

Aus der Klinik für Innere Medizin IV  
mit den Schwerpunkten Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
(Direktor: Prof. Dr. med. Roland Schmitt)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

## **Die Gewichtung von ACSL4 im Verlauf der regulierten Nekrose**

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

vorgelegt von  
**Tammo Müller**  
aus Jever

Kiel 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Krautwald

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Karina Reiß

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2025

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 28.04.2025

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Krautwald

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Regulierter Zelltod.....	1
1.2 Nekroptose.....	2
1.3 Klinische Relevanz der Nekroptose .....	5
1.4 Ferroptose .....	8
1.5 Klinische Relevanz der Ferroptose .....	11
1.6 ACSL4 .....	13
1.7 Fragestellung .....	15
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Material.....	16
2.1.1 Laborgeräte .....	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	17
2.1.3 Medium, Medienzusätze und Antibiotika.....	18
2.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Bakterien und Enzyme.....	18
2.1.5 Kommerzielle Kits .....	19
2.1.6 Zelllinien .....	20
2.1.7 Fluoreszenzreagenzien und Antikörper .....	21
2.1.8 Software .....	21
2.1.9 Plasmid und Expressionsvektor .....	21
2.1.10 Oligonukleotide.....	22
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Zellkultur.....	22
2.2.2 Proteinnachweis .....	23

2.2.3 Zelltodassays .....	26
2.2.4 Quantifizierung des Zelltods .....	27
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1. Bedeutung von ACSL4 in der Ferroptose .....	29
3.1.1 Nachweis der erfolgreichen <i>Acs/4</i> -Deletion .....	29
3.1.2 Zelltodassays in <i>Acs/4</i> -ko NIH3T3 Zellen.....	30
3.1.3 Bestimmung von ACSL4 in unterschiedlichen Zelllinien .....	31
3.2 Untersuchung einer Interaktion von Ferroptose und Nekroptose.....	32
3.2.1 Nachweis der erfolgreichen <i>Mkl</i> -Deletion .....	33
3.2.2 Zelltodassays in <i>Mkl</i> -ko NIH3T3 Zellen .....	33
3.3 Untersuchung der Schlüsselproteine im Verlauf von Zelltodassays .....	35
3.3.1 Bestimmung von ACSL4 und GPX4 im zeitlichen Verlauf der Ferroptose.....	35
3.3.2 Bestimmung von pMLKL und MLKL im Verlauf der Nekroptose .....	36
3.4 Durchflusszytometrische Zelltodanalysen in Ferroptose- und Nekroptoseassays .....	38
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>46</b>
4.1 ACSL4 ist essentieller Bestandteil des ferroptotischen Zelltods.....	46
4.2 Ferroptose und Nekroptose beeinflussen einander .....	48
4.3 Ausblick.....	50
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>54</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>67</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung und Veröffentlichung .....</b>	<b>68</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Nekroptose.....	5
Abbildung 2: Eine Auswahl von Erkrankungen mit Beteiligung von Nekroptose.....	7
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Ferroptose .....	10
Abbildung 4: Eine Auswahl von Erkrankungen mit Beteiligung von Ferroptose. ....	13
Abbildung 5: Deletionsnachweis von <i>Acsf4</i> auf Proteinebene mittels Western Blot .....	30
Abbildung 6: Zelltodassays unter Verwendung von <i>Acsf4</i> -ko NIH3T3 Zellen.....	31
Abbildung 7: Expression von ACSL4 in unterschiedlichen Zelllinien.....	32
Abbildung 8: Deletionsnachweis von <i>Mkl</i> auf Proteinebene mittels Western Blot.....	33
Abbildung 9: Zelltodassays unter Verwendung von <i>Mkl</i> -ko NIH3T3 Zellen.....	34
Abbildung 10: Bestimmung von ACSL4 und GPX4 im zeitlichen Verlauf der Ferroptose....	36
Abbildung 11: Nachweis von aktiviertem pMLKL im zeitlichen Verlauf der Nekroptose.....	37
Abbildung 12: Ferroptoseassays in parental vs. <i>Mkl</i> -ko NIH3T3 Zellen.....	39
Abbildung 13: Ferroptoseassays in NIH3T3 Zellen unter Zusatz eines MLKL-Inhibitors .....	40
Abbildung 14: Ferroptoseassays in NIH3T3 Zellen unter Inhibition von RIPK1 und RIPK3	41
Abbildung 15: Bestimmung von ROS in Ferroptoseassays .....	42
Abbildung 16: Nekroptoseassays in parental vs. <i>Acsf4</i> -ko NIH3T3 Zellen.....	43
Abbildung 17: Nekroptoseassays in <i>Acsf4</i> -ko NIH3T3 Zellen unter Inhibition der Ferroptose .....	44

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	20
Tabelle 2: Lysis Puffer .....	23
Tabelle 3: Trenngel (10 ml) für 10% Polyacrylamidgel .....	25
Tabelle 4: Sammelgel (4 ml) für 3% Polyacrylamidgel.....	25
Tabelle 5: 1x Laufpuffer mit SDS.....	25

## Abkürzungsverzeichnis

<b>7-AAD</b>	7-Aminoactinomycin
<b>ACSL4</b>	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i> (humanes Gen)
<b>Acs14</b>	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i> (murines Gen)
<b>ACSL4</b>	<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 4</i> (Protein)
<b>Acyl-CoA</b>	Acyl-Coenzym A
<b>AA</b>	Arachidonsäure, <i>arachidonic acid</i>
<b>AA-CoA</b>	Arachidonsäure-Coenzym A
<b>AA-PE</b>	Arachidonsäure-Phosphatidylethanolamin
<b>AdA</b>	Docosatetraensäure, <i>adrenic acid</i>
<b>AdA-CoA</b>	Docosatetraensäure-CoA
<b>AdA-PE</b>	Docosatetraensäure-Phosphatidylethanolamin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Molekulares Calcium
<b>CoQ10</b>	Ubichinon = Coenzym Q10
<b>CoQH<sub>2</sub></b>	Ubichinol = Reduziertes Coenzym Q10
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>cIAP1</b>	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein 1</i>
<b>cIAP2</b>	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein 2</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>CRISPR/Cas9</b>	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9</i>
<b>CypD MPT</b>	Cyclophilin D-vermittelte <i>mitochondrial permeability transition</i>
<b>DAMPs</b>	<i>damage-associated molecular patterns</i>
<b>DFO</b>	Deferoxamin
<b>Era</b>	Erastin
<b>FADD</b>	<i>Fas-associated death domain</i>
<b>Fer-1</b>	Ferrostatin-1
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FSP1</b>	<i>ferroptosis suppressor protein 1</i>
<b>γ-GCS</b>	γ-Glutamylcysteinsynthetase
<b>GPX4</b>	Glutathionperoxidase 4
<b>GSH</b>	Glutathion

<b>GSK‘872</b>	GlaxoSmithKline ‘872
<b>GSS</b>	Glutathionsynthetase
<b>GSSG</b>	Glutathiondisulfid
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoff
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i>
<b>IRI</b>	<i>ischemia/reperfusion injury</i>
<b>LOX</b>	Lipoxygenasen
<b>LUBAC</b>	<i>linear ubiquitin chain assembly complex</i>
<b>Mkl</b>	<i>mixed lineage kinase-like protein</i> (murines Gen)
<b>MLKL</b>	<i>mixed lineage kinase-like protein</i> (Protein)
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaF</b>	Natriumfluorid
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	Natriumorthovanadat
<b>NF-κB</b>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>NSA</b>	Necrosulfonamid
<b>Nec-1</b>	Necrostatin-1
<b>Nec-1s</b>	Necrostatin-1 stable
<b>PL-PUFA-OOH</b>	Phospholipidhydroperoxid
<b>PL-PUFA-OH</b>	Phospholipidhydroxid
<b>pMLKL</b>	phosphoryliertes MLKL
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PRR</b>	<i>pattern recognition receptor</i>
<b>PUFA</b>	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
<b>PUFA-CoA</b>	<i>polyunsaturated fatty acid-Coenzym A</i>
<b>RAS</b>	<i>rat sarcoma</i>
<b>RHIM</b>	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
<b>RIPK1</b>	<i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
<b>RIPK3</b>	<i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
<b>RN</b>	Regulierte Nekrose
<b>RNA</b>	<i>ribonucleid acid</i>
<b>ROO•</b>	Peroxyradikale
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>RSL3</b>	<i>RAS-selective compound 3</i>



<b>SD</b>	<i>standard deviation</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>sgRNA</b>	<i>single guide RNA</i>
<b>SLC7A11</b>	<i>solute carrier family 7 member 11</i>
<b>TBS-T</b>	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor-alpha
<b>TNFR</b>	TNF Rezeptor
<b>TRAF2</b>	<i>TNFR-associated factor 2</i>
<b>TRAIL</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors</i>
<b>TZ</b>	TNF- $\alpha$ + zVAD-fmk
<b>VEGFR2</b>	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	Zinkchlorid
<b>zVAD-fmk</b>	<i>N-benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-(O-methyl)fluoromethylketone</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Regulierter Zelltod

Der Zelltod stellt einen essentiellen Vorgang in jedem zellulären Organismus dar. Bis vor wenigen Jahren unterschied man lediglich zwei Formen des Zelltodes: die Apoptose und die Nekrose. Ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden Zelltodformen ist hierbei, dass die Apoptose über genetisch vorprogrammierte Signalwege verfügt, welche in den Zelltod und folgende Phagozytose der Zellbestandteile münden. Die Apoptose geht ohne eine immunologische Reaktion einher und wird daher auch als biologischer Selbstmord der Zelle bezeichnet (Elmore, 2007). Die Apoptose ist für viele biologische Prozesse unverzichtbar, unter anderem der Embryogenese und Entwicklung, der Zellhomöostase mit ihrem kontinuierlichen Austausch von irreversibel geschädigten Zellen sowie der Funktion des Immunsystems (Fuchs & Steller, 2011; Zakeri & Ahuja, 1997). Der apoptotische Zelltod kann sowohl intrinsisch als auch extrinsisch über die Stimulation von Todesrezeptoren initiiert werden. Die Apoptose ist letztendlich von einer Gruppe Cysteinproteasen, den Caspasen, abhängig. Der apoptotische Zelltod ist durch ein Schrumpfen der Zelle, einer Kondensierung des Chromatins und einer Fragmentierung des Zellkerns gekennzeichnet. Zuletzt werden Apoptosevesikel gebildet, welche durch Phagozyten, wie beispielsweise Makrophagen, dendritische Zellen oder epithelialen Zellen, aufgenommen werden (D'Arcy, 2019).

Die Nekrose hingegen stellt einen unkontrollierten und pathologischen Zelltod dar, der durch eine externe Schädigung der Zelle oder durch intrinsische Stressoren ausgelöst werden kann. Die Schädigung kann durch eine Bandbreite an Stimuli induziert werden, zum Beispiel durch Traumata, radioaktive Strahlung, Ischämien, Toxine oder auch Infektionen (Elmore, 2007). Die Nekrose führt nach einem Anschwellen der Zelle zu einer Zellruptur und der folgenden Freisetzung der Zellbestandteile in das umliegende Gewebe (D'Arcy, 2019). Dies resultiert in einer immunologischen Reaktion, da die freigesetzten Zellbestandteile als DAMPs (damage-associated molecular patterns) dienen, welche vom Immunsystem über Rezeptoren, wie den toll-like receptors (TLRs) oder NOD-like receptors (NLRs) erkannt werden (Murao et al., 2021). Diese Gruppe der Rezeptoren wird als pattern recognition receptors (PRRs) bezeichnet. Hieraus folgt eine inflammatorische Kaskade durch die Expression von Zytokinen und Rekrutierung weiterer Immunzellen (Elmore, 2007).

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde das Feld der Zelltodforschung durch die Entdeckung von weiteren regulierten Zelltodentitäten neu aufgerollt. Diese Zelltode verfügen über jeweils unterschiedliche, genetisch determinierte Signalwege ähnlich der Apoptose, weisen jedoch zugleich morphologische und immunologische Charakteristika der Nekrose auf (Weinlich et al., 2017). Diese neu entdeckten Zelltodentitäten werden unter dem Begriff der regulierten Nekrose (RN) zusammengefasst und führten zu einem Paradigmenwechsel in der Zelltodforschung. Die erste Zelltodentität der regulierten Nekrose stellt die Nekroptose dar, welche 2005 erstmalig beschrieben wurde (Degterev et al., 2005). In den folgenden Jahren konnten noch weitere Zelltodformen entdeckt werden, die relevantesten stellen die Ferroptose, Pyroptose, Parthanatos und die Cyclophilin D-vermittelte MPT (*mitochondrial permeability transition-dependent necrosis*) dar (Andrabi et al., 2008; Bergsbaken et al., 2009; Dixon et al., 2012; Javadov & Kuznetsov, 2013; Monack et al., 2001). Die Relevanz der regulierten Nekrose für die Zelltodforschung verdeutlicht sich anhand der multiplen physiologischen aber insbesondere pathologischen Prozesse, in denen Modalitäten der RN den Zelltod und Gewebeschaden bedingen (Conrad et al., 2016). Um einen therapeutischen Nutzen durch eine Modulation des Zelltodes zu ziehen, stellte sich nunmehr eine Erforschung der Apoptose als unzureichend dar und zwang die Zelltodforschung dazu, den Blick zu erweitern (Conrad et al., 2016).

## 1.2 Nekroptose

Die Nekroptose stellt die erste beschriebene sowie am besten erforschte Entität der regulierten Nekrose dar (Degterev et al., 2005; Pasparakis & Vandenabeele, 2015). Die Entdeckung der Nekroptose basiert auf Zelltodstudien mit dem Zytokin Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), welches nach Blockade der Apoptose eine morphologische Nekrose der Zellen auslösen konnte (Vercammen et al., 1998). Während der hieraus resultierende Zelltod seinerseits als eine TNF-induzierte Nekrose beschrieben wurde, konnte die Arbeitsgruppe um Degterev im Jahr 2005 diesen Zelltod der Zellen durch das Hydantoin Necrostatin-1 (Nec-1) inhibieren und beschrieben erstmalig die Existenz einer eigenständigen Zelltodentität, welche fortan als Nekroptose bezeichnet wurde (Degterev et al., 2005). Die Nekroptose zeichnet sich durch morphologische Charakteristika einer Nekrose aus. Die Zelle schwillt zunächst in Folge einer erhöhten Membranpermeabilität an. Durch die folgende Ruptur der Zellmembran gelangen die intrazellulären Bestandteile in den Extrazellulärraum und dienen als DAMPs mit einer hieraus resultierenden immunologischen Reaktion des Organismus (Tang et al., 2019). Die Nekroptose stellt somit einen regulierten, nekrotischen und proinflammatorischen Zelltod dar (Pasparakis

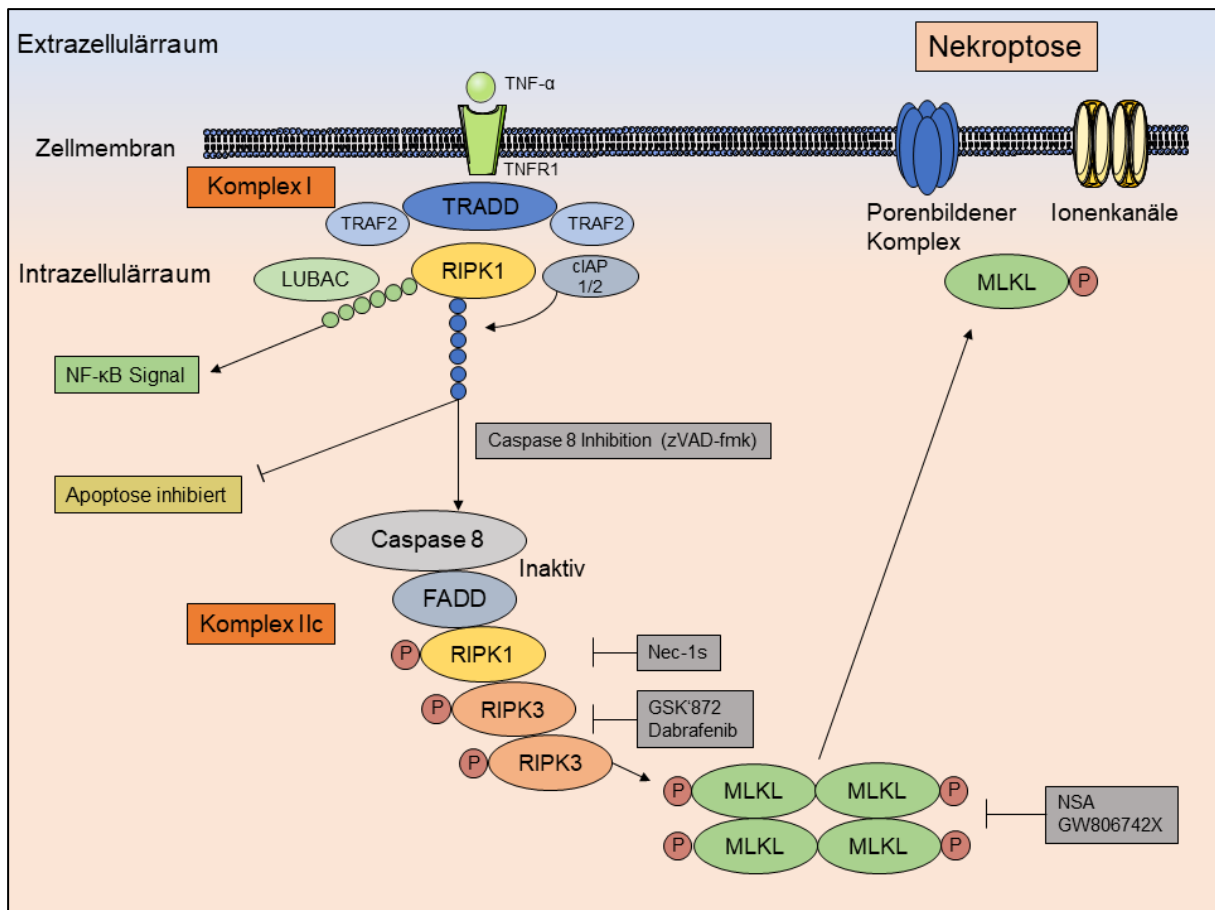
& Vandenabeele, 2015). Der molekulare Signalweg der Nekroptose wurde seit der Erstbeschreibung der Zelltodentität ausführlich untersucht und weitestgehend aufgeschlüsselt, stellt aber weiterhin den Bestandteil aktueller Forschung dar.

Der apoptotische als auch der nekroptotische Zelltod kann mitunter durch Todesrezeptoren vermittelt werden, zu denen unter anderem der Fas-Rezeptor, die TNF-Rezeptoren 1 und 2 (TNFR1/2) sowie die *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors* 1 und 2 (TRAIL1/2) gehören (Tang et al., 2019). Während die Aktivierung des nekroptotischen Zelltods auch durch Lipopolysaccharide, doppelsträngige RNA, Interferon, Virusinfektionen, Stress des endoplasmatischen Retikulums, DNA Schaden oder durch onkologische Medikamente erfolgen kann, stellt die Zelltodinduktion mit TNF- $\alpha$  den am besten verstandenen Auslöser dar (Grootjans et al., 2017; Shan et al., 2018). Daher wird nachfolgend der Signalweg der Nekroptose anhand der Aktivierung mit TNF- $\alpha$  dargestellt. Durch die Aktivierung des TNFR1 bildet sich ein Molekülkomplex aus *receptor-interacting serine/threonine kinase 1* (RIPK1), *TNFR1-associated death domain* (TRADD), *TNFR-associated factor 2* (TRAF2), *cellular inhibitor of apoptosis protein 1* (cIAP1), cIAP2 und dem *linear ubiquitin chain assembly complex* (LUBAC) am intrazellulären Teil des Rezeptors. Dieser Molekülkomplex wird als Komplex I bezeichnet (Conrad et al., 2016). An Komplex I kann die lineare Ubiquitinierung von RIPK1 durch LUBAC erfolgen, was in die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs und folgend dem Überleben der Zelle mündet (Dondelinger et al., 2015). Wird der Komplex I jedoch destabilisiert, mündet das TNF- $\alpha$  Signal in den Tod der Zelle. Dies kann zu diesem Zeitpunkt durch drei verschiedene Signalkaskaden erfolgen: Es kann sich der Komplex IIa, bestehend aus TRADD, RIPK1, Caspase-8 und *Fas-associated death domain* (FADD), bilden, woraufhin die Zelle durch Apoptose stirbt. Der Komplex IIb wird unter anderem durch einen Mangel an cIAP1/2 bedingt und mündet ebenfalls in der Apoptose, diese stellt sich hierbei jedoch als abhängig von der RIPK1-Kinasefunktion dar (Wang et al., 2008).

Damit sich der Komplex IIc bildet, ist sowohl eine suffiziente Konzentration von RIPK3 und *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) vonnöten, als auch eine Inhibition der Caspase-8. Durch die Assoziation von RIPK1 und RIPK3 über *RIP homotypic interaction motif* (RHIM) bildet sich das Nekrosom (Conrad et al., 2016). Während eine pharmakologische Inhibition von RIPK1 die Nekroptose inhibiert, kann im Falle einer genetischen Deletion von RIPK1 weiterhin die Nekroptose aktiviert werden, wobei in diesem Falle TRADD als Partner von RIPK3 dessen Phosphorylierung ermöglicht (Wang et al., 2020). Auf die Bildung des

Molekülkomplexes folgen Auto- sowie Transphosphorylierungen zwischen RIPK1 und RIPK3, mündend in die Phosphorylierung von MLKL durch RIPK3 (Conrad et al., 2016). Phosphoryliertes MLKL bildet ein Multimer und transloziert an die Plasmamembran, wo es über Ionenkanäle einen Kationeninflux induziert sowie durch Ausbildung von Poren eine Membranpermeabilität erzeugt. Dies resultiert in den Tod der Zelle (Cai et al., 2014; Sun et al., 2012; Xia et al., 2016; Zhao et al., 2012).

Die Proteine RIPK1, RIPK3 und MLKL stellen Schlüsselproteine der nekroptotischen Signalkaskade dar. Aufgrund dessen verhindert die Inhibition eines dieser Proteine den Ablauf der Nekroptose. Nec-1 stellt den erstmals beschriebenen Nekroptoseinhibitor dar, welches durch eine Inhibition von RIPK1 die Nekroptose unterbindet (Degterev et al., 2005). Wie zuvor beschrieben, konnte anhand der inhibitorischen Wirkung von Nec-1 die Nekroptose als Zelltodentität identifiziert werden. Mittlerweile wird jedoch ein optimierter RIPK1-Inhibitor, das Necrostatin-1s (Nec-1s), aufgrund der höheren Spezifität und Plasmastabilität bevorzugt verwendet (Takahashi et al., 2012). Inhibitoren von RIPK3 stehen ebenfalls zur Verfügung, hierbei sind GSK‘872 (GlaxoSmithKline ‘872) und Dabrafenib zu nennen (J.-X. Li et al., 2014; Mandal et al., 2014). Dabrafenib ist ein im Menschen zugelassener B-RAF<sup>V600E</sup> Inhibitor, der u.a. auch RIPK3 inhibiert (J.-X. Li et al., 2014; Sugaya et al., 2019). Eine weitere effektive Möglichkeit den Signalweg der Nekroptose zu stoppen, besteht in der Inhibition des Effektorproteins MLKL. Die Moleküle Nekrosulfonamid (NSA) sowie GW806742X inhibieren effektiv die Nekroptose durch eine Inhibition des MLKLs. NSA wirkt jedoch nur auf das humane MLKL, während GW806742X das murine MLKL inhibiert (Hildebrand et al., 2014; Sun et al., 2012). Aufgrund der Komplexität des nekroptotischen Signalweges ist dieser in vereinfachter Form in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Nekroptose**

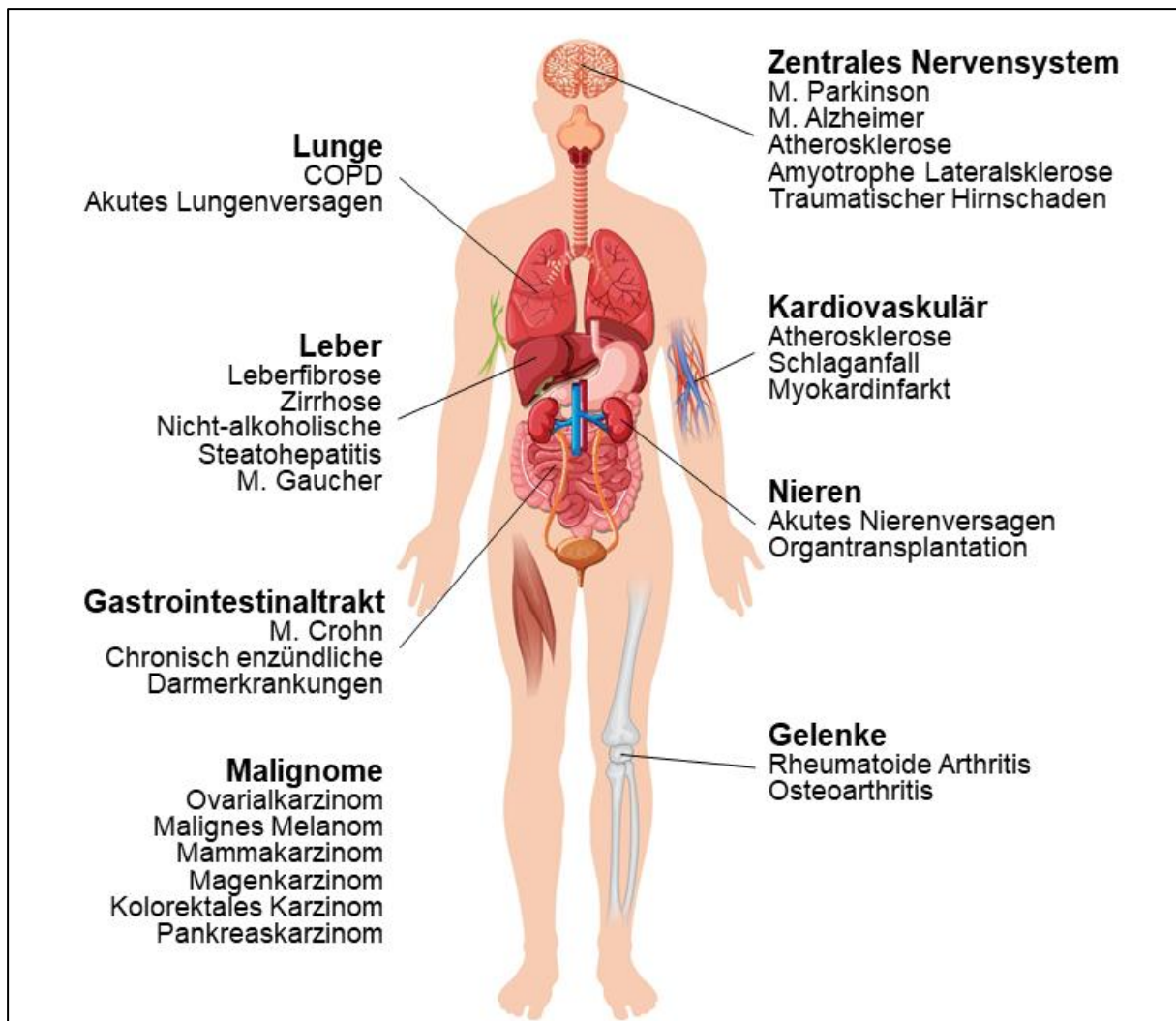
Nach Aktivierung des TNFR1 durch TNF- $\alpha$  erfolgt die Rekrutierung von RIPK1, TRADD, TRAF2, cIAP1, cIAP2 und LUBAC am intrazellulären Teil des Rezeptors, dies bildet den Komplex I. Eine lineare Ubiquitinierung von RIPK1 durch LUBAC kann zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signals und somit zum Überleben der Zelle führen. Andererseits kann die Ubiquitinierung von RIPK1 durch cIAP den Zelltod initiieren. Durch Inhibition von Caspase-8 bildet sich Komplex IIc. Caspase-8 und FADD sind inaktiv und es erfolgen Auto- und Transphosphorylierungen zwischen RIPK1 und RIPK3. Phosphoryliertes RIPK3 rekrutiert wiederum MLKL und phosphoryliert dieses. MLKL oligomerisiert und transloziert an die Zellmembran. Dort wird der Zelltod durch die Ausbildung von Poren sowie Kationenkanälen vollzogen. Nekroptoseinhibitoren wirken auf RIPK1 (u.a. Nec-1s), RIPK3 (u.a. GSK'872 und Dabrafenib) sowie MLKL (u.a. NSA und GW806742X). Zur Vereinfachung wurde auf die Darstellung von weiteren Komponenten der nekroptotischen Signalkaskade verzichtet (modifiziert nach Conrad et al., 2016).

### 1.3 Klinische Relevanz der Nekroptose

Die Relevanz der Nekroptose im Organismus präsentiert sich primär im Rahmen von Krankheiten und Pathologien. Dennoch stellt sich eine suffiziente Homöostase der Apoptose und Nekroptose als essentiell in der embryologischen Entwicklung dar. Dies konnte anhand des gezielten Ausschaltens von Genen an Mäusen demonstriert werden. Caspase-8- und FADD-defiziente Mäuse, in denen durch die genetischen Deletionen die Apoptose ausgeschaltet wird, versterben bereits intrauterin, da die Nekroptose verstärkt aktiviert wird (Kaiser et al., 2011; Varfolomeev et al., 1998; Yeh et al., 1998). Auch RIPK1-defiziente Mäuse versterben perinatal durch eine unregulierte Apoptose und eine fehlende Aktivierung des Überlebenssignals NF- $\kappa$ B (Dillon et al., 2014; Kelliher et al., 1998). RIPK1 stellt ein essentielles regulatorisches Protein

für die Entwicklung der Mäuse dar, wobei die Aktivität der Kinase hierbei keine Rolle spielt (Kaiser et al., 2014). Triple-knockout Mäuse, in denen FADD, RIPK1 und RIPK3 deletiert wurden, sind überlebensfähig und zeigen eine normale Entwicklung, erleiden jedoch im weiteren Lebensverlauf eine lymphoproliferative Erkrankung, vermutlich bedingt durch eine dysregulierte Homöostase der Lymphozyten, welche durch den selektiven Zelltod erreicht wird (Dowling et al., 2015). Dies demonstriert, dass die Regulation und das Gleichgewicht von Apoptose und Nekroptose eine wichtige Rolle in der physiologischen Entwicklung einnimmt.

Die Anzahl der Erkrankungen, in denen die Nekroptose beteiligt ist, nahm in den letzten Jahren deutlich zu, sodass hier nur auf eine Auswahl eingegangen wird (siehe Abbildung 2). Die klinische Relevanz der Nekroptose wurde initial an Ischämie/Reperfusionsschäden (*ischemia/reperfusion injury*, IRI) demonstriert, was unter anderem Erkrankungen wie den Schlaganfall, Myokardinfarkt und das akute Nierenversagen beinhaltet (Degterev et al., 2005; Deroo et al., 2020; Khoury et al., 2020; Linkermann et al., 2012). Die Nekroptose ist auch in kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt, hierbei seien die Atherosklerose, das Aortenaneurysma und die Myokarditis beispielhaft zu nennen (Deroo et al., 2020; Leng et al., 2021). Erwiesenermaßen besteht eine Beteiligung der Nekroptose in einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen, sowohl infektiöser als auch steriler Natur. So wurde die Nekroptoseinhibition als mögliches therapeutisches Ziel im Rahmen von akuten und chronischen Lungenerkrankungen wie z.B. dem akuten Lungenversagen oder der COPD beschrieben (Faust et al., 2020; Wang et al., 2021). Auch in einer Vielzahl von Lebererkrankungen wie der nicht-alkoholischen Steatohepatitis, der alkoholischen Hepatitis, der Leberfibrose und -zirrhose wird der Nekroptose eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Xuehui Li et al., 2021; Saeed et al., 2019; Shojaie et al., 2020). Neben einer Beteiligung der Nekroptose an weiteren autoimmunologischen Erkrankungen, wie dem Morbus Crohn oder der rheumatoiden Arthritis, besteht ein weiterer Forschungsfokus auf Erkrankungen des Nervensystems (Dai et al., 2021; Khoury et al., 2020). Die Beteiligung der Nekroptose wurde in einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose, Morbus Parkinson, der Multiplen Sklerose und auch Morbus Alzheimer nachgewiesen (Yu et al., 2021).



**Abbildung 2: Eine Auswahl von Erkrankungen mit Beteiligung von Nekroptose** (modifiziert nach Morgan & Kim, 2022).

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt der Nekroptose besteht darin, einen möglichen therapeutischen Nutzen in Hinblick auf Tumorerkrankungen zu beleuchten. Eines der zentralen Merkmale von Krebserkrankungen besteht in einer Resistenz gegenüber den physiologischen Zelltodmechanismen, insbesondere der Apoptose (Hanahan & Weinberg, 2011). In einer Vielzahl von Malignomen, wie beispielsweise dem Pankreas-, Magen-, Mamma- und kolorektalem Karzinom, geht eine hohe Expression von nekroptotischen Schlüsselproteinen mit einer positiven Prognose der Tumorerkrankung einher, während eine niedrige Expression von RIPK3 und MLKL mit einer schlechten Prognose korreliert (Colbert et al., 2013; Conev et al., 2019; Ertao et al., 2016; Xian Li et al., 2017). Während dies eine Relevanz in der Tumorkontrolle impliziert, stellt sich die Nekroptose in anderen Tumorentitäten auch als möglicher Mediator einer Metastasierung und Tumorprogresses dar (Seifert et al., 2016; Strilic et al., 2016). Die Rolle der Nekroptose in Karzinomen erscheint dichotom und abhängig von



der jeweiligen Tumorentität zu sein, sodass die Nekroptose sowohl die Onkogenese fördern als auch reduzieren kann (Gong et al., 2019). Basierend auf diesen Erkenntnissen wird ein möglicher therapeutischer Nutzen der Nekroptose in Tumorerkrankungen *in vivo* untersucht, wobei bereits erste kleinere Studien am Menschen durchgeführt werden (Tong et al., 2022).

Aufgrund des Umfangs der Pathologien, in denen die Nekroptose beteiligt ist, stellen die dargestellten Erkrankungen lediglich einen Überblick dar. Die Nekroptose fungiert im Rahmen dieser klinisch relevanten Erkrankungen sowohl als Mediator des Zelltods als auch der Entzündung. Dieser Kreislauf, bestehend aus regulierter Nekrose und Entzündung, triggert sich gegenseitig und wird unter dem Begriff „Nekroinflammation“ zusammengefasst (Linkermann et al., 2014). Die Pathophysiologie vieler Erkrankungen musste aufgrund einer nachgewiesenen Beteiligung der Nekroptose neu evaluiert werden und stellte hierdurch neue potentielle therapeutische Zielstrukturen dar.

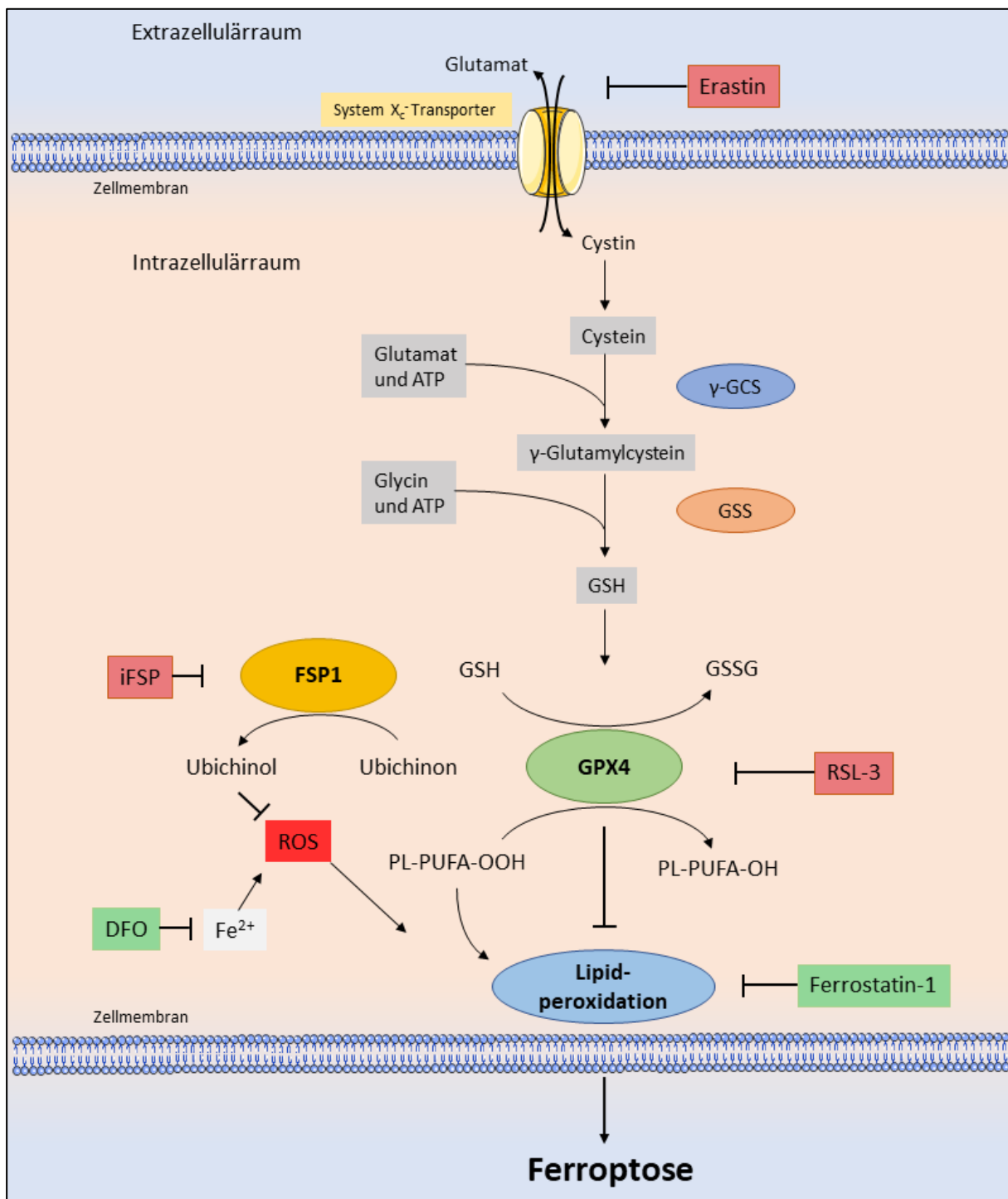
## 1.4 Ferroptose

Die Ferroptose konnte im Jahr 2012 erstmalig als eigenständige Zelltodentität der regulierten Nekrose beschrieben werden, welche sich durch die Charakteristika der Eisenabhängigkeit und der Lipidperoxidation der Zellmembran auszeichnet (Dixon et al., 2012). Die Ferroptose stellt somit eine weitere Zelltodmodalität dar, doch kann retrospektiv nachvollzogen werden, dass der ferroptotische Zelltod bereits in den vorherigen Jahrzehnten wiederholt beobachtet werden konnte. So wurden die charakteristischen Eigenschaften der Ferroptose in Zelltodstudien zuvor zwar beschrieben, doch gelang es nicht, den ferroptotischen Zelltod als eigenständige Zelltodentität zu erkennen (Hirschhorn & Stockwell, 2019). Nachdem die Arbeitsgruppe um Stockwell im Jahr 2008 einen nicht-apoptotischen Zelltod beschreiben konnte, welcher mittels Erastin bzw. *Ras-selective lethal* (RSL) bei Ras-mutierten Tumorzellen induziert wurde, konnte nach weiterer Forschungsarbeit die Ferroptose im Jahr 2012 als eine eigenständige Entität der regulierten Nekrose determiniert werden (Dixon et al., 2012). Die Ferroptose unterscheidet sich sowohl in seiner Signalkaskade als auch der Morphologie von anderen Zelltodentitäten. So stellt sich die Ferroptose durch verkleinerte Mitochondrien mit einer verdickten Organellmembran dar, während der Tod der Zelle durch eine Lipidperoxidation der Zellmembran gekennzeichnet ist. Ein weiteres Charakteristikum der Ferroptose besteht in seiner Abhängigkeit von intrazellulärem Eisen. Das intrazelluläre Eisenvorkommen dient der Akkumulation von freien Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) in der Zelle über die sogenannte Fenton-Reaktion und fördert die Aktivierung von Lipoxygenasen (LOX),

welche ebenfalls die Produktion von ROS initiieren (Yang et al., 2016). Durch eine Kumulation von ROS folgt eine Lipidperoxidation der Mitochondrien und Zellmembran mit dem resultierenden Tod der Zelle (Yan et al., 2021).

Im Folgenden wird die Signalkaskade des ferroptotischen Zelltods dargestellt. Zum besseren Verständnis wurde sich hierbei auf eine vereinfachte Veranschaulichung beschränkt. Die Ferroptose wird negativ reguliert vom System  $X_c^-$  Transporter, einem Cystin-Glutamat Antiporter der Zellmembran. Dieser Antiporter ist für den Influx des Dipeptids Cystin, welches aus zwei Molekülen Cystein besteht, im Austausch mit Glutamat notwendig. Cystein ist ein wichtiger Bestandteil des zellulären Antioxidans Glutathion (GSH), welches wiederum ein essentielles Substrat für die Phospholipidperoxidasefunktion des Proteins Glutathionperoxidase 4 (GPX4) darstellt. Cystein wird über die  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase ( $\gamma$ -GCS) mit Glutamat zu  $\gamma$ -Glutamylcystein und im nächsten Schritt mit Glycin durch die Glutathionsynthetase (GSS) zu Glutathion synthetisiert. Von acht bekannten Vertretern der GPX-Familie ist GPX4 die einzige, die die Fähigkeit besitzt, Produkte der Lipidperoxidation wie Phospholipidhydroperoxide zu Phospholipidalkoholen zu reduzieren und ist essentiell für eine Homöostase der Lipidmembran, wobei GSH im Rahmen der Redoxreaktion oxidiert wird (X. Jiang et al., 2021; Yang et al., 2014). Ein Mangel an GPX4 bzw. ein Mangel von dessen Substrat GSH führt durch die Akkumulation von reaktiven Phospholipidhydroperoxiden und ROS durch die folgende Lipidperoxidation der Zellmembran zum ferroptotischen Zelltod (Cao & Dixon, 2016; Tang et al., 2021). Die Ferroptose kann u.a. durch eine Inhibition des System  $X_c^-$  Transporters als auch durch die direkte Inhibition von GPX4 ausgelöst werden. Die Erstbeschreibung der Ferroptose erfolgte mit den ferroptotischen Zelltodinduktoren Erastin und RSL3 (Dixon et al., 2012). Erastin fungiert hierbei durch die Inhibition des System  $X_c^-$  Transporters, während RSL3 direkt die GPX4 inhibiert (X. Jiang et al., 2021; Yang et al., 2014). Während der System  $X_c^-$ /GPX4 Signalweg als das primäre System zur Regulierung der Ferroptose angesehen wird, konnten kürzlich weitere Signalwege beschrieben werden, welche dem ferroptotischen Zelltod entgegenwirken (Xie et al., 2022). Am relevantesten stellt sich das zytosolische Protein *ferroptosis suppressor protein 1* (FSP1) dar, welches Ubichinon, auch Coenzym Q10 (CoQ10) genannt, zu Ubichinol (CoQH<sub>2</sub>) reduziert. Ubichinol fungiert in der Zellmembran als Antioxidans und supprimiert die Lipidperoxidation und somit die Ferroptose (Bersuker et al., 2019; Doll et al., 2019). Der FSP1 Signalweg wird als möglicher Biomarker für die Ferroptoseresistenz mancher Zellen diskutiert, da eine Inhibition von FSP1 die

Ferroptose induzieren bzw. die Zellen gegenüber anderen Ferroptoseinduktoren sensitivieren kann (Doll et al., 2019).



**Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Ferroptose**

Der System X<sub>c</sub> Transporter transportiert Cystin im Austausch mit Glutamat in die Zelle. Cystin wird zu Cystein reduziert. Glutathion (GSH) wird aus den Substraten Cystein, Glutamat und Glycin unter Verwendung von zwei Molekülen ATP über Zwischenschritte mit der γ-Glutamylcysteinsynthetase (γ-GCS) und der Glutathionsynthetase (GSS) hergestellt. GSH dient der Glutathionperoxidase 4 (GPX4) zur Reduktion von Phospholipidhydroperoxiden (PL-PUFA-OOH) zu den jeweiligen Phospholipidhydroxiden (PL-PUFA-OH). Hierbei wird GSH oxidiert (GSSG) und somit verbraucht. GPX4 verhindert die Akkumulation von oxidierten Lipiden und somit die Lipidperoxidation der Zellmembran und den ferroptotischen Zelltod. Ferroptoseinduktoren

bewirken einen Verlust der GPX4-Aktivität. Erastin inhibiert den System  $X_c^-$ -Transporter, RSL3 inhibiert direkt die GPX4 und induziert somit die Ferroptose. Der ferroptotische Zelltod wird durch eine Lipidperoxidation der Zellmembran vermittelt. Die Ferroptose ist abhängig von Eisen ( $Fe^{2+}$ ) und kann somit durch dessen Depletion oder durch Eisenchelatoren wie Deferoxamin (DFO) inhibiert werden. Ebenso kann die Ferroptose durch Ferrostatin-1 inhibiert werden, welches als Antioxidans wirkt. Ein alternativer Signalweg besteht in der Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol durch das FSP1. Ubichinol dient als Antioxidans in der Zellmembran und reduziert freie Sauerstoffradikale (ROS) (modifiziert nach Conrad et al., 2016).

Die Ferroptose kann, aufgrund der namensgebenden Eisenabhängigkeit der Ferroptose, durch Chelatoren wie beispielsweise Deferoxamin (DFO), einer Deletion des Eisentransporters Transferrin oder einer geringen Eisenkonzentration wirksam inhibiert werden (Dixon et al., 2012; Dixon & Stockwell, 2013; Torii et al., 2016). Das reduzierte intrazelluläre Eisenvorkommen bedingt eine Reduktion der Fenton-Reaktion sowie der Aktivität von LOX, wodurch die Lipidperoxidation wirksam inhibiert werden kann (Xie et al., 2022). Die Ferroptose kann ebenso durch lipophile Antioxidantien wie Ferrostatin-1 (Fer-1) inhibiert werden, welche freie Radikale einfangen und hierüber die Lipidperoxidation verhindern (Zilka et al., 2017). Fer-1 stellt hierbei einen weitgenutzten und effektiven Ferroptoseinhibitor dar, welcher oft - zumindest *in vitro* - in ferroptotischen Zelltodstudien genutzt wird (Xie et al., 2022).

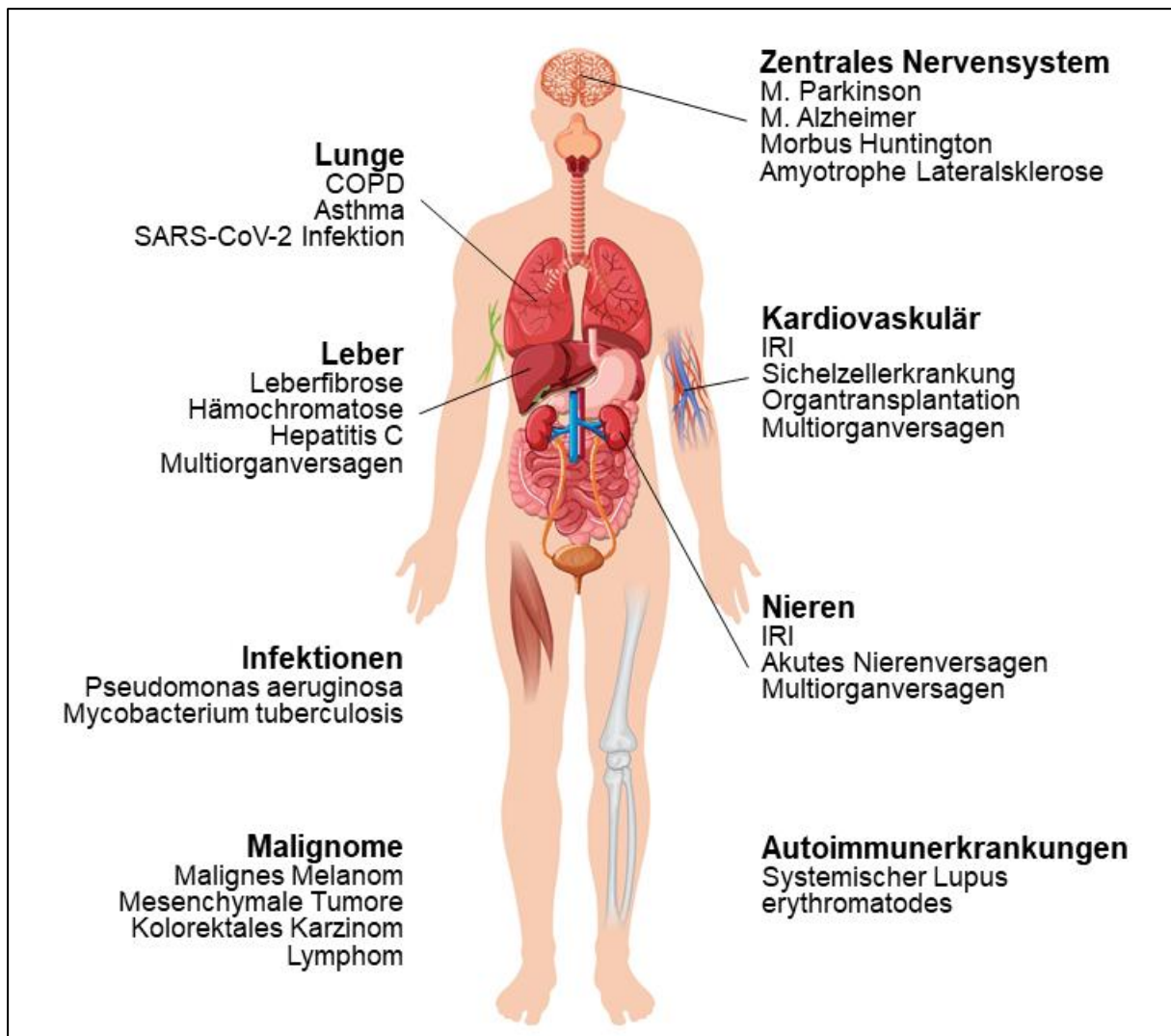
## 1.5 Klinische Relevanz der Ferroptose

Während die genaue physiologische Funktion der Ferroptose noch nicht verstanden ist, konnte eine Beteiligung der Ferroptose in einer Vielzahl von Erkrankungen und Pathologien nachgewiesen werden, woraus sich wichtige Implikationen für die weitere Erforschung dieser Zelltodform ergeben (X. Jiang et al., 2021). Da die Entdeckung der Ferroptose aus der Suche nach neuen Tumorthapeutika resultierte, bestand bereits frühzeitig eine Verbindung dieser Zelltodentität zu Tumorerkrankungen (Yang & Stockwell, 2008). Weitere Untersuchungen stellten dar, dass insbesondere hochresistente entdifferenzierte Tumorzellen sehr empfänglich für den ferroptotischen Zelltod sind, weshalb Ferroptoseinduktoren als potentielle Tumorthapeutika angesehen werden (Hangauer et al., 2017; Tsoi et al., 2018; Viswanathan et al., 2017). So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombination von Ferroptoseinduktoren mit anderen Tumorthapien wie einer Strahlentherapie oder einer Immuncheckpointblockade den Effekt der jeweiligen Einzeltherapien steigern kann (Lang et al., 2019; W. Wang et al., 2019). Doch auch die singuläre Nutzung von Ferroptoseinduktoren bedingt in verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise dem malignen Melanom, dem kolorektalen Karzinom oder dem Lymphom einen signifikanten antitumorösen Effekt (Cheng et al., 2023; Sato et al., 2020; Y. Zhang et al., 2019). Die Bedeutung der Ferroptose in Tumorerkrankungen geht über den potentiellen Nutzen als Therapeutikum hinaus, da auch

verschiedene endogene Tumorsuppressoren in der Lage sind, Tumorzellen gegenüber der Ferroptose zu sensibilisieren (X. Jiang et al., 2021). Der Tumorsuppressor p53 ist beispielsweise in der Lage, die Transkription von *solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11)*, einer Untereinheit des System  $X_c^-$  Transporters, zu supprimieren, wodurch der ferroptotische Tod der Zelle befördert wird (L. Jiang et al., 2015).

In Pathologien abseits von Tumorerkrankungen ist die Bedeutung der Ferroptose in IRI hervorzuheben. An Modellen konnte gezeigt werden, dass die Ferroptose unter anderem bei IRI der Niere, Leber, Herz und Gehirn beteiligt ist (Friedmann Angeli et al., 2014; Linkermann et al., 2014; Fang et al., 2019; Gao et al., 2015; Skouta et al., 2014; Tuo et al., 2017). So resultiert beispielsweise aus dem organspezifischen Knockout von *Gpx4*, einem Schlüsselprotein im Ablauf der Ferroptose, in Nieren ein akutes Nierenversagen, welches nur durch spezifische Ferroptoseinhibitoren, nicht aber durch spezifische Inhibitoren der Nekroptose wie Nec-1s gemildert werden kann. (Friedmann Angeli et al., 2014). Auch der gezielt gesetzte IRI am Mausmodell erscheint stärker abhängig von der Ferroptose zu sein als von der Nekroptose, da eine Inhibition der Ferroptose einen stärkeren Schutz der Tiere bewirkt als eine alleinige Inhibition der Nekroptose (Linkermann et al., 2014). Bei Herztransplantationen am Mausmodell konnte ebenso dargestellt werden, dass der IRI-assoziierte Gewebeschaden durch die Ferroptose bedingt wird (W. Li et al., 2019).

Zusätzlich zu Tumorerkrankungen und dem IRI wurde eine Beteiligung der Ferroptose in einer Vielzahl weiterer Erkrankungen impliziert (X. Jiang et al., 2021). Hierunter fallen unter anderem neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise die Alzheimerdemenz, Morbus Parkinson und Morbus Huntington, als auch entzündliche Erkrankungen wie die Leberfibrose, Autoimmunerkrankungen oder die chronisch obstruktiven Lungenerkrankung COPD (Chen et al., 2015; Devos et al., 2014; Do Van et al., 2016; Hambright et al., 2017; Hu et al., 2019; Masaldan et al., 2019; Z. Zhang et al., 2018; Yoshida et al., 2019). Zudem konnte kürzlich dargestellt werden, dass die Ferroptose im Rahmen eines Multiorganversagens involviert ist und der Einsatz von Ferroptoseinhibitoren im Mausmodell den Multiorganschaden reduziert (Van Coillie et al., 2022). Aufgrund der Vielfalt der Erkrankungen, in denen eine Beteiligung des ferroptotischen Zelltods nachgewiesen oder impliziert wurde, kann in diesem Rahmen nur eine Auswahl dargestellt werden (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Eine Auswahl von Erkrankungen mit Beteiligung von Ferropoptose** (modifiziert nach Stockwell, 2022).

Die Ferropoptose bietet sich als ein potentiell therapeutisches Ziel für eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen an. Daher besteht ein Forschungsinteresse sowohl in der gezielten Induktion der Ferropoptose in malignen Zellen, als auch in der Inhibition des Zelltods im Rahmen von Organschäden (X. Jiang et al., 2021). Hierbei wird der klinische Nutzen aktuell durch das Fehlen von verlässlichen Biomarkern für das Vorliegen eines ferroptotischen Zelltods als auch durch die bisher nicht selektive Aktivierung bzw. Inhibition der Ferropoptose behindert und bedürfen weiterer Forschungsanstrengungen (Stockwell, 2022).

## 1.6 ACSL4

In einem Mutagenesecscreening konnte 2015 eine Verbindung des Enzyms *acyl-CoA synthetase long-chain family member 4* (ACSL4) zum ferroptotischen Zelltod aufgezeigt werden (Dixon et al., 2015). Hierzu wurde die Zelllinie KBM7, welche einen haploiden Chromosomensatz

aufweist, über einen viralen Vektor mutiert und in der Folge Ferroptoseinduktoren ausgesetzt. Die Gensequenzierung von zelltodresistenten Populationen ermöglicht wiederum, die verantwortliche Gendeletion nachzuweisen (Carette et al., 2011).

Die Familie der ACSL Proteine umfasst fünf Isoformen, welche durch die Bildung von Acyl-Coenzym A (CoA) aus Fettsäuren eine relevante Rolle im Lipidmetabolismus der Zelle zur Lipidsynthese und Fettsäurenkatabolismus einnehmen (Soupene & Kuypers, 2008). Fettsäuren stellen eine Hauptquelle der gespeicherten Energie des Organismus dar, bedürfen jedoch zur Einspeisung in den Metabolismus einer Konversion in Acyl-CoAs. Die Familie der ACSLs katalysiert diese Reaktion für Fettsäuren von einer Länge zwischen 12 und 20 Kohlenstoffatomen, während andere Enzyme die Fettsäuren mit anderer Kohlenstofflänge zu Acyl-CoA konvertieren. Die Isoformen von ACSL weisen Unterschiede in Substrat- und Organspezifität auf, wodurch eine Manipulation der ACSL Isoformen die intrazelluläre Menge und Verteilung der einzelnen Lipide beeinflusst. ACSL4 hat eine besondere Affinität zur Arachidonsäure und ist verstärkt in hormonaktiven Zellen nachweisbar (Kang et al., 1997).

## 1.7 Fragestellung

Der Signalweg der Ferroptose über die System  $X_c^-$ /GPX4-Achse als auch alternative Signalwege wie FSP1 sind bereits weitgehend erforscht, doch sind die bisherigen Erkenntnisse sowohl über die Signalkaskade als auch die genaue Ausführung des Zelltods durch die Lipidperoxidation unvollständig (Stockwell, 2022). In dieser Arbeit sollte die Bedeutung von ACSL4 in der Ferroptose unter der Hypothese geprüft werden, dass ACSL4 einen unentbehrlichen Bestandteil der ferroptotischen Signalkaskade darstellt. Die Hypothese fußt auf dem zuvor dargestellten Mutagenesescreeing von Dixon et al. im Jahr 2015. An murinen NIH3T3 Zellen mit einer *Acsl4*-Deletion sollte geprüft werden, ob die Deletion des Gens den Ablauf des ferroptotischen Zelltods inhibiert. Eine Inhibition der Ferroptose durch eine Deletion von *Acsl4* würde eine essentielle Rolle von ACSL4 im Signalweg der Ferroptose darstellen und somit auf bisher unbekannte Bestandteile der ferroptotischen Signalkaskade hinweisen. Aufgrund der Funktion von ACSL4 als Enzym in der Generation von Fettsäuren ist eine direkte Beteiligung von ACSL4 in der Lipidperoxidation der Zellmembran denkbar, indem möglicherweise eine veränderte Lipidkomposition der Zellmembran die Lipidperoxidation vermindert. Sollte sich ACSL4 als essentiell für die Ferroptose darstellen, könnte dies zudem ein weiteres Zielprotein für eine therapeutische Intervention darstellen. Viele Tumorzelllinien weisen eine habituelle Resistenz gegenüber verschiedenen Zelltodentitäten auf, unter anderem bedingt durch Mutationen der Zellen. Daher sollte zudem untersucht werden, ob die Expression von ACSL4 in Zelllinien eine Aussage über deren Empfänglichkeit gegenüber der Ferroptose ermöglichen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Jahr 2013 darstellen, dass im *in vivo* Modell eines Organschadens der Niere zwei unabhängige Entitäten der regulierten Nekrose, die Nekroptose und die CypD MPT, simultan agieren können (Linkermann et al., 2013). Hierbei fungieren beide Zelltodentitäten im Mausmodell synergistisch zueinander. Mit dem Nachweis eines solchen Synergismus zwischen zwei unabhängigen Zelltodentitäten der regulierten Nekrose, stellte sich die Frage, ob eine solche Interaktion auch bei weiteren Zelltodentitäten vorliegt. Es sollte daher in dieser Arbeit geprüft werden, ob sich die Ferroptose und Nekroptose in ihren Signalwegen gegenseitig beeinflussen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Modell, Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	HE33, Amersham, UK
Agarosegel-Dokumentationssystem	Gel Doc EZ Imager, Bio-Rad, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator	HERAcell 240, Thermo Electron Corp./Heraeus, USA
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500, Beckman Coulter, USA
Filmentwicklungsmaschine	Curix 60, Agfa, Belgien
Gelelektrophoreseeinheit für SDS-PAGE	SE 250, Amersham Hoefer, UK
Gelgießkammer (SDS-PAGE)	Duel Gel Caster, Amersham Hoefer, UK
Inkubator	Binder B28, Tuttlingen
Inversmikroskop	Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Göttingen
Magnetrührer	RH basic 2, IKA, Staufen
Mikroplatten-Reader	Sunrise, Tecan, Schweiz
Mikrozentrifugen	Mini Star silverline, VWR, USA Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	Easypet 3, Eppendorf, Hamburg Pipetboy, Integra, Schweiz
Photometer	Ultrospec 2100 pro, Amersham, UK
Präzisionswaage	CP 4202 S, Sartorius, Göttingen
Röntgenkassette	Special/Rapid 200, Dr.Goos-Suprema, Heidelberg
Schüttelinkubator	Certomat BS 1, Sartorius, Göttingen
Sterilwerkbank	HERAsafe HS 18, Thermo Electron Corp./Heraeus, USA
Spannungsquelle für die Gelelektrophorese	EPS 301, Amersham, UK
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra T3, Göttingen
Tiefkühlschrank	HERAfreeze HFU 586, Thermo Scientific/Heraeus, USA
Transfer-Blotting Sytem	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, USA

<b>Wasserbad</b>	1003, GFL, Burgwedel
<b>Wassersaugpumpe</b>	FTA-1, Biosan, Lettland
<b>Wippschüttler</b>	ProBlot™ Rocker 25, Labnet USA
<b>Vortexer</b>	Reax top, Heidolph, Schwabach
<b>Zentrifuge</b>	Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Details, Bezugsquelle</b>
<b>Durchflusszytometer-Röhrchen</b>	5 ml Röhrchen, Sarstedt, Nümbrecht
<b>Film für Chemilumineszenzdetektion</b>	Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare, UK
<b>Filterpapier</b>	Blot paper, GE Healthcare, UK
<b>Küvetten</b>	1,5 ml halbmikro Küvetten, Brand, Wertheim
<b>Mikrotiterplatte (96 Well), Schwarz, Flachboden</b>	Black 96-Well Plate, Thermo Fisher Scientific, USA
<b>Nitrocellulosemembran</b>	Amersham Protran Premium 0,45 µm, GE Healthcare, UK
<b>PCR Reagiergefäß 0,5 ml</b>	Safe Seal, Sarstedt, Nümbrecht
<b>Pipetten (2/5/10/25 ml)</b>	Serologische Pipetten, Sarstedt, Nümbrecht
<b>Pipettenspitzen (10/200/1250 µl)</b>	Biosphere Tip 10/200 µl, Biosph. Filter Tip 1250 µl, Sarstedt, Nümbrecht
<b>Reagiergefäß (1,5/2/5 ml)</b>	Eppendorf Tubes, Eppendorf, Hamburg
<b>Spritzen (2/5 ml)</b>	BD Discardit II, Heidelberg
<b>Spritzenfilter</b>	Whatman 0.2 µm, GE Healthcare, UK
<b>Vakuum-Sterilfilterset</b>	Stericup and Steritop Vacuum filter units, 0,22 µm, Merck Millipore, Darmstadt
<b>Zählkammer nach Neubauer</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Zellkulturflasche 175 cm<sup>2</sup></b>	TC-Flasche T175, Sarstedt, Nümbrecht
<b>Zellkulturflasche 75 cm<sup>2</sup></b>	Cellstar TC 75 cm <sup>2</sup> , Greiner Bio-One, Solingen
<b>Zellkulturflasche 25 cm<sup>2</sup></b>	Cellstar TC 25 cm <sup>2</sup> , Greiner Bio-One, Solingen
<b>Zellkulturplatten (6 Well), Flachboden</b>	Cellstar 6 Well Platte, Greiner Bio-One, Solingen
<b>Zellkulturplatten (12/24 Well), Flachboden</b>	TC-Platte 12/24 Well, Sarstedt, Nümbrecht
<b>Zellkulturplatten (96 Well), Flachboden</b>	Falcon 96-Well Cell Culture Plate, Corning, USA
<b>Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)</b>	Cellstar Polypropylenröhrchen, Greiner Bio-One, Solingen

### 2.1.3 Medium, Medienzusätze und Antibiotika

Medium, Zusatz	Details, Bezugsquelle
Accutase	Enzyme Cell Detachment Medium, eBioscience, Frankfurt a. M.
Blasticidin	Invivogen, USA
DMEM	Dulbecco's MEM, 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Thermo Fisher Scientific, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem, Darmstadt
FBS (Fetal Bovine Serum)	Sera Plus, Pan-Biotech, Aidenbach
G418 (Geneticin)	Invivogen, USA
Hygromycin B	Invivogen, USA
MEM Non Essentiell Amino Acids 100x (NEAA)	Thermo Fisher Scientific, USA
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Merck Millipore, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Merck Biochrom, Darmstadt
Puromycin	Invivogen, USA
SOC-Medium	Sigma-Aldrich, München

### 2.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Bakterien und Enzyme

Chemikalie, Reagenz	Bezugsquelle
Agarose	SERVA, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
Bbs I	Thermo Fisher Scientific, USA
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin)	AppliChem, Darmstadt
DH5α Bakterien	Thermo Fisher Scientific, USA
DNA-Marker Agarosegel	Invivogen, USA
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Erastin	Merck, Darmstadt
Ferrostatin-1	Xcess Biosciences, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
GSK'872	Merck, Darmstadt

<b>GW806742X</b>	Biomol, Hamburg, Deutschland
<b>HD Green Plus</b>	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
<b>Lipofectamin</b>	Turbofect, Thermo Fisher Scientific, USA
<b>Magermilchpulver</b>	Carl. Roth, Karlsruhe
<b>Marker für SDS-Page</b>	Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad, USA
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Necrostatin-1s</b>	BioVision Inc., Milpitas, USA
<b>Necrosulfonamid (NSA)</b>	Calbiochem, Merck, Darmstadt
<b>PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)</b>	Calbiochem, Merck, Darmstadt
<b>Proteinassay Dye Reagent Concentrate</b>	Bio-Rad, USA
<b>RSL3</b>	Synthese nach Yang <i>et al.</i> , 2014
<b>SDS (Natriumdodecylsulfat)</b>	SERVA, Heidelberg
<b>Smac-mimetic</b>	Absource Diagnostics, München
<b>Tango Puffer</b>	Thermo Fisher Scientific, USA
<b>TEMED</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Abcam, UK
<b>TRIS</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Tween-20</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>T4 Ligase</b>	Thermo Fisher Scientific, USA
<b>T4 Ligase Puffer</b>	Thermo Fisher Scientific, USA
<b>zVAD-fmk</b>	Bachem, Weil

### 2.1.5 Kommerzielle Kits

<b>Kommerzielle Kits</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Chemilumineszenz-Detektion-Kit für die Western Blot-Analyse</b>	Pierce ECL Western Blotting Substrat, Thermo Fisher, USA
<b>LDH-Release Assay</b>	CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, USA
<b>Plasmid-DNA Purification Kit</b>	QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Niederlande

### 2.1.6 Zelllinien

Die Zelllinien, die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit verwendet wurden, lauten wie folgt: NIH3T3, L929, HT-29 sowie HT-1080. Die folgende Tabelle 1 enthält einen Überblick über die Zelllinien sowie das Medium, in denen sie kultiviert wurden. Eine genaue Beschreibung der einzelnen Zelllinien folgt im weiteren Verlauf der Arbeit. Mit Ausnahme der NIH3T3 Zellen wurden die Zelllinien von der American Tissue Culture Collection (ATCC) aus den USA akquiriert. Die ausschließlich in dieser Arbeit verwendeten RIPK3-exprimierenden NIH3T3 Zellen (NIH3T3-N) wurden von Sabine Adam (Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 1: Verwendete Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Kulturmedium</b>	<b>Zusätze</b>
<b>NIH3T3</b>	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM	FBS 10% Pen/Strep 1% G418 1 mg/ml
<b>L929</b>	Murine Bindegewebsfibroblasten	DMEM	FBS 10% Pen/Strep 1% G418 1 mg/ml
<b>HT-29</b>	Humanes kolorektales Adenokarzinom	DMEM	FBS 10% Pen/Strep 1% G418 1 mg/ml
<b>HT-1080</b>	Humanes Fibrosarkom	DMEM	FBS 10% Pen/Strep 1% MEM NEAA 100x 1% G418 1 mg/ml

**NIH3T3.** Die NIH3T3 Zellen entstammen einem murinen Embryo des Stamms Swiss Albino und wurden 1962 erstmals kultiviert (Todaro & Green, 1963). Die Zellen bilden heute den Standard der Fibroblastenzelllinien. Der Grund für die präferierte Arbeit mit dieser Zelllinie liegt in einer bestimmten Eigenschaft: RIPK3-exprimierende NIH3T3 N-Zellen (von nun an nur noch als NIH3T3 bezeichnet) verfügen über die Fähigkeit, nach entsprechender Stimulierung sowohl Nekroptose als auch Ferroptose ablaufen zu lassen, wodurch ein Vergleich der beiden Zelltodwege innerhalb eines Zellsystems möglich ist. Des Weiteren ist das adhärente Wachstum der NIH3T3 Zellen von Vorteil, da dies die mikroskopische Analyse der Zellvitalität erleichtert.

**L929.** L929 Zellen wurden erstmals aus subkutanem Areola- und Fettgewebe einer männlichen C3H/An Maus kultiviert (Sanford et al., 1948). Diese adhärente Zelllinie ist resistent gegen die Ferroptose, jedoch sensitiv für die Nekroptose.

**HT-29.** Diese humane Zelllinie wurde aus dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen Kaukasierin kultiviert (Fogh & Trempe, 1975). HT-29 Zellen sind ebenfalls adhärente Zellen und dienen unter anderem der Studie von Nekroptose, während die Zelllinie resistent für einen ferroptotischen Zelltod ist.

**HT-1080.** Die humane HT-1080 Zelllinie entstammt einem Fibrosarkom eines 35-jährigen kaukasischen Patienten, der zuvor weder Chemo- noch Strahlentherapie erhalten hatte, wodurch wenige Mutationen innerhalb der Zelllinie bestehen (Rasheed et al., 1974). Die adhärennten Zellen verfügen jedoch über eine Mutation des Onkogens Ras. Sie sind damit sensitiv für die Ferroptose und resistent gegen Nekroptose (Brown et al., 1984; Torii et al., 2016).

### 2.1.7 Fluoreszenzreagenzien und Antikörper

Produkt	Verwendung	Hersteller
<b>7-AAD</b>	Durchflusszytometrie	BioLegend, USA
<b>Annexin V-FITC</b>	Durchflusszytometrie	BioLegend, USA
<b>Anti-ACSL4</b>	Western Blot	Abcam, UK
<b>Anti-MLKL</b>	Western Blot	Abcam, UK
<b>Anti-<math>\beta</math>-Actin</b>	Western Blot	Cell Signaling, UK
<b>Anti-phospho MLKL</b>	Western Blot	Abcam, UK

### 2.1.8 Software

CXP Analysis Software, Beckman Coulter, USA

CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9*) design tool: <http://tools.genome-engineering.org>

Microsoft Office 365

### 2.1.9 Plasmid und Expressionsvektor

Für diese Arbeit konnte auf bestehende Zellklone mit Deletionen von *Acs14* und *Mlkl* zurückgegriffen werden. Damit die Hintergründe der Deletion nachvollzogen werden können, werden das verwendete Plasmid sowie Vektoren aufgezeigt:

Plasmid: pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9, Addgene, Plasmid No.42230

Expressionsvektor: pcDNA3.1(+), Invitrogen, No. V790-20

Fluoreszenzvektor: pEGFP-N1

### 2.1.10 Oligonukleotide

Für diese Arbeit konnte auf bestehende Zellklone mit Deletionen von *Acsl4* und *Mkl* zurückgegriffen werden. Damit die Deletionen nachvollzogen werden können, werden die verwendeten Oligonukleotidsequenzen dargestellt:

m*Mkl*\_1.1: GCACACGGTTTCCTAGACGCTGG  
m*Mkl*\_1.2: GACTTCATCAAAACGGCCCAGGG  
m*Mkl*\_3.1: AGGAACATCTTGGACCTCCGTGG  
h*MLKL*\_1.1: AAGAAACAGTGCCGGCGCCTGGG  
h*MLKL*\_1.2: CACACCGTTTGTGGATGACCTGG  
h*MLKL*\_1.3: GGAGCTCTCGCTGTTACTTCAGG  
m*Acsl4*\_1.1: ACAGAGCGATATGGACTTCCAGG  
m*Acsl4*\_1.2: CTAGCTGTCATAGACATCCCTGG  
m*Acsl4*\_3.1: GATTACTAGTGTTGAGCTTCTGG  
h*ACSL4*\_1.1: CTAGCTGTAATAGACATCCCTGG  
h*ACSL4*\_2.1: TGCAATCATCCATTCGGCCCTGG  
h*ACSL4*\_3.1: GATTACCAGTGTTGAACTTCTGG

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit den jeweilig passenden Kulturmedien und Zusätzen (siehe Tabelle 1) in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator unter einer konstanten Temperatur von 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Abhängig von der Teilungsrate der Zellen wurden diese zwei- bis dreimal wöchentlich passagiert. Da alle verwendeten Zelllinien adhärent zu der Oberfläche der Flaschen sind, wurden hierzu das bestehende Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und dann zur Ablösung der Zellen 5 ml Accutase zugeführt. Nach kurzer Inkubation der Zellen bei 37 °C lösten sich die Zellen von der Oberfläche, woraufhin die Zellsuspension mit komplettem Kulturmedium aufgenommen werden konnte. Abhängig von der mikroskopisch bestimmten Zelldichte mit der Neubauer-Zählkammer wurde ein Teil der Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20, bezogen auf die Gesamtmenge der Zellsuspension, der Zellkulturflasche wieder zugeführt.

## 2.2.2 Proteinnachweis

### 2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Um einen spezifischen Nachweis von Proteinen zu ermöglichen, müssen zunächst Zelllysate hergestellt werden. Hiernach liegen die zuvor intrazellulären Proteine löslich im Lysat vor. Die Herstellung wird wie folgt vorgenommen:

Nach Ablösung der Zellen wurden sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße 10 Minuten in einer gekühlten Zentrifuge zentrifugiert (2000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde dann mittels einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das verbliebene Zellpellet mit 1 ml gekühltem PBS resuspendiert. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße 10 Minuten lang zentrifugiert (2000 rpm, 4 °C) und der Überstand abgesaugt. Je nach Größe des verbliebenen Zellpellets wurden zwischen 20 und 30 µl eines Lysis Puffers hinzugefügt, dem ein Proteaseinhibitor zugesetzt wurde. Darauffolgend wurden die Proben 10 Minuten auf Eis gelagert, woraufhin die Proben eine Minute lang mittels eines Vortexers geschüttelt wurden. Nachdem die Zellen nun aufgebrochen waren, wurde das Reaktionsgefäß wiederum zentrifugiert, nun für fünf Minuten und mit einer höheren Zentrifugalkraft (13000 rpm, 4 °C), um etwaige Zellmembranbestandteile zu entfernen. Der proteinreiche Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

**Tabelle 2: Lysis Puffer**

10 mM	Tris-HCl
7,5	pH
50 mM	NaCl
1 %	Triton X-100
30 mM	Natriumpyrophosphat
50 mM	NaF
100 µM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
2 µM	ZnCl <sub>2</sub>
1 mM	PMSF

### 2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um alle Zelllysate auf eine einheitliche Proteinkonzentration von  $c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  einzustellen, wurde die Proteinkonzentration mittels der Bradford-Methode ermittelt (Bradford, 1976). Dieses Verfahren beruht auf der Fähigkeit des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250



Komplexe mit Proteinen zu bilden, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschiebt. Bei diesem Verfahren wurde *Bradford Protein Assay Dye Reagent* in einem Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Folgend wurden 998 µl der verdünnten Bradford Reagenz sowie 2 µl des proteinreichen Überstands in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Als Referenzwert wurde der Bradford Reagenz 2 µl Lysis Puffer hinzugefügt. Alle Proben wurden dann mittels eines Vortexers gründlich miteinander vermengt, in Küvetten überführt und dann deren Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen. Mittels zuvor erstellter Eichgerade konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden. Zur Verdünnung aller Proben auf eine gleiche Konzentration wurden die jeweiligen Mengen Lysis Puffer sowie 5x Probenpuffer nach Laemmli hinzugefügt. Abschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C im Schüttelinkubator bei 950 rpm denaturiert. Die fertigen Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts, unabhängig von ihrem Ladungszustand. Erreicht wird dieses durch die Zugabe von SDS und dem Erhitzen der Proben, da dadurch die Sekundär- und Tertiärstrukturen des Proteins aufbrechen und das Protein sich linearisiert. SDS bindet sich proportional zum Molekulargewicht an das lineare Protein und überlagert die Eigenladung mit seiner eigenen stark negativen Ladung. Um zusätzlich Disulfidbrücken innerhalb des Proteins in freie Thiole zu reduzieren, wurde dem 5x Probenpuffer auch 2-Mercaptoethanol hinzugefügt (Laemmli, 1970).

Zu Beginn wurde das Polyacrylamidgel in einer entsprechenden Gießkammer gegossen. Da eine diskontinuierliche SDS-PAGE genutzt wurde, verfügt das Gel über zwei verschiedene Anteile: ein Sammel- und ein Trenngel. Die beiden Anteile unterscheiden sich in Funktion, pH-Wert sowie Porengröße. In der Gießkammer wurde zwischen einer Glasplatte und einer Porzellanplatte zuerst das Trenngel gegossen. Um u.a. eine waagerechte Kante zu erzeugen, wurde Aqua dest. oben auf das Trenngel geschichtet. Nach dem Aushärten des Gels konnte das Wasser abgegossen werden und das Sammelgel auf das feste Trenngel aufgeschichtet werden. In das Sammelgel wurde ein Probenkamm eingesetzt, der nach dem Entfernen Vertiefungen für die Proben hinterlässt. Nach Einsetzen des polymerisierten Gels in eine Gelelektrophoresekammer wurde die Kammer mit 1x Laufpuffer angefüllt und je 20 µl der vorbereiteten Proben in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Proteinmarker genutzt,

um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine zu bestimmen. Solange sich die Probe im Sammelgel befand, wurde je Gel eine Stromstärke von 20 mA bei einer Spannung von 250 V angelegt. Sobald das Trenngel erreicht wurde, wurde diese auf 40 mA gesteigert. Die Dauer der Elektrophorese variiert je nach Molekülgröße der nachzuweisenden Proteine, doch wird sie zumeist mit dem Auslaufen der ersten Bande beendet.

**Tabelle 3: Trenngel (10 ml) für 10% Polyacrylamidgel**

3,4 ml	30% Bisacrylamid
2,5 ml	4x Trenngelpuffer
4,1 ml	Aqua dest.
100 µl	10% APS in Aqua dest.
10 µl	TEMED

**Tabelle 4: Sammelgel (4 ml) für 3% Polyacrylamidgel**

0,4 ml	30% Bisacrylamid
1 ml	4x Sammelgelpuffer
2,6 ml	Aqua dest.
40 µl	10% APS in Aqua dest.
8 µl	TEMED

**Tabelle 5: 1x Laufpuffer mit SDS**

3,02 g	Tris
14,42 g	Glycin
1000 ml	H <sub>2</sub> O
2,5 ml	20% SDS

#### 2.2.2.4 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen, die durch die SDS-PAGE im Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, indem diese mittels eines Proteintransfers auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen werden (Burnette, 1981). Hierzu wurde das Gel herausgelöst und auf ein Filterpapier gelegt, welches vorher in 1x Laufpuffer ohne SDS-Zusatz getränkt wurde. Darauffolgend wurde eine ebenfalls getränkte Nitrocellulose-Membran blasenfrei auf das Gel aufgebracht, gefolgt von getränktem Filterpapier. Nach dem Einlegen in

einen Semi-Dry Blotter wurde ein senkrechtes elektrisches Feld erzeugt, wodurch sich die Proteine in Richtung Anode aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurde für 70 Minuten eine Spannung von 25 V und eine Stromstärke von 60 mA angelegt. Nachdem die Proteine auf die Membran transferiert wurden, folgten mehrere Waschgänge der Membran in *Tris-buffered saline with Tween-20* (TBS-T). Hiernach verbrachte die Membran eine Stunde auf dem Schwenker in einer 5% Milchpulverlösung in TBS-T, wodurch alle unspezifischen Antikörperbindungsstellen geblockt werden. Nach weiteren Waschgängen der Blotmembran in TBS-T wurde ein spezifischer Primärantikörper in 5% BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin gelöst in TBS-T) gelöst und die Membran hierin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte nach weiteren Waschgängen der Zusatz des Sekundärantikörpers, welcher in einer 5 % Milchpulverlösung angesetzt wurde. Nach einstündigem Schwenken der Membran in der Lösung und anschließenden Waschgängen folgte die Detektion der Proteine. Die wiederholten Waschgänge mit TBS-T dienten der Lösung von unspezifischen Bindungen des Antikörpers. Mittels des Chemilumineszenz-Detektions-Kits konnte ein Signal erzeugt werden, da der Sekundärantikörper mit *horseradish peroxidase* (HRP), eine Meerrettichperoxidase, verknüpft ist. Diese wiederum resultierte in eine Luminolreaktion in der Detektionslösung, woraufhin letztlich die Abbildung und Entwicklung auf Filmpapier folgte.

### **2.2.3 Zelltodassays**

#### **2.2.3.1 Induktion der Nekroptose**

Die Induktion der Nekroptose bedingt eine vorherige Inhibition der zellulären Caspasen, wodurch die Apoptose blockiert wird. Hierzu wurde 15 Minuten vor Zugabe des Nekroptoseinduktors 25 µM des Pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk dem Zellmedium hinzugefügt. Zur Induktion der Nekroptose wurden 100 ng/ml TNF- $\alpha$  zugefügt. Um die Nekroptose zu inhibieren, wurden den Zellen 50 µM Necrostatin-1s zeitgleich mit zVAD-fmk zugefügt, diese inkubierten 15 Minuten vor Induktion der Nekroptose.

#### **2.2.3.2 Induktion der Ferroptose**

Die Ferroptose wurde mit 10 µM Erastin, einem Inhibitor des System X<sub>c</sub><sup>-</sup>-Transporters, induziert. Eine Inhibition der Ferroptose wiederum wurde durch die Zugabe von 1 µM Ferrostatin-1 (Fer-1) bewirkt, welches den Zellen 15 Minuten vor Ferroptoseinduktion zugesetzt wurde.

## 2.2.4 Quantifizierung des Zelltods

### 2.2.4.1 Annexin V/7-AAD

Die Analyse des Zelltods erfolgte mit einem Durchflusszytometer (Cytomics FC 500), nachdem die Zellen eine Färbung mit Annexin V und 7-AAD durchliefen. Annexin V ermöglicht das Anfärben von Phosphatidylserinen, welche als frühes Zeichen des Zelltods von der zytosolischen Seite der Zellmembran nach außen translozieren (Vermes et al., 1995). Um das Annexin V fluoreszenzspektroskopisch detektieren zu können, bedarf es einer Kopplung mit dem Fluoresceinderivat FITC, dessen Emission bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen wird. 7-AAD ist hingegen ein fluoreszierender DNA-Interkalator, welcher erst nach Verlust der Membranintegrität in die Zelle bzw. DNA eindringen kann. Dieser ist somit ein Zeichen für einen nekrotischen Zellmembranzerfall (Zimmermann & Meyer, 2011). Die Emissionsmessung erfolgt bei einer Wellenlänge von 675 nm.

Die Zellen wurden nach einer zuvor definierten Inkubationszeit abgelöst, in ein Durchflusszytometer-Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen sowie folgend für 15 Minuten in Dunkelheit inkubiert (gefärbt). Hierzu wurde jede Probe in 100 µl des folgenden Mastermixes inkubiert: 92,5 µl Annexin V Binding Buffer, 5 µl Annexin V-FITC, sowie 2,5 µl 7-AAD. Im Anschluss wurden weitere 600 µl gekühltes PBS hinzugefügt, die Proben fluoreszenzspektroskopisch analysiert und die logarithmische Verstärkung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur Referenzprobe bestimmt. Anhand dieser Signalverstärkung kann der prozentuale Anteil toter Zellen an der Gesamtpopulation ermittelt werden.

### 2.2.4.2 Bodipy 581/591 C11

Bodipy 581/591 C11 ist ein Fluoreszenzsensor für die Lipidperoxidation einer Zelle. Eine C11-Fettsäurekette verleiht dem Molekül eine Lipophilie, welches sich somit in die Lipiddoppelmembran der Zelle einlagern kann. Nach Oxidation des Moleküls durch ROS verändert sich die Farbe des Fluoreszenzsignals von Rot ( $\lambda=595$  nm) auf Grün ( $\lambda=520$  nm). Das Molekül wird bevorzugt von Peroxylradikalen ( $\text{ROO}\cdot$ ) oxidiert, doch auch von Hydroxyl-, Alkoxyradikalen sowie Peroxinitrit-Anionen (Gomes et al., 2005).

Die Proben wurden nach Zentrifugation im Durchflusszytometer-Röhrchen mit 2 µM Bodipy 581/591 C11 in 500 µl PBS resuspendiert und daraufhin für 10 Minuten bei 37 °C in Dunkelheit

inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation erfolgte die Resuspension in 600  $\mu$ l PBS und die fluoreszenzspektroskopische Analyse im Durchflusszytometer.

#### **2.2.4.4 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben  $t$ -Test. Als Signifikanzniveau galt  $p < 0,05$ , wobei weitere Differenzierungen bei  $p < 0,02$  sowie  $p < 0,001$  vorgenommen wurden. Entsprechende statistische Signifikanzen wurden mittels Asterisk (\*) markiert.

## 3 Ergebnisse

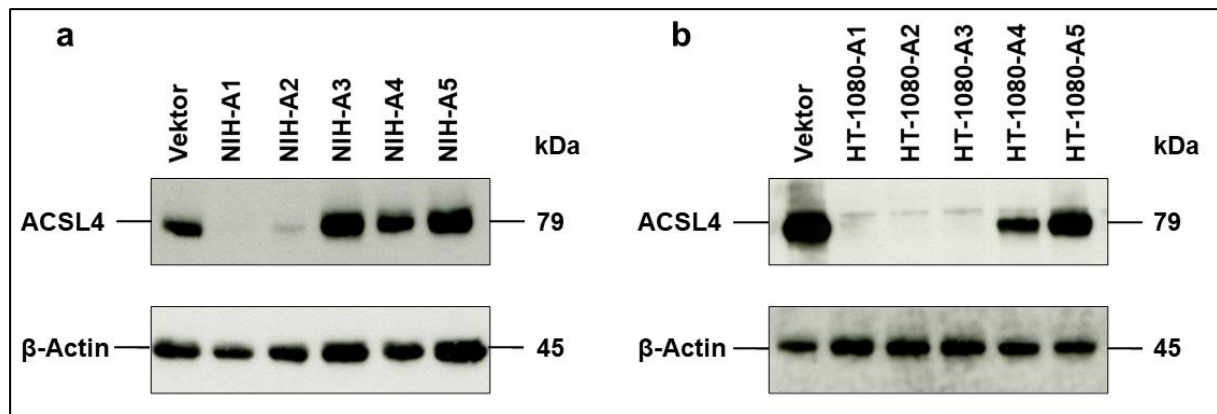
### 3.1. Bedeutung von ACSL4 in der Ferroptose

Um den Einfluss von ACSL4 im Ablauf der Ferroptose zu bestimmen, erfolgten Untersuchungen an Tumorzellpopulationen, in denen mittels CRISPR/Cas9 das korrespondierende Gen erfolgreich deletiert wurde. CRISPR/Cas9 stellt ein revolutionäres Werkzeug dar, mit dem genetische Veränderungen, wie zum Beispiel Deletionen, gezielt durchgeführt werden können (Cong et al., 2013; Deltcheva et al., 2011; Jinek et al., 2012). Durch einen Mangel des entsprechenden Proteins in der Zelle können Rückschlüsse auf die Funktion des Moleküls in der Zelltodentität der Ferroptose gezogen werden. In dieser Arbeit konnte auf Klone der murinen Zelllinie NIH3T3 sowie der humanen Zelllinie HT-1080 zurückgegriffen werden, in denen bereits eine Deletion von *Acs14* bzw. *ACSL4* mittels CRISPR/Cas9 vollzogen wurde. Im Rahmen dieses Verfahrens wurden multiple Einzelklone nach der Transfektion der Zellen angezüchtet und die erfolgte Deletion auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft.

#### 3.1.1 Nachweis der erfolgreichen *Acs14*-Deletion

Fünf Klone einer vorselektierten Auswahl beider Zelllinien wurden ausgewählt, mit A1 bis A5 betitelt, und mittels Western Blot überprüft. Vorausgehend sei angemerkt, dass die jeweiligen Klone keine mikroskopischen Unterscheidungen oder aberrantes Verhalten in der Zellkultur im Vergleich zu den nicht editierten Zellen aufwiesen. Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden, dienten als Kontrolle einer korrekten Versuchsdurchführung, ebenso wie der Nachweis des Proteins  $\beta$ -Actin mit einer Größe von 45 Kilodalton (kDa) als Ladungskontrolle. Das nachzuweisende Protein ACSL4 weist eine Größe von 79 kDa auf. Beim Western Blot der NIH3T3 Klone zeigten NIH-A3 bis NIH-A5 eine starke ACSL4 Bande, somit scheiterte in diesen Klonen die genetische Deletion. NIH-A2 wies eine schwache Bande auf und NIH-A1 zeigte keinerlei Signal auf Höhe von 79 kDa (Abbildung 5a). Aufgrund des Nachweises einer erfolgreichen Deletion von *Acs14* im Klon NIH-A1 wurde dieser Klon für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Im Western Blot der HT-1080 Zelllinie zeigten die Klone HT-1080-A4 sowie HT-1080-A5 eine deutliche Bande auf Höhe von 79 KDa, während in den übrigen Klonen (HT-1080-A1 bis HT-1080-A3) kein Nachweis von ACSL4 erfolgte und eine erfolgreiche Deletion nachgewiesen wurde (Abbildung 5b). Der Klon HT-1080-A1 wurde für die nachfolgenden Versuche ausgewählt.



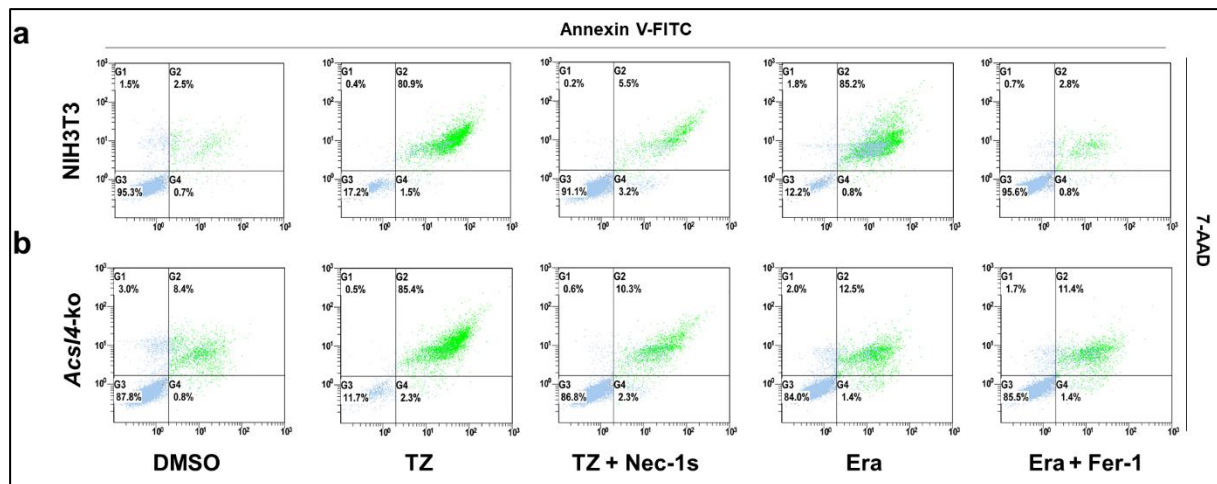
**Abbildung 5: Deletionsnachweis von *AcsI4* auf Proteinebene mittels Western Blot**

**a)** Fünf verschiedene Klone der Zelllinie NIH3T3 (A1-A5) bzw. **b)** der Zelllinie HT-1080 (A1-A5) sind dargestellt, in denen der Versuch einer Deletion von *AcsI4*/*ACSL4* mittels CRISPR/Cas9 vorgenommen wurde. Zum Nachweis einer erfolgreichen Deletion des Zielgens wurde die Expression von *ACSL4* mittels Western Blot ermittelt und eine fehlende Expression des Proteins als erfolgreiche Deletion des korrespondierenden Gens gewertet. Als Negativkontrolle dienten Lysate von Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden. Der Blot wurde mit einem *ACSL4*-Antikörper entwickelt und Banden auf Höhe von 79 kDa dargestellt. Es folgte ein  $\beta$ -Actin-Antikörper als Kontrolle der korrekten Proteinbeladung. Für die nachfolgende Versuche wurden die Klone NIH-A1 und HT-1080-A1 ausgewählt.

### 3.1.2 Zelltodassays in *AcsI4*-ko NIH3T3 Zellen

Nach der Selektion eines Klon mit erfolgreicher Deletion von *AcsI4* wurden Zelltodassays durchgeführt, um den zuvor postulierten Effekt der genetischen Deletion zu untersuchen. Hierbei wurden ausschließlich Versuche unter Verwendung von NIH3T3 N-Zellen (Klonen) vorgenommen, da sich diese Zelllinie auch für nekroptotische Zelltodassays eignen. HT-1080 Zellen exprimieren kein RIPK3 und sind daher *per se* nicht für eine RIPK3-medierte Nekroptose sensibel.

Die Zelltodassays erfolgten simultan in nicht modifizierten NIH3T3 Zellen sowie dem *AcsI4*-ko Klon NIH-A1. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Zugabe des Lösungsmittel DMSO, in dem die Zelltodinduktoren wie auch Inhibitoren gelöst sind. Ferner erfolgten nicht nur Ferroptose- sondern auch Nekroptoseassays, um die Zelltod-Spezifität zu überprüfen. Der Zelltodnachweis erfolgte über die Markierung der Zellen mit Annexin V-FITC sowie 7-AAD und folgender durchflusszytometrischer Zelltodmessung.



**Abbildung 6: Zelltodassays unter Verwendung von *Acs/4*-ko NIH3T3 Zellen**

Abgebildet sind durchflusszytometrische Zelltodanalysen mit 7-AAD sowie mit Annexin V-FITC. Die NIH3T3 N-Zellen wurden für 16 Stunden bei 37 °C mit einer der folgenden Substanzen bzw. Substanzkombinationen behandelt: DMSO als Lösungsmittel, 100 ng/ml TNF- $\alpha$  + 25  $\mu$ M zVAD-fmk (TZ), 100 ng/ml TNF- $\alpha$  + 25  $\mu$ M zVAD-fmk + 50  $\mu$ M Necrostatin-1s (TZ + Nec-1s), 10  $\mu$ M Erastin (Era) oder 10  $\mu$ M Erastin + 1  $\mu$ M Ferrostatin-1 (Era + Fer-1). Die Inhibitoren Nec-1s bzw. Fer-1 wurden 15 Minuten vor Gabe der Zelltodinduktoren hinzugefügt. Aufgeführt sind Versuche an **a)** parental NIH3T3 und **b)** *Acs/4*-knockout Zellen (n = 3).

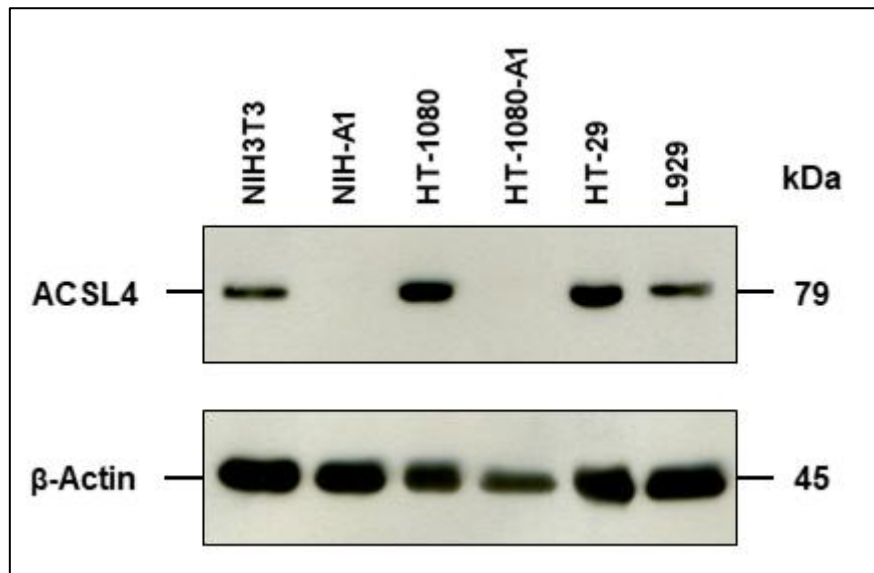
Die *Acs/4*-ko NIH3T3 Zellen stellten sich weiterhin empfänglich für den nekroptischen Zelltod dar, sodass durch die Deletion dieses Gens keine Zellprotektion gegenüber der Nekroptose bestand (Abbildung 6). Bemerkenswert war hier jedoch eine verminderte Zellvitalität (11,7%) der *Acs/4*-ko Zellen im Vergleich zu den nativen NIH3T3 (17,2%) Zellen, welche sich reproduzieren ließ (nicht dargestellt). Eine Inkubation mit dem Nekroptoseinhibitor Nec-1s inhibierte auch in den *Acs/4*-ko NIH3T3 wirksam den nekroptotisch-induzierten Zelltod. Im Ferroptoseassay, induziert durch 10  $\mu$ M Erastin, wiesen die *Acs/4*-ko Zellen einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den parental Zellen auf. 84,0% (Mittelwert 88,6%, Standardabweichung (SD) 4,2) der gendeletierten Zellen überlebten im Vergleich zu nur 12,2% (Mittelwert 15,7%, SD 8,4) der parental Zellen, sogleich entsprach dies dem Kontrollansatz mit einer Lebendrate von 87,8% (Mittelwert 92,3%, SD 4,0). Auch eine vorherige Inkubation mit dem Ferroptoseinhibitor Fer-1 bewirkte keinen zusätzlichen Überlebensvorteil, sodass die *Acs/4*-ko NIH3T3 eine komplette Protektion gegenüber dem ferroptischen Zelltod aufwiesen. Insgesamt ist zu vermerken, dass die *Acs/4*-ko Zellen im Vergleich zu den nicht editierten Zellen eine leicht erhöhte Rate toter Zellen im Kontrollansatz aufwiesen, was sich auch bei Wiederholung der Versuche bestätigte.

### 3.1.3 Bestimmung von ACSL4 in unterschiedlichen Zelllinien

Nachdem der Nachweis erfolgte, dass die Deletion von *Acs/4* spezifisch die Ferroptose inhibiert, stellte sich die Frage, ob die habituelle Protektion einiger Zelllinien gegenüber der



Ferroptose durch ein Fehlen von ACSL4 begründet ist. Daher erfolgte der Nachweis von ACSL4 mittels Western Blot in den Zelllinien HT-29 sowie L929, welche sich nicht sensitiv für die Ferroptose zeigen. Als Kontrolle dienten hierbei sowohl NIH3T3 und HT-1080, welche für die Ferroptose sensitiv sind, sowie deren *Acs14*-ko Klone.



**Abbildung 7: Expression von ACSL4 in unterschiedlichen Zelllinien**

Exemplarisch ist die Expression von ACSL4 in parental NIH3T3 Zellen und HT-1080-Zellen im Vergleich zu den verwendeten knockout Zellklonen dargestellt. Weiterhin ist die ACSL4-Expression in parental HT-29 und L929-Zellen, welche nicht für die Ferroptose sensitiv sind, mittels Western Blot dargestellt. Der Blot wurde mit einem ACSL4-Antikörper entwickelt und Proteinbanden auf Höhe der 79 kDa dargestellt. Es folgte ein  $\beta$ -Actin-Antikörper (45 kDa) als Kontrolle der korrekten Proteinbeladung.

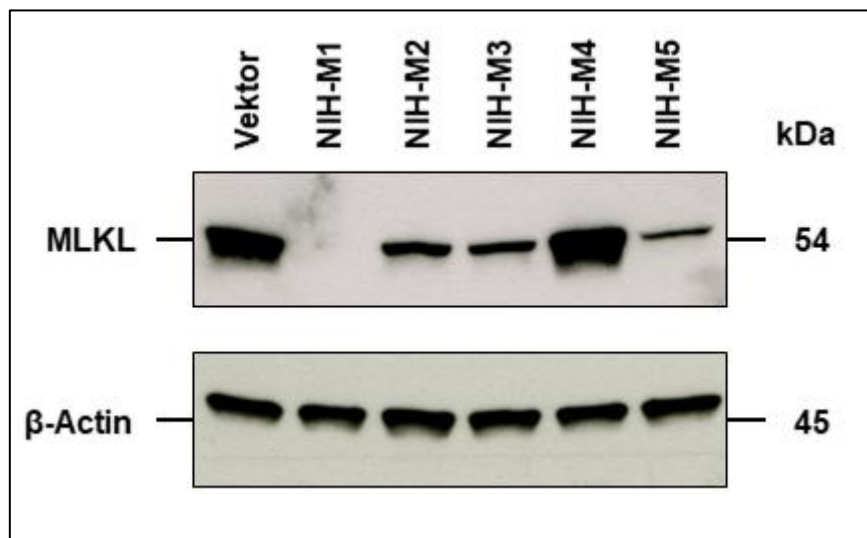
Es stellte sich hierbei dar, dass auch die Zelllinien HT-29 und L929 über eine ACSL4 Expression verfügen. Somit basiert deren Resistenz vor der Ferroptose nicht auf einer habituellen Deletion von *Acs14*/*ACSL4*, sondern auf anderen Protektionsmechanismen.

### 3.2 Untersuchung einer Interaktion von Ferroptose und Nekroptose

Die *Acs14*-ko NIH3T3 Zellen wurden zuvor sowohl Ferroptose- als auch Nekroptoseassays im Vergleich zu nativen Zellen unterzogen (Abbildung 6). Hierbei stellte sich in den Nekroptoseassays nach identischer Induktion des Zelltods eine verminderte Vitalität der *Acs14*-ko Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation dar, welche sich erstmal nicht erklärte. Um diese Diskrepanz näher zu untersuchen, wurden weitere vergleichende Untersuchungen der Ferroptose und Nekroptose unter Nutzung von sowohl *Acs14*-ko als auch *Mkl1*-ko NIH3T3 Zellen angestrebt. Daher erfolgte zunächst die Auswahl eines Zellklons mit suffizienter *Mkl1*-Deletion sowie die Etablierung der Resistenz gegenüber der Nekroptose.

### 3.2.1 Nachweis der erfolgreichen *Mkl*-Deletion

MLKL stellt ein Effektorprotein der Nekroptose dar, sodass durch dessen Gendeletion die Zellen vor einem nekroptotischen Zelltod geschützt sind. NIH3T3 Zellen sind sowohl für den nekroptotischen als auch ferroptotischen Zelltod empfänglich und wurden deshalb für die nachfolgenden Versuche ausgewählt.



**Abbildung 8: Deletionsnachweis von *Mkl* auf Proteinebene mittels Western Blot**

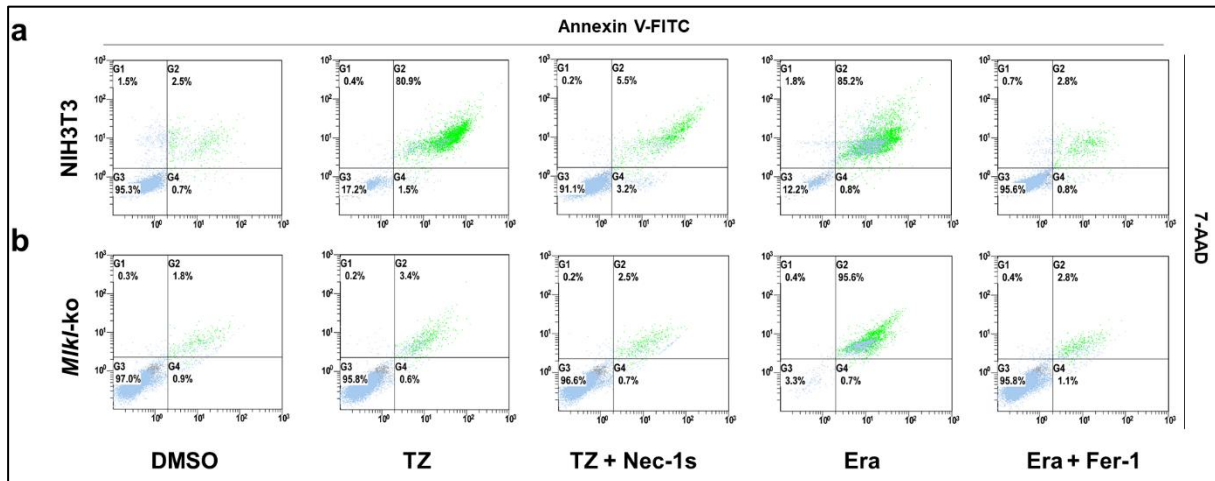
Fünf verschiedene Klone der NIH3T3 Zellen (M1-M5) sind aufgeführt, in denen der Versuch einer Deletion von *Mkl* mittels CRISPR/Cas9 vorgenommen wurde. Zum Nachweis einer erfolgreichen Deletion des Zielgens wurde die Expression von MLKL mittels Western Blot ermittelt und eine fehlende Expression des Proteins als erfolgreiche Deletion gewertet. Als Negativkontrolle dienten Lysate von Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden. Der Blot wurde mit einem MLKL-Antikörper entwickelt und Banden auf Höhe von 54 kDa dargestellt. Es folgte ein  $\beta$ -Actin-Antikörper (45 kDa) als Kontrolle der korrekten Proteinbeladung. Für nachfolgende Versuche wurde der Klon NIH-M1 ausgewählt.

Fünf *Mkl*-ko NIH3T3 Klone wurden vorselektiert und mit NIH-M1 bis NIH-M5 bezeichnet. Als Kontrolle diente ein Klon, welcher mit einem leeren Vektor transfiziert wurde. Es erfolgte die Auftrennung der Zellproteine in der Gelelektrophorese und Nachweis der Expression von MLKL mittels eines spezifischen Antikörpers. Das Protein MLKL stellt sich hierbei mit einer Größe von 54 kDa dar. Nach Markierung von MLKL erfolgte eine Kontrolle der korrekten Beladung mittels Nachweises von  $\beta$ -Actin. In den Klonen NIH-M2 bis NIH-M5 stellte sich eine 54 kDa Bande dar, somit schlug die Gendeletion in diesen Klonen fehl. Lediglich NIH-M1 wies eine erfolgreiche Deletion von *Mkl* auf, somit wurde dieser Klon für die weiteren Versuche ausgewählt.

### 3.2.2 Zelltodassays in *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen

Während eine Deletion von *Mkl* Zellen bekanntermaßen vor dem nekroptotischen Zelltod bewahrt, wurde der generierte *Mkl*-ko NIH-M1 Klon einem Nekroptoseassays mit 100 ng/ml

TNF- $\alpha$  und 25  $\mu$ M zVAD-fmk über 16 Stunden unterzogen, um auch einen funktionellen Nachweis der erfolgten Gendeletion aufzuzeigen. Zusätzlich wurden an dem *Mkl*-ko NIH-M1 Zellklon Ferroptoseassays mit 10  $\mu$ M Erastin durchgeführt, um mitunter einen Effekt der *Mkl*-Deletion auf die Ferroptose zu überprüfen. Zum Nachweis des Zelltods erfolgte die folgende Markierung der Zellen mit Annexin V-FITC und 7-AAD und die Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie.



**Abbildung 9: Zelltodassays unter Verwendung von *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen**

Abgebildet sind durchflusszytometrische Zellanalysen mit 7-AAD, einem Marker für Nekrose, sowie mit Annexin V-FITC, einem Marker für Phosphatidylserine. Die NIH3T3 Zellen wurden für 16 Stunden bei 37 °C mit einer der folgenden Substanzen bzw. Substanzkombinationen behandelt: DMSO als Lösungsmittel, 100 ng/ml TNF- $\alpha$  + 25  $\mu$ M zVAD-fmk (TZ), 100 ng/ml TNF- $\alpha$  + 25  $\mu$ M zVAD-fmk + 50  $\mu$ M Necrostatin-1s (TZ + Nec-1s), 10  $\mu$ M Erastin (Era) oder 10  $\mu$ M Erastin + 1  $\mu$ M Ferrostatin-1 (Era + Fer-1). Die Inhibitoren Nec-1s bzw. Fer-1 wurden 15 Minuten vor Gabe der Zelltodinduktoren hinzugefügt. Aufgeführt sind Versuche an **a)** parentalen und **b)** *Mkl*-knockout Zellen (n = 3).

Der *Mkl*-ko NIH-M1 Klon stellt sich in der Durchflusszytometrie mit einer Zellvitalität von 97,0% (Mittelwert 94,3%, SD 2,8) resistent gegenüber dem nekroptotischen Zelltod dar (Abbildung 9). Die Kontrollpopulation wies eine Zellvitalität von 95,3% (Mittelwert 96,2%, SD 1,3) auf. Der verwendete Zellklon zeigte sich nach Zusatz von Erastin weiterhin sensibel für den ferroptotischen Zelltod und wurde durch eine vorherige Inkubation mit Fer-1 ebenso wie die nativen Kontrollzellen vor Ferroptose geschützt. Die *Mkl*-ko NIH-M1 wiesen jedoch im Ferroptoseassay eine verringerte Zellvitalität von nur 3,3% (Mittelwert 5,8%, SD 2,8) im Vergleich zu 12,2% (Mittelwert 15,7%, SD 8,4) der Kontrollpopulation auf. Somit stellte sich in den Ferroptoseassays der *Mkl*-ko Zellen eine äquivalente Beobachtung wie zuvor in den *Acsf4*-ko Zellen im Rahmen der Nekroptose dar (Abbildung 6).

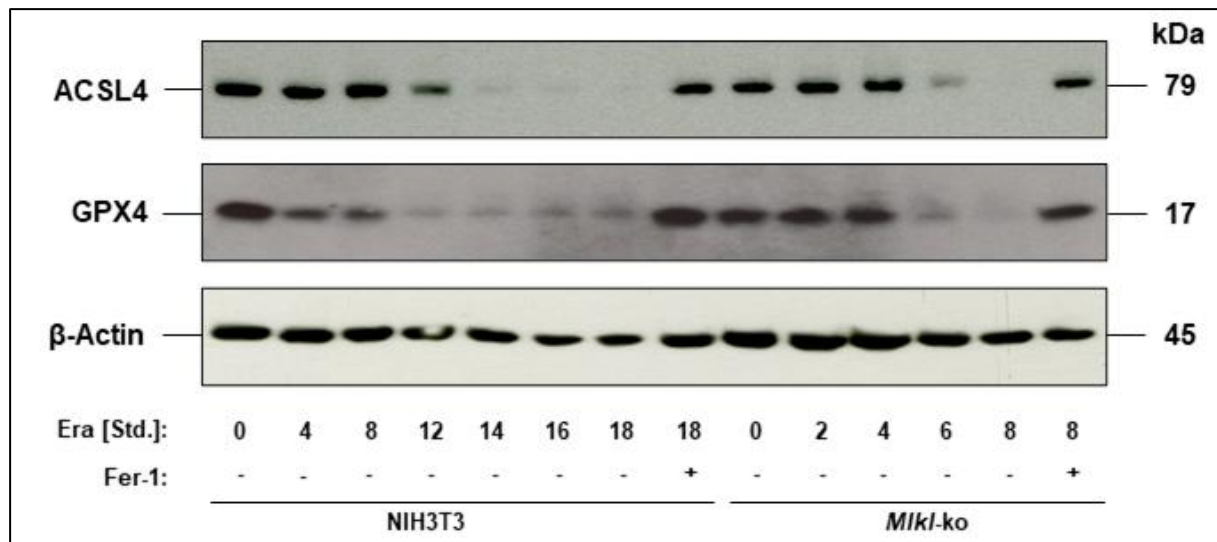
### 3.3 Untersuchung der Schlüsselproteine im Verlauf von Zelltodassays

Um die zuvor beschriebene Divergenz in der Zellvitalität der *Acs14*-ko Zellen in der Nekroptose sowie der *Mkl*-ko Zellen in der Ferroptose weiter zu untersuchen, folgten Zelltodassays sowohl an den *Acs14*-ko als auch an den *Mkl*-ko Klonen im Vergleich zu nativen, nicht editierten NIH3T3 Zellen über eine Zeitdauer von bis zu 18 Stunden. Hierbei wurden die jeweiligen Expressionslevel der beiden Schlüsselproteine ACSL4 bzw. MLKL nach Zelltodinduktion in unterschiedlichen Zeitabständen mittels Western Blot überprüft. Hierdurch sollte das Verhalten der jeweiligen zelltodspezifischen Schlüsselproteine über eine Zeitachse dargestellt werden, um die zuvor beobachteten Unterschiede der Zellvitalität weiter zu ergründen. Als Kontrolle dienten Versuchsansätze unter Verwendung der jeweiligen Zelltodinhibitoren Fer-1 (Ferroptose) und Nec-1s (Nekroptose).

#### 3.3.1 Bestimmung von ACSL4 und GPX4 im zeitlichen Verlauf der Ferroptose

Native NIH3T3 Zellen sowie *Mkl*-ko Zellen wurden Ferroptoseassays unter Induktion mit 10  $\mu$ M Erastin unterzogen. Hiernach wurden im zweistündlichen Rhythmus nach Induktion die Expressionslevel von ACSL4 sowie GPX4 mittels Western Blot bestimmt. Da der Zelltodinduktor Erastin seine Wirkung durch eine Inhibition des System X<sub>c</sub><sup>-</sup> Transporters vermittelt, welcher in der ferroptotischen Signalkaskade GPX4 vorgeschaltet ist, wird die Expression von GPX4 nicht direkt durch den Zelltodinduktor beeinflusst, wie dies z.B. durch RSL3 der Fall ist.

Wie zuvor in Abbildung 9 dargestellt, sind 16 Stunden nach Induktion des Zelltods bereits ein Großteil der Zellen dem Zelltod erlegen. Daher erfolgten Versuchsansätze im zweistündigen Intervall bis zu einer maximalen Inkubationszeit von 18 Stunden. Ansätze mit 1  $\mu$ M Ferrostatin-1 dienten als Kontrolle. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse sind die nativen NIH3T3 Zellen sowie die *Mkl*-ko Zellen mit unterschiedlichen Zeitachsen dargestellt.



**Abbildung 10: Bestimmung von ACSL4 und GPX4 im zeitlichen Verlauf der Ferroptose**

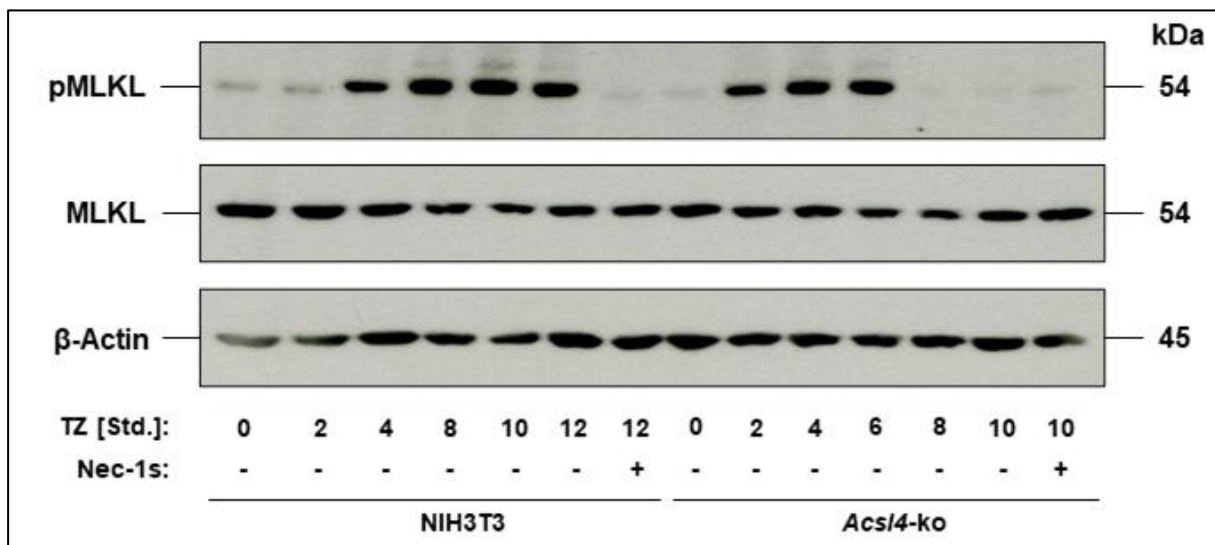
Native NIH3T3 Zellen und *Mkl*-knockout Zellen wurden mit 10  $\mu$ M Erastin (Era) über unterschiedliche Zeiträume hinweg stimuliert, ein Kontrollansatz wurde zuvor mit 1  $\mu$ M Ferrostatin-1 (Fer-1) inkubiert, wie entsprechend in der Abbildung gekennzeichnet. Je Spur wurden 20  $\mu$ g Protein aufgetragen und die Expression von ACSL4 (79 kDa), GPX4 (17 kDa) sowie  $\beta$ -Actin (45 kDa) mittels Western Blot bestimmt. Man beachte die unterschiedlichen Stimulationszeiten zwischen nativen und *Mkl*-knockout Zellen zur Akzentuierung der Unterschiede.

Aus Abbildung 10 wird ersichtlich, dass die Expression von ACSL4 in den nativen NIH3T3 Zellen ab Stunde 12 nach Ferroptoseinduktion abnahm und nach Stunde 14 erlosch, während das Signal von GPX4 ab Stunde 12 signifikant reduziert ist. In der Kontrolle unter Inhibition des Zelltods mit Fer-1 zeigte sich keine Veränderung in der Expression von ACSL4 oder GPX4. Bei Betrachtung der *Mkl*-ko NIH3T3 zeigte sich ein vermindertes Signal von sowohl ACSL4 als auch GPX4 allerdings bereits nach 6 Stunden Inkubationszeit sowie ein kompletter Signalverlust nach 8 Stunden. Somit zeigte sich der Signalverlust der beiden Proteine in den *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen circa 6 Stunden früher als in der Vergleichspopulation, passend zu den vorherigen Beobachtungen der divergierenden Zellvitalität in der Durchflusszytometrie. Anhand dieser Beobachtungen schlossen sich Nekroptoseassays an *Acs14*-ko NIH3T3 Zellen mit vergleichbarem Versuchsaufbau an, um zu überprüfen, ob sich diese Ergebnisse in den *Acs14*-ko Zellen spiegeln.

### 3.3.2 Bestimmung von pMLKL und MLKL im Verlauf der Nekroptose

MLKL stellt das Effektorprotein der Nekroptose dar. Im Rahmen des nekroptotischen Zelltods wird das Protein phosphoryliert und oligomerisiert. Hiernach transloziert das Molekül an die Zellmembran. Das phosphorylierte MLKL stellt somit die aktive, zelltodinduzierende Form des Proteins dar. Um das Verhalten beider Zellpopulationen im nekroptotischen Zelltod zu vergleichen, wurde somit die Expression des phosphorylierten MLKL (pMLKL) sowie des nicht phosphorylierten (aktivierten) MLKL im Western Blot bestimmt. Die Versuchsanordnung

orientierte sich an der zuvor beschriebenen Versuchsreihe (siehe 3.3.1). Sowohl native als auch *Acs/4*-ko NIH3T3 Zellen wurden in zweistündigen Intervallen einem Nekroptoseassays bis zu einer maximalen Inkubationsdauer von 12 Stunden unterzogen. Als Kontrolle dienten Ansätze mit vorheriger Zellinkubation mit 50  $\mu$ M Nec-1s. Es erfolgte die Induktion der Nekroptose durch Zusatz von 100 ng/ml TNF- $\alpha$  und 25  $\mu$ M zVAD-fmk.



**Abbildung 11: Nachweis von aktiviertem pMLKL im zeitlichen Verlauf der Nekroptose**

Native und *Acs/4*-knockout NIH3T3 Zellen wurden mit 100 ng/ml TNF- $\alpha$  + 25  $\mu$ M zVAD-fmk (TZ) über unterschiedliche Zeiträume hinweg stimuliert, ein Kontrollansatz wurde zuvor additiv mit Necrostatin-1s (Nec-1s) inkubiert, wie entsprechend in der Abbildung gekennzeichnet. Je Spur wurden 20  $\mu$ g Protein aufgetragen und die phospho-MLKL (pMLKL) Expression (54 kDa) mittels Western Blot analysiert. Man beachte die unterschiedlichen Stimulationszeiten zwischen den nativen und *Acs/4*-knockout Zellen zur Akzentuierung der Unterschiede. Es folgte die Entwicklung mit einem MLKL-Antikörper (54 kDa) sowie einem  $\beta$ -Actin-Antikörper (45 kDa).

In den nativen NIH3T3 Zellen erfolgte nach 4 Stunden eine messbare Phosphorylierung von MLKL mit einer Persistenz der pMLKL Expression bis zur Stunde 12. Die Expression des nicht phosphorylierten MLKL verblieb unverändert. Bei Nekroptoseinhibition mittels Nec-1s konnte erwartungsgemäß kein pMLKL Signal nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der *Acs/4*-ko NIH3T3 N-Zellen zeigte sich bereits zwei Stunden nach Nekroptoseinduktion eine Aktivierung bzw. Phosphorylierung von MLKL, diese war jedoch wieder ab Stunde 8 erloschen. Die MLKL-Banden stellten sich wie zu erwarten unverändert dar, während bei Zelltodinhhibition keine pMLKL Expression nachgewiesen werden konnte. Somit erfolgte bei Nekroptoseinduktion in den *Acs/4*-ko NIH3T3 eine Phosphorylierung von MLKL zwei Stunden früher als in vergleichbaren nativen Zellen und nahm auch zu einem früheren Zeitpunkt bereits wieder ab.

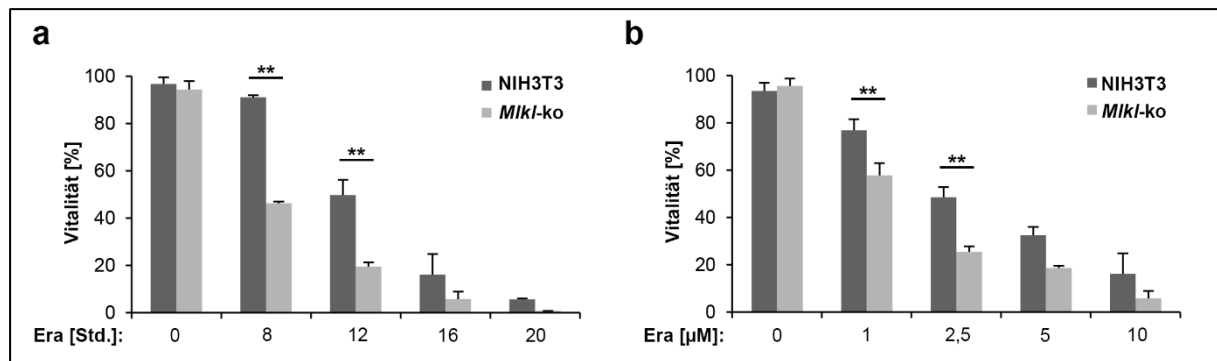
### 3.4 Durchflusszytometrische Zelltodanalysen in Ferroptose- und Nekroptoseassays

Basierend auf den zuvor gewonnenen Daten in Form eines früheren Nachweises einer Phosphorylierung von MLKL bei *Acsf4*-ko NIH3T3 in der Nekroptose und eines früheren Abfalls der ferroptotischen Schlüsselproteine GPX4 und ACSL4 in den *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen in der Ferroptose stellte der nächste Schritt die durchflusszytometrische Quantifizierung der Zellvitalität dar. Bisher konnte eine Diskrepanz der Zellvitalität innerhalb der Ferroptose als auch der Nekroptose nach 16 Stunden beschrieben werden (siehe Abbildungen 6 und 9), jedoch wiesen die Zellen zu diesem Zeitpunkt nur noch eine geringe Vitalität auf. Die Untersuchung der Schlüsselproteine im Western Blot stellte bereits zwei bzw. sechs Stunden nach der jeweiligen Zelltodinduktion eine messbare Abweichung dar, weshalb eine Betrachtung der Zellvitalität über eine zeitliche Achse angestrebt wurde. Zudem erfolgten die bisher angeführten Zelltodassays mit einer unveränderten Konzentration der Zelltodinduktoren, sodass diese in einem zweiten Versuchsansatz ebenfalls variiert wurden.

#### 3.4.1 Zellvitalitätsmessungen in Ferroptoseassays mit *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen

Es erfolgten Ferroptoseassays an nativen NIH3T3 und *Mkl*-ko NIH3T3 N-Zellen mit variierender Inkubationsdauer von 8, 12, 16 sowie 20 Stunden. Wie in Abbildung 12a dargestellt, wurde die Ferroptose mit 10  $\mu$ M Erastin induziert. Beide Zellpopulationen wiesen vor Beginn der Ferroptoseinduktion eine vergleichbare Zellvitalität von 96,7% (SD 2,8) bei den nativen Zellen bzw. 94,3% (SD 3,5) bei den *Mkl*-ko NIH3T3 auf. Nach einer achtstündigen Inkubationszeit in Gegenwart von Erastin stellte sich bei den *Mkl*-ko NIH3T3 bereits eine Reduktion der Zellvitalität auf 46,3% (SD 0,7) im Mittel dar. Die nativen Zellen hingegen wiesen zu diesem Zeitpunkt eine weiterhin hohe Vitalität von 91,0% (SD 0,8) auf. Nach 12 Stunden Inkubation der Zellen mit Erastin war weiterhin eine deutliche Diskrepanz messbar. Die *Mkl*-ko Zellen präsentierten eine verbliebene Zellvitalität von 19,6% (SD 1,8) gegenüber 49,7% (SD 6,4) in der nativen Kontrollpopulation. Die Unterschiede zeigten sich auch in der statistischen Analyse mittels *t*-Test signifikant mit einem *p*-Wert < 0,02. Zu späteren Messpunkten des Ferroptoseassays glichen sich die zwei Zellpopulationen wieder durch den dann nahezu vollständig erfolgten Untergang der Zellen an. Nach 20 Stunden lebten nur noch 5,7% (SD 0,4) der nativen Zellen gegenüber 0,8% (SD 0,0) der *Mkl*-ko NIH3T3.





**Abbildung 12: Ferroptoseassays in parentalen vs. *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen**

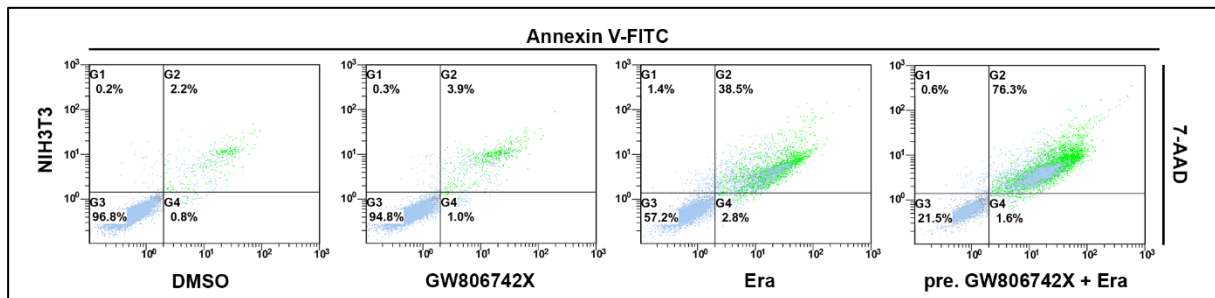
Dargestellt sind Zellvitalitätsmessungen in nativen und *Mkl*-knockout NIH3T3 N-Zellen in der Ferroptose. **a)** Die Zellen wurden über die indizierten Zeiträume bei 37 °C mit 10 µM Erastin (Era) stimuliert. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte mittels durchflusszytometrischer Zellanlyse nach Anfärbung der Zellen mit Annexin V-FITC und 7-AAD. Der Mittelwert und die Standardabweichung repräsentieren das Ergebnis dreier Experimente. **b)** Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden bei 37 °C mit den indizierten Konzentrationen von Erastin (Era) stimuliert. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte mittels durchflusszytometrischer Zellanlyse nach Anfärbung der Zellen mit Annexin V-FITC und 7-AAD (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ;  $n = 3$ ).

Zudem erfolgten Ferroptoseassays über jeweils 16 Stunden mit einer variierenden Konzentration von Erastin im Bereich von 1 bis 10 µM (Abbildung 12b). Als Kontrolle dienten Versuchsansätze mit Zugabe von DMSO. In den Kontrollansätzen ohne Zugabe von Erastin wiesen die nativen NIH3T3 Zellen eine Vitalität von 93,4% (SD 3,6) gegenüber 95,7% (SD 3,1) der *Mkl*-ko Zellen auf. Unter Ferroptoseinduktion mit 1 µM Erastin über 16 Stunden verblieben in der nativen Zellpopulation 76,9% (SD 4,6) vitale Zellen und somit signifikant mehr als in den *Mkl*-ko Zellen mit nur noch 57,8% (SD 5,2). Auch im Ferroptoseassay mit 2,5 µM Erastin zeigten sich signifikante Differenzen. Während die nativen Zellen noch zu 48,5% (SD 4,4) vital waren, lebten in der *Mkl*-ko Population nur noch 25,6% (SD 2,3) der Zellen. Mit steigender Konzentration an Erastin glichen sich die Zellpopulationen durch den schneller fortschreitenden Zelltod wieder an, sodass keine statistisch signifikante Abweichung mehr vorlag. Doch verblieben die nativen Zellen auch bei höheren Konzentrationen von Erastin im Vergleich zu *Mkl*-ko Zellen vitaler. Unter 5 µM Erastin lebten noch 32,5% (SD 3,5) der nativen Zellen im Vergleich zu nur 18,7% (SD 1,1) der *Mkl*-ko NIH3T3, während die Vitalität bei Induktion mit 10 µM Erastin auf 16,2% (SD 8,7) respektive 5,8% (SD 3,1) abfiel.

Die *Mkl*-ko NIH3T3 stellten sich in den angeführten Zelltodassays gegenüber der Ferroptose sensibler dar. Dies zeigte sich insbesondere in den Stunden 8 bis 12 nach Zelltodinduktion als auch bei niedrigen Konzentrationen von Erastin. Die Vermutung liegt nahe, dass die Diskrepanz der beiden Zellpopulationen in Bezug auf die Ferroptosesensitivität durch die Deletion von *Mkl* bedingt wird, einem Schlüsselprotein der Nekroptose. Um diese Aussage zu bekräftigen, bedarf es einem weiteren Nachweis, dass der spezifische Mangel des Proteins die



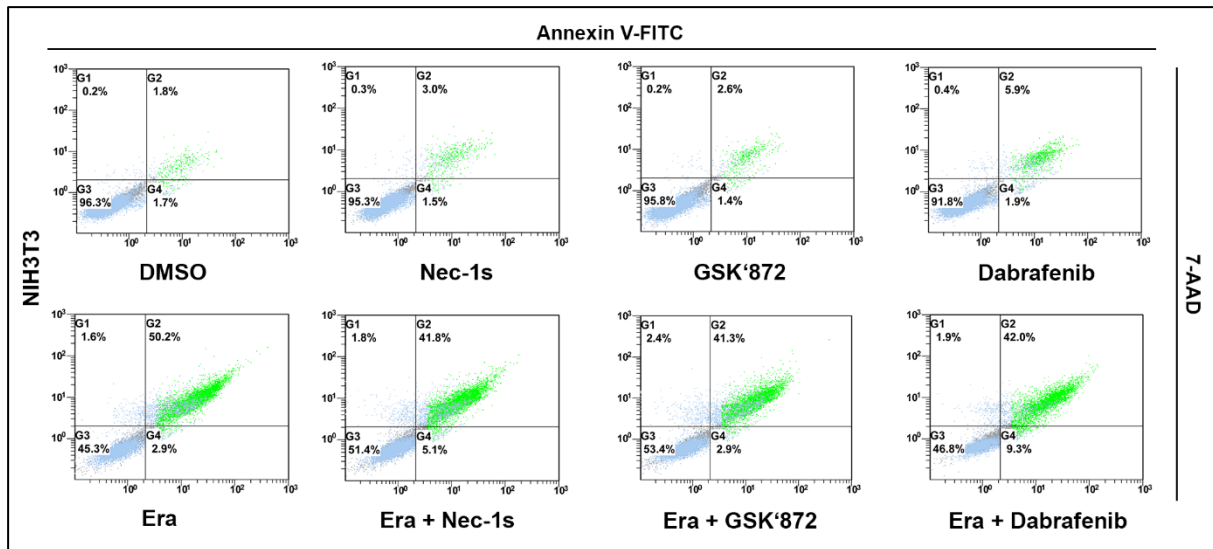
Ursache dieser Abweichung darstellt. Deshalb folgten Ferroptoseassays an nativen NIH3T3 Zellen mit 10  $\mu$ M Erastin über einen Zeitraum von 12 Stunden, da über diesen Zeitraum zuvor ein signifikanter Unterschied zwischen den nativen und *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen dargestellt werden konnte. Der murine MLKL-Inhibitor GW806742X wurde verwendet, um pharmakologisch den Effekt der *Mkl*-Deletion in den genetisch nicht modifizierten Zellen zu imitieren (Abbildung 13). Als Kontrolle dienten Ansätze mit DMSO und GW806742X ohne Zusatz von Erastin sowie ein weiterer Ansatz nur mit Erastin. Die Zellen wurden 30 Minuten vor Ferroptoseinduktion mit 2,5  $\mu$ M GW806742X inkubiert, um eine effektive Inhibition von MLKL hervorzurufen. Die Zellvitalität wurde nach Anfärbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Im Kontrollansatz mit GW806742X konnte dargestellt werden, dass keine nennenswerten Unterschiede der Zellvitalität gegenüber der DMSO Kontrolle bestanden (94,8 vs. 96,8%). Unter solitärer Inkubation mit 10  $\mu$ M Erastin stellten sich nach 12 Stunden 57,2% der Zellen vital dar, während nach pharmakologischer Inhibition von MLKL mittels GW806742X sich eine Zellvitalität von nur 21,5% präsentierte. Bei Betrachtung der Ferroptoseassays an *Mkl*-ko Zellen lässt sich eine vergleichbare Zellvitalität mit 19,6% aufzeigen (Abbildung 12a).



**Abbildung 13: Ferroptoseassays in NIH3T3 Zellen unter Zusatz eines MLKL-Inhibitors**

Dargestellt ist die Zelltodanalyse eines repräsentativen Experiments mit nativen NIH3T3 Zellen. Die Zellen wurden 30 Minuten vor Zelltodstimulation mit 2,5  $\mu$ M des MLKL-Inhibitors GW806742X inkubiert. Die Zelltodstimulation erfolgte mit 10  $\mu$ M Erastin (Era) über 12 Stunden, hiernach wurde die Zellvitalität nach Anfärbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt (n = 3).

Nachdem die pharmakologische Inhibition von MLKL nach Zusatz von Erastin einen verstärkten Zelltod hervorrief, stellte sich die Frage, ob auch eine Inhibition in der Signalkaskade aufwärts von MLKL vergleichbare Effekte erzielt. Hierzu wurden zum einen der RIPK1 Inhibitor Nec-1s als auch die RIPK3 Inhibitoren GSK‘872 und Dabrafenib verwendet. RIPK1 als auch RIPK3 stellen MLKL-vorgeschaltete Proteine der nekroptotischen Signalkaskade dar. Als Kontrolle dienten Ansätze mit DMSO sowie den jeweiligen Inhibitoren ohne folgende Zelltodinduktion. Die Ferroptoseinduktion erfolgte wiederum mit 10  $\mu$ M Erastin über eine Zeitdauer von 12 Stunden.



**Abbildung 14: Ferroptoseassays in NIH3T3 Zellen unter Inhibition von RIPK1 und RIPK3**

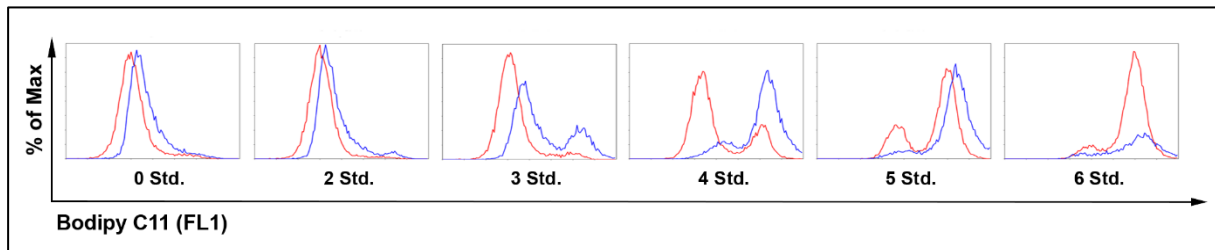
Dargestellt sind durchflusszytometrische Zelltodanalysen von genetisch nicht editierten NIH3T3 N-Zellen, welche 30 Minuten vor Zelltodstimulation mit 10  $\mu$ M Erastin (Era) mit folgenden Substanzen inkubiert wurden: DMSO als Trägersubstanz, 50  $\mu$ M Necrostatin-1s (Nec-1s), 1  $\mu$ M GSK'872, oder 50  $\mu$ M Dabrafenib. Die Zelltodstimulation mit Erastin erfolgte über einen Zeitraum von 12 Stunden, hiernach wurde die Zellvitalität nach Anfärbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt (n = 3).

Eine alleinige Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Nekroptoseinhibitoren wies keine relevanten Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle mit DMSO auf, lediglich die Zellpopulation mit Dabrafenib zeigte eine leicht reduzierte Zellvitalität mit 91,8% im Vergleich zu 96,3% der Kontrolle. Weder unter Inhibition von RIPK1 mittels Nec-1s noch unter Inhibition von RIPK3 mittels GSK'872 bzw. Dabrafenib zeigte sich eine reduzierte Zellvitalität im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Erastin. Somit ließ sich der zuvor beschriebene Effekt eines verstärkten ferroptotischen Zelltods durch die spezifische Inhibition von MLKL mittels GW806742X nicht bei einer Inhibition von RIPK1 bzw. RIPK3 reproduzieren.

### 3.4.2 Bestimmung von ROS in Ferroptoseassays

Der ferroptotische Zelltod kann u.a. über einen Anstieg der intrazellulären ROS Konzentration bestimmt werden, welche mit der einhergehenden Lipidperoxidation der Zellmembran den Untergang der Zelle verursacht. Die Untersuchung von ROS dient auch als Marker für das Vorliegen eines ferroptotischen Zelltods (Stockwell, 2022). Da sich die *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen im Rahmen der Ferroptose sensitiver im Vergleich zu ihrer nativen Kontrollpopulation zeigten, sollte folglich auch die Bildung von ROS früher einsetzen, da hierdurch der Zellschaden und nachfolgende Zelltod mediert wird. Um dies zu prüfen, wurden beide Zellpopulationen Ferroptoseassays mit 10  $\mu$ M Erastin unterzogen, und einer nachfolgenden Markierung der Zellen mit Bodipy 581/591 C11, einem Fluoreszenzsensor für eine Lipidperoxidation durch ROS. Da der Beginn der Lipidperoxidation dem folgenden Zelltod mit einer zeitlichen

Differenz vorangeht, wurden stündliche Messungen ab Stunde 2 bis Stunde 6 durchgeführt (Abbildung 15). Die nativen (rot) und *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen (blau) wurden zeitgleich einer durchflusszytometrischen Messung unterzogen und die Signalkurven überlagert. Die Oxidation von Bodipy 581/591 C11 bewirkt eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals von Rot ( $\lambda=595$  nm) zu Grün ( $\lambda=520$  nm).



**Abbildung 15: Bestimmung von ROS in Ferroptoseassays**

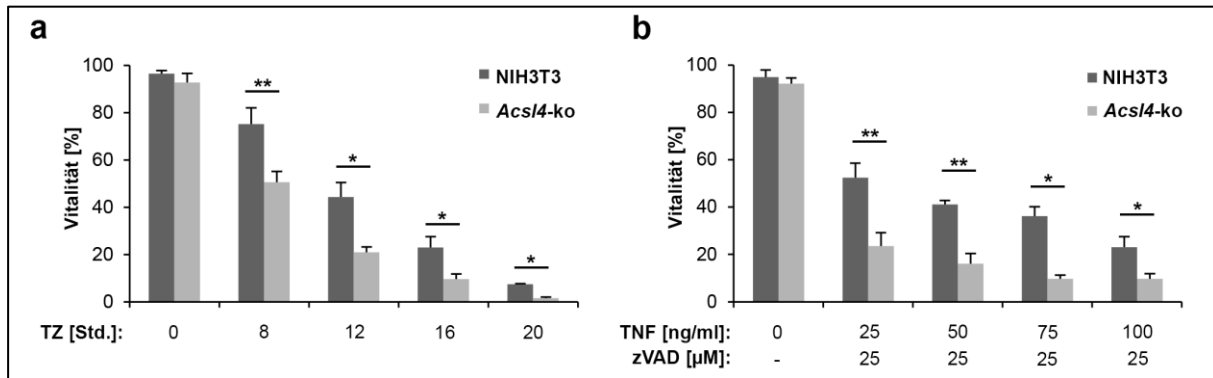
Die Überlagerungsgrafiken repräsentieren die Detektion von Sauerstoffradikalen (ROS) durch Darstellung der Lipidperoxidation der Zellmembran mittels Bodipy 581/591 C11. Die Zellen wurden über die indizierten Zeiten bei 37 °C mit 10  $\mu$ M Erastin stimuliert. *Mkl*-knockout NIH3T3 Zellen sind blau und native NIH3T3 rot dargestellt. Auf der x-Achse wird der Wechsel des Fluoreszenzsignals von Rot ( $\lambda=595$  nm) auf Grün ( $\lambda=520$  nm) dargestellt (n = 3).

Ohne Ferroptoseinduktion weisen die nativen und *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen nahezu identische Kurven im roten Farbspektrum auf. Nach 3 und insbesondere 4 Stunden zeigte sich ein frühzeitiger Anstieg der Lipidperoxidation in den *Mkl*-ko Zellen mit Verlagerung in das grüne Spektrum, während dies in den nativen Zellen erst ab Stunde 4 und 5 erfolgte. Nach sechsstündiger Inkubation präsentierten die nativen NIH3T3 ein Maximum der Lipidperoxidation, während das Signal in den *Mkl*-ko NIH3T3 Zellen durch den vorzeitig erfolgten Tod der Zellen nicht mehr gut darstellbar ist. Die frühzeitige Bildung von ROS in den *Mkl*-ko NIH3T3 unterstützt somit die Beobachtung eines früher eintretenden ferroptotischen Zelltods in diesen Zellen.

### 3.4.3 Zellvitalitätsmessungen in Nekroptoseassays mit *Acsf4*-ko NIH3T3 Zellen

Korrespondierend zu den Ferroptoseassays unter Verwendung von *Mkl*-ko NIH3T3 erfolgten vergleichbare Untersuchungen an *Acsf4*-ko NIH3T3 in Nekroptoseassays. Die im Rahmen der Ferroptoseassays (siehe 3.4.1) gewählten Zeitintervalle wurden mit Inkubationsdauern von 8, 12, 16 sowie 20 Stunden wie bislang beibehalten. Die Nekroptoseinduktion erfolgte mit 100 ng/ml TNF- $\alpha$  nach vorheriger 15-minütiger Inkubation der Zellen mit 25  $\mu$ M zVAD-fmk (Abbildung 16a). Initial wies die native Zellpopulation eine Vitalität von 96,4% (SD 1,4) gegenüber 92,7% (SD 3,9) der *Acsf4*-ko Zellen auf. 8 Stunden nach Nekroptoseinduktion wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Populationen deutlich: Während

die nativen NIH3T3 noch zu 75,2% (SD 6,8) lebten, zeigten sich nur noch 50,6% (SD 4,6) der *Acs14*-ko Zellen vital. Die Differenz in der Zellvitalität zog sich über die folgenden Messpunkte fort, nach 12 Stunden lebten 44,3% (SD 6,2) der nativen Zellen gegenüber 21,0% (SD 2,2) der *Acs14*-ko Zellen. Nach Stunde 20 wiesen die nativen NIH3T3 eine Restvitalität von 7,6% auf gegenüber nur 1,7% auf Seite der *Acs14*-ko Zellklone. Hierbei konnte über alle Messpunkte eine statistische Signifikanz bestimmt werden.



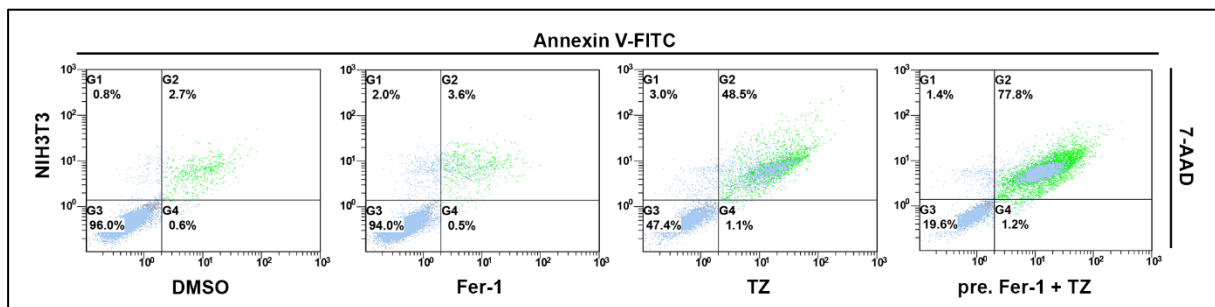
**Abbildung 16: Nekroptoseassays in parentalen vs. *Acs14*-ko NIH3T3 Zellen**

Dargestellt sind Zellvitalitätsmessungen in nativen und *Acs14*-knockout NIH3T3 Zellen nach Nekroptoseinduktion. **a)** Die Zellen wurden über die indizierten Zeiträume bei 37 °C mit 100 ng/ml TNF- $\alpha$  + 25  $\mu$ M zVAD-fmk (TZ) stimuliert. Die Bestimmung des Zelltodes erfolgte mittels durchflusszytometrischer Zellanalyse nach Anfärbung der Zellen mit Annexin V-FITC und 7-AAD. **b)** Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden bei 37 °C mit den angegebenen Konzentrationen von TNF- $\alpha$  bei konstanter Konzentration von zVAD-fmk stimuliert. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte mittels durchflusszytometrischer Zellanalyse nach Anfärbung der Zellen mit Annexin V-FITC und 7-AAD. Der Mittelwert und die Standardabweichung repräsentieren jeweils drei separate Experimente. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ).

Zur weiteren Untersuchung des konzentrationsabhängigen Verhaltens der Zellen wurden Nekroptoseassays mit variierenden Konzentrationen von TNF- $\alpha$  angewandt. Die Kontrollpopulation erhielt DMSO während zur Zelltodinduktion 25, 50, 75 bzw. 100 ng/ml TNF- $\alpha$  verwendet wurden. Die Konzentration des Pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk wurde mit 25  $\mu$ M konstant beibehalten. Die Zellen wurden über 16 Stunden bei 37 °C inkubiert (Abbildung 16b). Die Kontrollpopulationen zeigten keine nennenswerten Unterschiede mit einer Zellvitalität der nativen Zellen von 94,9% (SD 3,0) und 92,1% (SD 2,4) der *Acs14*-ko Zellen. Unter Nekroptoseinduktion mit 25 ng/ml TNF- $\alpha$  + 25  $\mu$ M zVAD zeigten sich deutliche Abweichungen. 52,4% (SD 6,1) der nativen Zellen lebten nach 16 Stunden, während die *Acs14*-ko NIH3T3 nur noch 23,5% (SD 5,7) Zellvitalität aufwiesen. Die signifikanten Differenzen konnten auch bei einer Konzentration von 50 ng/ml TNF- $\alpha$  + zVAD beobachtet werden. Hier lebten nur noch 16,0% (SD 4,4) *Acs14*-ko NIH3T3 während sich 41,2% (SD 1,7) der Kontrollpopulation vital zeigte. Bei einer Konzentration von 75 ng/ml TNF- $\alpha$  + zVAD stellte sich bei den *Acs14*-ko NIH3T3 ein bereits nahezu kompletter Zelltod ein mit einer Restvitalität

von 9,7% (SD 1,6), welche auch unter 100 ng/ml TNF- $\alpha$  + zVAD persistierte (9,7%, SD 2,1) im Vergleich zu 36,2% (SD 5,6) bzw. 23,1% (SD 4,5) Zellvitalität der nativen NIH3T3. Über alle Konzentrationen von TNF- $\alpha$  hinweg konnte eine statistische Signifikanz der Ergebnisse nachgewiesen werden.

Die *Acsf4*-Deletion stellt den entscheidenden Unterschied zwischen beiden Zellpopulationen dar. Daraus schloss die Vermutung, dass der spezifische Mangel an ACSL4 die Sensitivität der Zellen gegenüber dem nekroptotischen Zelltod erhöht. Um diese Hypothese zu überprüfen, bot sich auch in diesem Fall eine pharmakologische Inhibition der Ferroptose in nativen NIH3T3 an. Hierfür wurde der Ferroptoseinhibitor Fer-1 genutzt, welcher über seine antioxidative Wirkung ROS eliminiert und den ferroptotischen Zelltod inhibiert (Dixon et al., 2012). Es folgten Nekroptoseassays in nativen NIH3T3 mit einer Inkubationszeit von 12 Stunden, da die bisherigen Daten einen signifikanten Unterschied zwischen nativen und *Acsf4*-ko NIH3T3 nach diesem Intervall aufzeigten (Abbildung 17). Die Zelltodinduktion erfolgte wiederum mit 100 ng/ml TNF- $\alpha$  nach vorheriger Inkubation mit 25  $\mu$ M zVAD-fmk. Fer-1 wurde ebenfalls 30 Minuten vor Zelltodinduktion in einer Konzentration von 1  $\mu$ M den Zellen zugefügt. Als Kontrollansätze dienten DMSO als Trägerlösung, Fer-1 sowie ein Ansatz mit den Zelltodinduktoren TZ (TNF- $\alpha$  + zVAD-fmk). Nach der Inkubationszeit erfolgte die Markierung der Zellen mit Annexin V-FITC und 7-AAD. Die Zellvitalität wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt.



**Abbildung 17: Nekroptoseassays in *Acsf4*-ko NIH3T3 Zellen unter Inhibition der Ferroptose**

Abgebildet ist die Zelltodanalyse eines repräsentativen Experiments mit nativen NIH3T3, in dem die Zellen mit 1  $\mu$ M Ferrostatin-1 (Fer-1) und 25  $\mu$ M zVAD-fmk 30 Minuten vor Stimulation mit 100 ng/ml TNF- $\alpha$  inkubiert wurden. Die Stimulation mit TZ (TNF- $\alpha$  und zVAD-fmk) erfolgte über 12 Stunden, hiernach wurde die Zellvitalität nach Anfärbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD durchflusszytometrisch bestimmt (n = 3).

Sowohl die DMSO Kontrolle als auch die Fer-1 Kontrolle wiesen mit einer Zellvitalität von 96,0% bzw. 94,0% keinen nennenswerten Verlust der Zellvitalität auf. Nach 12-stündiger Inkubation mit TZ und Fer-1 waren nur noch 19,6% der Zellen vital, dem gegenüber standen 47,4% lebende Zellen nach einer Induktion mittels TZ. Bei Betrachtung der Vitalität der *Acsf4*-

ko NIH3T3 nach 12 Stunden im Nekroptoseassay zeigte sich eine Kongruenz der Ergebnisse (21,0% vs. 19,6%). Somit scheint die pharmakologische Inhibition der Ferroptose mittels Fer-1 die Beobachtungen durch eine genetische Deletion von *Acs/4* im Nekroptoseassay zu bestätigen.

## 4 Diskussion

Während für die Ferroptose der Signalweg über die System  $X_c^-$ /GPX4-Achse als auch alternative Signalwege wie FSP1 erforscht wurden, sind die bisherigen Erkenntnisse sowohl über die Signalkaskade als auch die genaue Ausführung des Zelltods durch die Lipidperoxidation unvollständig (Stockwell, 2022). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle des Gens *Acs14* in der ferroptotischen Signalkaskade und die Wechselwirkung der Ferroptose mit der Nekroptose zu untersuchen.

### 4.1 ACSL4 ist essentieller Bestandteil des ferroptotischen Zelltods

Das Gen *ACSL4* wurde erstmals durch ein Mutagenesecscreening mit der Ferroptose in Verbindung gebracht (Dixon et al., 2015). Zusätzlich zu *ACSL4* wurde zudem das Gen *lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3)* im Rahmen dieses Screenings als relevant für die Ferroptose aufgezeigt. Es wurde postuliert, dass die Präsenz von ACSL4 für die Auslösung des ferroptotischen Zelltods unentbehrlich ist. Um die Rolle dieses Proteins in der Ferroptose näher zu beleuchten, erfolgten Zelltodassays an NIH3T3 Zellklonen, in denen *Acs14* zuvor mittels CRISPR/Cas9 deletiert wurde. Der Nachweis der erfolgreichen Gendeletion in den vorliegenden Zellklonen erfolgte dann auf Proteinebene mittels Western Blot (Abbildung 5). Zudem wurden zur Validierung der Ergebnisse im humanen System *ACSL4*-ko Klone der humanen HT-1080 Zelllinie einbezogen. Im Western Blot wurde der Erfolg der Gendeletion mit dieser Methode auch in dieser humanen Tumorzelllinie dargestellt. Durch eine Gendeletion mittels CRISPR/Cas9 besteht auch die Möglichkeit von sogenannten off-target Effekten, hierbei werden durch die verwendete single guide RNA (sgRNA) andere Gene potentiell ungezielt deletiert. Dies birgt die Gefahr, dass messbare Veränderungen durch off-target Effekte bei der Gendeletion bedingt sein können. Zum Ausschluss dieser Fehlerquelle dient die Nutzung unterschiedlicher sgRNAs und Klone. Es wurde in dieser Arbeit jedoch nur Analysen im murinen System vorgenommen, allerdings ist anzumerken, dass durch Mitglieder der Arbeitsgruppe unter Nutzung anderer sgRNAs die dargestellten Ergebnisse speziesübergreifend reproduziert werden konnten und somit off-target Effekte als Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnten.

In standardisierten Ferroptoseassays unter Verwendung von 10  $\mu$ M Erastin als Induktor zeigten *Acs14*-deletierte NIH3T3 Zellen im Vergleich zu nativen Zellen über 16 Stunden eine komplette Protektion gegenüber dieser Zelltodmodalität (Abbildung 6). Die *Acs14*-ko NIH3T3 sind im Vergleich zu den parentalen NIH3T3 Zellen allerdings nicht gegenüber der Nekroptose

geschützt, weshalb von einem spezifischen Effekt der Gendeletion gegenüber der Ferroptose auszugehen ist. Mit Hilfe der vorliegenden Ergebnisse konnte zunächst einmal eine essentielle Funktion von ACSL4 im ferroptotischen Signalweg verifiziert werden. Die Resistenz von *Acs/4*-ko NIH3T3 gegen den ferroptotischen Zelltod schließt jedoch nicht aus, dass die Gendeletion einen generellen Schutzmechanismus gegenüber dem Zelltod bedingt. Daher wurden die *Acs/4*-ko Zellen ebenfalls dem nekroptischen Zelltod ausgesetzt. Hierbei konnte dargestellt werden, dass die Deletion von *Acs/4* in der Nekroptose keinen protektiven Effekt aufweist. Es ließ sich hingegen eine verstärkte Empfindlichkeit der *Acs/4*-ko Zellen im Verlauf der Nekroptose feststellen, welche in der Folge weiter erörtert wird. Hieraus lässt sich ableiten, dass die protektive Wirkung einer *Acs/4*-Deletion spezifisch für die Ferroptose ist, doch gilt es entgegenzusetzen, dass für diese Behauptung nur die Nekroptose zum Vergleich herangezogen wurde. Jedoch konnte der spezifische Effekt der *Acs/4*-Deletion in der Ferroptose auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden (Doll et al., 2017; Yuan et al., 2016).

Manche Tumorzelllinien weisen eine konstitutive Resistenz gegenüber der Ferroptose auf. Zu den Zelllinien gehören unter anderem L929 und HT-29. Daher wurden in der Folge, basierend auf der Zellprotektion durch eine *Acs/4*-Deletion, weitere Zelllinien auf die Expression von ACSL4 untersucht, unter der Annahme, dass eine Deletion von *Acs/4* den Resistenzmechanismus begründet. Hierzu wurde in den ferroptoseresistenten Zelllinien L929 und HT-29 die Expression von ACSL4 geprüft. Jedoch konnte eine suffiziente Expression von ACSL4 im Western Blot nachgewiesen werden, sodass die konstitutive Resistenz nicht auf einen Mangel dieses Proteins basiert (Abbildung 7). Daher bestehen andere, bisher unbekannte Resistenzmechanismen in den untersuchten Zelllinien. Möglicherweise ist die Resistenz in dem Vorliegen eines Wildtyp-RAS begründet, da ein mutiertes RAS durch eine Veränderung des Eisenmetabolismus mit folgend erhöhter Eisenkonzentration eine Induktion der Ferroptose in Tumorzelllinien *in vitro* fördert (Dixon et al., 2012; Yang et al., 2014).

Der Nachweis von ACSL4 als ein essentielles Effektorprotein in der Ferroptose eröffnet die Frage, welche molekulare Funktion das Protein in der Zelle einnimmt und weshalb eine Deletion des Gens die Zelle vor dem ferroptotischen Zelltod schützt. Während und nach der Datenerhebung für diese Arbeit erfolgten weitergehende Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich der genauen Funktionsweise dieses Proteins und dessen Bedeutung in der ferroptotischen Signalkaskade (H. L. Zhang et al., 2022).



## 4.2 Ferroptose und Nekroptose beeinflussen einander

Im Rahmen der Zelltodassays an *Acsf4*-ko NIH3T3 erfolgten auch Nekroptoseassays, um die spezifische inhibitorische Wirkung der Gendeletion auf den ferroptotischen Zelltod zu demonstrieren. Hierbei stellte sich interessanterweise eine reduzierte Zellvitalität der *Acsf4*-ko Zellen im Vergleich zu nativen Zellen dar (Abbildung 6). Aufgrund dieser Diskrepanz wurde die Fragestellung dieser Arbeit erweitert und eine mögliche Verbindung der Nekroptose und Ferroptose postuliert. Diese Hypothese wurde dadurch gestützt, dass nachweislich zwei unabhängige Entitäten der regulierten Nekrose im Verlauf eines akuten Nierenversagens den Organschaden im Tiermodell synergistisch bedingen können (Linkermann et al., 2013). Die Überprüfung erfolgte anhand vergleichender nekroptotischer und ferroptotischer Zelltodassays an NIH3T3 Zellklonen mit Deletionen für *Acsf4* respektive *Mkl*. Eine Analyse der Proteinkonzentrationen der jeweiligen Schlüsselproteine im Verlauf der jeweiligen Zelltodentität wies nach, dass im zeitlichen Verlauf der Ferroptose die Konzentration von ACSL4 und GPX4 in *Mkl*-ko NIH3T3 deutlich früher abnimmt im Vergleich zu den nativen Zellen (Abbildung 10). Ebenso erfolgte in *Acsf4*-ko NIH3T3 die Aktivierung (Phosphorylierung) von MLKL zu einem früheren Zeitpunkt im Vergleich zu nativen NIH3T3 (Abbildung 11). Dies deutet darauf hin, dass die Gendeletion von *Mkl* bzw. *Acsf4* einen beschleunigten zeitlichen Ablauf der Signalkaskade im jeweils anderem Zelltodweg bedingt.

In den durchflusszytometrischen Messungen der Zellvitalität stellte sich dar, dass die nekroptoseresistenten *Mkl*-ko Zellen gegenüber dem ferroptotischen Zelltod im Vergleich zu nativen Zellen signifikant sensitiver sind (Abbildung 12). Interessanterweise konnte reziprok aufgezeigt werden, dass ebenso *Acsf4*-ko NIH3T3 gegenüber der Nekroptose eine deutliche Sensibilisierung aufweisen (Abbildung 16). Die Effekte konnten als zeit- und konzentrationsabhängig in der Durchflusszytometrie demonstriert werden. Zudem zeigte sich bei der Ferroptose die frühere Akkumulation von ROS in *Mkl*-ko vs. den parental Zellen (Abbildung 15). Dies deutet darauf hin, dass die ferroptotische Signalkaskade in *Mkl*-ko Zellen beschleunigt abläuft, allerdings nicht durch eine höhere Konzentration der Schlüssel- oder Effektorproteine bedingt ist. Die Nekroptose und die Ferroptose stellen eigenständige Zelltodentitäten dar, deren Beteiligung zwar zum Teil in gleichen Pathologien nachgewiesen wurde, jedoch keine Überschneidungen in der Signalkaskade und den beteiligten Proteinen oder im Mechanismus der Zelltodinduktion aufweisen (Sanz et al., 2023). Es konnte gezeigt werden, dass Ferroptose und Nekroptose reziprok interagieren, indem bei Inhibition des einen Zelltodes der jeweilige andere verstärkt abläuft. Dies spricht für einen Schutzmechanismus des

Organismus, indem auch unter Inhibition einer Zelltodentität z.B. durch virale Erreger der vom Organismus als notwendig erachtete Zelltod ausgeführt werden kann. Solch ein redundantes System wurde bereits bei der Apoptose und Nekroptose nachgewiesen, da die Nekroptose bei einer Caspaseinhibition kompensatorisch agieren kann (Grootjans et al., 2017). Die reziproke Wechselwirkung zwischen Ferroptose und Nekroptose persistiert auch unter Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren, sodass auch eine funktionelle Inhibition eine reziproke Wirkung bedingt und somit nicht nur durch den genetischen Mangel eines Schlüsselproteins vermittelt wird.

Der Mechanismus, der diese Wechselwirkung vermittelt, ist aktuell unklar. Es bestehen keine bekannten Überschneidungen in den involvierten Proteinen der jeweiligen Signalkaskaden und der resultierende Zelltod wird ebenfalls auf unterschiedliche Art ausgelöst. Da jedoch bei Verwendung der Nekroptoseinhibitoren Nec-1s oder GSK‘872, welche in der Signalkaskade oberhalb von MLKL die Kinasen RIPK1 bzw. RIPK3 inhibieren, kein verstärkter ferroptotischer Zelltod nachzuweisen war (Abbildung 14), besteht die Möglichkeit, dass die Kommunikation zwischen diesen beiden Zelltodentitäten auf Ebene der Zellmembran stattfindet. MLKL transloziert nach Aktivierung und Oligomerisierung an die Zellmembran und löst hier den nekroptotischen Zelltod aus (Murphy et al., 2013; Petrie et al., 2019). ACSL4 hingegen bedingt eine ausreichende Konzentration von oxidationsbereiten PUFAs in der Zellmembran, welche die Voraussetzung für den ferroptotischen Zelltod darstellen (Doll et al., 2017). Möglicherweise besteht unter physiologischen Umständen ein permanenter inhibitorischer Einfluss beider Zelltodentitäten aufeinander, um ein Gleichgewicht zu gewährleisten. Dies hätte zur Folge, dass bei einer Gendeletion von *Mkl* bzw. *Acs14* der inhibitorische Einfluss schwindet und kompensatorisch der jeweilig korrespondierende Zelltod verstärkt ablaufen kann. Dies könnte bewirkt werden, indem MLKL die Bildung oder den Transport von oxidationsbereiten PUFAs verlangsamt oder eine antioxidative Wirkung vermittelt. Eine antioxidative Wirkung von MLKL wurde bisher jedoch nicht beschrieben. ACSL4 wiederum könnte durch dessen Bildung von oxidationsbereiten PUFAs die Lipidkomposition der Zellmembran zu Ungunsten einer Membranpermeabilisation durch MLKL verändern. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die inhibitorische Wirkung über Metaboliten wie Inositolphosphat bewirkt wird, welches essentiell für die korrekte Oligomerisierung von MLKL ist (Dovey et al., 2018). Jedoch könnten auch andere Proteine oder Lipide in der Signalkaskade unterhalb von ACSL4 die postulierte inhibitorische Wirkung auf die Nekroptose bedingen. Eine exakte Erklärung, wie die Ferroptose und Nekroptose

miteinander kommunizieren bzw. Einfluss aufeinander nehmen, gibt es bislang noch nicht. Insgesamt deckt sich der hier dargelegte Nachweis einer Interaktion zwischen der Nekroptose und Ferroptose mit dem bisherigen Wissen über die regulierte Nekrose. So sind im Rahmen einer Pathologie oftmals mehrere unterschiedliche Zelltodentitäten am Gesamtschaden beteiligt, was als ein redundantes System des Organismus verstanden werden kann (Linkermann et al., 2013). Zudem ist am Beispiel der Apoptose und Nekroptose bekannt, dass Zelltodentitäten im Falle einer Inhibition kompensatorisch agieren können. Eine solche kompensatorische Wirkung von Ferroptose und Nekroptose erscheint ebenfalls vorzuliegen, doch steht dies im Gegensatz zu der synergistischen Wirkung von Nekroptose und CypD MPT im Organschaden der Niere, welche in diesem Modell simultan agieren (Linkermann et al., 2013). Ferroptose und Nekroptose agieren antagonistisch, indem sie einen inhibitorischen Effekt aufeinander ausüben, sodass eine singuläre Inhibition nur einer Zelltodentität *in vitro* mit einer verstärkten Nekroptose bzw. Ferroptose einhergeht (Müller et al., 2017). Die praktische Konsequenz für einen möglichen therapeutischen Nutzen in Form einer Zelltodinhibition ist zwar prinzipiell identisch, da eine Inhibition aller beteiligten Zelltodentitäten eine Gewebeprotektion bewirkt, doch bringt eine solche antagonistische Wirkung auch weitere Herausforderungen mit sich. So könnte *in vivo* durch eine insuffiziente Inhibition der jeweils beteiligten Zelltodentitäten der gewünschte Effekt einer Gewebeprotektion durch die Hochregulation einer alternativen Zelltodentität aufgewogen werden. Dies bedingt die Notwendigkeit der genauen Identifikation und Inhibition aller beteiligten Zelltodentitäten im spezifischen Modell, wobei diese je nach Organ und Gewebeschaden variieren und einen therapeutischen Nutzen *in vivo* erschweren.

### 4.3 Ausblick

Die Beschreibung von ACSL4 als essentielles Protein der ferroptotischen Signalkaskade vertieft zum einen das Verständnis dieser relativ gesehen neuen Zelltodform und eröffnet diagnostische und therapeutische Möglichkeiten *in vivo*. Während in Folge des ferroptotischen Zelltods die ACSL4 Expression *in vitro* abnimmt, konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe im IRI-Modell der Niere im Verlauf der Reperfusion *ex vivo* eine verstärkte Expression von ACSL4 festgestellt werden. Diese Diskrepanz beruht am ehesten auf einer hochregulierten *de novo* Synthese von ACSL4 im frühen Stadium des Organschadens, eröffnet jedoch eine Möglichkeit dieses Protein als Biomarker der Ferroptose *in vivo* zu nutzen (Müller et al., 2017). Relevant erscheint auch der therapeutische Nutzen, da spezifische Inhibitoren von ACSL4 bereits identifiziert wurden, die über eine Arzneimittelzulassung verfügen und somit eine

klinische Anwendung der Erkenntnisse der Grundlagenforschung ermöglicht. So konnte im Mausmodell mittlerweile durch eine Inhibition von ACSL4 ein reduzierter Organschaden bei IRI des Darms oder der Nieren nachgewiesen werden (Y. Li et al., 2019; Y. Wang et al., 2022).

Zudem konnte in dieser Arbeit erstmals eine Interaktion zwischen dem nekroptotischen und ferroptotischen Zelltod beschrieben werden, welche womöglich im Sinne eines redundanten Systems des Organismus kompensatorisch agieren. Wie genau die beiden Zelltodformen miteinander kommunizieren, muss jedoch noch weitergehend untersucht werden. Die Erkenntnisse werden durch Beobachtungen gestützt, dass im Rahmen von Organschädigungen multiple Zelltodentitäten agieren und eine Inhibition mehrerer Zelltodformen für den optimalen Gewebeerhalt notwendig sind. Hier besteht die Gefahr, dass eine Organprotektion durch Inhibition eines singulären Zelltodweges aufgrund der kompensatorischen Aktivierung anderer Zelltodentitäten aufgewogen wird, sodass bei einem therapeutischen Ansatz multimodal agiert werden muss. Dies bedingt die Notwendigkeit der genauen Identifikation der beteiligten Zelltodmodalitäten im jeweiligen Modell, um einen optimalen therapeutischen Effekt hervorzurufen, was die klinische Anwendung von Zelltodinhibitoren erschwert. Dass nur die Ferroptose und Nekroptose in dieser Weise interagieren, erscheint angesichts der Vielzahl von Zelltodentitäten eher unwahrscheinlich. Es bleibt zu vermuten, dass ähnliche Mechanismen auch bei anderen Vertretern der regulierten Nekrose vorliegen.

## 5 Zusammenfassung

Seitdem erstmalig neben den bekannten Zelltodentitäten der Apoptose und Nekrose weitere regulierte Nekrosewege entdeckt wurden, stellte sich ein Paradigmenwechsel in dem Verständnis von Zelltod ein (Degterev et al., 2005). In den letzten Jahren konnten mittlerweile multiple eigenständige Zelltodformen sowie deren Beteiligung in verschiedensten Erkrankungen des menschlichen Organismus beschrieben werden (Conrad et al., 2016; Morgan & Kim, 2022; Stockwell, 2022). Dies zeigte auch den potentiellen therapeutischen Nutzen, welcher sich aus der Erforschung der regulierten Nekrose ergibt.

Nach der Erstbeschreibung der Ferroptose als eigenständige Zelltodentität der regulierten Nekrose im Jahr 2012 konnte auch deren Signalkaskade mit den beteiligten Proteinen größtenteils identifiziert werden (Dixon et al., 2012). Zudem konnte die klinische Relevanz dieser Zelltodentität in multiplen Pathologien, insbesondere dem Ischämie/Reperfusionsschaden und neurodegenerativen Erkrankungen, dargelegt werden (Friedmann Angeli et al., Linkermann et al., 2014; Chen et al., 2015; Do Van et al., 2016; Hambright et al., 2017; 2014; Weiland et al., 2019; Stockwell, 2022).

Im ersten Teil der Arbeit wurde unter Verwendung stabiler Zelllinien, in denen *Acs14* mittels CRISPR/Cas9 deletiert wurde, untersucht, welche Auswirkungen die genetische Deletion von *Acs14* auf den ferroptotischen Zelltod ausübt. Während der Genverlust von *Acs14* keine morphologischen Veränderungen der Zellen bewirkte, konnte jedoch dargestellt werden, dass die Gendeletion die Zellen spezifisch vor dem ferroptotischen Zelltod schützt. Somit konnte ACSL4 als ein essentielles Protein der ferroptotischen Signalkaskade bestimmt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Interaktion von Nekroptose und Ferroptose im Verlauf der Signaltransduktion dieser beiden eigenständigen Zelltodwege untersucht. Im Rahmen vergleichender Untersuchungen zeigte sich eine reziproke Einflussnahme der beiden Zelltodentitäten zueinander. Bei genetischer Deletion der jeweiligen Schlüsselproteine *Acs14* (Ferroptose) bzw. *Mkl1* (Nekroptose) wiesen die Zellen interessanterweise eine signifikant gesteigerte Sensitivität gegenüber der jeweils anderen Zelltodform auf. Dies ließ sich sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig demonstrieren. Auch die pharmakologische Inhibition von Ferroptose bzw. Nekroptose zeigte selbigen Effekt. Diese Beobachtung konnte über das Expressionslevel der jeweiligen Schlüsselproteine ACSL4 bzw. MLKL im Ablauf des jeweiligen Zelltods verifiziert werden. Im Fall der Ferroptose konnte dieses Ergebnis zudem

unter Messung der Lipidperoxidation additiv bestätigt werden. Wie dieser Mechanismus innerhalb der Zelle auf zellulärer Ebene exakt vermittelt wird, konnte im Verlauf der hier vorgestellten Arbeit allerdings nicht weiter charakterisiert werden.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit die Erkenntnis einer essentiellen Funktion von ACSL4 in der ferroptotischen Signalkaskade, dessen genetische oder pharmakologische Inhibition eine komplette Protektion der Zellen vor dem ferroptotischen Zelltod bietet. Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Ferroptose und die Nekroptose auf molekularer Ebene nicht nur neben- und/oder nacheinander ablaufen können, sondern miteinander kommunizieren. Durch genetische als auch pharmakologische Inhibition der Ferroptose sind die Zellen sensitiver gegenüber dem nekroptotischen Zelltod, und *vice versa* sind die Zellen nach genetischer bzw. pharmakologischer Inhibition von MLKL, einem Schlüsselprotein der Nekroptose, sensitiver gegenüber der Ferroptose. Die hier vorgelegten Ergebnisse vertiefen nicht unser Verständnis der Signalkaskaden verschiedener regulierter Zelltodwege, sondern vermitteln zudem wichtige Informationen für den therapeutischen Nutzen dieser regulierten Zelltodentitäten. Die im Verlauf der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind aus klinischer Sicht, sowohl im Rahmen einer gezielten Zelltodinduktion maligner Zellen als auch für die Inhibition pathologischer Zelltodprozesse im Verlauf einer Vielzahl akuter und chronischer Erkrankungen von immenser Bedeutung.

## 6 Summary

The discovery of multiple cell death entities termed regulated necrosis, alongside the well-known apoptosis and necrosis, initiated a paradigm shift in the understanding of cell death. Over the last few years, various forms of regulated necrosis have been uncovered, along with their involvement in numerous diseases (Degterev et al., 2005). These discoveries shed light on the potential therapeutic benefits of further investigations into regulated necrosis.

In 2012, an iron-dependent cell death entity termed ferroptosis was first described, and since then, much of its signaling cascade, along with the corresponding proteins, has been uncovered (Dixon et al., 2012). Additionally, the clinical relevance of this cell death in numerous pathologies, especially in ischemia/reperfusion injury and neurodegenerative diseases has been revealed (Friedmann Angeli et al., 2014; Linkermann et al., 2014; Chen et al., 2015; Do Van et al., 2016; Hambright et al., 2017; Weiland et al., 2019; Stockwell, 2022).

The first part of this dissertation explores the effects of a genetic deletion of *Acs14* on ferroptotic cell death, utilizing stable cell lines in which *Acs14* was knocked out using CRISPR/Cas9. While the deletion of *Acs14* didn't result in any morphological changes, the loss of the gene protected the cells specifically against ferroptosis. Therefore, ACSL4 was defined as an essential part of the ferroptotic signaling cascade.

In the second part, the interaction between the distinct cell death entities of necroptosis and ferroptosis in the course of signal transducing was further investigated. Reciprocal interaction between the two entities was discovered in these experiments. The genetic ablation of the key proteins *Acs14* (ferroptosis) and *Mkl1* (necroptosis), respectively, resulted in a significantly increased sensitivity of the cells towards necroptosis and, accordingly, ferroptosis. These findings were demonstrated in a concentration- and time-dependent manner. Even pharmacological inhibition of ferroptosis or necroptosis, respectively, displayed the same effects. This observation was verified by checking the expression of the key proteins ACSL4 or MLKL in the respective cell death. Additionally, the measurement of lipid peroxidation in the case of ferroptosis supported the aforementioned findings. The underlying mechanisms of this newly discovered interaction on a cellular level could not be uncovered in this dissertation.

In summary, this dissertation delivers the understanding of ACSL4 as an essential protein in the ferroptotic signaling cascade, with the genetic or pharmacological ablation resulting in

complete protection of the cells against ferroptosis. Additionally, it was demonstrated for the first time that ferroptosis and necroptosis can not only take place simultaneously but also interact on a molecular level. After genetic or pharmacological inhibition of ferroptosis, the cells are more sensitive towards necroptosis and *vice versa*. These results not only deepen our understanding of the signalling cascades of these cell death entities but also provide important information for their potential therapeutic use. These findings are immensely important from a clinical perspective, whether in the targeted induction of regulated cell death in malignant cells or the inhibition of pathological cell death in a number of acute and chronic diseases.



## Literaturverzeichnis

- Andrabi, S. A., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2008). Mitochondrial and Nuclear Cross Talk in Cell Death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1147(1), 233–241.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7(2), 99–109.
- Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., Roberts, M. A., Tong, B., Maimone, T. J., Zoncu, R., Bassik, M. C., Nomura, D. K., Dixon, S. J., Olzmann, J. A. (2019). The CoQ oxidoreductase FSP1 acts in parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, 575(7784), 688.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Brown, R., Marshall, C. J., Pennie, S. G., Hall, A. (1984). Mechanism of activation of an N-ras gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080. *EMBO J.*, 3(6), 1321–1326.
- Burnette, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112(2), 195–203.
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.-C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.-G., Liu, Z.-G. (2014). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.*, 16(1), 55–65.
- Cao, J. Y., & Dixon, S. J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73(11–12), 2195–2209.
- Carette, J. E., Guimaraes, C. P., Wuethrich, I., Blomen, V. A., Varadarajan, M., Sun, C., Bell, G., Yuan, B., Muellner, M. K., Nijman, S. M., Ploegh, H. L., Brummelkamp, T. R. (2011). Global gene disruption in human cells to assign genes to phenotypes. *Nat. Biotechnol.*, 29(6), 542.
- Chen, L., Hambright, W. S., Na, R., Ran, Q. (2015). Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. *J. Biol. Chem.*, 290(47), 28097–28106.
- Cheng, X., Zhao, F., Ke, B., Chen, D., Liu, F. (2023). Harnessing Ferroptosis to Overcome Drug Resistance in Colorectal Cancer: Promising Therapeutic Approaches. *Cancers (Basel)*, 15(21).
- Colbert, L. E., Fisher, S. B., Hardy, C. W., Hall, W. A., Saka, B., Shelton, J. W., Petrova, A. V., Warren, M. D., Pantazides, B. G., Gandhi, K., Kowalski, J., Kooby, D., El-Rayes, B., Staley, C., Adsay, N., Curran, W., Landry, J., Maithel, S., Yu, D. S. (2013). Pronecrotic Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Expression Is a Prognostic Biomarker in Patients With Early-Stage Resected Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer*, 119(17), 3148.

- Conev, N. V., Dimitrova, E. G., Bogdanova, M. K., Kashlov, Y. K., Chaushev, B. G., Radanova, M. A., Petrov, D. P., Georgiev, K. D., Bachvarov, C. H., Todorov, G. N., Kalchev, K. P., Popov, H. B., Manev, R. R., Donev, I. S. (2019). RIPK3 expression as a potential predictive and prognostic marker in metastatic colon cancer. *Clin. Invest. Med.*, 42(1), E31–E38.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., Guschin, D. Y. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823.
- Conrad, M., Angeli, J. P. F., Vandenabeele, P., Stockwell, B. R. (2016). Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 15(5), 348–366.
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.*, 43(6), 582–592.
- Dai, W., Cheng, J., Leng, X., Hu, X., Ao, Y. (2021). The potential role of necroptosis in clinical diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 47(5), 89.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.*, 1(2), 112–119.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602.
- Deroo, E., Zhou, T., Liu, B. (2020). The Role of RIPK1 and RIPK3 in Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(21), 8174.
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J. C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., Jonneaux, A., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Bordet, R. (2014). Targeting Chelatable Iron as a Therapeutic Modality in Parkinson’s Disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 21(2), 195–210.
- Dillon, C. P., Weinlich, R., Rodriguez, D. A., Cripps, J. G., Quarato, G., Gurung, P., Verbist, K. C., Brewer, T. L., Llambi, F., Gong, Y.-N., Janke, L. J., Kelliher, M. A., Kanneganti, T.-D., Green, D. R. (2014). RIPK1 Blocks Early Postnatal Lethality Mediated by Caspase-8 and RIPK3. *Cell*, 157(5), 1189–1202.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072.
- Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2013). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat. Chem. Biol.* 2014 10:1, 10(1), 9–17.

- Dixon, S. J., Winter, G. E., Musavi, L. S., Lee, E. D., Snijder, B., Rebsamen, M., Superti-Furga, G., Stockwell, B. R. (2015). Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chem. Biol.*, 10(7), 1604–1609.
- Do Van, B., Gouel, F., Jonneaux, A., Timmerman, K., Gelé, P., Pétrault, M., Bastide, M., Laloux, C., Moreau, C., Bordet, R., Devos, D., Devedjian, J.-C. (2016). Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiol. Dis.*, 94, 169–178.
- Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Grocin, A. G., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H., Conrad, M. (2019). FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, 575(7784), 693–698.
- Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Irmeler, M., Beckers, J., Aichler, M., Walch, A., Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat. Chem. Biol.*, 13(1), 91–98.
- Dondelinger, Y., Jouan-Lanhouet, S., Divert, T., Theatre, E., Bertin, J., Gough, P. J., Giansanti, P., Heck, A. J. R., Dejardin, E., Vandenabeele, P., Bertrand, M. J. M. (2015). NF- $\kappa$ B-Independent Role of IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. *Mol. Cell*, 60(1), 63–76.
- Dovey, C. M., Diep, J., Clarke, B. P., Hale, A. T., McNamara, D. E., Guo, H., Brown, N. W., Cao, J. Y., Grace, C. R., Gough, P. J., Carette, J. E. (2018). MLKL Requires the Inositol Phosphate Code to Execute Necroptosis. *Mol. Cell*, 70(5), 936–948.
- Dowling, J. P., Nair, A., Zhang, J. (2015). A novel function of RIP1 in postnatal development and immune homeostasis by protecting against RIP3-dependent necroptosis and FADD-mediated apoptosis. *Front. Cell Dev. Biol.*, 3, 12.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4), 495–516.
- Ertao, Z., Jianhui, C., Kang, W., Zhijun, Y., Hui, W., Chuangqi, C., Changjiang, Q., Sile, C., Yulong, H., Shirong, C. (2016). Prognostic value of mixed lineage kinase domain-like protein expression in the survival of patients with gastric cancer. *Tumor Biol.*, 37(10), 13679–13685.
- Fang, X., Wang, H., Han, D., Xie, E., Yang, X., Wei, J., Gu, S., Gao, F., Zhu, N., Yin, X., Wang, F. (2019). Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116(7), 2672–2680.
- Faust, H., Mangalmurti, N. S., Mangalmurti, N. S., Mangalmurti, N. S. (2020). Collateral damage: necroptosis in the development of lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 318(2), L215–L225.
- Fogh, J., & Trempe, G. (1975). New Human Tumor Cell Lines. in *Human Tumor Cells in Vitro*.

- Friedmann Angeli, J. P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. a, Hammond, V. J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., Conrad, M. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell Biol.*, 3(8), 1–9.
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell*, 147(4), 742–758.
- Gao, M., Monian, P., Quadri, N., Ramasamy, R., Jiang, X. (2015). Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. *Mol. Cell*, 59(2), 298–308.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 65(2–3), 45–80.
- Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., Liu, C. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol. Cancer*, 18(1), 100.
- Grootjans, S., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. (2017). Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Diff.*, 24(7), 1184–1195.
- Hambricht, W. S., Fonseca, R. S., Chen, L., Na, R., & Ran, Q. (2017). Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biol.*, 12, 8–17.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hangauer, M. J., Viswanathan, V. S., Ryan, M. J., Bole, D., Eaton, J. K., Matov, A., Galeas, J., Dhruv, H. D., Berens, M. E., Schreiber, S. L., McCormick, F., McManus, M. T. (2017). Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature*, 551(7679), 247.
- Hildebrand, J. M., Tanzer, M. C., Lucet, I. S., Young, S. N., Spall, S. K., Sharma, P., Pierotti, C., Garnier, J.-M. M., Dobson, R. C. J. J., Webb, A. I., Silke, J. (2014). Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(42), 15072–15077.
- Hirschhorn, T., & Stockwell, B. R. (2019). The development of the concept of ferroptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 133, 130–143.
- Hu, C. L., Nydes, M., Shanley, K. L., Morales Pantoja, I. E., Howard, T. A., Bizzozero, O. A. (2019). Reduced expression of the ferroptosis inhibitor GPx4 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.*, 148(3), 426–439.
- Javadov, S., Kuznetsov, A. (2013). Mitochondrial Permeability Transition and Cell Death: The Role of Cyclophilin D. *Front. Physiol.*, 4, 76.

- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S. J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, 520(7545), 57–62.
- Jiang, X., Stockwell, B. R., Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology, and role in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 22(4), 266–282.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.
- Kaiser, W. J., Daley-Bauer, L. P., Thapa, R. J., Mandal, P., Berger, S. B., Huang, C., Sundararajan, A., Guo, H., Roback, L., Speck, S. H., Bertin, J., Gough, P. J., Balachandran, S., Mocarski, E. S. (2014). RIP1 suppresses innate immune necrotic as well as apoptotic cell death during mammalian parturition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(21), 7753–7758.
- Kaiser, W. J., Upton, J. W., Long, A. B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L. P., Hakem, R., Caspary, T., Mocarski, E. S. (2011). RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, 471(7338), 368–372.
- Kang, M.-J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., Iijima, H., Yamamoto, T. T. (1997). A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(7), 2880–2884.
- Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., Leder, P. (1998). The Death Domain Kinase RIP Mediates the TNF-Induced NF- $\kappa$ B Signal. *Immunity*, 8(3), 297–303.
- Khoury, M. K., Gupta, K., Franco, S. R., Liu, B. (2020). Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *Am. J. Pathol.*, 190(2), 272.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lang, X., Green, M. D., Wang, W., Yu, J., Choi, J. E., Jiang, L., Liao, P., Zhou, J., Zhang, Q., Dow, A., Zou, W. (2019). Radiotherapy and immunotherapy promote tumoral lipid oxidation and ferroptosis via synergistic repression of SLC7A11. *Cancer Discov.*, 9(12), 1673–1685.
- Leng, Y., Zhang, Y., Li, X., Wang, Z., Zhuang, Q., Lu, Y. (2021). Receptor Interacting Protein Kinases 1/3: The Potential Therapeutic Target for Cardiovascular Inflammatory Diseases. *Front. Pharmacol.*, 12, 762334.
- Li, J.-X., Feng, J.-M., Wang, Y., Li, X.-H., Chen, X.-X., Su, Y., Shen, Y.-Y., Chen, Y., Xiong, B., Yang, C.-H., Ding, J., Miao, Z.-H. (2014). The B-RafV600E inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell Death Dis.*, 5(6), e1278.

- Li, W., Feng, G., Gauthier, J. M., Lokshina, I., Higashikubo, R., Evans, S., Liu, X., Hassan, A., Tanaka, S., Cicka, M., Hsiao, H. M., Ruiz-Perez, D., Bredemeyer, A., Gross, R. W., Mann, D. L., Tyurina, Y. Y., Gelman, A. E., Kagan, V. E., Linkermann, A., Lavine, K. J., Kreisel, D. (2019). Ferroptotic cell death and TLR4/Trif signaling initiate neutrophil recruitment after heart transplantation. *J. Clin. Invest.*, 129(6), 2293–2304.
- Li, Xian, Guo, J., Ding, A. P., Qi, W. W., Zhang, P. H., Lv, J., Qiu, W. S., Sun, Z. Q. (2017). Association of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Expression With Prognosis in Patients With Colon Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 16(4), 428–434.
- Li, Xuehui, Dong, G., Xiong, H., Diao, H. (2021). A narrative review of the role of necroptosis in liver disease: a double-edged sword. *Ann. Transl. Med.*, 9(5), 422.
- Li, Y., Feng, D., Wang, Z., Zhao, Y., Sun, R., Tian, D., Liu, D., Zhang, F., Ning, S., Yao, J., Tian, X. (2019). Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. *Cell Death Differ.*, 26(11), 2284–2299.
- Linkermann, A., Skouta, R., Himmerkus, N., Mulay, S. R., Dewitz, C., De Zen, F., Prokai, A., Zuchtriegel, G., Krombach, F., Welz, P.-S., Weinlich, R., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Pasparakis, M., Bleich, M., Weinberg, J. M., Reichel, C. A., Bräsen, J. H., Kunzendorf, U., Anders, H. J., Krautwald, S. (2014). Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(47), 16836–16841.
- Linkermann, A., Bräsen, J. H., Darding, M., Jin, M. K., Sanz, A. B., Heller, J. O., De Zen, F., Weinlich, R., Ortiz, A., Walczak, H., Weinberg, J. M., Green, D. R., Kunzendorf, U., Krautwald, S. (2013). Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(29), 12024–12029.
- Linkermann, A., De Zen, F., Weinberg, J., Kunzendorf, U., & Krautwald, S. (2012). Programmed necrosis in acute kidney injury. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 27(9), 3412–3419.
- Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S., Anders, H. J. (2014). Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat. Rev. Immunol.*, 14(11), 759–767.
- Mandal, P., Berger, S. B., Pillay, S., Moriwaki, K., Huang, C., Guo, H., Lich, J. D., Finger, J., Kasparcova, V., Votta, B., Kaiser, W. J. (2014). RIP3 Induces Apoptosis Independent of Pronecrotic Kinase Activity. *Mol. Cell*, 56(4), 481–495.
- Masaldan, S., Bush, A. I., Devos, D., Rolland, A. S., Moreau, C. (2019). Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.*, 133, 221–233.
- Monack, D. M., Navarre, W. W., Falkow, S. (2001). Salmonella-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes and Infect.*, 3(14–15), 1201–1212.
- Morgan, M. J., & Kim, Y. S. (2022). Roles of RIPK3 in necroptosis, cell signaling, and disease. *Exp. Mol. Med.*, 54(10), 1695–1704.

- Müller, T., Dewitz, C., Schmitz, J., Schröder, A. S., Bräsen, J. H., Stockwell, B. R., Murphy, J. M., Kunzendorf, U., Krautwald, S. (2017). Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure. *Cell. Mol. Life Sci.*, 74(19), 3631–3645.
- Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., Wang, P. (2021). Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*, 26(3-4), 152–162.
- Murphy, J. M., Czabotar, P. E., Hildebrand, J. M., Lucet, I. S., Zhang, J. G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A. I., Alexander, W. S. (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39(3), 443–453.
- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311–320.
- Petrie, E. J., Czabotar, P. E., Murphy, J. M. (2019). The Structural Basis of Necroptotic Cell Death Signaling. *Trends Biochem. Sci.*, 44(1), 53–63.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P., Gardner, M. B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, 33(4), 1027–1033.
- Saeed, W. K., Jun, D. W., Jang, K., Koh, D. H. (2019). Necroptosis signaling in liver diseases: An update. *Pharmacol. Res.*, 148.
- Sanford K., Earle W. R., Likely G. D. (1948). The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 9(3), 229–246.
- Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Ramos, A. M., Ortiz, A. (2023). Regulated cell death pathways in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 19(5), 281–299.
- Sato, M., Onuma, K., Domon, M., Hasegawa, S., Suzuki, A., Kusumi, R., Hino, R., Kakihara, N., Kanda, Y., Osaki, M., Sato, H. (2020). Loss of the cystine/glutamate antiporter in melanoma abrogates tumor metastasis and markedly increases survival rates of mice. *Int. J. Cancer*, 147(11), 3224–3235.
- Seifert, L., Werba, G., Tiwari, S., Gao Ly, N. N., Allothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Barilla, R., Daley, D., Greco, S. H., Torres-Hernandez, A., Pergamo, M., Ochi, A., Zambirinis, C. P., Pansari, M., Rendon, M., Tippens, D., Hundeyin, M., Mani, V. R., Hajdu, C., Engle, D., Miller, G. (2016). The Necrosome Promotes Pancreas Oncogenesis via CXCL1 and Mincle Induced Immune Suppression. *Nature*, 532(7598), 245–249.
- Shan, B., Pan, H., Najafov, A., Yuan, J. (2018). Necroptosis in development and diseases. *Genes Dev.*, 32(5–6), 327–340.
- Shojaie, L., Iorga, A., Dara, L. (2020). Cell Death in Liver Diseases: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(24), 9682.

- Skouta, R., Dixon, S. J., Wang, J., Dunn, D. E., Orman, M., Shimada, K., Rosenberg, P. A., Lo, D. C., Weinberg, J. M., Linkermann, A., Stockwell, B. R. (2014). Ferrostatins Inhibit Oxidative Lipid Damage and Cell Death in Diverse Disease Models. *J. Am. Chem. Soc.*, 136(12), 4551–4556.
- Soupeine, E., & Kuypers, F. A. (2008). Mammalian Long-Chain Acyl-CoA Synthetases. *Exp. Biol. Med.*, 233(5), 507–521.
- Stockwell, B. R. (2022). Ferroptosis turns 10: Emerging Mechanisms, Physiological Functions, and Therapeutic Applications. *Cell*, 185(14), 2401–2421.
- Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U. C., Pasparakis, M., Offermanns, S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*, 536(7615), 215–218.
- Sugaya, T., Kanno, H., Matsuda, M., Handa, K., Tateda, S., Murakami, T., Ozawa, H., & Itoi, E. (2019). B-RAFV600E Inhibitor Dabrafenib Attenuates RIPK3-Mediated Necroptosis and Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Cells*, 8(12), 1582.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148, 213–227.
- Takahashi, N., Duprez, L., Grootjans, S., Cauwels, A., Nerinckx, W., DuHadaway, J. B., Goossens, V., Roelandt, R., Van Hauwermeiren, F., Libert, C., Declercq, W., Callewaert, N., Prendergast, G. C., Degterev, A., Yuan, J., Vandenabeele, P. (2012). Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis.*, 3(11), e437.
- Tang, D., Chen, X., Kang, R., Kroemer, G. (2021). Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res.*, 31(2), 107–125.
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.*, 29(5), 347–364.
- Todaro, G. J., & Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell. Biol.*, 17, 299–313.
- Tong, X., Tang, R., Xiao, M., Xu, J., Wang, W., Zhang, B., Liu, J., Yu, X., Shi, S. (2022). Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. *J. Hematol. Oncol.*, 15(1), 174.
- Torii, S., Shintoku, R., Kubota, C., Yaegashi, M., Torii, R., Sasaki, M., Suzuki, T., Mori, M., Yoshimoto, Y., Takeuchi, T., Yamada, K. (2016). An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells. *Biochem. J.*, 473(6), 769–777.
- Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K. M., Lay, J., Wong, D. J. L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., Braas, D., Grasso, C. S., Palaskas, N., Ribas, A., & Graeber, T. G. (2018). Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell*, 33(5), 890–904.



- Tuo, Q., Lei, P., Jackman, K. A., Li, X., Xiong, H., Li, X., Liuyang, Z., Roisman, L., Zhang, S., Ayton, S., Wang, Q., Crouch, P. J., Ganio, K., Wang, X. C., Pei, L., Adlard, P. A., Lu, Y. M., Cappai, R., Wang, J. Z., Liu, R., Bush, A. I. (2017). Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. *Mol. Psychiatry*, 22(11), 1520–1530.
- Van Coillie, S., Van San, E., Goetschalckx, I., Wiernicki, B., Mukhopadhyay, B., Tonnus, W., Choi, S. M., Roelandt, R., Dumitrascu, C., Lamberts, L., Dams, G., Weyts, W., Huysentruyt, J., Hassannia, B., Ingold, I., Lele, S., Meyer, E., Berg, M., Seurinck, R., Saeys, Y., Vermeulen, A., Van Nuijs, A., Conrad, M., Linkermann, A., Rajapurkar, M., Vandenabeele, P., Hoste, E., Augustyns, K., Vanden Berghe, T. (2022). Targeting ferroptosis protects against experimental (multi)organ dysfunction and death. *Nat. Commun.*, 13(1), 1046.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., Wallach, D. (1998). Targeted Disruption of the Mouse Caspase 8 Gene Ablates Cell Death Induction by the TNF Receptors, Fas/Apo1, and DR3 and Is Lethal Prenatally. *Immunity*, 9(2), 267–276.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 187(9), 1477–1485.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 184(1), 39–51.
- Viswanathan, V. S., Ryan, M. J., Dhruv, H. D., Gill, S., Eichhoff, O. M., Seashore-Ludlow, B., Kaffenberger, S. D., Eaton, J. K., Shimada, K., Aguirre, A. J., Viswanathan, S. R., Chattopadhyay, S., Tamayo, P., Yang, W. S., Rees, M. G., Chen, S., Boskovic, Z. V., Javai, S., Huang, C., Wu, X., Schreiber, S. L. (2017). Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature*, 547(7664), 453–457.
- Wang, Lai, Du, F., Wang, X. (2008). TNF- $\alpha$  Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. *Cell*, 133(4), 693–703.
- Wang, Lili, Chang, X., Feng, J., Yu, J., Chen, G. (2020). TRADD Mediates RIPK1-Independent Necroptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. *Front. Cell Dev. Biol.*, 7, 393.
- Wang, Lingling, Zhou, L., Zhou, Y., Liu, L., Jiang, W., Zhang, H., Liu, H. (2021). Necroptosis in Pulmonary Diseases: A New Therapeutic Target. *Front. Pharmacol.*, 12, 737129.
- Wang, W., Green, M., Choi, J. E., Gijón, M., Kennedy, P. D., Johnson, J. K., Liao, P., Lang, X., Kryczek, I., Sell, A., Xia, H., Zhou, J., Li, G., Li, J., Li, W., Wei, S., Vatan, L., Zhang, H., Szeliga, W., Gu, W., Zou, W. (2019). CD8<sup>+</sup> T cells regulate tumor ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature*, 569(7755), 270–274.

- Wang, Y., Zhang, M., Bi, R., Su, Y., Quan, F., Lin, Y., Yue, C., Cui, X., Zhao, Q., Liu, S., Yang, Y., Zhang, D., Cao, Q., Gao, X. (2022). ACSL4 deficiency confers protection against ferroptosis-mediated acute kidney injury. *Redox Biol.*, *51*, 102262.
- Weiland, A., Wang, Y., Wu, W., Lan, X., Han, X., Li, Q., Wang, J. (2019). Ferroptosis and Its Role in Diverse Brain Diseases. *Mol. Neurobiol.*, *56*(7), 4880–4893.
- Weinlich, R., Oberst, A., Beere, H. M., Green, D. R. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *18*(2), 127–136.
- Xia, B., Fang, S., Chen, X., Hu, H., Chen, P., Wang, H., Gao, Z. (2016). MLKL forms cation channels. *Cell Res.*, *26*(5), 517–528.
- Xie, L. H., Fefelova, N., Pamarthi, S. H., Gwathmey, J. K. (2022). Molecular Mechanisms of Ferroptosis and Relevance to Cardiovascular Disease. *Cells*, *11*(17), 2726.
- Yan, B., Ai, Y., Sun, Q., Ma, Y., Cao, Y., Wang, J., Zhang, Z., Wang, X. (2021). Membrane Damage during Ferroptosis Is Caused by Oxidation of Phospholipids Catalyzed by the Oxidoreductases POR and CYB5R1. *Mol. Cell*, *81*(2), 355–369.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, *113*(34), E4966–4975.
- Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., Stockwell, B. R. (2014). Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell*, *156*(1–2), 317–331.
- Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2008). Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chem. Biol.*, *15*(3), 234–245.
- Yeh, W. C., De La Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W. S., Lowe, S. W., Goeddel, D. V., Mak, T. W. (1998). FADD: Essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, *279*(5358), 1954–1958.
- Yoshida, M., Minagawa, S., Araya, J., Sakamoto, T., Hara, H., Tsubouchi, K., Hosaka, Y., Ichikawa, A., Saito, N., Kadota, T., Kuwano, K. (2019). Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis. *Nat. Commun.*, *10*(1), 3145.
- Yu, Z., Jiang, N., Su, W., Zhuo, Y. (2021). Necroptosis: A Novel Pathway in Neuroinflammation. *Front. Pharmacol.*, *12*, 701564.
- Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R., Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *478*(3), 1338–1343.

- Zakeri, Z. F., & Ahuja, H. S. (1997). Cell death/apoptosis: Normal, chemically induced, and teratogenic effect. *Mutat. Res.*, 396(1–2), 149–161.
- Zhang, H. L., Hu, B. X., Li, Z. L., Du, T., Shan, J. L., Ye, Z. P., Peng, X. D., Li, X., Huang, Y., Zhu, X. Y., Chen, Y. H., Feng, G. K., Yang, D., Deng, R., Zhu, X. F. (2022). PKC $\beta$ II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis. *Nat. Cell Biol.*, 24(1), 88–98.
- Zhang, Y., Tan, H., Daniels, J. D., Zandkarimi, F., Liu, H., Brown, L. M., Uchida, K., O'Connor, O. A., Stockwell, B. R. (2019). Imidazole ketone erastin induces ferroptosis and slows tumor growth in a mouse lymphoma model. *Cell Chem. Biol.*, 26(5), 623–633.
- Zhang, Z., Yao, Z., Wang, L., Ding, H., Shao, J., Chen, A., Zhang, F., Zheng, S. (2018). Activation of ferritinophagy is required for the RNA-binding protein ELAVL1/HuR to regulate ferroptosis in hepatic stellate cells. *Autophagy*, 14(12), 2083–2103.
- Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., Liu, Z. G. (2012). Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(14), 5322–5327.
- 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 Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent. Sci.*, 3(3), 232–243.
- Zimmermann, M., & Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol. Biol.*, 740, 57–63.

## **Danksagung**

Mein Dank geht an alle, die mich auf meinem Weg zur Fertigstellung der Dissertation unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Stefan Krautwald für die Überlassung des Themas, für die fachliche Unterstützung, das herzliche Arbeitsklima als auch für viele humorvolle private Momente danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der AG Krautwald, welche mich herzlich aufgenommen haben, mir jederzeit mit Ratschlägen zur Seite standen und in die Laborarbeit eingewiesen haben.

Ich danke Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf für die Einladung und das Angebot im nephrologischen Forschungslabor zu promovieren.

Meiner Familie und insbesondere meinem Vater danke ich für die persönliche und moralische Unterstützung während der gesamten Studienzeit, sowie für die finanzielle Unterstützung, welche diese Dissertation ermöglicht hat.

Mein großer persönlicher Dank gilt meiner Ehefrau Nina für die liebevolle Motivation und Unterstützung zur Vollendung der Dissertation sowie dem baldigen Geschenk einer Familie.

## Eidesstattliche Erklärung und Veröffentlichung

Hiermit versichere ich, Tammo Müller, an Eides statt, dass meine Dissertation, abgesehen von den Ratschlägen meiner akademischen Betreuer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist und dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe. Meine Arbeit wurde bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegt. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

**Müller, T.**, Dewitz, C., Schmitz, J. *et al.* Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 3631–3645 (2017).