert werden und wiederum die Sensitivität der Zellmembran für Ferroptose verringert werden (Doll et al., 2017).

### 1.3.5 Induktoren der Ferroptose

Die bisher entdeckten Mechanismen der Ferroptose bieten multiple Möglichkeiten zur Induktion dieses regulierten Zelltodes.

Zu diesen *ferroptosis inducing agents* (FINs) zählt der Wirkstoff *ras selective lethal 3* (RSL3), welcher unabhängig vom System  $x_c^-$  über die kovalente Bindung an den Selenocysteinrest des GPX4 dessen katalytische Aktivität inhibiert. Demgemäß konnte RSL3 seine Wirkung in GPX4-knockout Zellen nicht entfalten (Yang et al., 2014, 2016). Weitere GPX4-Inhibitoren sind die Wirkstoffe ML162 und ML210, welche ebenfalls an den Selenocysteinrest binden und so Ferroptose induzieren (Eaton et al., 2020). Zusätzlich kann durch das *small molecule* FIN56 GPX4 direkt degradiert werden und somit nicht mehr seine antiferroptotische Wirkung entfalten (Shimada et al., 2016).

Des Weiteren ist eine Ferroptoseinduktion über die Hemmung des System  $x_c^-$ -Antiporters und eine konsekutive Erschöpfung der Cystein- und GSH-Vorräte möglich. Das *small molecule* Erastin wurde hierbei als direkter Inhibitor des System  $x_c^-$  identifiziert und verursachte auch in geringen Konzentrationen einen deutlichen intrazellulären GSH-Abfall (Dolma et al., 2003; Dixon et al., 2012). Darüber hinaus zeigte auch das bereits im Rahmen der rheumatoiden Arthritis und den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verwendete Sulfasalazin eine Ferroptose-induzierende Wirkung über Hemmung des System  $x_c^-$  (Dixon et al., 2014).

Eine weitere Möglichkeit, die Ferroptose zu induzieren ist über die Inhibierung des FSP-1, welches bei Ausfall der GPX4 weiterhin die Ferroptose über die Bildung von Ubiquinol und konsekutive Bindung von  $LOO^\circ$  verhindert. Das neu entdeckte *small molecule* iFSP1 konnte in Zellkultur Ferroptose auslösen (Doll et al., 2019a). An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass iFSP noch nicht *in vivo* angewandt wurde und dessen Effektivität daher noch nicht abschließend bestätigt ist. Eine kombinierte Inhibition der Cystein-GSH-GPX4-Achse und FSP1-Ubiquinol könnte jedoch in einer verlässlichen Induktion der Ferroptose münden und ist daher von Interesse. Insbesondere in der Krebstherapie könnten diese unterschiedlichen FINs neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

#### 1.4 Fragestellungen der Forschungsarbeit

Aktuell existieren keine kausalen Therapieansätze zur Behandlung der Rhabdomyolyse und der Crush-Niere. In dieser Arbeit soll der Hypothese nachgegangen werden, dass die Rhabdomyolyse die Crush-Niere durch die Induktion von Ferroptose auslöst. Pathophysiologisch wäre hier denkbar, dass eisenhaltige Muskelabbauprodukte glomerulär filtriert werden und anschließend über die luminalen Seite der Nierentubuli zu einer überschießenden Lipidperoxidation führen.

Als Ziel ergibt sich somit die Konzeption und Etablierung eines präklinischen, translational relevanten Modells der Crush-Niere in Mäusen.

Zusätzlich gilt besonderes Augenmerk der Blockade der Ferroptose durch *small molecules* mit konsekutiver Beeinflussung der Crush-Niere. Insbesondere soll geklärt werden, ob sich funktionelle Parameter des Nierenversagens verbessern und ob akute Tubulusnekrosen in diesem Zusammenhang reduzierbar sind?

## 2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die unterschiedlichen Materialien und Methoden erläutert, die Bestandteil dieser experimentellen Dissertation waren.

### 2.1 Materialliste

#### Puffer: 10 x Tris Puffer (pH 8,3):

61 g Tris	Sigma-Aldrich
116,9 g NaCl	Sigma-Aldrich
500 ml Aqua dest.	Sigma-Aldrich

#### Inhibitoren & Lösungsmittel:

2 % v/v Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK-Chemie
0,9 % w/v Natriumchlorid	Berlin Chemie
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Fer-1	Sigma-Aldrich

#### Verbrauchsmaterial Mausexperimente:

Buprenorphin-HCl (Temgesic)	Indivior Europe Limited
Kodan Tinktur forte Desinfektionsspray	Schülke
99.5 % v/v Glycerol	Sigma-Aldrich
4 % w/v Formaldehyd (gepuffert pH 6,9)	Sigma-Aldrich
Isofluran	Baxter
100 IE/ml Insulinspritze	Braun
50 µl Kapillarpipetten	servoprax
1,3 ml Lithium-Heparin Serummonovette	Sarstedt

Mäusefutter ssniff V1534-300	ssniff
Eppendorf Safe-Lock Tube 1,5 ml	Eppendorf

PAS-Färbung:

Tris-Puffer (pH 8,3)	Sigma-Aldrich
100 % v/v Ethanol	Sigma-Aldrich
Hämalaun	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Aqua dest.	Sigma-Aldrich
Paraffin	Sigma-Aldrich
2 % w/v Perjodsäure	Sigma-Aldrich
Hämatoxylin MHS16	Sigma-Aldrich
Xylol	Sigma-Aldrich
Schiffs Reagenz	Merck
Roti-Histokitt	Carl Roth
Deckgläschen	Carl Roth
Objekträger Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific

Organentnahmebesteck:

Feinschere (CeramaCut®)	FST
Anatomische Pinzette (BD239SU)	Braun

Geräte:

Keyence BZ 9000E Mikroskop	Keyence
Glasperlensterilisator	FST

Magnetisches Retraktorsystem 18200-20	FST
Temperature-controlled-self-regulated heating system	FST
RM2245 Mikrotome	Leica
COP30 Kühlplatte	Medite
Cobas 8000 modular analyzer	Roche
VetEquip COMPAC <sup>5</sup> Narkosesystem	VetEquip
Wage Kern 440-47N	Kern & Sohn
Thermoregulator	ProSense B.V.
Eppendorf Research Plus Pipetten	Eppendorf
Stoppuhr	Oregon Scientific

## 2.2 Versuchstiere

### 2.2.1 Maus-Wildtyp

Das Modell des akuten intrarenalen Nierenversagens nach Rhabdomyolyse wurde *in vivo* etabliert und durchgeführt. Dafür wurden Mäuse des Mausstamms C57BL/6N verwendet, welche von Charles River Laboratories in Sulzfeld (Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte in zertifizierten S1-Bereichen im ehemaligen Tierstall der Pharmakologie auf dem Gelände der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die 32 männlichen *wildtype* (wt) Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (IVC) in Gruppen von 2 Tieren pro Käfig gehalten. Sie durchliefen in diesen Käfigen einen 12-stündigen Tag/Nacht Rhythmus. Bei Etablierung des Modells betrug ihr Gewicht ca. 22 – 24 g (Varianz ca. 10 %) und ihr Alter 8-10 Wochen. Sie erhielten während der gesamten Zeit artgerechte und ausreichende Nahrung (Standardfutter der Firma ssniff) mit einem Proteinanteil von 19 %, eine Wasserversorgung *ad libitum*, sowie genügend Möglichkeiten zum Nestbau.

### 2.2.2 Behördliche Genehmigung

Alle *in vivo* Experimente wurden unter der Tierversuchsantragsnummer: V312-7224.121-4 (79-5/12) genehmigt und nach dem aktuellen Tierschutzgesetz durchgeführt.

Der Tierversuchsantrag wurde vom Tierschutzbeauftragten Prof. Dr. Schultheiss der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sowie vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein geprüft und genehmigt.

### 2.3 Wirkstoffaufbereitung

Die 99,5 % v/v Glycerollösung wurde mittels PBS auf eine 50 % v/v Lösung verdünnt und hiervon wurden 200 µL intramuskulär injiziert.

Fer-1 wurde mittels 2 % v/v DMSO in PBS auf eine finale Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht gelöst und ein finales Volumen von 200 µl intraperitoneal injiziert.

### 2.4 Rhabdomyolysemodell

Dieses Modell wurde in modifizierter Form bereits von Fäling und Kollegen aus dem Jahr 2013 als eine effektive Methode der Induktion des akuten Nierenversagens durch Rhabdomyolyse etabliert (Fäling et al., 2013) und hier auf unsere Fragestellung hin dementsprechend modifiziert.

Die zu behandelnden männlichen *wf*-Tiere wurden in IVCs in 2er Gruppen gehalten, die IVCs entsprechend gekennzeichnet und den Tieren das Wasser 12 Stunden vor der Durchführung der Injektion entzogen. Nach Ablauf der Frist wurde die jeweilige Maus gewogen, das Gewicht notiert und zur Analgesie den Versuchstieren 2 µg Buprenorphin-HCL im 0,1 ml 0,9 % w/v NaCl intraperitoneal injiziert. Nach 15 Minuten Einwirkzeit wurde das Versuchstier mittels Isofluran-Inhalation in der Induktionskammer der Narkoseeinheit (VetEquip COMPAC<sup>5</sup>) unter einem Fluss von 4 l/l O<sub>2</sub> Isofluran narkotisiert. Die Tiere wurden bis zur tiefen Narkose beobachtet und anschließend aus der Narkosekammer entnommen. Die Narkosetiefe wurde mittels der Reaktion auf leichte Schmerzreize initial festgestellt und anschließend über die Beobachtung der Atmung kontrolliert. Die Versuchstiere wurden in Rückenlage auf einer beheizten Operationsplatte, welche eine dauerhafte Temperatur von 37 °C aufwies, fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde die Schnauze der Tiere in einem Beatmungsschlauch platziert, über welchen die Mäuse mit einer Mischung aus O<sub>2</sub> und 2 l/l O<sub>2</sub> Isofluran versorgt wurden. Zeitgleich wurde über den Beatmungsschlauch konstant das überschüssige Narkosegas abgesaugt.

Anschließend erfolgte eine intramuskuläre Applikation der 50 % v/v Glycerollösung mittels 1 ml/100 I.E. Insulinspritze. Die Applikation eines finalen Volumens von 200 µl (10 ml/kg Körpergewicht) erfolgte bilateral in den M. quadriceps femoris. Nach der Injektion wurde die Maus farblich am Schwanz markiert, um einer Verwechslung vorzubeugen.

Exakt 15 Minuten nach Applikation des Glycerols erfolgte eine weitere intraperitoneale Injektion mittels Insulinspritze. Appliziert wurde entweder 2 % v/v DMSO in einem finalen Volumen von 200 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) oder Ferrostatin-1 (5 mg/kg Körpergewicht) in einem finalen Volumen von 200 µl. Die Injektion des jeweiligen Wirkstoffes erfolgte doppelblind.

Nach der erfolgten Injektion wurden die Männchen wieder in die IVCs zurückgesetzt und Futter als auch Wasser *ad libitum* zugeführt. Über die nächsten 24 h erfolgte eine Nachbeobachtung der Tiere. Nach Ablauf der 24 h erfolgte eine retroorbitale Blutabnahme über das rechte Auge mittels 50 µl Kapillarpipetten und anschließend die Tötung durch zervikale Dislokation. Mittels Feinschere erfolgte die Eröffnung des Abdomens entlang der Linea Alba und eine anschließende Mobilisierung des Darmes zur Darstellung der Nieren. Die rechte Niere wurde entnommen und in 4 % w/v Formalinlösung für 24 h fixiert. Daraufhin erfolgte das Umbetten in 70% v/v Ethanol und die Lagerung bei Raumtemperatur für die spätere Weiterverarbeitung. Zusätzlich wurde ebenfalls die linksseitige Niere entnommen, in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß deponiert und mittels Flüssigstickstoff schockgefroren. Diese Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

Als Kontrollgruppe dienten 12 männliche *wt*-Tiere des C57Bl/6N Mausstammes, dessen Haltung in IVCs in Gruppen von 2-5 Mäusen erfolgte. Das Gewicht der Versuchstiere betrug ca. 22-24 g und das Alter ca. 9 Wochen. Die Versuchstiere wurden mittels Isofluran in der Induktionskammer narkotisiert. Analog zu den übrigen Versuchstieren wurde die Narkosetiefe mittels der Reaktion auf Schmerzreize beobachtet. Unter tiefer Narkose erfolgte eine rechtsseitige, retrobulbäre Blutabnahme mittels 50 µl Kapillarpipetten und eine anschließende Euthanasie über zervikale Dislokation.

Alle gewonnenen Blutproben wurden im nächsten Schritt an das Zentrallabor der Universitätsklinik Schleswig-Holstein (UKSH) in Kiel übergeben.



## 2.5 Laboranalytik

### 2.5.1 Kreatininmessung

Die Blutabnahme zur Messung des Kreatinins im Serum erfolgte über einen retrobulbären Zugang mit Auffangen des Materials in einem 1,3 ml Lithium-Heparin Röhrchen. Direkt nach der Blutabnahme wurden die Proben in das Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel (UKSH) gebracht. Es erfolgte nach akkreditierter Routinediagnostik in Doppelverblindung eine enzymatisch-photometrische Messung mittels des Cobas 8000 modular analyzer (Roche).

### 2.5.2 Harnstoffmessung

Aus der gleichen Blutprobe im 1,3 ml Lithium-Heparin Röhrchen wurde der Harnstoff ebenfalls im Zentrallabor des UKSH in Kiel mittels akkreditierter Routinediagnostik photometrisch und in Doppelverblindung bestimmt.

### 2.5.3 Kreatinkinase

Die Messung der Kreatinkinase wurde ebenfalls im Zentrallabor des UKSH Kiel aus der Blutabnahme im 1,3 ml Lithium-Heparin Röhrchen mittels Farbumschlagassay in akkreditierter Routinediagnostik und in Doppelverblindung durchgeführt.

### 2.5.4 Laktatdehydrogenasemessung

Schließlich wurde auch die Messung der Laktatdehydrogenase der gleichen Blutabnahme im 1,3 ml Lithium-Heparin Röhrchen mittels Farbumschlagassay im Zentrallabor des UKSH Standort Kiel in akkreditierter Routinediagnostik und in Doppelverblindung durchgeführt.

## 2.6 Histologie

### 2.6.1 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat Peter Boor an der Universitätsklinik RTWH Aachen durchgeführt. Als erstes wurden die in 70 % v/v Ethanol gelagerten Nieren in Ethanolbädern mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert.

Hiernach wurden die Proben mit Xylol durchtränkt und in Paraffin eingebettet. Mittels Rotationsmikrotom der Firma Leica wurden Schnitte von 1 µm Schichtdicke angefertigt. Vor dem Schneiden wurden die Proben auf -15 °C runtergekühlt, die Schnitte in einem Wasserbad bei 37 °C gestreckt und je ein Schnitt auf dem Objektträger aufgebracht. Hiernach wurden die Schnitte bei 50 °C über Nacht getrocknet. Für die PAS-Färbung wurden die in Paraffin eingebetteten Proben in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und entparaffiniert. Hierbei wurden die Proben 3 x 5 Minuten in Xylol, 3 x 2 Minuten in 100 % v/v Alkohol, 2 x 3 Minuten in 95 % v/v Alkohol und 1 x 2 Minuten in 70 % v/v Alkohol getränkt. Hiernach wurden die Proben 5 Minuten lang mittels destillierten Wassers gewaschen.

Danach wurden die Proben für 30 Minuten in 2 % w/v Perjodsäure bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mittels destillierten Wassers für jeweils 2 Minuten und eine angeschlossene Inkubation in Schiffs Reagenz für 60 Minuten unter Raumtemperatur. Unter fließend warmem Wasser wurden die Proben bei 35 °C für 5 Minuten gespült und für 4 Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach einem erneuten Waschen mittels destillierten Wassers für 5 Minuten erfolgte das Bläuen in Tris-Puffer (pH 8,3) durch mehrmaliges Dippen (8 x). Nach einem letzten Waschen in destilliertem Wasser für 5 Minuten wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Dies wurde durch mehrfaches Dippen in 95% v/v (2 x) und 100% v/v Alkohol (3 x) bewerkstelligt. Schließlich wurden die Gewebeproben 3 x 5 Minuten in Xylol getränkt und mittels Histokit eingedeckt.

## 2.6.2 Tubular Injury Score

Die histopathologische Beurteilung erfolgte durch das Keyence BZ 9000E Mikroskop in 400 x Vergrößerung. Mittels integrierter CCD-Kamera wurden die Mikrographien erstellt und durch die BZ-II-Analyzer Software digitalisiert. In den PAS-gefärbten Schnitten wurden jeweils ca. 100 Nierentubuli pro Versuchstier gewählt und ihre Morphologie bewertet.

Zu den morphologischen Kriterien der Tubulusschädigung bei akutem Nierenversagen zählten Verlust des Bürstensaums, Glycerolablagerungen, Tubulusdilatation, Tubulusnekrosen, Apoptose und tubuläre Zylinderbildung. Für jede Versuchsgruppe wurde somit ein *tubular injury score* (TIS) erstellt und je nach Ausmaß der Schädigung auf einer Skala von 0-3 beurteilt. Abwesenheit von Schäden (0) gingen über in milde (1), moderate (2) und schwere (3) Tubulusschädigungen.

Dies wurde pro Gruppe jeweils an mindestens 10 Tieren doppelblind durchgeführt.

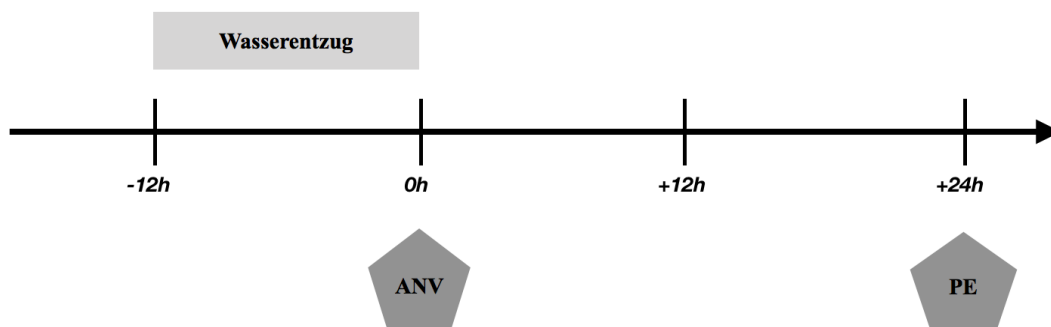
## 2.7 Statistik

Als statistisch signifikant wurden Unterschiede bewertet, deren p-Wert kleiner als 0.05 war. Die statistische Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism (Version 9.00) des Unternehmens GraphPad Software Inc. Die Messwerte wurden unter Annahme einer Normalverteilung mittels eines *unpaired Student's t-Test* mit Welch's Korrektur ausgewertet. Sternchen in allen Abbildungen repräsentieren das Signifikanzniveau (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung des Mausmodells der Rhabdomyolyse

Dieses Modell entstand als modifizierte Version des bereits etablierten Rhabdomyolyse-Modells aus der Publikation von Fähling et al. aus dem Jahr 2013 (Fähling et al., 2013) und ist in **Abbildung 7** schematisch dargestellt.

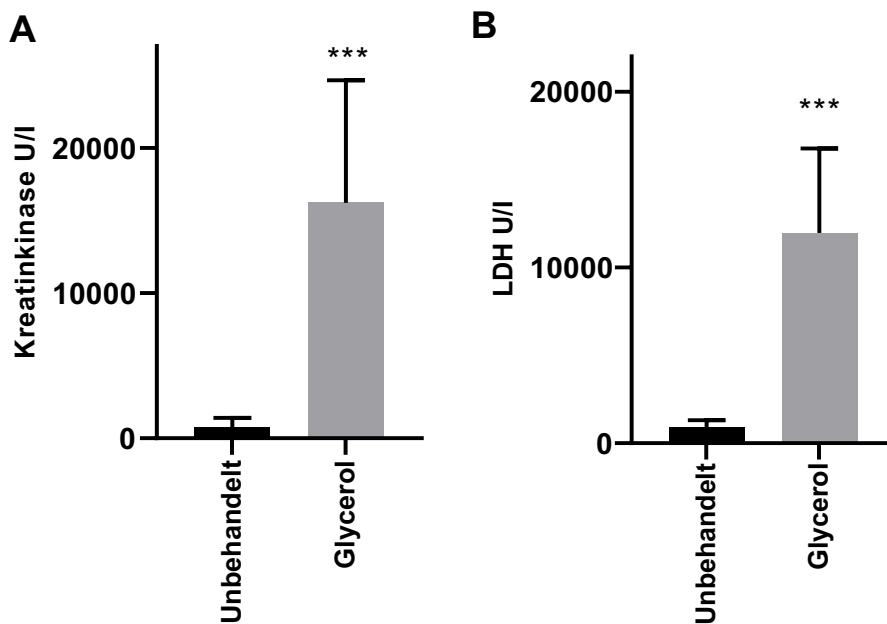


**Abbildung 7 – Zeitstrahl des Rhabdomyolyse-Protokolls** Den Versuchstieren (n = 20) wurde 12 Std. lang das Wasser entzogen. Hiernach erfolgte die Inhalationsnarkose mit Isofluran, die i.p. Anästhesie mittels Buprenorphin und schließlich die Applikation der 50% v/v Glycerollösung i.m. in die Oberschenkelmuskulatur zur Induktion des akuten Nierenversagens (ANV). 15 min nach Applikation wurde doppelblind Fer-1 oder PBS (finales Volumen 200 µl) i.p. appliziert. Wasser war hiernach *ad libitum* verfügbar. Nachfolgende Beobachtung der Mäuse für 24 Std. und anschließende Blutabnahme und Probeentnahme (PE).

Als Parameter für die Schädigung der Muskelzellen dienten analog zur klinischen Praxis ein Anstieg der Aktivität der Kreatinkinase und für den allgemeinen Zelluntergang ein Anstieg der LDH-Aktivität im Serum. In **Abbildung 8** zeigt sich die Induktion des Schadens durch das Rhabdomyolyse-Protokoll.

Die PBS-Gruppe (n = 10) erhielt eine i.m. Glycerolapplikation, sowie ein finales Volumen von 200 µl PBS i.p. und wies bei der Auswertung höchst signifikant ( $p < 0.001$ ) erhöhte Kreatinkinasewerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (n = 12) auf. Die Mittelwerte der Kreatinkinase (CK) betragen in der Kontrollgruppe ca. 740 U/l und in der PBS-Gruppe (n = 10) ca. 16209 U/l (**Abbildung 8A**).

Ebenfalls als höchst signifikant ( $p < 0.001$ ) stellten sich die Unterschiede in Bezug auf die LDH-Aktivität dar. Die Kontrollgruppe wies einen durchschnittlichen Wert von ca. 897 U/l und die PBS-Gruppe von ca. 11961 U/l auf. Dies weist auf eine erfolgreiche Induktion des Muskelzerfalles und somit der Rhabdomyolyse im Mausmodell hin (**Abbildung 8 B**).



**Abbildung 8 – Induktion der Rhabdomyolyse** Die unbehandelte Kontrollgruppe (n = 12) zeigte deutlich reduzierte Werte für Kreatinkinase (A) und die Unterschiede stellten sich im Vergleich zur mittels Glycerol-behandelten PBS-Gruppe (n = 10) als höchst signifikant (\*\*\*, p<0.001) dar. Die Unterschiede in Bezug auf LDH (B) waren ebenfalls höchst signifikant (\*\*\*, p<0.001), so dass sich hieraus auf eine erfolgreiche Induktion der Rhabdomyolyse durch das Modell schließen lässt.

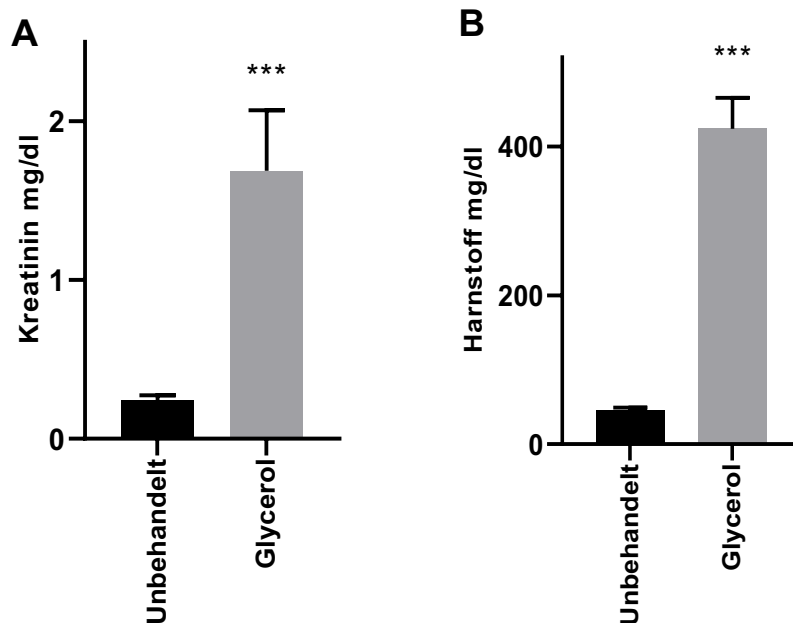
### 3.2 Auslösung der Crush-Niere im Mausmodell

Nach Auslösung der Rhabdomyolyse wurden die funktionellen renalen Schäden mittels Messung der Kreatinin- und Harnstoffwerte im Serum quantifiziert, um eine erfolgreiche Induktion der Crush-Niere zu überprüfen.

Die mit Glycerol (i.m.) und PBS (i.p.) vorbehandelten Tiere der PBS-Gruppe wiesen durchschnittlich höchst signifikant (p<0.001) erhöhte Kreatininwerte von ca. 1.7 mg/dl (150 µmol/l) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit Kreatininwerten von ca. 0.24 mg/dl (21.33 µmol/l) auf.

Darüber hinaus konnten ebenfalls höchst signifikante (p<0.001) Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der PBS-Gruppe in Bezug auf Harnstoff festgestellt werden. Der durchschnittliche Wert für den Serumharnstoff betrug bei der Kontrollgruppe ca. 45 mg/dl (7,59 mmol/l) und in der PBS-Gruppe ca. 426 mg/dl (71 mmol/l).

Somit zeigte sich in der PBS-Gruppe ein hochsignifikanter Anstieg der Nierenretentionsparameter (**Abbildung 9**).



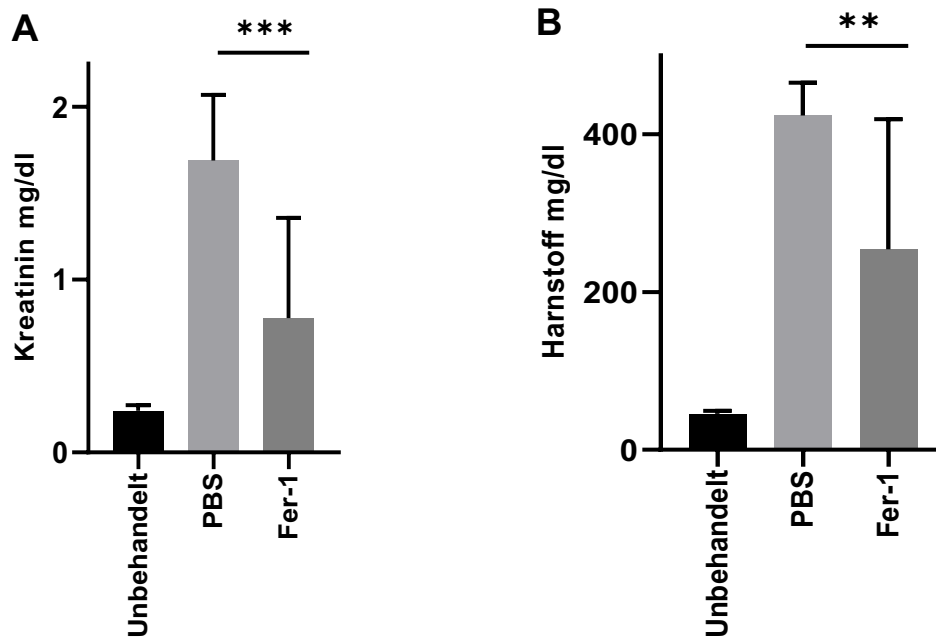
**Abbildung 9 – Induktion der Crush-Niere** Zur Bewertung der funktionellen Nierenschäden wurden die Retentionsparameter Kreatinin (A) und Harnstoff (B) herangezogen. In Bezug auf das Kreatinin wurden hoch signifikante (\*\*\*,  $p < 0.001$ ) Unterschiede festgestellt. Zudem unterschieden sich ebenfalls die Harnstoffwerte der mit Glycerol behandelten PBS-Gruppe höchst signifikant (\*\*\*,  $p < 0.001$ ) von der Kontrollgruppe. Es lässt sich daher von einer erfolgreichen Induktion der Crush-Niere im Mausmodell ausgehen.

### 3.3 Erniedrigte Retentionsparameter nach Fer-1 Applikation

Verglichen wurden die Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff der unbehandelten Kontrollgruppe ( $n = 12$ ), der PBS-Gruppe ( $n = 10$ ) und der Fer-1-Gruppe ( $n = 9$ ).

In Bezug auf die Kreatininwerte wies die Fer-1-Gruppe im Vergleich zu der PBS-Gruppe höchst signifikant ( $p < 0.001$ ) erniedrigte Werte auf (**Abbildung 10A**). Das durchschnittliche Serumkreatinin für die Fer-1 Gruppe betrug ca. 0.78 mg/dl (90  $\mu\text{mol/l}$ ) und für die PBS-Gruppe ca. 1.7 mg/dl (150  $\mu\text{mol/l}$ ). Der erfasste Unterschied stellte sich als höchst signifikant ( $p < 0.001$ ) dar.

Hochsignifikant ( $p < 0.01$ ) erniedrigt waren ebenfalls die Werte für Harnstoff in der Fer-1-Gruppe mit durchschnittlich ca. 252 mg/dl (42 mmol/l) verglichen mit den ca. 426 mg/dl (71 mmol/l), welche in der PBS-Gruppe gemessen wurden (**Abbildung 10B**). Somit waren die Retentionswerte nach Fer-1-Applikation signifikant erniedrigt.



**Abbildung 10 – Eine Behandlung mit Fer-1 schützt gegen die Entwicklung einer Crush-Niere** Beim (A) Serumkreatinin zeigte sich ein höchst signifikanter (\*\*\*,  $p < 0.001$ ) und beim (B) Harnstoff ein hochsignifikanter (\*\*,  $p < 0.01$ ) Unterschied zwischen PBS- und Fer-1-Gruppe, welcher auf eine Nephroprotektion durch Fer-1 hinweist.

### 3.4 Verringerung der tubulären Schädigung durch Fer-1 Applikation

Zusätzlich zu der laborchemischen Auswertung wurde eine histologische Auswertung des Kortex und der Medulla mittels PAS-gefärbter und nach Morphologie bewerteter Nierenschnitte durchgeführt.

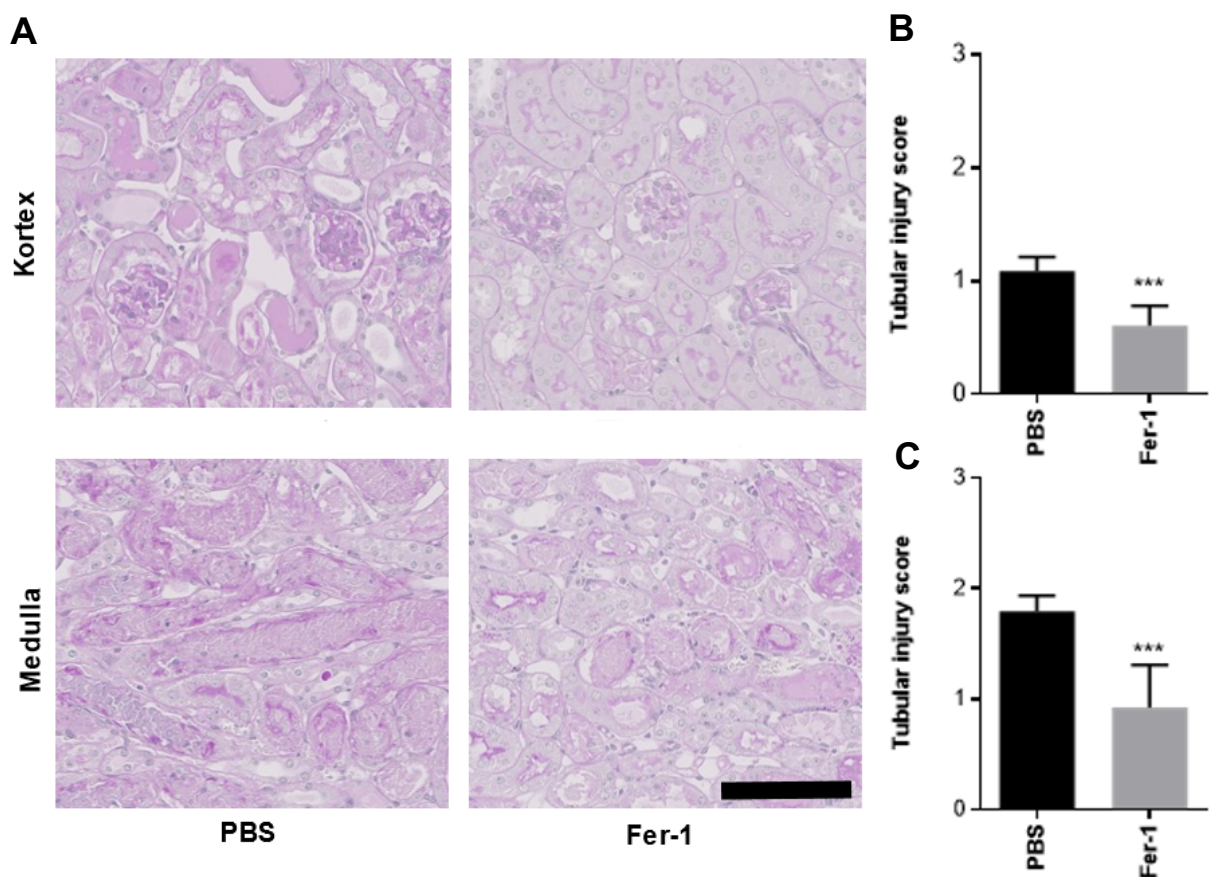
Schädigungen des Kortex und der Medulla waren sowohl in der PBS-Gruppe als auch in der Fer-1-Gruppe nachzuweisen (**Abbildung 11A**).

Die Schädigungen beinhalten den Strukturverlust des Bürstensaumes, die deutliche Dilatation der Lumina der Nierentubuli, Zylinderbildung sowie Glycerolablagerungen. Im direkten Vergleich ließen sich diese Schädigungen bei den mittels Fer-1 behandelten Gruppen deutlich weniger stark ausgeprägt feststellen. Die medulläre und kortikale Struktur blieb hier weitestgehend erhalten, die Nierentubuli wiesen deutlich schlankere Lumina auf und es ließ sich eine deutlich höhere Anzahl erhaltener Zellkerne nachweisen. Zusätzlich konnten in den proximalen Tubuli der PBS-Gruppe eine große Anzahl PAS-positiver Droplets im Zytosol dargestellt werden.

Zur Quantifizierung wurde, gemäß den morphologischen Veränderungen, ein kortikaler (**Abbildung 11B**) und medullärer (**Abbildung 11C**) *tubular injury score* (TIS) für die Tiere aus der Fer-1-Gruppe und der PBS-Gruppe erstellt.

Kortikal wies die Fer-1-Gruppe einen TIS von ca. 0.606 auf und war somit im Vergleich mit der PBS-Gruppe mit einem TIS von ca. 1.086 höchst signifikant ( $p < 0.0001$ ) verbessert.

Medullär ergab sich ebenfalls ein höchst signifikanter ( $p < 0.0001$ ) Unterschied zwischen Fer-1-behandelten Tieren mit einem TIS von ca. 0.923 und der PBS-Gruppe mit einem TIS von ca. 1.795. Somit kann von einem protektiven Effekt des Fer-1 in Bezug auf die kortikalen und medullären Nierentubuli ausgegangen werden.



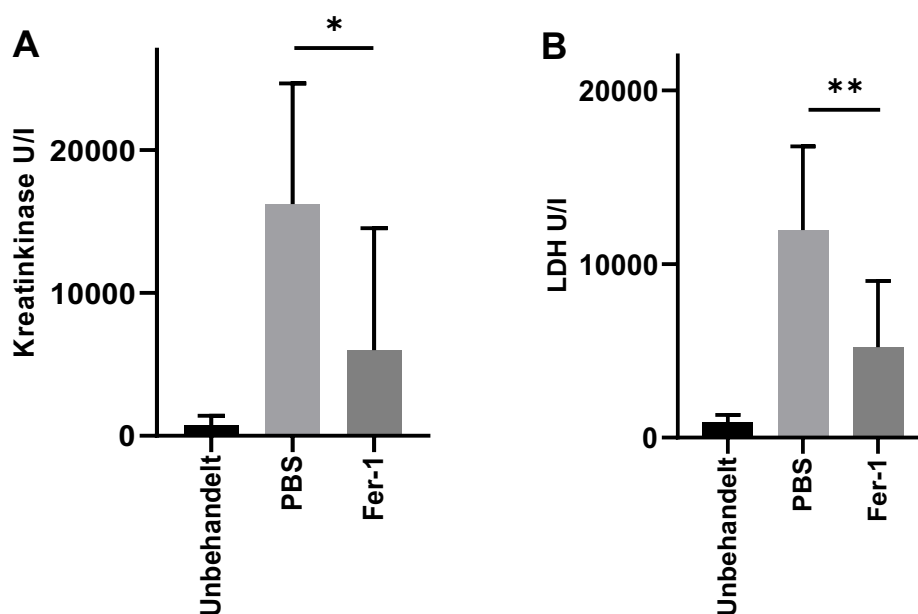
**Abbildung 11 – Fer-1 schützt vor histopathologischen Veränderungen bei Crush-Niere** Nach PAS-Färbung (**A**) wurde der *tubular injury score* (TIS) für Medulla und Kortex erhoben. In der PBS-Gruppe zeigten sich verstärkte morphologische Veränderungen, wie Bürstensaumverlust, Dilatation der Lumina, Zellkernverlust und Glycerolablagerungen. Auch der TIS war kortikal (**B**) und medullär (**C**) bei der Fer-1-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe höchst signifikant (\*\*\*,  $p < 0.001$ ) erniedrigt. Balken: 100  $\mu\text{m}$ .



### 3.5 Erniedrigte Werte für CK und LDH nach Fer-1 Applikation

Nach Fer-1 Applikation konnte eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Reduktion der Kreatinkinase-Werte im Serum gemessen werden (**Abbildung 12A**). Diese betrug durchschnittlich ca. 16209 U/I in der PBS-Gruppe und ca. 6001 U/I in der Fer-1 Gruppe. Hochsignifikant ( $p < 0.01$ ) erniedrigt waren zudem die LDH-Aktivität im Serum der Fer-1-Gruppe, welche ca. 5214 U/I im Vergleich zu den ca. 11961 U/I der PBS-Gruppe betrug (**Abbildung 12B**).

Insgesamt deutet dies auf einen Schutz vor Rhabdomyolyse durch Fer-1 hin.



**Abbildung 12 – Fer-1 reduziert die Muskelschädigung bei Rhabdomyolyse** Trotz deutlich erhöhter Werte im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe unterschieden sich die Werte der Fer-1- und PBS-Gruppe. Sowohl die (A) Kreatinkinase als Kriterium für eine verminderte Zerstörung der Muskulatur im Rahmen des Crush-Syndroms (\*,  $p < 0.05$ ) als auch (B) die LDH-Aktivität als Indikator für die allgemeine Zellschädigung (\*\*,  $p < 0.01$ ) waren in der Fer-1-Gruppe im Vergleich zu PBS-Gruppe signifikant erniedrigt.

## 4 Diskussion

An erster Stelle dieser Diskussion steht die Bewertung des neu entwickelten Mausmodells zur kontrollierten Auslösung der Crush-Niere als Folge der Rhabdomyolyse. Die Wirkung des Fer-1 und dessen nephroprotektive Wirkung in diesem Modell bilden den zweiten Schwerpunkt dieses Abschnitts.

Abschließend werden die therapeutischen Möglichkeiten beleuchtet, die sich hierbei eröffnen, aber auch potenzielle Fehlerquellen beleuchtet und Verbesserungsvorschläge gemacht.

### 4.1 Etablierung des Mausmodells zur verlässlichen Auslösung der Crush-Niere

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war neben der Erforschung des Wirkstoffes Fer-1 die Entwicklung eines leicht reproduzierbaren Verfahrens zur verlässlichen Auslösung des myorenalen Syndroms als Grundlage für weitere translationale Forschung. Übertragbarkeit und Vergleichbarkeit der erhobenen Daten hängen maßgeblich von einem standardisierten Modell ab. Hierfür wurde das präexistente Modell der Rhabdomyolyse aus dem Jahr 2013 von Fähling und Kollegen (Fähling et al., 2013) leicht modifiziert. Der Wasserentzug betrug anstatt 24 nur 12 Stunden und wurde direkt nach der Glycerolinjektion ausgesetzt. Zusätzlich wurden anstatt des 72 Stunden vorher verabreichten Doxycyclins, Fer-1/PBS 15 Minuten nach Glycerolinjektion i.p. appliziert. Die erforderliche bilaterale intramuskuläre Glycerolinjektion in den M. quadriceps femoris der Versuchstiere ist unkompliziert durchzuführen, benötigt nur eine begrenzte Menge an zusätzlichen Materialien und ist daher sinnvoll skalierbar. Gleiches ist auch auf die intraperitoneale Applikation eines Ferrostatins übertragbar.

Die erfolgreiche Induktion des Muskelzerfalles konnten die massiv erhöhten Serumparameter Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase nachweisen und die effektive Tubulusschädigung wurde durch Erhöhung der Retentionsparameter und die Histopathologie bestätigt.

### 4.2 Wirkung des Ferrostatin-1

#### 4.2.1 Nephroprotektion durch Fer-1

Zur korrekten Auswertung des Ausmaßes des verursachten renalen Schadens wurden die Serumwerte der Kontrollgruppe als Normwerte herangezogen und diese mit der aktuellen Studienlage verglichen, um deren Validität zu sichern. Exemplarisch dienten hier die Studien von Fähling und Kollegen (Fähling et al., 2013), Linkermann und Kollegen (Linkermann et al., 2012) und Martin-Sanchez und Kollegen (Martin-Sanchez et al., 2017), sowie deren

Normwerte für Serumkreatinin und Serumharnstoff der unbehandelten Tiere. Die hierbei festgestellte Deckungsgleichheit bildete die Grundlage zur weiteren Bewertung unserer Ergebnisse.

Die signifikant weniger ausgelenkten Retentionsparameter und Tubulusschädigungen der mittels Fer-1 behandelten Mäuse weisen auf eine zentrale Rolle der Ferroptose im Rahmen der Crush-Niere hin, die bereits im Rahmen der IRI etabliert wurde (Linkermann et al., 2014; Tonnus et al., 2021). Weitere grundlagenwissenschaftliche Forschung ist jedoch notwendig, um den Ablauf und die Regulation der Ferroptose *in vitro* und *in vivo* weiter zu charakterisieren.

Die Beteiligung der Ferroptose schließt jedoch andere RCD-Wege nicht aus. Unter anderem wurde in Studien zum Folsäure-induzierten akuten Nierenversagen die wichtige Rolle der Ferroptose und Nekroptose demonstriert, welche unabhängig voneinander und parallel ablaufen (Martin-Sanchez et al., 2018). Zusätzlich wurde ebenfalls bei der Untersuchung der Oxalat-Nephropathie und des hierdurch ausgelösten akuten Nierenversagens eine Beteiligung der Nekroptose sowie der Ferroptose beschrieben (Belavgeni et al., 2020). Ebenfalls im Modell der IRI wurde die Nekroptose mehrfach als wichtiger beteiligter Mechanismus charakterisiert (Lau et al., 2013; Linkermann et al., 2013 a, b; Garg and Vucic, 2016). Insbesondere vor dem Hintergrund, dass Fer-1 nur eine partielle Protektion bot, ist die Untersuchung anderer Wege des regulierten Zelltodes in der Pathophysiologie des myorenalen Syndroms sinnvoll. Aktuell existiert keine genetisch veränderte Maus, welche resistent gegen die Ferroptose wäre, so dass die pharmakologische Evidenz noch nicht genetisch bestätigt werden kann.

Zusammengefasst lässt sich mittels der laborchemischen und histologischen Auswertung die Schlüsselrolle der Ferroptose im Rahmen des myorenalen Syndroms durch die nephroprotektive Wirkung des Fer-1 partiell nachweisen, so dass unser Modell die bisherigen Studienergebnisse untermauert.

#### 4.2.2 Myoprotektive Wirkung des Ferrostatin-1

Es wurde eine signifikante Verringerung der CK- und LDH-Werte im Serum der Fer-1-Gruppe festgestellt. Zu erklären wäre dies einerseits durch einen reduzierten Zerfall der Muskulatur und dementsprechend weniger freigesetztes Myoglobin und andererseits durch die besser erhaltene Ausscheidungsleistung der Niere der Fer-1-Gruppe und eine damit verbundene höhere Kreatinkinase- und LDH-Elimination. Der Zusammenhang zwischen Muskelschäden und Ferroptose wurde in einer Studie aus dem Jahr 2018 von Baba und Kollegen (Baba et al., 2018) besonders in Bezug auf das Überleben der Herzmuskulatur nach Myokardinfarkt

hergestellt. In einer weiteren Studie zur Wirkung von Fer-1 und Nec-1 in Herzmuskelzellen nach Auslösen einer IRI durch Koronarligatur zeigte sich, dass sowohl Fer-1 als auch Nec-1f zu einer deutlich reduzierten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten als auch zu einer Reduktion der Infarzierung mit subsequent erhaltener linksventrikulärer Funktion führten (Li et al., 2019). Eine antiferroptotische Wirkung des Nec-1 wurde bereits in mehreren Studien vorbeschrieben und ist an den Thiohydantoinrest des Nec-1 gekoppelt (Friedmann Angeli et al., 2014b; Tonnus et al., 2021; Von Mässenhausen et al., 2018).

Diese Studien beschreiben somit eine wichtige Rolle der Ferroptose im regulierten Zelltod der Kardiomyozyten. Da die Überlebenswahrscheinlichkeit der Herzmuskelzellen durch die Gabe des Fer-1 signifikant gesteigert wird, liegt auch die Vermutung nahe, dass die quergestreifte Muskulatur des M. quadriceps femoris davon profitieren könnte. Diese Hypothese stützt zusätzlich eine Studie, welche die Beteiligung der Ferroptose im IRI des M. cremaster bestätigte (Linkermann et al., 2014). Somit könnten Ferrostatine durchaus eine Möglichkeit sein, den Untergang von Muskelzellen durch Ferroptose zu verhindern oder wenigstens zu mildern. Anders als die Kreatinkinase weisen die erniedrigten LDH-Werte der Fer-1-Gruppe auf einen allgemein gehemmten Zelluntergang hin und könnten auch aufgrund der nephroprotektiven Wirkung des Fer-1 entstanden sein.

Schlussendlich sind die genauen Mechanismen jedoch noch nicht eingehend erforscht worden, so dass hier eine abschließende Beurteilung nicht möglich ist.

### 4.3 Therapeutische Perspektiven

Die translationale Relevanz der hier vorgelegten Arbeit beruht auf der Tatsache, dass die Behandlung der Crush-Niere bisher nur supportiv möglich ist und die Mortalität sich weiterhin bei ca. 20 % befindet (Michaelson, 1992; Sever *et al.*, 2006; Jagodzinski *et al.*, 2010).

Doch die Ferroptose beschränkt sich nicht nur auf die Mechanismen des Crush-Syndroms sondern ist, wie weiter oben beschrieben, essentieller Teil unterschiedlichster organischen Krankheiten.

#### 4.3.1 Therapeutische Möglichkeiten der Crush-Niere

Durch den Nachweis einer Beteiligung der Ferroptose im Rahmen der Crush-Niere werden neue kausale therapeutische Ansätze durch die Verabreichung von Ferrostatinen denkbar. Doch die Weiterentwicklung dieser *small molecules* wird durch das fehlende Wissen um ihren exakten Wirkmechanismus erschwert. Da die Ferroptose selbst nur teilweise in ihrem Ablauf

verstanden ist, gestaltet sich die Herstellung eines spezifischen Inhibitors als schwierig. Eine andere therapeutische Möglichkeit könnte die kombinierte Hemmung der Ferroptose und Nekroptose bieten. Dies wurde im Rahmen der IRI erforscht und hat bereits mit Nec-1f einen kombinierten Inhibitor hervorgebracht (Linkermann et al., 2014; Tonnus et al., 2021). Dies könnte nicht nur das akute Nierenversagen behandeln, sondern auch den Übergang in eine chronische Niereninsuffizienz verhindern.

#### 4.3.2 Perspektiven im Rahmen der Organtransplantation

Ein weitere Einsatzmöglichkeit der Ferrostatine birgt die Verabreichung im Zuge einer Organtransplantation. Insbesondere im Rahmen der Nieren- und Herztransplantation wurde die Ferroptose als wichtiger Mitwirkender identifiziert (Li et al., 2019; Sarhan et al., 2018; Schumann-Bischoff et al., 2018). Nach dem aktuellen Forschungsstand ist jedoch ebenfalls die Nekroptose an dem Zelltod nach Organtransplantation beteiligt und somit ein dualer Inhibitor möglicherweise noch effektiver.

#### 4.4 Potenzielle Fehlerquellen und Lösungsvorschläge

In der Etablierung des Rhabdomyolyse-Modells wurde in dieser Arbeit strikt darauf geachtet, mögliche Fehlerquellen zu minimieren. Entsprechend wurden nur Tiere verwendet, welche exakt auf genetischen Hintergrund, Geschlecht, Alter und Gewicht gematcht waren. Somit ist nicht von relevanten Unterschieden in der Muskelmasse oder der Nierenfunktion auszugehen. Schwieriger zu kontrollieren ist die identische Induktion der Rhabdomyolyse, da hier bereits geringe anatomische Abweichungen deutliche Effekte zeigen können. Dem wurde durch hohe verwendete Glycerolvolumina und eine strikte Kontrolle der intramuskulären Nadellage entgegengewirkt.

Mögliche Unterschiede im Trinkverhalten könnten die funktionellen Parameter (Kreatinin, Harnstoff) über eine prärenale Komponente beeinflusst haben. Durch das 12-stündige Intervall des Wasserentzugs nach Induktion wurde versucht, dem entgegenzuwirken, um einen möglichst identischen Hydrierungsstatus zu erhalten.

##### 4.4.1 Ferrostatin-1 als Fehlerquelle

Die antiferroptotische Wirkung des Ferrostatin-1 wird seiner Funktion als unselektives radikalfangendes Antioxidans (RTA) zugeschrieben (Conrad & Pratt, 2019). Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur die Lipoperoxyradikale unschädlich gemacht werden, sondern Fer-1 auch die Propagation der Lipidperoxidation terminiert.

Andere Ferrostatine oder Inhibitoren anderer Zelltodwege wurden im Rahmen dieser Dissertation nicht getestet und somit konnte die Wirkung des Fer-1 nicht mit weiteren direkten Inhibitoren wie Phenoxazin, Liproxstatin-1, SRS9-11, SRS11-92 oder SRS16-86 verglichen werden. Indirekte Inhibitoren, wie Deferoxamin wurden ebenfalls nicht untersucht. Daher ist das Ausmaß der protektiven Wirkung des Ferrostatin-1 im myorenalen Syndrom in Relation zu den anderen Inhibitoren nicht bekannt. Die Ferroptose als Schlüsselmechanismus im Modell der Crush-Niere könnte durch das Erlangen eines vergleichbaren Effektes unter Einsatz verschiedener direkter/indirekter Inhibitoren bestätigt werden.

Zusätzlich weist Ferrostatin-1 aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung (siehe **Abbildung 6**) eine Ester-Funktionsgruppe auf, die durch Hydrolyse rasch zu einer Karbonsäure abgebaut wird und somit dessen Halbwertszeit und Wirksamkeit reduziert.

Mittels Mikrosomen wurde *in vitro* dessen HWZ bei Mäusen und Menschen errechnet (Hofmans et al., 2016), welche bei Mäusen durchschnittlich ca. 2 und bei Menschen ca. 7 Minuten betrug. Zudem stellte man einen vollkommenen Abbau des Fer-1 im Mäuseplasma nach nur 6 Stunden fest, eine Tatsache, die die Aussagekraft der im Mausmodell getätigten Studien zur Fer-1 Wirksamkeit deutlich mindern würde. Jedoch ist zu beachten, dass Fer-1 als *small molecule* primär renal eliminiert wird und entsprechend bei Nierenversagen akkumulieren kann. Die bekannte kurze Halbwertszeit von Fer-1 im Plasma könnte somit bei einem akuten Nierenversagen deutlich verlängert sein.

Dennoch liegt es nahe, neue Fer-1-Analoga zu entwickeln, welche eine höhere Wirksamkeit und Stabilität aufweisen. Eine Möglichkeit wäre der Ersatz der Ester-Gruppe durch andere funktionelle Gruppen, doch von den bisher zahlreichen hergestellten Fer-1-Analoga gehören nur das SRS9-11, SRS11-92 und SRS16-86 (siehe **Abbildung 6**) zu den wenigen mit einer antiferroptotischen Wirkung. Das SRS9-11 besitzt zwar eine deutlich längere HWZ, ist jedoch mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC 50) von 950 nM deutlich weniger wirksam als Fer-1 (Dixon et al., 2012). Darüber hinaus müssten die neu synthetisierten Ferrostatine sehr lipophile Eigenschaften besitzen, um ggf. an der Zellmembran der betroffenen Tubuluszellen effektiv wirken zu können.

#### 4.4.2 Ferroptose als Fehlerquelle

In Bezug auf das myorenale Syndrom wurden abgesehen von der Ferroptose keine weiteren regulierten Zelltodwege ausgeschlossen und somit ist die Beteiligung der Nekroptose und Pyroptose weiterhin möglich. Hierbei wären u. a. Interaktionen zwischen der Ferroptose und anderen Zelltodwegen möglich, obwohl diese bislang nicht bekannt sind.

U. a. befasste sich eine kürzlich veröffentlichte Publikation mit der Rolle der Nekroptose im Rahmen des akuten Nierenversagens und beschrieb diese als Initiator für einen ferroptotisch vermittelte Tubulusschädigung (Belavgeni et al., 2020). Weitere Mausmodelle mit Testung spezifischer Nekrostatine wie Nec-1s könnten die Auswirkungen der Nekroptose in Bezug auf das myorenale Syndrom weiter untersuchen. Ein Problem bleibt weiterhin der passive Charakter der Ferroptose, so dass bislang kein genetisches Mausmodell mit Protektion gegen Ferroptose zur Verfügung steht, sondern lediglich solche, die sensitiver für die Induktion von Ferroptose sind (Doll et al., 2019; Ingold et al., 2018). In Anbetracht der unspezifischen Wirkweise der RTAs wäre dies ein großer Fortschritt, da auch weiterhin keine spezifischen Marker für die Ferroptose *in vivo* zur Verfügung stehen (Feng et al., 2020).

#### 4.5 Fazit

Mit der erfolgreichen Etablierung des Modells der Crush-Niere und der Demonstration einer signifikanten Nephroprotektion durch das Ferrostatin-1 wurden beide Ziele dieser Studie, den möglichen Fallstricken und Fehlerquellen zum Trotz, erreicht. Die Ferroptose wurde hier als pathophysiologisch relevanter Mechanismus etabliert. Somit eröffnen sich zukünftige kausale therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung eines letalen und bisher nur supportiv therapierbaren Krankheitsbildes.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Fragestellung

Das akute Nierenversagen nach Rhabdomyolyse ist trotz der Fortschritte in der Medizin eine Krankheit, die bisher nur unzureichend behandelt werden kann. Flüssigkeitsgabe und ggf. Hämodialyse sind bislang die einzigen Methoden, um die Überlebenschancen des Patienten zu steigern. Es ist daher wenig verwunderlich, dass die Mortalität bis zu 20% beträgt. An den bisher unbefriedigenden therapeutischen Möglichkeiten setzt diese Dissertation an und versucht, neue Perspektiven zu schaffen.

Daher liegen die Ziele dieser Dissertation in der Etablierung eines neuen translationalen Modells *in vivo* zur möglichst kontrollierten Auslösung der Crush-Niere, aber ebenfalls in der Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen und in der Bewertung der therapeutischen Wirksamkeit des Ferrostatin-1. Bei letzterem liegen die Hoffnungen in der Blockade des kürzlich entdeckten Mechanismus der Ferroptose, dessen Relevanz bereits bei anderen Entitäten der akuten Nierenschädigung etabliert wurde.

### 5.2 Material und Methoden

Zur Etablierung des Modells der Crush-Niere wurde *wildtype* Mäusen nach einer 12-stündigen Wasserdeprivation intramuskulär eine 50 % v/v Glycerollösung injiziert und somit eine Rhabdomyolyse ausgelöst. Doppelblind wurde 15 Minuten nach Glycerolapplikation den Versuchstieren das etablierte Ferrostatin-1 oder alternativ PBS intraperitoneal verabreicht. Nach einer 24stündigen Beobachtung wurde die Blutabnahme durchgeführt und die Nierenfunktion mittels Nierenretentionsparameter Kreatinin und Harnstoff im Serum untersucht. Zusätzlich wurden auch die Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase bestimmt. Darüber hinaus wurden histopathologisch die akuten Nierentubulusschäden erfasst und quantifiziert. Die entnommenen

### 5.3 Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die funktionellen Parameter der Nierenfunktion, Kreatinin und Harnstoff, in Fer-1-behandelten Tieren hochsignifikant weniger stark angestiegen waren als in mit Lösungsmittel-Kontrollen behandelten Tieren. Zusätzlich zeigte sich in der Histologie der Nieren ein höchstsignifikant reduzierter tubulärer Schaden. Somit konnte die Beteiligung der Ferroptose am myorenenalen Syndrom, sowie die protektive Wirkung des Fer-1 zumindest partiell bestätigt werden.



Überdies konnte anhand der erfassten Serumwerte für Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase bestätigt werden, dass die Etablierung des Modells des myorenenalen Syndroms erfolgreich war und somit ein einfach reproduzierbares Modell geschaffen wurde.

#### 5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit somit ein klinisch relevantes Modell der Crush-Niere nach Rhabdomyolyse etabliert und eine Beteiligung der Ferroptose demonstriert. Mit diesen Ergebnissen bietet sich erstmals die Möglichkeit, das akute Nierenversagen bei Rhabdomyolyse kausal statt nur supportiv zu behandeln. Zukünftige Arbeiten mit höherpotenten und pharmakodynamisch weiterentwickelten Ferrostatinen haben somit das Potential, die Ergebnisse dieser Arbeit aus dem Labor ans Patientenbett zu bringen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., & Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell*, *9*(2), 423–432. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00442-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00442-2)
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, *281*(5381), 1305–1308. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Baba, Y., Higa, J. K., Shimada, B. K., Horiuchi, K. M., Suhara, T., Kobayashi, M., ... Matsui, T. (2018). Protective effects of the mechanistic target of rapamycin against excess iron and ferroptosis in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *314*(3), H659–H668. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00452.2017>
- Bannai, S., Tsukeda, H., & Okumura, H. (1977). Effect of antioxidants on cultured human diploid fibroblasts exposed to cystine-free medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *74*(4), 1582–1588. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90623-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90623-4)
- Belavgeni, A., Meyer, C., Stumpf, J., Hugo, C., & Linkermann, A. (2020). Ferroptosis and Necroptosis in the Kidney. *Cell Chemical Biology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.03.016>
- Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., ... Olzmann, J. A. (2019). The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, *575*(7784), 688–692. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1705-2>
- Better, O. S., & Abassi, Z. A. (2011). Early fluid resuscitation in patients with rhabdomyolysis. *Nature Reviews Nephrology*, *7*(7), 416–422. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.56>
- Bosch, X., Poch, E., & Grau, J. M. (2009). Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury. *New England Journal of Medicine*, *361*(1), 62–72. <https://doi.org/10.1056/nejmra0801327>
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., & Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(42), 26159–26165. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26159>

- Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 1(1), 5–15. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900003>
- Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K. M. (2009). Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*, 137(6), 1112–1123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037>
- Conrad, M., & Pratt, D. A. (2019). The chemical basis of ferroptosis. *Nature Chemical Biology*, 15(12), 1137–1147. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0408-1>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch’en, I. L., Korkina, O., Teng, X., ... Yuan, J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 313–321. <https://doi.org/10.1038/nchembio.83>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Dixon, S. J., Patel, D., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E., Hayano, M., ... Stockwell, B. R. (2014). Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *ELife*, 2014(3), e02523. <https://doi.org/10.7554/eLife.02523>
- Dixon, S. J., Winter, G. E., Musavi, L. S., Lee, E. D., Snijder, B., Rebsamen, M., ... Stockwell, B. R. (2015). Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chemical Biology*, 10(7), 1604–1609. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00245>
- Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., ... Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology*, 13(1), 91–98. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2239>
- Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., ... Conrad, M. (2019). FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, 575(7784), 693–698. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1707-0>
- Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C., & Stockwell, B. R. (2003). Identification of genotype-

- selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*, 3(3), 285–296. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00050-3)
- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122(3168), 501–504. <https://doi.org/10.1126/science.122.3168.501>
- Eagle, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130(3373), 432–437. <https://doi.org/10.1126/science.130.3373.432>
- Eaton, J. K., Furst, L., Ruberto, R. A., Moosmayer, D., Hilpmann, A., Ryan, M. J., ... Schreiber, S. L. (2020). Selective covalent targeting of GPX4 using masked nitrile-oxide electrophiles. *Nature Chemical Biology*, 16(5), 497–506. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0501-5>
- Fähling, M., Mathia, S., Paliege, A., Koesters, R., Mrowka, R., Peters, H., ... Rosenberger, C. (2013). Tubular von hippel-lindau knockout protects against rhabdomyolysis-induced AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(11), 1806–1819. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013030281>
- Feng, H., Schorpp, K., Jin, J., Yozwiak, C. E., Hoffstrom, B. G., Decker, A. M., ... Stockwell, B. R. (2020). Transferrin Receptor Is a Specific Ferroptosis Marker. *Cell Reports*, 30(10), 3411-3423.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.049>
- Friedmann Angeli, J. P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Hammond, V. J., ... Conrad, M. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature Cell Biology*, 16(12), 1180–1191. <https://doi.org/10.1038/ncb3064>
- Garg, J. P., & Vucic, D. (2016). Targeting Cell Death Pathways for Therapeutic Intervention in Kidney Diseases. *Seminars in Nephrology*. *Semin Nephrol.* <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.03.003>
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s004410000193>
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., ... Mak, T. W. (1998). Differential requirement for Caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 94(3), 339–352. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81477-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81477-4)
- Hayano, M., Yang, W. S., Corn, C. K., Pagano, N. C., & Stockwell, B. R. (2016). Loss of

- cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) induces the transsulfuration pathway and inhibits ferroptosis induced by cystine deprivation. *Cell Death and Differentiation*, 23(2), 270–278. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.93>
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., & Wang, X. (2009). Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- $\alpha$ . *Cell*, 137(6), 1100–1111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021>
- Herold, G. (2007). Innere Medizin. In *Aromatherapie* (pp. 131–155). Vienna: Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-49345-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-211-49345-8_20)
- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., & Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO Journal*, 23(10), 2134–2145. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600210>
- Hofmans, S., Berghe, T. Vanden, Devisscher, L., Hassannia, B., Lyssens, S., Joossens, J., ... Augustyns, K. (2016). Novel Ferroptosis Inhibitors with Improved Potency and ADME Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(5), 2041–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01641>
- Ingold, I., Berndt, C., Schmitt, S., Doll, S., Poschmann, G., Buday, K., ... Conrad, M. (2018). Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell*, 172(3), 409–422.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.048>
- Jagodzinski, N. a., Weerasinghe, C., & Porter, K. (2010). Crush injuries and crush syndrome — a review. Part 1: The systemic injury. *Trauma*. <https://doi.org/10.1177/1460408610372440>
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y. J., ... Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549–554. <https://doi.org/10.1038/35069004>
- Ke, F. F. S., Vanyai, H. K., Cowan, A. D., Delbridge, A. R. D., Whitehead, L., Grabow, S., ... Strasser, A. (2018). Embryogenesis and Adult Life in the Absence of Intrinsic Apoptosis Effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell*, 173(5), 1217–1230.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.036>
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., & Kobayashi, Y. (2003). Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4672–4679. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4672>

- Land, W. G., Agostinis, P., Gasser, S., Garg, A. D., & Linkermann, A. (2016). Transplantation and Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs). *American Journal of Transplantation*, *16*(12), 3338–3361. <https://doi.org/10.1111/ajt.13963>
- Lau, A., Wang, S., Jiang, J., Haig, A., Pavlosky, A., Linkermann, A., ... Jevnikar, A. M. (2013). RIPK3-mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival. *American Journal of Transplantation*, *13*(11), 2805–2818. <https://doi.org/10.1111/ajt.12447>
- Li, W., Feng, G., Gauthier, J. M., Lokshina, I., Higashikubo, R., Evans, S., ... Kreisel, D. (2019). Ferroptotic cell death and TLR4/Trif signaling initiate neutrophil recruitment after heart transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(6), 2293–2304. <https://doi.org/10.1172/JCI126428>
- Lin, J., Li, H., Yang, M., Ren, J., Huang, Z., Han, F., ... Han, J. (2013). A Role of RIP3-Mediated Macrophage Necrosis in Atherosclerosis Development. *Cell Reports*, *3*(1), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.012>
- Linkermann, A., Bräsen, J. H., Darding, M., Jin, M. K., Sanz, A. B., Heller, J. O., ... Krautwald, S. (2013). Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(29), 12024–12029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305538110>
- Linkermann, A., Bräsen, J. H., Himmerkus, N., Liu, S., Huber, T. B., Kunzendorf, U., & Krautwald, S. (2012). Rip1 (Receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney International*, *81*(8), 751–761. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.450>
- Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *New England Journal of Medicine*, *370*(5), 455–465. <https://doi.org/10.1056/nejmra1310050>
- Linkermann, A., Hackl, M. J., Kunzendorf, U., Walczak, H., Krautwald, S., & Jevnikar, A. M. (2013). Necroptosis in immunity and ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Transplantation*. *Am J Transplant*. <https://doi.org/10.1111/ajt.12448>
- Linkermann, A., Skouta, R., Himmerkus, N., Mulay, S. R., Dewitz, C., De Zen, F., ... Krautwald, S. (2014). Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), 16836–16841. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415518111>

- Martin-Sanchez, D., Ruiz-Andres, O., Poveda, J., Carrasco, S., Cannata-Ortiz, P., Sanchez-Niño, M. D., ... Sanz, A. B. (2017). Ferroptosis, but not necroptosis, is important in nephrotoxic folic acid-induced AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(1), 218–229. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015121376>
- Martin-Sanchez, D., Fontecha-Barriuso, M., Carrasco, S., Sanchez-Niño, M. D., Von Mässenhausen, A., Linkermann, A., ... Sanz, A. B. (2018). TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(16), 4182–4187. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716578115>
- McArthur, K., Whitehead, L. W., Heddleston, J. M., Li, L., Padman, B. S., Oorschot, V., ... Kille, B. T. (2018). BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science*, 359(6378). <https://doi.org/10.1126/science.aao6047>
- Michaelson, M. (1992). Crush injury and crush syndrome. *World Journal of Surgery*, 16(5), 899–903. <https://doi.org/10.1007/BF02066989>
- Piper, W. (2007). *Innere Medizin*. Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-49345-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-211-49345-8_20)
- Poon, J. F., & Pratt, D. A. (2018). Recent Insights on Hydrogen Atom Transfer in the Inhibition of Hydrocarbon Autoxidation. *Accounts of Chemical Research*, 51(9), 1996–2005. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00251>
- Riegman, M., Sagie, L., Galed, C., Levin, T., Steinberg, N., Dixon, S. J., ... Overholtzer, M. (2020). Ferroptosis occurs through an osmotic mechanism and propagates independently of cell rupture. *Nature Cell Biology*, 22(9), 1042–1048. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0565-1>
- Ronco, C., Bellomo, R., & Kellum, J. A. (2019). Acute kidney injury. *The Lancet*. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32563-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32563-2)
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., Van Gorp, M., Van Loo, G., & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16 REV. ISS. 2), 2861–2874. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207523>
- Sarhan, M., Land, W. G., Tonnus, W., Hugo, C. P., & Linkermann, A. (2018). Origin and consequences of necroinflammation. *Physiological Reviews*, 98(2), 727–780. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2016>

- Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805), 784–788. <https://doi.org/10.1038/35037722>
- Schumann-Bischoff, A., Schmitz, J., Scheffner, I., Schmitt, R., Broecker, V., Haller, H., ... Gwinner, W. (2018). Distinct morphological features of acute tubular injury in renal allografts correlate with clinical outcome. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 315(3), F701–F710. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00189.2017>
- Sever, M. S., Vanholder, R., & Lameire, N. (2006). Management of Crush-Related Injuries after Disasters. *New England Journal of Medicine*, 354(10), 1052–1063. <https://doi.org/10.1056/nejmra054329>
- Shimada, K., Skouta, R., Kaplan, A., Yang, W. S., Hayano, M., Dixon, S. J., ... Stockwell, B. R. (2016). Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis. *Nature Chemical Biology*, 12(7), 497–503. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2079>
- Skouta, R., Dixon, S. J., Wang, J., Dunn, D. E., Orman, M., Shimada, K., ... Stockwell, B. R. (2014). Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *Journal of the American Chemical Society*, 136(12), 4551–4556. <https://doi.org/10.1021/ja411006a>
- Smith, C. C. T., Davidson, S. M., Lim, S. Y., Simpkin, J. C., Hothersall, J. S., & Yellon, D. M. (2007). Necrostatin: A potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 21(4), 227–233. <https://doi.org/10.1007/s10557-007-6035-1>
- Sprooten, J., De Wijngaert, P., Vanmeerbeerk, I., Martin, S., Vangheluwe, P., Schlenner, S., ... Garg, A. D. (2020). Necroptosis in Immuno-Oncology and Cancer Immunotherapy. *Cells*, 9(8): 1823 <https://doi.org/10.3390/cells9081823>
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., ... Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1–2), 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>
- Thomas, M. E., Blaine, C., Dawnay, A., Devonald, M. A. J., Ftouh, S., Laing, C., ... Ostermann, M. (2015). The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.328>
- Tonnus, W., & Linkermann, A. (2016). “Death is my Heir” - Ferroptosis Connects Cancer Pharmacogenomics and Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Chemical Biology*, 23(2), 202–



203. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.02.005>

Tonnus, W., & Linkermann, A. (2017). The in vivo evidence for regulated necrosis. *Immunological Reviews*, 277(1), 128–149. <https://doi.org/10.1111/imr.12551>

Tonnus, W., Gembardt, F., Latk, M., Parmentier, S., Hugo, C., Bornstein, S. R., & Linkermann, A. (2019 a). The clinical relevance of necroinflammation—highlighting the importance of acute kidney injury and the adrenal glands. *Cell Death and Differentiation*, 26(1), 68–82. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0193-5>

Tonnus, W., Meyer, C., Paliege, A., Belavgeni, A., von Mässenhausen, A., Bornstein, S. R., ... Linkermann, A. (2019 b). The pathological features of regulated necrosis. *Journal of Pathology*, 247(5), 697–707. <https://doi.org/10.1002/path.5248>

Tonnus, W., Meyer, C., Steinebach, C., Belavgeni, A., von Mässenhausen, A., Gonzalez, N. Z., ... Linkermann, A. (2021). Dysfunction of the key ferroptosis-surveilling systems hypersensitizes mice to tubular necrosis during acute kidney injury. *Nature Communications*, 12(1), 4402. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24712-6>

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 700–714. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>

Von Mässenhausen, A., Tonnus, W., Himmerkus, N., Parmentier, S., Saleh, D., Rodriguez, D., ... Linkermann, A. (2018). Phenytoin inhibits necroptosis. *Cell Death and Disease*, 9(3). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0394-3>

Waage, P., Kreuter, P., & Blome, B. (2020). *Jahresbericht DSO 2020*. Frankfurt am Main.

Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2008). Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chemistry and Biology*, 15(3), 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.02.010>

Yang, W. S., Sriramaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., ... Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 156(1–2), 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010>

Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), E4966–E4975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113>

Yant, L. J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J. G., ... Prolla, T. A. (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(4), 496–502. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01360-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01360-6)

Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>

Yuan, J., Najafov, A., & Py, B. F. (2016). Roles of Caspases in Necrotic Cell Death. *Cell*, 167(7), 1693–1704. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.047>

Zilka, O., Shah, R., Li, B., Friedmann Angeli, J. P., Griesser, M., Conrad, M., & Pratt, D. A. (2017). On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Lipoxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Central Science*, 3(3), 232–243. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00028>

## 7 Abbildungsverzeichnis

Nummer	Seite	Titel
1	1	Organisation der Niere
2	5	Signalwege des regulierten Zelltodes
3	7	Signalwege der Apoptose
4	9	Signalwege der Nekroptose
5	12	Signalwege der Ferroptose
6	14	Strukturformeln der Ferrostatine Fer-1, SRS 16-86 und SRS 11-92.
7	25	Zeitstrahl des Rhabdomyolyse-Protokolls
8	26	Induktion der Rhabdomyolyse
9	27	Induktion der Crush-Niere
10	28	Eine Behandlung mit Fer-1 schützt gegen die Entwicklung einer Crush-Niere
11	29	Fer-1 schützt vor histopathologischen Veränderungen bei Crush-Niere
12	30	Fer-1 reduziert die Muskelschädigung bei Rhabdomyolyse

## 8 Bildnachweise

Nummer	Seite	Quelle
1	1	© AMBOSS GmbH; Nephron; Niere [ <a href="https://www.amboss.com/de/wissen/Niere/">https://www.amboss.com/de/wissen/Niere/</a> ], Kapitel zuletzt aktualisiert am: 14.01.2022.
2	5	Tonnus et al. 2019 a; <i>Cell Death and Differentiation</i> , 26(1), 68–82
3	7	In Anlehnung an D´Arcy 2019 <i>Cell Biology International</i> , 43(6), 582–592.
4	9	Sprooten et al., 2020 ; <i>Cells</i> . 9(8): 1823
5	12	Conrad and Pratt, 2019; <i>Nature Chemical Biology</i> , 15(12), 1137–1147
6	14	©Cayman-Chemical [ <a href="https://www.caymanchem.com/product/17729/ferrostatin-1">https://www.caymanchem.com/product/17729/ferrostatin-1</a> ], zuletzt besucht am: 14.01.2022.
6	14	©Cayman-Chemical [ <a href="https://www.caymanchem.com/product/26752">https://www.caymanchem.com/product/26752</a> ], zuletzt besucht am: 14.01.2022.
6	14	©Cayman-Chemical [ <a href="https://www.caymanchem.com/product/25689/srs11-92">https://www.caymanchem.com/product/25689/srs11-92</a> ], zuletzt besucht am: 14.01.2022.
7	25	n.a.
8	26	n.a.
9	27	n.a.
10	28	n.a.
11	29	n.a.
12	30	n.a.

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Arbeit – abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine akademischen Betreuer – nach Inhalt und Form meine eigene ist, soweit dies nicht explizit anders vermerkt ist. Ich erkläre weiterhin, dass Teile dieser Arbeit zur Publikation eingereicht wurden und dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Hamburg, den 14.01.2022

---

Adrián Zierleyn

## 10 Danksagung

Das Verfassen einer Promotionsarbeit ist eine anspruchsvolle, zeitintensive Aufgabe, welche mir jedoch die besondere Möglichkeit eröffnete, mich intensiv mit einem herausragend interessanten und zukunftssträchtigen Thema zu befassen.

Die Bewältigung dieses Unterfanges gelang mir aber nur dank der tatkräftigen Mithilfe mehrerer Menschen, denen besondere Aufmerksamkeit hier gebührt.

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. rer. nat. Dieter Adam für sein dargebrachtes Vertrauen, Ratschläge und Förderung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Andreas Linkermann für die Einführung in die Welt der Ferroptose, die Überlassung eines solch innovativen und unerforschten Themas, sowie ebenfalls für die jahrelange Unterstützung meiner Arbeit.

Überaus dankbar bin ich auch Dr. med. Wulf Tonnus für seine tatkräftige und unermüdliche Unterstützung, für das fundierte Fachwissen und seine Freundschaft.

Daneben bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Peter Boor und seinem Team aus der Pathologie der Uniklinik Aachen für die gute und angenehme Zusammenarbeit.

Überbordend ist auch die Dankbarkeit gegenüber meinen Eltern Jörg und Margarita Zierleyn welche mir die akademische Laufbahn erst ermöglichten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie meiner Schwester Marie Sophie Zierleyn für die psychologische Unterstützung.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Partnerin Sabrina, welche mich auch in sehr anstrengenden Zeiten immer zu motivieren und unterstützen wusste.

## 11 Appendix

### 11.1 Curriculum Vitae



---

#### **Adrián Zierleyn**

Klinik für Radiologie und Neuroradiologie  
Asklepios Klinik Hamburg Nord Heidberg  
Tangstedter Landstraße 400  
22417 Hamburg, Deutschland  
Dienstnummer: +49-(0) 40 1818879007  
E-Mail: [a.zierleyn@asklepios.com](mailto:a.zierleyn@asklepios.com)

#### **Persönliche Daten:**

Geburtsdatum:	03.04.1992
Geburtsort:	Duisburg
Nationalität:	Deutsch, mexikanisch
Adresse:	Barmbeker Str. 187 22299 Hamburg, Deutschland

### **Karriere:**

10/2018 – aktuell                      Assistenzarzt in Weiterbildung für Radiologie  
  
Klinik für Radiologie und Neuroradiologie  
  
Asklepios Klinik Hamburg Nord Heidberg

### **Ausbildung:**

1998 – 2004                              Alexander von Humboldt Schule (Mexico City, Mexiko)

2004 – 2011                              Gymnasium Essen-Werden

**Abitur:** 1,3

10/2011 – 05/2018                      Christian-Albrechts-Universität, Kiel – **Humanmedizin**  
  
(Abschlussnote: 2,3)

04/2015 – 08/2017                      Promotionsarbeit „Rolle der regulierten Nekrose  
  
beim akuten Nierenversagen“ bei PD Dr. med. Andreas  
  
Linkermann an der CAU Kiel

09/2017 – aktuell                      Weiterführung der Promotionsarbeit „Rolle der regulierten  
  
Nekrose beim akuten Nierenversagen“ bei Prof Dr. rer. nat.  
  
Dieter Adam an der CAU Kiel

06/2018                                      **Deutsche Approbation als Arzt**

Hamburg, Januar 2022



## 11.2 Publikationsverzeichnis (Stand 01/22)

### **Primäre Publikationen:**

1. von Mässenhausen A, Tonnus W, Himmerkus N, Parmentier S, Saleh D, Rodriguez D, Ousingsawat J, Ang RL, Weinberg JM, Sanz AB, Ortiz A, **Zierleyn A**, Becker JU, Baratte B, Desban N, Bach S, Schiessl IM, Nogusa S, Balachandran S, Anders HJ, Ting AT, Bleich M, Degterev A, Kunzelmann K, Bornstein SR, Green DR, Hugo C und Linkermann A. (2018) Phenytoin inhibits necroptosis, ***Cell Death & Disease*** – Mar 2;9(3):359.
2. **Zierleyn A**, Adam D, Tonnus W, Linkermann A, Boor P und Djurdjaj S (2021) Abstracts zum 127. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e. V., Ferroptosis mediates acute kidney injury after rhabdomyolysis ***Der Internist***, 62(April), pp. 175. doi: 10.1007/s00108-021-01036-7.