

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

Die Rolle der Glutathionperoxidase 4 bei der Ausbildung des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Bauernschmitt

aus

Karlsruhe

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: PD Dr. Ulrich Dendorfer
Prof. Dr. André Werner Brändli
Prof. Dr. Holger Schmid

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Dr. Marc Weidenbusch

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2023

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2016 bis November 2017 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Betreut wurde diese Dissertation durch Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders.

Förderung des Projekts

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München unterstützt.

Vorträge

Nephrologisches Forum München *Fellow's Night* 2017:

„Die Rolle der Glutathionperoxidase 4 bei der Ausbildung des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens“

Johannes Bauernschmitt; Marc Weidenbusch; Hans-Joachim Anders

Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2016:
„*A new, pathophysiologically oriented in vitro model of ischemia reperfusion injury of the kidney*“

Johannes Bauernschmitt; Tobias Seibt; Marc Weidenbusch; Hans-Joachim Anders

Preise und Stipendien:

Vortragspreis des Nephrologischen Forums München 2017

Reisestipendium zur Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	vii
Abkürzungsverzeichnis	vii
Verzeichnis im Text erwähnter Gene und Proteine	ix
Gender-Hinweis.....	x
1. Einleitung.....	1
1.1 Funktion und Anatomie der Niere	1
1.2 Akute Nierenschädigung und Chronische Niereninsuffizienz.....	2
1.3 Allogene Nierentransplantation	3
1.4 Der Ischämie-Reperfusionsschaden.....	6
1.5 Ferroptose	14
1.6 Intrazelluläre Proteindegradationssysteme	26
1.7 Zielsetzung und Hypothesen	29
2. Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.2 Methoden.....	37
3. Ergebnisse	57
3.1 Liproxstatin-2 hat im IRS-Mausmodell einen protektiven Effekt	57
3.2 Nach IRS kommt es zu einer Gpx4 Depletion in der Niere.....	60
3.3 Das S3 Segment ist von der Gpx4-Depletion besonders stark betroffen	61
3.4 Nach Reperfusion kommt es zu einer verminderten Gpx4-Genexpression	64
3.5 Intramitochondriales Superoxid verursacht <i>in vitro</i> keine Gpx4-Degradation	65
3.6 In einem Hypoxie-Reoxygenierungs-Modell kommt es <i>in vitro</i> zu Ferroptose	68

3.7	Vergleich der Häufigkeit ferroptoserelevanter Proteine entlang des Tubulussystems.....	70
3.8	Beim Menschen kommt es im Verlauf einer NTx zu einer tubulären GPX4 Depletion.....	75
3.9	Kein Nachweis einer signifikante Assoziation zwischen der Menge der tubulären GPX4 und dem Auftreten einer VTF	76
4.	Diskussion	78
4.1	Lip-2 wirkt im IRS-Mausmodell protektiv	79
4.2	Ein neuer Pathomechanismus des renalen IRS	80
4.3	Wie kommt es zum Verlust der Gpx4?.....	81
4.4	Gpx4-Degradation durch direkte Interaktion mit ROS?	82
4.5	Verlust der Gpx4 durch Bildung eines oxidativ vernetzten Makromoleküls?	85
4.6	Intrazelluläre Gpx4-Degradation über Proteasom und Autophagie	87
4.7	Warum sind die proximalen Tubulusepithelien so anfällig für Ferroptose?	89
4.8	Tubuläre GPX4-Depletion im Verlauf einer Nierentransplantation	93
4.9	Limitationen dieser Arbeit	94
4.10	Ausblick.....	96
	Zusammenfassung.....	99
	Literatur.....	102
	Danksagung	115
	Eidesstattliche Erklärung.....	116
	Übereinstimmungserklärung	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das renale Tubulussystem	1
Abbildung 2: Oxidativer Stress und seine Folgen	7
Abbildung 3: Physiologische Arbeitsweise der Atmungskette und Superoxid-Entstehung über RET	8
Abbildung 4: Wichtige Reaktionswege des intrazellulären Wasserstoffperoxid-Metabolismus	9
Abbildung 5: Modellierung von oxidativem Stress	11
Abbildung 6: Veränderungen im Bereich der proximalen Tubuli im Verlauf eines renalen IRS	14
Abbildung 7: Die GPX4/GSH-Achse der Ferroptose	16
Abbildung 8: Ablauf der Lipidperoxidation in Biomembranen	18
Abbildung 9: Proteindegradation über die drei Formen der Autophagie	27
Abbildung 10: Schematische Darstellung der operativen Induktion des renalen bIRS	40
Abbildung 11: Zeitachse des Tierversuchs zum Einfluss des IRS auf die renale Gpx4	41
Abbildung 12: Zeitachse des Tierversuchs zum Effekt von Lip-2 im renalen bIRS-Mausmodell	42
Abbildung 13: Zeitpunkte der Biopsieentnahme im Verlauf einer Nierentransplantation	55
Abbildung 14: Ablauf der Quantifizierung der tubulären GPX4-Proteinkonzentration	56
Abbildung 15: Effekt unterschiedlicher Dosen Lip-2 auf die renalen Funktionsparameter nach bIRS ..	57
Abbildung 16: Effekt der Behandlung mit Lip-2 auf die renalen Funktionsparameter nach bIRS	58
Abbildung 17: Effekt der Intervention mit Lip-2 auf die strukturelle Tubulusschädigung nach bIRS ...	59
Abbildung 18: Renale Gpx4-Proteinkonzentration im Verlauf eines unilateralen IRS	60
Abbildung 19: Physiologische Gpx4-Verteilung in der Mausniere	62
Abbildung 20: Vergleich der physiologischen Gpx4-Verteilung mit der 24 h nach IRS-Induktion	63
Abbildung 21: Renale Gpx4-Genexpression im Verlauf eines unilateralen IRS	64
Abbildung 22: Antimycin A und Dimethylsuccinat verursachen synergistisch Zelltod	65
Abbildung 23: Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Zytotoxizität im Modell	66
Abbildung 24: MitoSox-Oxidation nach Behandlung mit Antimycin A und Dimethylsuccinat	66
Abbildung 25: Gpx4-Proteinkonzentration nach Inkubation mit Antimycin A und Dimethylsuccinat ..	67
Abbildung 26: Effekt von Lip-2 auf den durch Hypoxie und Reoxygenierung verursachten Zelltod	68
Abbildung 27: GPX4-Proteinkonzentration in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen	69
Abbildung 28: Vergleich der Häufigkeit ausgewählter Proteine in den Tubulussegmenten der Niere ...	71
Abbildung 29: Tubuläre GPX4-Proteinmenge im Verlauf einer Nierentransplantation	75
Abbildung 30: Tubuläre GPX4-Proteinmenge im Verlauf einer NTx bei Patienten mit PTF und VTF .	76
Abbildung 31: Anteil von Arachidonsäure und Docosatetraensäure in verschiedenen Geweben	92
Abbildung 32: Publikationsanalyse zu Ferroptose und der Niere	97
Abbildung 33: Zentrale Erkenntnisse dieser Arbeit	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Statistischer Vergleich der Häufigkeit ausgewählter Proteine in den 14 Tubulussegmenten 72

Abkürzungsverzeichnis

•O₂⁻, Superoxidanion
ADP, Adenosindiphosphat
AGP, 1-O-Alkylglycerol-3-Phosphat
ANS, Akute Nierenschädigung
ATL, *Ascending Thin Limb of the Loop of Henle*
ATP, Adenosintriphosphat
bIRS, bilateraler Ischämie-Reperfusions-Schaden
BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*
CCD, *Cortical Collecting Duct*
CNI, Chronische Niereninsuffizienz
CoA, Coenzym A
CVA, Chaperon vermittelte Autophagie
DCT, *Distal Convoluted Tubule*
DSO, Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTL, *Descending Thin Limb of the Loop of Henle*
ePL, Phospholipidether
Fe²⁺/Fe³⁺, Zweiwertiges/Dreiwertiges Eisenion
Fer, Ferrostatin
Fer-1, Ferrostatin-1
GFR, Glomeruläre Filtrationsrate
GSH, reduziertes Glutathion
GSSG, oxidiertes Glutathion
IKEM, Institut für Klinische und Experimentelle Medizin Prag
IMCD, Inner Medullary Collecting Duct
IRS, Ischämie-Reperfusions-Schaden
KDIGO, *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*
KTEA, *Kidney Tubules Expression Atlas*

LDH, Laktatdehydrogenase
 LEP, Labiler Eisenpool
 Lip-1, Liproxstatin-1
 Lip-2, Liproxstatin-2
 mTAL/cTAL, *medullary/cortical Thick ascending Limb of the Loop of Henle*;
 MUFA, *Mono Unsaturated Fatty Acids* (Einfach ungesättigte Fettsäure)
 NADPH/NADP⁺, reduziertes/oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
 NO, Stickstoffmonoxid
 NTx, Nierentransplantation
 O₂, Sauerstoff
 OMCD, *Outer Medullary Collecting Duct*;
 ONOO⁻, Peroxynitrit
 PAS, *Periodic Acid-Schiff*
 PL, Phospholipid
 PL=O, Phospholipidketon
 PL•, Kohlenstoffzentriertes Phospholipidradikal
 PLH, Phospholipid
 PLOH, Phospholipidalkohol
 PLOO•, Phospholipidperoxyradikal
 PLOOH, Phospholipidperoxid
 PTF, Primäre Transplantatfunktion
 PUFA, *Poly Unsaturated Fatty Acids* (Mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
 rIRS, renaler Ischämie-Reperfusionsschaden
 RNS, *Reactive Nitrogen Species* (Reaktive-Stickstoff-Spezies)
 ROS, *Reactive Oxygen Species* (Reaktive Sauerstoffspezies)
 rpm, *Rounds per minute* (Umdrehungen/Minute)
 RT-qPCR, *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*
 S1-3, S1-3 Segment des proximalen Tubulus
 SEM, *Standard Error of the Mean* (Standardfehler)
 uIRS, unilateraler Ischämie-Reperfusionsschaden
 VTF, Verzögerte Transplantatfunktion
 α-Toc, α-Tocopherol

Verzeichnis im Text erwähnter Gene und Proteine

Die erwähnten Gene und Proteine wurden anhand der aktuellen Nomenklatur der *Mouse Genome Informatics* Datenbank (<http://www.informatics.jax.org/>) bezeichnet. Humane Proteine wurden im Text von murinen gemäß der herkömmlichen Nomenklatur unterschieden, wie hier anhand des Proteins Glutathionperoxidase 4 demonstriert: Murine Gpx4, humane GPX4.

Acs14, Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4

Agpat3, 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3

Agps, Alkylglycerone phosphate synthase

Alox12, Arachidonate 12-lipoxygenase

Alox15, Arachidonate 15-lipoxygenase

Alox5, Arachidonate 5-lipoxygenase

Aloxe3, Arachidonate lipoxygenase 3

Cat, Catalase

Cyb5r1, Cytochrome b5 reductase 1

Far1, Fatty-acyl-CoA Reductase 1

Fsp1, Ferroptosis Supressor Protein 1

Gch1, GTP Cyclohydrolase 1

Gclc, Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit

Ggt1, gamma-glutamyltransferase 1

Gnpat, Glyceronephosphate O-acyltransferase

Gpx1, Glutathione peroxidase 1

Gpx4, Glutathione peroxidase 4

Gsr, Glutathione reductase

Gss, Glutathione synthetase

Hsp90, Heat shock protein 90

Hspa8, Heat shock protein 8

Lpcat3, Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3

Nox1, NADPH oxidase 1

Nox4, NADPH oxidase 4

Pex10, Peroxisomal biogenesis factor 10

Pex12, Peroxisomal biogenesis factor 12

Pex3, Peroxisomal biogenesis factor 3
Pex7, Peroxisomal biogenesis factor 7
Por, Cytochrome p450 oxidoreductase
Prdx1, Peroxiredoxin 1
Prdx2, Peroxiredoxin 2
Prdx6, Peroxiredoxin 6
Scl7a11, Solute carrier family 7 (im Text als System xc⁻ bezeichnet)
Smcp, Sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein
Txn1, Thioredoxin 1
Txnrd1, Thioredoxin Reductase 1

Gender-Hinweis

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Die verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich, falls nicht anders kenntlich gemacht, auf alle Geschlechter.

1. Einleitung

1.1 Funktion und Anatomie der Niere

Die Nieren sind ein lebenswichtiges menschliches Organ. Als „Blutfilter“ dienen sie der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und der Aufrechterhaltung des Salz-, Flüssigkeits- und Säure-Basen-Haushalts des Körpers. Darüber hinaus beeinflussen sie Knochenumbau und Hämatogenese. Erkrankungen der Nieren sind häufig und haben große Auswirkung auf die globale Gesundheit (1). Zum Verständnis pathophysiologischer Prozesse sind Kenntnisse der Anatomie und Funktionsweise relevant, die im Weiteren erläutert werden sollen.

Die Nieren sind paarig angelegt und jeweils über eine aus der Aorta abdominalis abgehende Nierenarterie und eine in die untere Hohlvene drainierende Nierenvene ans Blutssystem angeschlossen. Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Nephrene bestehen aus jeweils einem Glomerulus und dem zugehörigen ableitenden Tubulussystem, sowie den zu- und ableitenden Blutgefäßen. Im Kapillarbett des Glomerulus wird das Blut über eine mehrschichtige Membran filtriert, wodurch der Primärharn entsteht. Dieser wird im Verlauf des Tubulussystems durch komplexe Sezernierungs- und Resorptionsprozesse zum Endharn prozessiert. Der Endharn wird ins Nierenbecken geleitet und verlässt die Niere über den Ureter in die Blase.

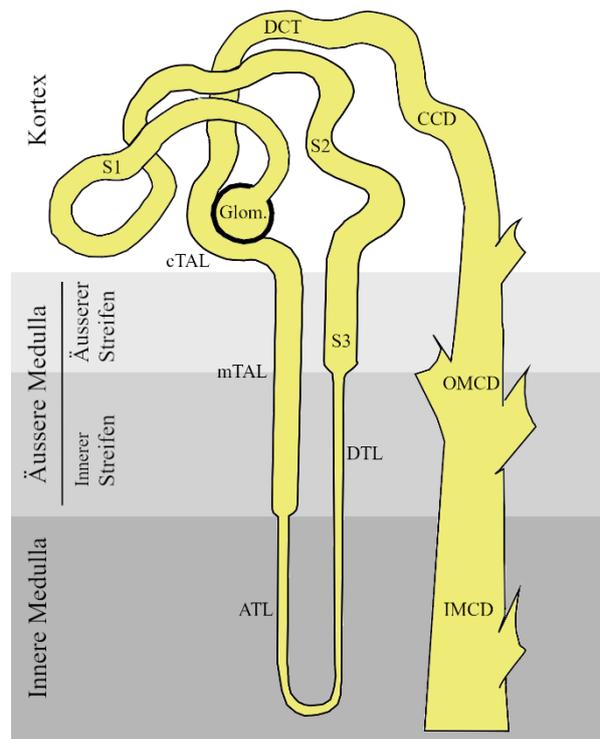


Abbildung 1: Das renale Tubulussystem

Schematische Darstellung des renalen Tubulussystems mit gängigen Bezeichnungen, frei nach Chen et al. (2). Abkürzungen: S1-3, S1-S3 Segment des proximalen Tubulus; DTL, *Descending Thin Limb of the Loop of Henle*; ATL, *Ascending Thin Limb of the Loop of Henle*; mTAL/cTAL, *medullary/cortical Thick ascending Limb of the Loop of Henle*; DCT, *Distal Convoluted Tubule*; CCD, *Cortical Collecting Duct*; OMCD, *Outer Medullary Collecting Duct*; IMCD, *Inner Medullary Collecting Duct*.

Anhand von Zellmorphologie und Funktion kann das Tubulussystem grob in vier Teile untergliedert werden: Proximaler Tubulus, Henle'sche Schleife, distaler Tubulus und Sammelrohr. Der proximale Tubulus wird weiter unterteilt in S1 bis S3 Segment, wobei das S3 Segment in etwa dem geraden Abschnitt (*Pars Recta*) des proximalen Tubulus entspricht (2). Es ist besonders anfällig für Schädigung durch Ischämie und Reperfusion und steht deshalb im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Am Querschnitt der Niere lässt sich bereits makroskopisch die hellere Rinde vom dunkleren Mark unterscheiden. In der Rinde befinden sich die Glomeruli und die gewundenen Elemente des Tubulussystems (*Pars convoluta* des proximalen und distalen Tubulus), während im Mark die geraden Anteile der proximalen Tubuli (proximaler Tubulus, *Pars recta*) und die Henl'schen Schleifen liegen. Anhand der vorhandenen Tubulussegmente werden im Nierenmark eine äußere und innere Zone voneinander unterschieden. Die äußere Zone wird noch einmal in äußeren und inneren Streifen (*Outer Stripe of Outer Medulla*, OSOM; *Inner Stripe of Outer Medulla*, ISOM) unterteilt. Das S3 Segment des proximalen Tubulus liegt im OSOM der Niere.

1.2 Akute Nierenschädigung und Chronische Niereninsuffizienz

Den wichtigsten Parameter zur Beurteilung der exkretorischen Nierenfunktion stellt die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) dar. Sie bezeichnet das in der Gesamtheit der Glomeruli filtrierte Flüssigkeitsvolumen pro Minute. Im klinischen Alltag wird die GFR näherungsweise anhand von Kreatinin-Serumkonzentration, Alter, Körpergewicht und Geschlecht geschätzt. Kreatinin ist ein Abfallprodukt des Muskelstoffwechsels, das fast ausschließlich renal eliminiert wird. Im Glomerulus wird es frei filtriert und im Tubulussystem nicht relevant resorbiert oder sezerniert. Da Kreatinin im Körper mit konstanter Rate gebildet wird, korreliert die Serumkonzentration im Gleichgewichtszustand eng mit der GFR.

Die akute Nierenschädigung (ANS) beschreibt eine innerhalb kurzer Zeit auftretende Funktionsstörung der Nieren. Die KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) definiert dies über einen akuten bis subakuten Abfall der Urinproduktion oder einen Anstieg des Serumkreatinins (3). Das Spektrum der pathologischen Prozesse, die eine akute Nierenschädigung hervorrufen können, ist breit (4). Ihre korrekte Zuordnung ist im klinischen Kontext von hoher Relevanz, da sie die Einleitung entscheidender therapeutischer Schritte ermöglicht.

Neben der Kreatininkonzentration stellt auch die Harnstoffkonzentration im Serum einen relevanten Parameter zur Beurteilung der exkretorischen Nierenfunktion dar. Harnstoff, ein Metabolit des Proteinabbaus, wird in der Leber über den Harnstoffzyklus gebildet und ausschließlich renal ausgeschieden. Im Glomerulus wird Harnstoff frei filtriert und teilweise im proximalen Tubulus resorbiert. Der Harnstoffspiegel ist neben der Nierenfunktion auch von anderen Faktoren wie Proteinaufnahme oder gesteigertem Katabolismus abhängig und deshalb als Filtrationsparameter nur unter Vorbehalt zu verwenden. In Zusammenschau mit der klinischen Situation stellt die Messung von Serumkreatinin- und Harnstoffspiegel jedoch den validierten Standard zur Detektion einer ANS beim Menschen und im Mausmodell dar (5, 6).

Als chronische Niereninsuffizienz (CNI) bezeichnet man eine länger als drei Monate bestehende Einschränkung der Nierenfunktion. Die häufigsten Ursachen sind in den Industrienationen eine chronische Schädigung der Nieren durch Diabetes mellitus und Hypertonie (7). Weltweit litten im Jahr 2017 in etwa 844 Millionen Menschen an einer CNI (8). Die Prävalenz steigt dabei mit dem Lebensalter, weshalb die WHO für den Zeitraum 2016 bis 2060 eine Zunahme der durch Nierenerkrankungen verursachten Todesfälle in Europa um ca. 60% projiziert (9).

Initial macht sich eine CNI meist durch keine oder nur unspezifische Symptome, wie zum Beispiel Abgeschlagenheit oder Juckreiz, bemerkbar. Dennoch ist die CNI bereits in frühen Stadien mit einer erhöhten Mortalität assoziiert, wozu insbesondere eine gesteigerte kardiovaskuläre Mortalität beiträgt (10). In fortgeschrittenen Stadien kommt es durch den zunehmenden Verlust der Filterfunktion der Nieren zu Störungen des Salz-, Flüssigkeits- und Säure-Basen-Haushalts. Zusätzlich tritt häufig eine Hypertonie auf und die endokrinen Funktionen der Niere sind beeinträchtigt. Sprechen die Veränderungen nicht ausreichend auf eine konservative Therapie an, oder kommt es durch den Anstieg harnpflichtiger Substanzen im Blut zu Komplikationen, ist der dauerhafte Einsatz eines Nierenersatzverfahrens die einzige Möglichkeit, das Überleben sicherzustellen. Als Nierenersatzverfahren werden die Dialyseverfahren (Hämo- und Peritonealdialyse), sowie im weiteren Sinne die allogene Nierentransplantation bezeichnet.

1.3 **Allogene Nierentransplantation**

Unter allogener Nierentransplantation (NTx) versteht man die Transplantation der Niere eines genetisch vom Empfänger abweichenden Spenders. Es wird unterschieden zwischen NTx

nach Lebend- und nach Kadaverspende, wobei letztere die Organspende nach dem Tod des Spenders bezeichnet. In Deutschland werden hierzu nur Organe von hirntoten Spendern verwendet, während in anderen Ländern auch die Organspende nach dem Tod durch zirkulatorischen Stillstand möglich ist. Die Vergabe von Spenderorganen nach Kadaverspende wird in Deutschland und sieben weiteren Ländern gemeinsam durch die Stiftung Eurotransplant organisiert. Anhand eines Scores, der sich aus Wartezeit, Patientenalter, medizinischer Dringlichkeit, immunologischen Kriterien und der Transportzeit des Organs zum Empfänger berechnet, werden Organe einem Empfänger auf der aktiven Eurotransplant-Warteliste zugeteilt (11).

Die Explantation der Spenderniere erfolgt unter Mitnahme von Ureter und Nierengefäßen. Vor dem Absetzen der Nierenarterie wird diese abgeklemmt, wodurch die Perfusion der Niere gestoppt wird und es zur Gewebeischämie kommt. Um den pathophysiologischen Prozessen während der Ischämie entgegenzuwirken, wird die Niere mit einer kalten Organpräservationslösung durchspült und auf 4 °C gekühlt. Typische verwendete Lösungen sind zum Beispiel Celsior, University of Wisconsin, Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat oder Institute George Lopez-1-Lösung. Diese enthalten spezifische Elektrolytgemische, osmotisch wirksame Kolloide (z.B. Hydroxyethylstärke oder Polyethylenglykol), Puffersysteme (z.B. Histidinpuffer), sowie teilweise antioxidativ wirksame Supplemente (z.B. Glutathion) (12). Nach der Explantation der Niere erfolgt auf schnellstem Wege der Transport zum Empfänger. Die Implantation erfolgt offen chirurgisch in die extraperitoneal gelegene Fossa Iliaca unter Anschluss an Arteria und Vena Iliaca externa, sowie an die Harnblase (13). Die Dauer des Intervalls zwischen Explantation und Implantation des Organs wird als kalte Ischämiezeit bezeichnet und ist prognostisch relevant. Das Risiko des Transplantatversagens und die Empfängermortalität steigen mit jeder Stunde der kalten Ischämiezeit an (14).

Neben der Kadaverspende besteht auch die Möglichkeit einer Transplantation nach Lebendspende. Da man zum Überleben nur eine Niere benötigt, kann ein gesunder Mensch sich entscheiden, einem Mitmenschen eine Niere zu spenden. Als Voraussetzung verlangt der Gesetzgeber in Deutschland eine besondere emotionale Nähe zwischen Spender und Empfänger. Aus prozeduraler Sicht unterscheidet sich die Transplantation nach Lebendspende von der nach Kadaverspende vor allem darin, dass die Operation an Spender und Empfänger zumeist parallel abläuft, sodass die Ischämiezeit minimiert wird. Neben der kürzeren

Ischämiezeit ist aufgrund der Spenderselektion auch davon auszugehen, dass sich die Organe nach Lebendspende in einem besseren Ausgangszustand befinden, als dies nach Kadaverspende der Fall ist. Das Langzeitüberleben der Empfänger nach Lebendspende ist dem nach Kadaverspende deutlich überlegen. Laut dem Jahresreport des ERA-EDTA Registry 2013 betrug das altersadjustierte 5-Jahres-Überleben der Empfänger nach Lebendspende 95,6 %, während es nach Kadaverspende 91,8 % betrug (15).

Tonelli et al. konnten in einer Metaanalyse zeigen, dass bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz die Nierentransplantation im Vergleich zur chronischen Hämodialyse mit einer reduzierten Langzeitmortalität und einer besseren Lebensqualität assoziiert ist. In der perioperativen Phase kommt es bei Transplantatempfängern zu einem kurzfristigen Anstieg der Mortalität, die jedoch rasch wieder abfällt und mittelfristig mehr als kompensiert wird. Auch die bessere Lebensqualität nach Transplantation stellt einen wichtigen Faktor dar, da diese unter chronischer Hämodialyse oft eingeschränkt ist (16). Entsprechend stellt die Nierentransplantation für die meisten Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz die bevorzugte Therapiemodalität dar. Dem gegenüber steht ein Mangel an Spenderorganen, aufgrund dessen nur ein Bruchteil der Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz tatsächlich transplantiert wird. Laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes gab es in Deutschland 2018 rund 80 000 dialysepflichtige Patienten (17), von denen laut DSO (Deutsche Stiftung Organtransplantation) zum 31.12.2018 ca. 12 000 auf der Warteliste für eine Spenderniere gelistet waren. Tatsächlich transplantiert wurden im selben Jahr jedoch nur 2291 Patienten, davon 638 nach Lebend- und 1653 nach Kadaverspende (18). Im gleichen Zeitraum verstarben allein auf der Warteliste 465 Patienten (19).

Um diesem ausgeprägten Mangel entgegenzuwirken, werden für Nierentransplantationen heute auch Organe verwendet, die aufgrund von hohem Alter, renaler Vorschädigung oder anderer klinischer Charakteristika früher nicht in Betracht gezogen worden wären. Dabei spricht man historisch auch von marginalen Organen. Dies birgt für den einzelnen jedoch auch Risiken, da diese Organe nicht in einem idealen Ausgangszustand sind.

Nach Transplantation kommt es infolge der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion häufig zu einer Form des akuten Nierenversagens, das in diesem Zusammenhang als verzögerte Transplantatfunktion (VTF) bezeichnet wird. Der Großteil der klinischen Studien definiert VTF über den Bedarf an Dialyse in der ersten Woche nach Transplantation (20). Diese

Definition umfasst in geringerem Umfang auch Fälle von hyperakuten Abstoßungsreaktionen, sowie vaskulären, Harnwegs- und anderen perioperativen Komplikationen (21).

Den wichtigsten modifizierbaren Risikofaktor stellt die kalte Ischämiezeit dar (22). Daneben sind Spenderalter und Kreatininclearance vor Explantation, die den Ausgangszustand des Spenderorgans abbilden, wichtige spenderabhängige Risikofaktoren (22, 23). Die Inzidenz der VTF beträgt 20-50% nach Kadaverspende und 4-10% nach Lebendspende (24). Ihr Auftreten kompliziert den postoperativen Verlauf und hat weitreichende Konsequenzen. So konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass Patienten, die nach Transplantation eine VTF erlitten hatten, nach einem mittleren Follow-up von 3,2 Jahren ein 41% höheres Risiko des Transplantatversagens hatten als Patienten, die keine VTF erlitten hatten (25). Die VTF stellt somit eine ernstzunehmende postoperative Komplikation dar, deren Auftreten mit einem schlechteren langfristigen Ergebnis nach Nierentransplantation assoziiert ist.

1.4 **Der Ischämie-Reperfusionsschaden**

Die Unterbrechung des Blutflusses in einem Gewebe wird als Ischämie bezeichnet. Während der Ischämie ist das Gewebe von der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung abgeschnitten und anfallende Stoffwechselprodukte können nicht mehr abtransportiert werden. Insbesondere die fehlende Zufuhr von Sauerstoff hat weitreichende Konsequenzen, da Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor der mehrschrittigen Oxidation von Glucose, Fettsäuren und Proteinen zu CO₂ dient. Die dabei freiwerdende Energie wird im Rahmen der Atmungskette genutzt, um durch den Export von Protonen aus der mitochondrialen Matrix einen elektrochemischen Gradienten über die mitochondriale Innenmembran aufzubauen. Dieser wird wiederum von der ATP-Synthase als Treiber der endothermen Reaktion von Adenosindiphosphat (ADP) und organischem Phosphat zu Adenosintriphosphat (ATP) verwendet. Insgesamt entstehen bei diesem als oxidative Phosphorylierung bezeichneten Prozess pro Mol Glucose 36 Mol ATP (26). Fehlt Sauerstoff, so kommt die oxidative Phosphorylierung zum Erliegen und Glucose kann lediglich zu Laktat abgebaut werden, wobei pro Mol Glucose nur 2 Mol ATP entstehen. Bei zu geringer Sauerstoffzufuhr kommt es daher nach dem Aufbrauchen zellulärer Energiespeicher zum Erliegen der zahlreichen ATP-abhängigen Prozesse in der Zelle. Zu den größten ATP-Verbrauchern zählen Ionenpumpen in der Zellmembran, vor allem Na⁺/K⁺-ATPasen, die das Elektrolytgleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellulärraum aufrechterhalten. Sind sie in ihrer Funktion gestört, resultiert eine

Elektrolytumverteilung und in Folge ein osmotisch bedingtes Anschwellen der Zellen (27). Durch das in der anaeroben Glykolyse anfallende saure Laktat kommt es zudem zu einer Gewebsazidose, die weitere Stoffwechselwege beeinflusst (27). Daneben tritt eine Vielzahl von weiteren, gewebspezifischen Veränderungen auf, die die zelluläre Homöostase beeinträchtigen.

Um das Überleben des Gewebes zu ermöglichen, muss die Blutversorgung wiederhergestellt werden. Im Rahmen der Reperfusion kommt es jedoch zu einer erneuten Schädigung, da reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) entstehen und eine Entzündungsreaktion initiiert wird. Dieser sogenannte Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) bildet den entscheidenden Pathomechanismus von Myokardinfarkt und Schlaganfall und hat auch im Rahmen von Transplantationen weitreichende Auswirkungen.

1.4.1 Reaktive Sauerstoffspezies und wichtige antioxidative Enzymsysteme

ROS ist ein Überbegriff für von Sauerstoff abgeleitete Moleküle, die eine höhere Reaktivität als Sauerstoff selbst aufweisen. Dazu zählen vor allem Peroxide (R-O-O-R) und freie Sauerstoffradikale. ROS entstehen als Nebenprodukt verschiedener Stoffwechselwege und werden z.B. als Botenstoffe gezielt enzymatisch produziert (28, 29). Da sie durch chemische Reaktion Proteine, Lipide und Nukleinsäuren in ihrer Funktion beeinträchtigen können, unterhält der Organismus ein komplexes antioxidatives System, um Schäden zu limitieren. Besteht ein Ungleichgewicht zwischen anfallenden ROS und der Möglichkeiten zu ihrer Entgiftung, so bezeichnet man dies als oxidativen Stress. Zu der Vielzahl an pathophysiologischen Prozessen, bei denen oxidativer Stress eine Rolle spielt, gehört auch der IRS (30).

Beim IRS beobachtet man über verschiedene Gewebe hinweg, dass nach der Reperfusion höhere Zelltodraten auftreten als es während der Ischämie der Fall ist. Die Behandlung mit unterschiedlichen endogenen und exogenen Antioxidantien wirkt sich dabei

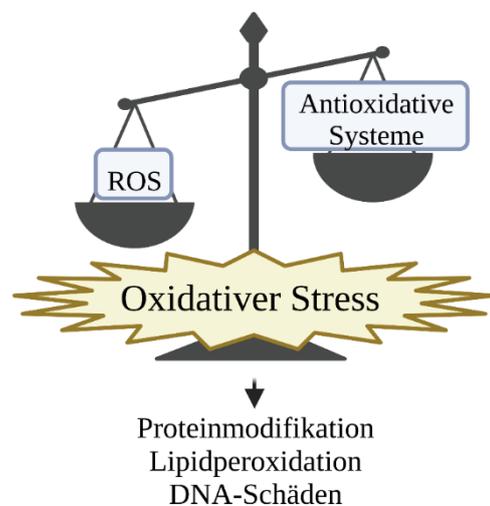


Abbildung 2: Oxidativer Stress und seine Folgen

Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

protektiv aus, weshalb man davon ausgeht, dass ROS diesen Effekt vermitteln (31, 32). Sie entstehen nach der Reperfusion explosionsartig, wobei initial insbesondere die ROS Superoxid an der Atmungskette gebildet wird (33–36).

Superoxid ist das Produkt der Ein-Elektronen Reduktion von Sauerstoff und entsteht auch als physiologisches Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung. Insbesondere an Komplex I und III kommt es zum versehentlichen „Entweichen“ von Elektronen aus der Atmungskette auf Sauerstoff, welcher dadurch unvollständig reduziert wird. Wie Chouchani et al. demonstrieren konnten, ist der Mechanismus der Superoxidentstehung nach Reperfusion jedoch primär ein anderer. Durch Purinnukleotidabbau und teilweise Umkehrung des Malat/Aspartatshuttles akkumuliert während der Ischämie in verschiedenen Geweben der Citratzyklusmetabolit Succinat. Nach Reperfusion kommt es zu einer schnellen Verstoffwechslung des Succinats durch die Succinatdehydrogenase (Komplex II), woraus eine Über-Reduktion des Coenzym Q-Pools resultiert. Dies begünstigt ein Phänomen, das als reverser Elektronentransfer (RET) bezeichnet wird (35). Es kommt zu einem umgekehrten Fluss von Elektronen durch den Komplex I, wobei an der zur Matrix gerichteten Seite des Komplex I, vermutlich an der prosthetischen Flavinmononukleotid-Gruppe, Superoxid entsteht (37, 38). Die physiologische Arbeitsweise der Atmungskette, sowie der Ablauf der Superoxidentstehung über RET während der Reperfusion, sind in Abbildung 3 dargestellt.

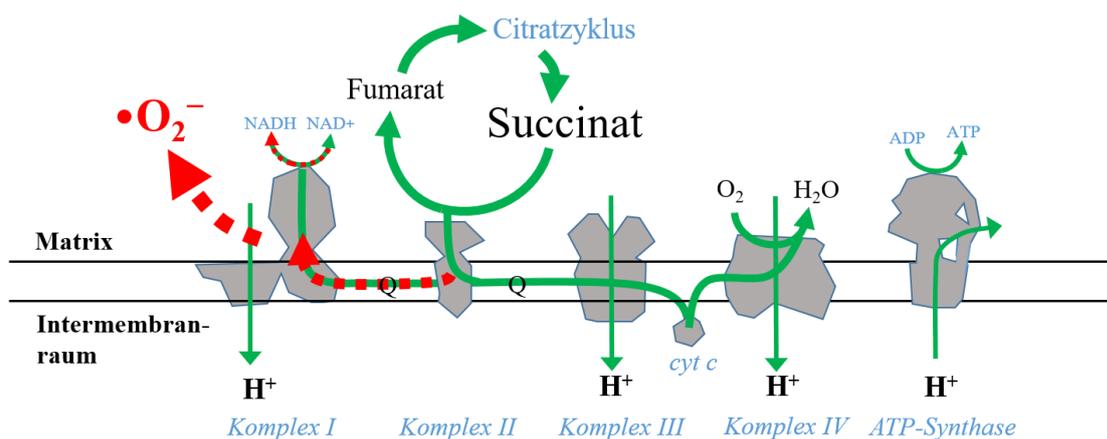


Abbildung 3: Physiologische Arbeitsweise der Atmungskette und Superoxid-Entstehung über RET

Die Grafik wurde frei adaptiert nach einer Abbildung von Chouchani et al. (35). Grüne Pfeile repräsentieren die physiologische Arbeitsrichtung der Atmungskette, während gestrichelt in Rot die Entstehung von ROS über RET während der Reperfusion dargestellt ist. Abkürzungen: RET, Reverser Elektronen-Transfer; H^+ , Protonen; Cyt C, Cytochrom C; Q, Ubiquinon/Ubiquinol; $\bullet O_2^-$, Superoxidanion;

Im Vergleich zu anderen ROS ist Superoxid eher reaktionsträge. Es reagiert vor allem mit Eisen-Schwefel-Clustern bestimmter Proteine, wie zum Beispiel dem Citratzyklusenzym Aconitase, das durch die Reaktion reversibel inaktiviert wird (39). Zur Initiierung von Lipidperoxidation oder direkten Modifikation von Nukleinsäuren ist Superoxid hingegen selbst nicht in der Lage (40). Es ermöglicht jedoch die Entstehung einer Vielzahl weiterer ROS- und Reaktiver-Stickstoff-Spezies (*Reactive Nitrogen Species*, RNS). In wässriger Lösung liegt Superoxid zum Beispiel im Gleichgewicht mit dem Hydroperoxyradikal vor, das ein breiteres Spektrum an Proteinen modifizieren und unter bestimmten Bedingungen Lipidperoxidationen initiieren kann (41).

Um anfallendes Superoxid zu kontrollieren und Schäden zu verhindern, sind die meisten Zellen mit einem Enzymsystem ausgestattet, das intrazelluläres Superoxid schnell abbaut. Den ersten Schritt, die Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, katalysiert die Enzymfamilie der Superoxiddismutasen (SOD). Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid ist wiederum eine ROS mit potentiell schädigender Wirkung, da es in Gegenwart von freiem Eisen hochreaktive Hydroxylradikale generieren kann (siehe auch Kapitel 1.5.2). Daher werden auch die Wasserstoffperoxidspiegel in der Zelle streng kontrolliert. Verantwortlich hierfür sind bei Säugetieren die Enzyme Katalase, Gpx1 und die Peroxiredoxine 1-6, die Wasserstoffperoxid jeweils zu Wasser umsetzen. Die Enzyme unterscheiden sich dabei hinsichtlich der benötigten Kofaktoren. Die Gpx1 ist auf Glutathion angewiesen um ihre Funktion auszuüben, während die Peroxiredoxine, bis auf Prdx6, als Kofaktor Thioredoxin nutzen. Die Kofaktoren Thioredoxin und Glutathion müssen

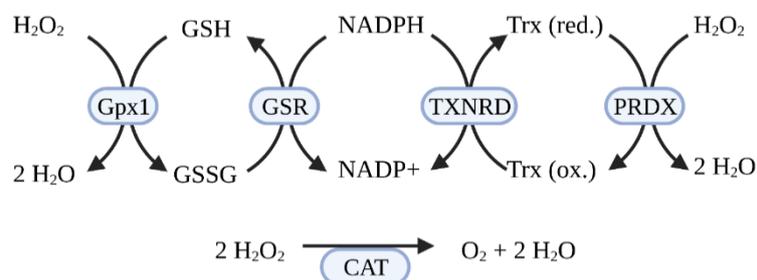


Abbildung 4: Wichtige Reaktionswege des intrazellulären Wasserstoffperoxid-Metabolismus

Abkürzungen: H_2O_2 , Wasserstoffperoxid; H_2O Wasser; GPX1, Glutathionperoxidase 1; GSH, reduziertes Glutathion; GSSG, oxidiertes Glutathion; NADPH/NADP⁺, reduziertes/oxidiertes Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat; GSR, Glutathion-Reduktase; TXNRD, Thioredoxin-Reduktase; TRX, Thioredoxin; PRDX, Peroxiredoxin; CAT, Katalase.

anschließend, katalysiert durch entsprechende Enzyme, unter NADPH-Oxidation wieder reduziert werden. Katalase ist als einziges Enzym nicht auf einen Kofaktor angewiesen. Wichtige Reaktionswege intrazellulären Wasserstoffperoxids sind schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

Die Wasserstoffperoxid-verstoffwechselnden Enzyme werden in unterschiedlichen Zellkompartimenten und teilweise redundant exprimiert (42). Neben den daraus resultierenden unterschiedlichen Abbauraten, unterscheiden sich auch die Entstehungsraten von Wasserstoffperoxid zwischen den Kompartimenten. Zudem kann Wasserstoffperoxid aufgrund seines hohen Dipolmoments nicht ungehindert durch Membranen diffundieren, sondern ist auf Transportermoleküle angewiesen (43). Es bietet sich daher eine getrennte Betrachtung der Wasserstoffperoxidspiegel in unterschiedlichen Kompartimenten an.

Enzyme die Wasserstoffperoxid im Cytosol verstoffwechseln sind Prdx1, Prdx2 und Prdx6, sowie die Gpx1. Experimente mit kompartimentspezifischen Wasserstoffperoxid-Generatoren und -Sensoren belegen, dass die cytosolischen Wasserstoffperoxidspiegel typischerweise durch die deutlich höher exprimierten Peroxiredoxine kontrolliert werden, während der Beitrag glutathionabhängiger Systeme begrenzt ist (42).

1.4.2 Modellierung von oxidativem Stress

Die Atmungskette ist in der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert und besteht aus den Proteinkomplexen I, II, III und IV. Zusätzlich wichtig für ihre Funktion sind das membranständige Coenzym Q (Ubichinon/Ubichinol) und das an der Außenseite der Membran verankerte Cytochrom C. Die Substrate NADH und Succinat werden vor allem durch den Citratzyklus generiert, der in der mitochondrialen Matrix abläuft. Um zu verstehen, wie während eines IRS reaktive Sauerstoffspezies entstehen, sind insbesondere die ersten drei Proteinkomplexe der Atmungskette relevant. Vor allem auf diesen basiert auch das in dieser Arbeit verwendete Modell für oxidativen Stress. Die physiologische Arbeitsweise, so wie die Entstehung von ROS während des IRS sind in Abbildung 5 illustriert.

Am Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) werden Elektronen von NADH auf Ubichinon (Coenzym Q) übertragen, das unter Aufnahme von 2 Protonen aus der Matrix und von 2 Elektronen von NADH zu Ubichinol reduziert wird. Die dabei freiwerdende Energie wird zum Export von 4 Protonen aus der mitochondrialen Matrix genutzt.

Der Komplex II (Succinatdehydrogenase) ist ein Teil der Atmungskette, fungiert aber auch als Enzym des Citratzyklus, indem er die Reaktion von Succinat zu Fumarat katalysiert. Dabei werden ebenfalls Elektronen auf Ubichinon übertragen, das unter Aufnahme von 2 Protonen aus der Matrix zu Ubichinol reduziert wird. Ubichinol transferiert Elektronen von Komplex I und II auf Komplex III. Es ist in der mitochondrialen Innenmembran frei beweglich, kann diese aufgrund einer hydrophoben Seitenkette allerdings nicht verlassen (44).

Der Komplex III dient der Elektronenübertragung von Ubichinol auf Cytochrom C und trägt über den Q-Zyklus zum Aufbau des Protonengradienten bei. Ubichinol bindet an der Q_0 -Bindestelle des Komplex III und wird dort unter Abgabe von zwei Protonen in den Intermembranraum sowie zweier Elektronen vollständig oxidiert. Das erste Elektron hat ein höheres Redoxpotential und wird über Eisen-Schwefel-Komplexe direkt auf Cytochrom C übertragen. Dabei wird Ubichinol übergangsweise zum instabilen Semichinonradikal oxidiert, bevor es nach der zweiten Oxidation als Ubichinon die Bindungsstelle wieder verlässt. Das zweite Elektron besitzt ein niedrigeres Redoxpotential und wird über Reduktion von Cytochrom b566 und b562 auf die Q_i -Bindestelle des Komplex III übertragen, wo mithilfe eines zweiten Elektrons Ubichinon wieder zu Ubichinol reduziert wird. Dabei nimmt Ubichinon erneut zwei Protonen aus der Matrix auf. Ubichinol kann daraufhin wieder an die Q_0 -Bindestelle binden

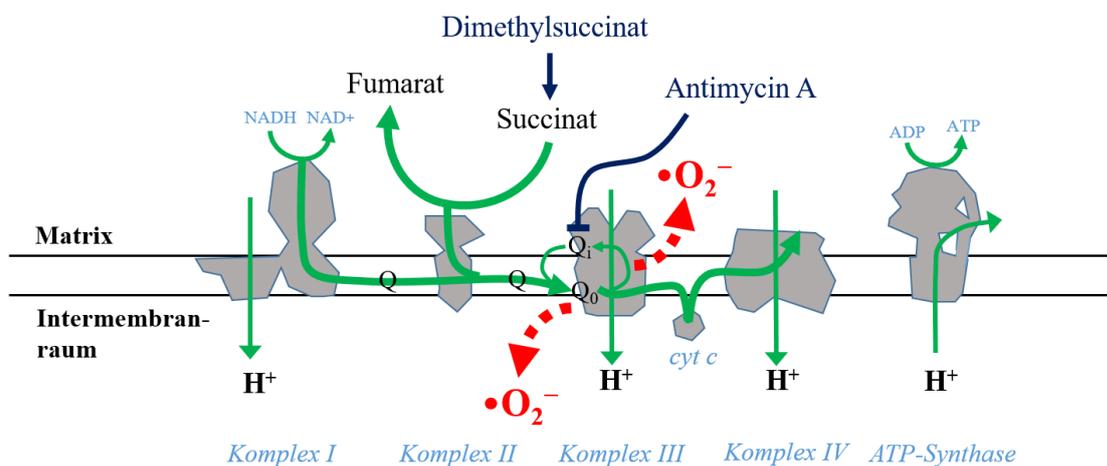


Abbildung 5: Modellierung von oxidativem Stress

Die Grafik wurde frei adaptiert nach einer Abbildung von Chouchani et al. (35). Grüne Pfeile repräsentieren die physiologische Arbeitsrichtung der Atmungskette, während gestrichelt in Rot die Entstehung von Superoxid-anionen am Komplex III durch Inhibition mit Antimycin A dargestellt ist. In Dunkelblau sind die von uns verwendeten Substanzen und ihre Angriffspunkte markiert. Abkürzungen: H^+ , Protonen; Cyt C, Cytochrom C; Q, Ubiquinon/ Ubiquinol; Q_i , Q_i -Bindestelle des Komplex III; Q_0 , Q_0 -Bindestelle des Komplex III; $\bullet O_2^-$, Superoxidanion;

und den Prozess, bei dem die Protonen in den Intermembranraum abgegeben werden, wiederholen. Dieser Prozess, bei dem Protonen von der Matrix in den Intermembranraum transportiert werden, wird auch als Q-Zyklus bezeichnet (45).

Ein typisches *in vitro* Modell für oxidativen Stress ist die Inkubation von Zellen mit Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid wird über spezifische Kanäle, sogenannte Peroxiporine, in die Zelle aufgenommen und bedingt die Entstehung verschiedener weiterer ROS (43). Im Hinblick auf die vorliegenden ROS und ihre subzelluläre Verteilung unterscheidet sich dieses Modell jedoch deutlich von den Bedingungen während eines IRS.

Eine intramitochondrielle ROS-Entstehung lässt sich durch Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren der Atmungskette induzieren. Ein häufig verwendetes Modell stellt die Inkubation von Zellen mit Antimycin A dar. Dies ist ein von Bakterien produziertes Zellgift, welches die Oxidation von Cytochrom b562 an der Q_i-Bindestelle des Komplex III verhindert und so den Q-Zyklus unterbricht (siehe auch Abbildung 5) (46). Es kommt zu einem vermehrten Entweichen von Elektronen auf Sauerstoff, wodurch am Komplex III Superoxid entsteht, das auf beide Seiten der mitochondriellen Innenmembran abgegeben wird (46). Zudem resultiert eine vermehrte Reduktion des Coenzym Q-Pools (47).

Inkubation mit Succinat resultiert ebenfalls in einer vermehrten Reduktion des Coenzym Q-Pools (47) und löst bei isolierten Mitochondrien die Entstehung von Superoxid am Komplex I über reversen Elektronentransfer aus (48). Dieser Effekt kann durch Inhibition verschiedener Bestandteile der Atmungskette moduliert werden (48). Succinat selbst kann Zellmembranen nicht ungehindert passieren. Dimethylsuccinat hingegen ist ein zellgängiges Derivat, das intrazellulär rasch zu Succinat verstoffwechselt wird. Es wird daher verwendet, um intrazelluläre Succinatakkumulation *in vitro* zu simulieren (35).

1.4.3 Der IRS der Niere

Wenn die Blutversorgung der Niere zu lange unterbrochen ist, kommt es nach der Reperfusion zu einer akuten Nierenschädigung. Die wichtigsten Faktoren, die hierzu beitragen, sind eine veränderte Hämodynamik nach Reperfusion, eine Schädigung des Endothels und der Tubulusepithelien, sowie im Verlauf die Ausbildung einer Entzündungsreaktion. In verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass die Zellen des S3 Segments besonders anfällig für Schädigung durch IRS sind (49, 50). Das Augenmerk dieser Arbeit liegt deshalb auf den hier ablaufenden pathophysiologischen Prozessen.

Venkatachalam et al. dokumentierten an Ratten die strukturellen und ultrastrukturellen Veränderungen in der Niere nach 25-minütiger Ischämie. Nach Reperfusion kommt es zu einem Verlust der *Brush Border*, dem mikroskopischen Korrelat der Mikrovilli an der apikalen Oberfläche der Tubulusepithelien. Diese werden teilweise internalisiert und liegen als Membrankonglomerat unter der apikalen Zellmembran vor. Teilweise werden sie auch als kleine Vesikel, sogenannte ‚*Blebs*‘ ins tubuläre Lumen abgeschilfert. Anschließend beginnt nach 20 Minuten die Regeneration der Mikrovilli. Ab ca. vier Stunden nach Reperfusion sind die Zellen des S1 und S2 Segments weitgehend regeneriert. Im S3 Segment zeigen sich hingegen ab ca. zwei Stunden nach der Reperfusion zunehmend Zeichen der irreversiblen zellulären Schädigung und im Verlauf ausgedehnte zelluläre Nekrosen. Ultrastrukturell beobachtet man dabei ein Anschwellen der Mitochondrien und eine nukleäre Kondensation. Im Verlauf kommt es zur Ruptur der Plasmamembran, sowie zur Ablösung der Zellen von der Basalmembran. Es kommt also nach einer kurzen Ischämiezeit im S3 Segment nach Reperfusion in erheblichem Umfang zu Zelltod mit nekrotischem Phänotyp, während bei anderen Zelltypen kein Zelltod auftritt. Insbesondere zeigte sich auch bei S2-Zellen, die in direkter Nachbarschaft zu nekrotischen S3-Zellen lagen, kein Zelltod und die Zellen regenerierten wenige Stunden nach IRS wieder ihren normalen Phänotyp. Die Autoren schlussfolgerten, dass intrinsische zelluläre Eigenschaften das S3 Segment anfällig für IRS machen (49).

Molitoris et al. konnten zeigen, dass eine Depolymerisation des Zytosklettes nach Reperfusion für den beobachteten Verlust der *Brush Border* verantwortlich ist und auch weitere pathophysiologische Prozesse bedingt. Normalerweise werden die Mikrovilli durch das Zytoskelett stabilisiert, das knapp unter der Zellmembran dichte Netze bildet, um die Zellstruktur aufrecht zu erhalten (51). Durch den ATP-Mangel kommt es zu einer Depolymerisation des Aktinskeletts und dadurch zu einer Destabilisierung der Mikrovilli (52, 53). Auch die lokale Fixierung von Membranproteinen durch das Zytoskelett ist beeinträchtigt. Durch die Relokalisation von Transportermolekülen kommt es zum Verlust der Zellpolarität, wodurch die Resorptionsleistung der Tubuli eingeschränkt ist (54). Die Relokalisation von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. beta-Integrin, hat das Abschilfern lebender und toter Zellen ins Lumen zur Folge (55). Dort bilden diese zusammen mit *Blebs* und dem Protein Uromodulin Aggregate, sogenannte Zylinder, die die Tubuli verstopfen können (53, 56).

Als Erklärungsversuche für die besondere Vulnerabilität des S3 Segments wurde in der Vergangenheit eine ausgeprägte ATP-Depletion während der Ischämie vermutet (27, 50, 57). Die proximalen Tubulusepithelien leisten den Großteil der aktiven Resorptionsarbeit der Niere, weshalb sie einen besonders hohen ATP-Bedarf haben (57). Gleichzeitig arbeiten sie, bedingt durch das komplexe Gegenstromsystem der *Vasa recta*, bereits unter physiologischen Bedingungen an der Grenze zur Hypoxie und sind im Gegensatz zu den Epithelien des ISOM und der inneren Medulla nur in wesentlich geringerem Umfang in der Lage, anaerobe Glykolyse zu betreiben (58).

Neuere Arbeiten lassen vermuten, dass zwei Formen von regulierter Nekrose zum Zelltod im S3 Segment beitragen, nämlich Ferroptose und Nekroptose (59). Wir wollen in dieser Arbeit den Beitrag der Ferroptose zum renalen IRS genauer untersuchen.

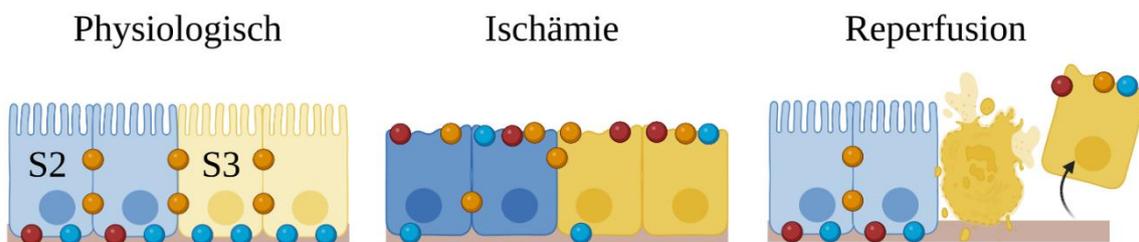


Abbildung 6: Veränderungen im Bereich der proximalen Tubuli im Verlauf eines renalen IRS

Dargestellt sind in Blau Zellen des S2 Segments und in Gelb Zellen des S3 Segments des proximalen Tubulus. Die grünen Kügelchen repräsentieren Adhäsionsmoleküle, die Zell-Zell-Kontakte vermitteln, wie z.B. Tight-Junctions. Blaue stehen für Adhäsionsmoleküle, die die Zelle an der Basalmembran fixieren, wie z.B. verschiedene beta-Integrine. Die roten Kügelchen repräsentieren basale Transportermoleküle, wie z.B. Na⁺/K⁺-ATPasen. Physiologisch werden diese drei Molekülklassen und andere durch das Zytoskelett der Zelle lokal fixiert. Auch die apikal dargestellten Mikrovilli werden durch das Zytoskelett aufrechterhalten. In Folge der Ischämie kommt es zum Verlust der Mikrovilli und zu einer Dislokation der genannten Proteine, was vielfältige Folgen hat. Beispielhaft ist die Abschilferung einer lebenden Zelle ins tubuläre Lumen dargestellt. Bei kürzeren Ischämiezeiten kommt es im Verlauf der Reperfusion zu einer vollständigen Regeneration der Zellen des S2 Segments, während man in direkter Nachbarschaft bei Zellen des S3 Segments Zelltod mit nekrotischem Phänotyp beobachtet. Die Grafik wurde mit der Software Biorender frei nach einer Abbildung von Bonventre et al. erstellt (56).

1.5 Ferroptose

Ursprünglich wurde Zelltod als ein passiver Prozess betrachtet, als ein Resultat überwältigender äußerer Umstände. Dieses Verständnis wurde in den 70er Jahren durch die Entdeckung der Apoptose erweitert, die ein streng reguliertes Zelltodprogramm darstellt (60).

Heute sind verschiedene Formen von reguliertem Zelltod bekannt, die sich durch das Ablaufen spezifischer biochemischer Prozesse und molekularer Kontrollmechanismen voneinander unterscheiden. Beispiele hierfür sind Ferroptose, Nekroptose oder Pyroptose. Die Ferroptose, als eigenständige Form von reguliertem Zelltod, wurde erstmals 2012 beschrieben (61). Ihre Grundlage bildet die Lipidperoxidation, ein Prozess, bei dem es zu einer sich selbst unterhaltenden oxidativen Modifikation von Membranlipiden kommt. Wird die Lipidperoxidation nicht ausreichend kontrolliert, so hat sie den Zelltod zur Folge, den man in diesem Kontext als Ferroptose bezeichnet.

1.5.1 Antiferroptotische Mechanismen

Um Lipidperoxidation zu kontrollieren, sind Zellen mit verschiedenen Enzymsystemen ausgestattet. Das wichtigste davon bildet die GPX4/GSH Achse (62). Die Glutathionperoxidase 4 (GPX4) ist bei Säugetieren das einzige bekannte Enzym, das in der Lage ist, effizient die Reduktion von Lipidperoxiden zu stabileren Alkoholen zu katalysieren. Dabei ist sie auf Glutathion als Kofaktor angewiesen (63). Ist die Funktion der GPX4 bei ferroptosesensiblen Zellen beeinträchtigt, so kommt es zur Lipidperoxidation und in Folge zum Zelltod. Über diesen Mechanismus wirken verschiedene Moleküle, die experimentell als Ferroptoseinduktoren verwendet werden. Die bekanntesten und am besten charakterisierten Ferroptoseinduktoren sind (1S,3R)-RSL-3 (im weiteren als RSL-3 bezeichnet) und Erastin. RSL-3 hemmt die GPX4 direkt, indem es kovalent an das katalytische Zentrum bindet und so die Interaktion mit dem Substrat verhindert (64). Erastin hat über eine Glutathion-Depletion den Funktionsverlust der GPX4 zur Folge, indem es den Glutamat/Cystin-Antiporter SLC7A11 (auch als System xc- bezeichnet) inhibiert. Dadurch wird kein Cystin mehr aufgenommen, welches in der Zelle zu Cystein reduziert wird und als solches ein essentielles Synthesesubstrat für Glutathion darstellt (65).

Neben der GPX4/Glutathion-Achse wurden durch genetische Screeningverfahren zwei weitere Systeme entdeckt, die Zellen unabhängig von GPX4 vor Ferroptose schützen können. Eines dieser Systeme bildet die FSP1-CoenzymQ-Achse. Doll et al. konnten zeigen, dass reduziertes Coenzym Q (Ubichinol), neben seiner Rolle als Bestandteil der Atmungskette, in der Plasmamembran als lipophiler Radikalfänger agiert und dort die Prozesse der Lipidperoxidation unterbricht. *Ferroptosis Suppressor Protein 1* (FSP1) regeneriert Ubichinol NADPH-abhängig. Daneben reduziert FSP1 vermutlich auch den lipophilen Radikalfänger

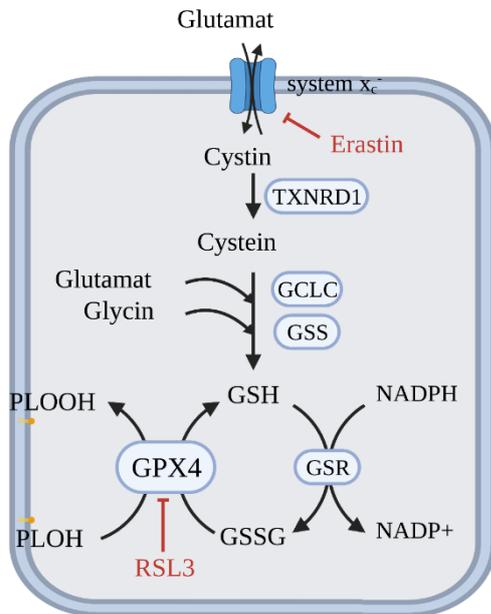


Abbildung 7: Die GPX4/GSH-Achse der Ferroptose

Blau umkreist dargestellt sind beteiligte Enzyme, während in Rot die Angriffspunkte von zwei beispielhaften Ferroptoseinduktoren gekennzeichnet sind. Abkürzungen: TXNRD1, Thioredoxin Reduktase 1; GCLC, Glutamat–Cystein Ligase, GSS, Glutathionsynthase; GSR, Glutathionreduktase; GPX4, Glutathionperoxidase 4; GSH, reduziertes Glutathion; GSSG, oxidiertes Glutathion; NADPH/NADP+, reduziertes/oxidiertes Nicotinamadeninindinukleotid-phosphat; PLOOH, Phospholipidperoxid; PLOH, Phospho-lipidalkohol. Die Abbildung wurde mit BioRender.com frei nach einer Abbildung von Jiang et al. (82) erstellt.

α -Tocopherol (die aktive Form von Vitamin E), der ebenfalls die Prozesse der Lipidperoxidation unterbricht (66). Wie Ubichinol und α -Tocopherol wirken auch verschiedene andere Moleküle, die als Ferroptoseinhibitoren verwendet werden, als lipophile Radikalfänger (67).

Ein weiteres antiferroptotisches System bildet die GCH1-Tetrahydrobiopterin-Achse. Die GTP Cyclohydrolase 1 (GCH1) schützt Zellen über die Synthese von Tetrahydrobiopterin und Dihydrobiopterin vor ferroptotischem Zelltod. Tetrahydrobiopterin agiert dabei zum einen direkt als Radikalfänger und trägt darüber hinaus zur Synthese von Coenzym Q bei (68).

Die Möglichkeit, Ferroptose durch Inhibition oder Induktion pharmakologisch zu beeinflussen, hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Zu den pathophysiologischen Prozessen, bei denen eine Rolle der Ferroptose vermutet wird, gehören zum Beispiel der Ischämie-Reperfusionsschaden von Leber (62), Niere (69), Gehirn (70) und Herz (71), sowie verschiedene neurodegenerative Erkrankungen (72). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Mechanismen, die Ferroptoseresistenz vermitteln, bei Karzinogenese (64) und Metastasierung (73) eine Rolle spielen und dass Ferroptoseinduktion einen vielversprechenden, neuartigen Ansatz der medikamentösen Malignomtherapie darstellt (74).

1.5.2 Lipidperoxidation

Lipidperoxidation (Autooxidation von Lipiden) beschreibt eine fortlaufende oxidative Modifikation von Membranlipiden über sich selbst unterhaltende Freie-Radikal-

Kettenreaktionen. Ein Alltagsbeispiel für Lipidperoxidation bildet Olivenöl, das an der Luft gelagert „ranzig“ wird. Ursächlich ist eine umfangreiche oxidative Modifikation der enthaltenen Lipide, durch die sich der Geruch und Geschmack verändert. Ein ähnlicher Prozess spielt sich im Rahmen der Ferroptose auch in den Membranen der Zelle ab. In beiden Fällen dienen die Doppelbindungen mehrfach ungesättigter Fettsäuren als bevorzugter Angriffspunkt für ROS (75).

Freie-Radikal-Kettenreaktionen bestehen aus drei Reaktionsschritten, die schematisch in Abbildung 8 dargestellt sind: Initiation, Kettenfortpflanzung (Propagation) und Termination. Als Initiation bezeichnet man im Kontext der Lipidperoxidation die Entstehung eines Lipidradikals. Hierzu kommt es z.B. durch ionisierende Strahlung, oder, in Zellen häufiger durch Reaktion von Lipiden mit anderen reaktiven Spezies. So können z.B. manche ROS, wie das Hydroxylradikal, durch Wasserstoffabstraktion mit Lipiden reagieren, wobei ein kohlenstoffzentriertes Lipidradikal ($L\bullet$) entsteht (75). Im Fortpflanzungsschritt der Kettenreaktion reagiert dieses kohlenstoffzentrierte Lipidradikal mit Sauerstoff. Diese Reaktion läuft bei physiologischem Sauerstoffpartialdruck rein diffusionslimitiert ab (76). Es entsteht ein Lipidperoxyradikal ($LOO\bullet$), welches erneut mit Membranlipiden reagieren kann, wobei ein Lipidperoxid ($LOOH$) und ein neues kohlenstoffzentriertes Lipidradikal entstehen. Dieser Kettenfortpflanzungsschritt wiederholt sich so oft, bis zwei Radikale aufeinandertreffen, oder die Substrate aufgebraucht sind. Treffen zwei Radikale aufeinander, reagieren sie unter Entstehung von stabileren Verbindungen miteinander, wodurch die Kettenreaktion unterbrochen wird. Man bezeichnet dies als Termination.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*Poly Unsaturated Fatty Acids*, PUFA), sind besonders gute Substrate für Lipidperoxidation, da sie anfällig für Wasserstoffabstraktion (Die Abspaltung von Wasserstoff unter Radikalbildung) sind. Yang et al. konnten die Bedeutung von PUFA für ferroptotischen Zelltod demonstrieren, indem sie Zellen mit PUFA behandelten, die in den bis-allylischen Positionen das Wasserstoffisotop Deuterium enthielten. Durch die Substitution wird die Wasserstoffabstraktion erschwert und so der Initiationsschritt der Kettenreaktion verlangsamt. Entsprechend behandelte Zellen sind vor Ferroptoseinduktion durch RSL-3 geschützt, während die Supplementation mit regulären PUFA Zellen für Ferroptose sensibilisiert (77).

Es wird vermutet, dass die Prozesse der Lipidperoxidation durch eisenabhängige Fentonreaktionen amplifiziert werden. Als solche bezeichnet man die nicht-enzymatische Reduktion eines Hydroperoxids durch freies Eisen (Fe^{2+}). Durch Fentonreaktionen können in Gegenwart von freien Eisenionen aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) generiert werden, die wiederum Freie-Lipidradikal-Kettenreaktionen initiieren können (75). Außerdem können aus Lipidperoxiden, die im Zuge der Propagation entstehen, neue Lipid-Hydroxylradikale entstehen, die wiederum neue Kettenreaktionen initiieren können (78). Die für Ferroptose relevanten Fentonreaktionen sind Abbildung 8 dargestellt. Die besondere

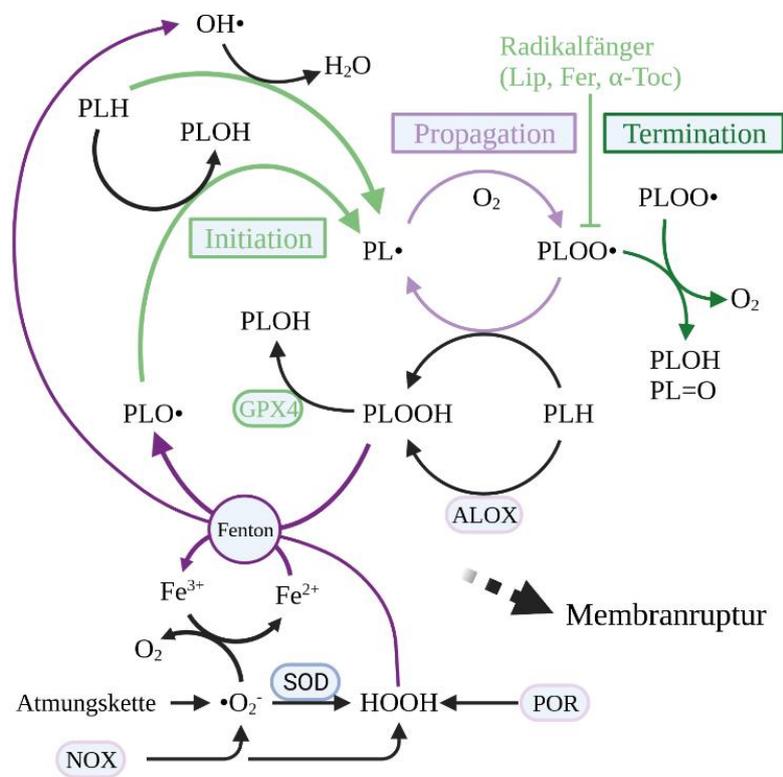


Abbildung 8: Ablauf der Lipidperoxidation in Biomembranen

In den entsprechenden Farben dargestellt sind die Prozesse der (Auto-) Initiation, Propagation und Termination. Elliptisch umkreist sind beteiligte Enzyme. Bei bekannter proferroptotischer Wirkung sind diese grau, bei antiferroptotischer Wirkung hellgrün hinterlegt. Dunkellila markiert sind nicht-enzymatische Fentonreaktionen. Abkürzungen: $\text{OH}\bullet$, Hydroxylradikal; H_2O , Wasser; Lip, Liproxstatin; Fer, Ferrostatin; α -Toc, α -Tocopherol; PLH, Phospholipid; PLOH, Phospholipidalkohol; $\text{PL}\bullet$, Kohlenstoffzentriertes Phospholipidradikal; $\text{PLOO}\bullet$, Phospholipidperoxyradikal; O_2 , Sauerstoff; $\text{PL}=\text{O}$, Phospholipidketon; PLOOH, Phospholipidperoxid; ALOX, Lipoxygenasen-Enzymfamilie; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, zweiwertiges/dreiwertiges Eisen, $\bullet\text{O}_2^-$, Superoxidation; SOD, Superoxiddismutase; HOOH, Wasserstoffperoxid; POR, NADPH-Cytochrom P450 Reduktase; NOX, NADP-Oxidase-Enzymfamilie. Die Grafik wurde frei adaptiert nach einer Abbildung von Jiang et al. (82). Erstellt wurde sie mit BioRender.com.

Bedeutung des freien Eisens für Ferroptose wird durch die Beobachtung belegt, dass die Behandlung mit Eisenchelatoren wie z.B. Desferoxamin Zellen vor Ferroptose schützt (61).

Neben der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation können Lipidperoxide auch durch enzymatische Katalyse entstehen. Die ALOX Enzymfamilie besteht aus sechs Mitgliedern (ALOXE3, ALOX5, ALOX12, ALOX12B, ALOX15 and ALOX15B), welche die Dioxygenierung von PUFA und PUFA-haltigen Lipiden an unterschiedlichen Kohlenstoffatomen katalysieren und dadurch an der Synthese von Lipidmediatoren wie den Eicosanoiden beteiligt sind (79). Die Hauptsubstrate der ALOX-Enzyme sind Arachidonsäure, Linolensäure und Linolsäure (79).

In der Vergangenheit wurde den ALOX-Enzymen eine entscheidende Rolle beim Ablauf von Ferroptose zugeschrieben. Das lag vor allem daran, dass verschiedene ALOX-Inhibitoren Zellen vor Ferroptose schützen (80). Pratt et al. konnten jedoch zeigen, dass die entsprechenden Inhibitoren meist zusätzliche Aktivität als Radikalfänger aufweisen und darüber auch die nicht-enzymatische Lipidperoxidation hemmen. Vermutlich wurde die Relevanz der ALOX Enzyme also bisher überschätzt (81). Tatsächlich konnten Yang et al. zeigen, dass die gemeinsame genetische Deletion aller ALOX Isoformen Zellen nicht vor Ferroptoseinduktion durch RSL-3 schützt, während sie dagegen einen relevanten Schutz vor Ferroptoseinduktion durch Erastin bietet (77). Der kontextabhängige Effekt der Lipoxygenasen lässt vermuten, dass diese unter bestimmten Umständen zum Pool der Lipidperoxide und so zur Initiation der Lipidperoxidation beitragen. Den ausführenden Schritt der Ferroptose stellt jedoch die Lipidperoxidation dar (82). Eine Erklärung für den protektiven Effekt der ALOX-Deletion bei Ferroptoseinduktion durch Erastin bietet möglicherweise eine durch Erastin vermittelte Induktion der ALOX Enzyme, die durch die Deletion verhindert wird (77).

Im Rahmen der Lipidperoxidation entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher oxidativ veränderter Lipide und Proteine. Wie dies den Verlust der Membranintegrität im Rahmen der Ferroptose verursacht, ist nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass hierbei kein porenformendes Protein, wie z.B. bei der Nekroptose, beteiligt ist. Stattdessen legen *in silico* Analysen nahe, dass möglicherweise die massive Akkumulation der peroxidierten Phospholipide selbst die Membranintegrität stört. Durch die veränderte Form und Polarität der peroxidierten Phospholipide liegen diese im Modell nicht mehr so eng gepackt vor, wodurch es zu vermehrter Membrankrümmung mit resultierender Mizellenbildung kommt und die Zellmembran ihre Integrität verliert (83).

1.5.3 Der Beitrag des Lipidstoffwechsels zur Ferroptose

Aufgrund der Tatsache, dass PUFA besonders gute Substrate für Lipidperoxidation sind, ist ihr Stoffwechsel eng mit der Ferroptosesensibilität einer Zelle verknüpft. Die am häufigsten in der Zelle vorkommenden Membranlipide sind Phospholipide. Mittels zellbasierter genetischer Screenings wurden zwei am Phospholipidmetabolismus beteiligte Gene identifiziert, die Zellen stark für Ferroptose sensibilisieren: *Acyl-CoA Synthetase long-chain family member-4* (ACSL4) und *Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase-3* (LPCAT3) (84, 85). ACSL4 aktiviert langkettige PUFA durch Ligation von CoA. LPCAT3 verestert diese anschließend mit Phospholipiden, vor allem mit Phosphatidylethanolaminen und Phosphocholinen (86). Beide tragen darüber zur Anreicherung der Membranlipide mit PUFA bei. Der Effekt von ACSL4 ist so stark, dass genetische Deletion verschiedene Ferroptose-sensible Zelllinien vor Ferroptoseinduktion durch Gpx4-Deletion schützt. Entsprechende Zellen mit Gpx4/Acsl4-Doppel-Knockout (Gpx4^{-/-}; Acsl4^{-/-}) können über mehrere Generationen erfolgreich kultiviert werden (85).

Ether-Glycerophospholipide stellen eine besonders stark mit PUFA angereicherte Subspezies dar. Sie werden sequenziell in Peroxisomen und dem endoplasmatischen Retikulum gebildet, wobei in Peroxisomen durch die Enzyme FAR1, GNPAT und AGPS ein Vorläufer entsteht, der im endoplasmatischen Retikulum weiter modifiziert wird. Das Enzym AGPAT3 verestert anschließend PUFA. Zou et al. identifizierten die beteiligten Gene, sowie mehrere Gene, die für die Biogenese von Peroxisomen essenziell sind (PEX3, PEX7, PEX10 und PEX12) in einem genomweiten CrisprCas-Supressor-Screening als stark proferroptotisch. Dabei wird dieser Effekt ebenfalls durch die vermehrte Anreicherung der Phospholipide mit PUFA vermittelt (87).

1.5.4 Die Oxidoreduktase POR und der Beitrag von Wasserstoffperoxid zu Ferroptose

Die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (POR) ist eine im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Oxidoreduktase, die Elektronen von NADPH auf verschiedene Akzeptormoleküle überträgt. Dadurch ist sie essentiell für die Funktion verschiedener mikrosomaler Cytochrom P450 (CYP) Enzyme (88).

Vor kurzem konnten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander demonstrieren, dass die Aktivität von POR bei verschiedenen Zelllinien eine Voraussetzung für den Ablauf von

ferroptotischem Zelltod ist (89, 90). Yan et al. konnten zeigen, dass POR diese proferroptotische Rolle unabhängig von den CYP-Enzymen und anderen bekannten Interaktionspartnern erfüllt. Stattdessen übertragen POR und eine andere Oxidoreduktase, die NADH-Cytochrom-b5-Reduktase (CYB5R1), Elektronen von NADPH (bzw. NADH) auf Sauerstoff, wodurch Wasserstoffperoxid entsteht. In Gegenwart von Eisenionen generiert dieses Wasserstoffperoxid über Fentonreaktionen Hydroxylradikale, die wiederum Lipidperoxidation initiieren. Ein funktionales antiferroptotisches System ist in diesem Kontext notwendig, um ungezügelter Lipidperoxidation und ferroptotischen Zelltod zu verhindern. Der protektive Effekt der genetischen POR-Deletion lässt sich durch Restitution der cytosolischen Wasserstoffperoxidspiegel durch externe Zugabe wieder antagonisieren, sodass die Zellen wieder sensibel für Ferroptoseinduktion sind. Bei ektopter Expression des Wasserstoffperoxid-verstoffwechelnden Enzyms Katalase im Cytosol ist die Sensibilität für Ferroptoseinduktion hingegen reduziert. Cytosolisches Wasserstoffperoxid stellt also in verschiedenen zellulären Kontexten eine Voraussetzung für den Ablauf von ferroptotischem Zelltod dar, indem es über die Entstehung von Hydroxylradikalen Lipidperoxidation initiiert (90).

1.5.5 Der wichtigste Gegenspieler der Ferroptose: Die Glutathionperoxidase 4

Die Glutathionperoxidase 4 ist das einzige bekannte Enzym der Säugetiere, das in der Lage ist, die Reduktion von Phospholipidperoxiden (PL-OOH) zu stabileren Phospholipidalkoholen (PL-OH) zu katalysieren. Dafür ist sie als Kosubstrat auf Glutathion (GSH/GSSG) angewiesen. Sie katalysiert die Reaktion: $PL-OOH + 2 GSH \rightarrow GSSG + PL-OH + H_2O$.

Die herausragende Bedeutung der Gpx4 für die Gewebshomöostase wurde durch verschiedene genetische Gpx4-Deletionsmodell (*Knockout*-Modelle) demonstriert. Eine konventionelle Deletion der Gpx4 ist im Mausmodell während der embryonalen Entwicklung letal. Um die Rolle der Gpx4 bei erwachsenen Tieren zu untersuchen, etablierten Friedmann Angeli et al. ein induzierbares *Knockout*-Mausmodell, bei dem die Gpx4 nach Tamoxifengabe außerhalb des Gehirns ubiquitär deletiert wird. Anhand dieses Modells konnten die Autoren zeigen, dass adulte Mäuse ca. 2 Wochen nach Gpx4-Deletion an einem akuten Nierenversagen versterben. Dabei kommt es initial vor allem bei den proximalen Tubulusepithelien, die Gpx4 unter physiologischen Bedingungen sehr stark exprimieren, zu Zelltod mit nekrotischem Phänotyp. Im Verlauf dehnt sich dieser auf die restlichen Tubulusepithelien aus. Die Niere und

insbesondere die proximalen Tubulusepithelien sind also *in vivo* auf eine funktionale Gpx4 angewiesen, um Ferroptose zu verhindern.

Werden die Mäuse nach Gpx4-Deletion täglich mit dem spezifischen Ferroptoseinhibitor Liproxstatin-1 (Lip-1) behandelt, überleben die Tiere deutlich länger. Lip-1 schützt somit nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* vor Ferroptose (62).

Um die Relevanz der Gpx4 in anderen Geweben zu untersuchen, wurden gewebsspezifische Gpx4-*Knockout*-Mausmodelle etabliert. Ein leberspezifischer Gpx4-*Knockout* ist innerhalb der ersten 48 Stunden nach Geburt letal, wobei es zu ausgeprägter Lipidperoxidation und hepatozellulärer Degeneration kommt (91). Auch für die Homöostase des Endothels ist die Gpx4 relevant. Werden Mäuse mit endothelspezifischem Gpx4-*Knockout* Vitamin E-arm ernährt, kommt es zum vorzeitigen Tod durch zahlreiche thrombembolische Ereignisse (92). Daneben ist die Gpx4 auch für das Überleben verschiedener neuronaler Zellpopulationen essenziell (93–96).

Es gibt drei Formen der GPX4, die durch unterschiedliche Genexpression entstehen. Aufgrund unterschiedlicher Zielsequenzen werden diese historisch als nukleäre Form (nGPX4, nukleäre Zielsequenz), mitochondriale Form (mGPX4, mitochondriale Zielsequenz) und cytosolische Form (cGPX4, keine Zielsequenz) bezeichnet. Die nGPX4 unterscheidet sich im N-Terminus von den beiden anderen Formen, da das Startkodon im ersten Intron des GPX4 Gens liegt (97). Conrad et al. konnten zeigen, dass sie nur im Zuge der Spermatogenese exprimiert wird und der Stabilisierung des Chromatins im Spermium dient. Mäuse mit einem selektiven *Knockout* der nGpx4 sind lebensfähig und fertil (97).

Die mGPX4 ist nach Import ins Mitochondrium und Abspaltung der mitochondrialen Importsequenz identisch mit der cGPX4 (98). Auch die mGPX4 erfüllt ihre Hauptfunktion während der Spermatogenese. Sie wechselt dabei die Funktion, von löslichem, katalytisch aktivem Enzym hin zu einem unlöslichen, oxidativ vernetzten Makromolekül, das als Strukturprotein der Spermatozoenkapsel dient (99). Trigger für die Vernetzung ist ein starker Abfall der Glutathionkonzentration, woraufhin die oxidierte GPX4 über Ausbildung von Disulfidbrücken mit SMCP und anderen GPX4-Molekülen polymerisiert (100). Bei männlichen Mäusen hat ein selektiver *Knockout* der mGpx4 einen Verlust der Fertilität zur Folge. Abgesehen davon zeigen die Mäuse einen normalen Phänotyp (101).

Liang et al. konnten zeigen, dass die cGPX4 die für Embryogenese und Gewebshomöostase entscheidende Variante darstellt. Die cGpx4 kann nicht selektiv deletiert

werden, ohne die anderen Gene zu beeinflussen. Die Autoren konnten jedoch zeigen, dass der letale Phänotyp der kompletten Gpx4-Deletion sich durch transgene cGpx4 Expression verhindern lässt. Diese Tg(cGpx4)/Gpx4^{-/-} Mäuse sind normal lebensfähig und weisen darüber hinaus außerhalb des Hodens die gleiche subzelluläre Verteilung der Gpx4 auf wie Gpx4^{+/+} Mäuse. Die transgene cGpx4 ist am stärksten im Intermembranraum der Mitochondrien angereichert, was nahelegt, dass es tatsächlich die cGpx4 ist, die zum Großteil in den Mitochondrien vorkommt (102, 103). Der genaue Mechanismus, wie die cGpx4 in die Mitochondrien gelangt, ist bislang nicht bekannt.

1.5.6 Glutathion

Glutathion ist ein Tripeptid, das aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin besteht. Es ist ein zentraler Bestandteil des antioxidativen Systems der meisten eukaryontischen und vieler prokaryotischer Zellen und erfüllt verschiedene Aufgaben zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Gebildet wird Glutathion im Zytoplasma durch serielle Aktivität der Glutamat-Cystein-Ligase (GCLC) und der Glutathionsynthase (GSS) (104).

In der Zelle liegt die reduzierte Form von Glutathion (GSH) im Gleichgewicht mit der oxidierten Form (GSSG) vor, bei der zwei Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das Verhältnis GSH:GSSG beträgt in den meisten Zellen mehr als 100:1, da GSSG durch das Enzym Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch schnell wieder zu GSH reduziert wird (30). Aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration trägt Glutathion entscheidend zum zellulären Redoxpotential bei.

Slusser et al. konnten bereits 1990 zeigen, dass es im Rahmen eines IRS zu einer Glutathiondepletion in der Niere kommt. Dabei wird Glutathion während der Ischämie degradiert und kann anschließend nach der Reperfusion aufgrund eines Cysteinmangels nur langsam regeneriert werden (105).

1.5.7 Radikalfänger als Ferroptoseinhibitoren

Radikalfänger sind Moleküle wie zum Beispiel Phenole oder aromatische Amine, die schwache O-H- oder N-H-Bindungen besitzen und deshalb leicht durch Wasserstoffabstraktion mit Radikalen reagieren (78). Gleichzeitig zeichnet sie aus, dass die dabei entstehenden Radikale reaktionsträge sind und deshalb nicht erneut, beziehungsweise nur langsam, mit den Substraten oder mit Sauerstoff reagieren. Stattdessen reagieren Radikalfänger eher erneut mit

einem Radikal, wodurch stabile, nicht-radikalische Verbindungen entstehen, und der Fortpflanzungsschritt der Freie-Radikal-Kettenreaktion unterbrochen wird. α -Tocopherol, die aktive Form von Vitamin E, ist der klassische lipophile Radikalfänger in natürlichen Biosystemen (106). Zugabe von α -Tocopherol hemmt Ferroptose *in vitro* und *in vivo* (67, 92).

Mittels zellbasierter Screeningverfahren des Effekts großer Molekül-Bibliotheken auf den durch Ferroptoseinduktion verursachten Zelltod wurden von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen die Moleküle Ferrostatin-1 (Fer-1) und Liproxstatin-1 (Lip-1) identifiziert. Diese hemmen Ferroptose spezifisch, ohne andere Zelltodwege zu beeinflussen, und bereits in deutlich niedrigerer Konzentration als α -Tocopherol (61, 62). Beide gehören zur Substanzgruppe der Arylamine, deren Vertreter häufig Radikalfänger-Aktivität aufweisen und industriell zum Beispiel als Zusatzstoff in Gummiverbindungen und Schmierölen verwendet werden, um Autooxidation zu verlangsamen (107, 108). Zilka et al. konnten zeigen, dass Lip-1 und Fer-1 als lipophile Radikalfänger fungieren und so den Fortpflanzungsschritt der Freie-Radikal-Kettenreaktion verhindern. Beide Moleküle weisen deutlich höhere Radikalfänger-Aktivität in Biomembranen auf als α -Tocopherol, was vermutlich ihre höhere antiferroptotische Potenz vermittelt.

Eine mögliche Limitation für die klinische Anwendung von Lip-1 ist, dass es zwar eine hohe Stabilität in Maus-Leber-Mikrosomen besitzt, die Stabilität in humanen Leber-Mikrosomen und primären Hepatozyten jedoch begrenzt ist (unpublizierte Daten des Conrad-Labors). Dies deutet auf einen hohen *First-Pass* Effekt nach oraler Applikation hin. Die Arbeitsgruppe um unseren Kooperationspartner Dr. Marcus Conrad am Institut für Metabolismus und Zelltod des Helmholtz Zentrum München, darunter insbesondere Dr. Bettina Proneth, entwickelte basierend auf Lip-1 das Molekül Liproxstatin-2 (Lip-2). Dieses hemmt Ferroptose spezifisch, im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich, und weist eine verbesserte *in vivo* Stabilität beim Menschen auf (unpublizierte Daten des Conrad-Labors).

1.5.8 Ferroptose und verschiedene Pathologien der Niere

Die Schädigung der Tubulusepithelien ist eine der häufigsten Ursachen des akuten Nierenversagens beim Menschen (109). Aufgrund des typischen histologischen Bildes spricht man auch von einer akuten Tubulusnekrose, wobei das S3 Segment anhand von Biopsie- und Autopsiestudien als der primäre Ort der Schädigung betrachtet wird (109). Hauptursachen der akuten Tubulusnekrose sind ischämische und nephrotoxische Schädigung. Die proximalen

Tubulusepithelien sind wie beschrieben *in vivo* auf die Gpx4 angewiesen, um Ferroptose zu verhindern. Dasselbe wurde auch *in vitro* demonstriert. Nach Inhibition der Gpx4 durch RSL-3 kommt es bei primär isolierten proximalen Tubulusepithelien zu Ferroptose (62). Auch Behandlung mit Erastin löst bei primär isolierten proximalen Tubulusepithelien Ferroptose aus (110).

Es wird vermutet, dass Ferroptose eine wichtige Rolle bei der Ausprägung des IRS der Niere spielt. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass die Ferroptoseinhibitoren Fer-1 und der auf Fer-1 basierende Inhibitor SRS 16-86 beim IRS der Niere im Mausmodell einen starken protektiven Effekt aufweisen (69). Daneben wurden auch bei IRS Modellen von Leber, Gehirn und Dünndarm protektive Effekte von Ferroptoseinhibitoren demonstriert (59, 62, 111, 112).

Ein Beitrag der Ferroptose wird auch bei verschiedenen Formen der nephrotoxischen akuten Nierenschädigung vermutet. Nach Rhabdomyolyse, dem Untergang von Muskelgewebe, kommt es häufig zu einem akuten Nierenversagen. Ursächlich hierfür ist insbesondere die Freisetzung von Myoglobin aus den geschädigten Muskelzellen, das im Glomerulus frei filtriert und von den proximalen Tubuli reabsorbiert wird (113). Beim Abbau von Myoglobin wird Eisen freigesetzt, das über Fentonreaktionen zu Lipidperoxidation beitragen kann. Guerrero et al. konnten demonstrieren, dass es bei einem Mausmodell der Rhabdomyolyse-induzierten akuten Nierenschädigung zu einer intrarenalen Eisenakkumulation und zu vermehrter Lipidperoxidation kommt. Im Einklang mit einer Schlüsselrolle der Ferroptose wirkt sich Behandlung mit dem Ferroptoseinhibitor Fer-1 in dem Modell protektiv aus, während Inhibitoren von Apoptose und Nekroptose keinen protektiven Effekt haben (114). Auch bei Mausmodellen der akuten Nierenschädigung durch Behandlung mit Folsäure, Oxalat und Cisplatin wirkt sich die Behandlung mit Ferroptoseinhibitoren protektiv aus (69, 115).

Eine Studie von Wenzel et al. unterstützt die Vermutung, dass Ferroptose auch beim Menschen zu einem breiteren Spektrum der akuten Nierenschädigung beiträgt. Die Autoren untersuchten den Urin von Patienten mit einer schweren akuten Nierenschädigung zum Zeitpunkt des Beginns einer Hämodialyse. Hier fanden sich Zellpellets, in denen ferroptosetypische, oxidierte PUFA-Phospholipide nachweisbar waren. Patienten, die im weiteren dialysepflichtig blieben, zeigten im Vergleich zu Patienten mit einer späteren Erholung der Nierenfunktion erhöhte oxidierte PUFA-Phospholipide (80).

Die Akkumulation von Eisen in der Niere, vermutlich insbesondere im Bereich der proximalen Tubulusepithelien, stellt einen typischen Befund der chronischen Niereninsuffizienz beim Menschen dar (116). In verschiedenen Mausmodellen der chronischen Niereninsuffizienz wurde zudem ein protektiver Effekt von Eisenchelatoren oder diätetischer Eisenrestriktion nachgewiesen (117–119). Es erscheint daher möglich, dass Ferroptose auch unabhängig von der Ätiologie zur Progression der chronischen Nierenerkrankung beiträgt, wenngleich dies bisher noch nicht experimentell demonstriert wurde (120).

1.6 Intrazelluläre Proteindegradationssysteme

In Zellen existieren verschiedene intrazelluläre Proteindegradationssysteme. Die beiden wichtigsten Systeme bei Säugetieren sind das Ubiquitin-Proteasom-System und das Autophagosom-Lysosom-System (ALS). Sie dienen der Aufrechterhaltung der regulären Proteinzusammensetzung durch Degradation von fehlerhaften oder redundanten Proteinen, oder im Fall des ALS auch anderen Makromolekülen oder Zellbestandteilen (121).

Unter physiologischen Bedingungen wird der Großteil der intrazellulären Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert. Dazu werden Proteine durch ein mehrschrittiges Enzymsystem spezifisch durch Poly-Ubiquitylierung markiert und anschließend zum Proteasom transportiert. Durch spezifische Deubiquitinasen kann Ubiquitin von Proteinen wieder abgespalten werden, was auf dieser Ebene eine weitere Regulation ermöglicht.

Das 26s Proteasom ist ein großer Multiproteinkomplex, der aus einem fassförmigen 20s Komplex, dem Kernpartikel, sowie ein bis zwei deckelartigen 19s Komplexen besteht. Diese werden auch als regulatorische Partikel bezeichnet und kontrollieren den Zugang zur proteolytischen Kammer des Proteasoms. Die markierten Proteine werden durch proteolytische Aktivität gespalten und die dadurch entstehenden Aminosäuren freigesetzt, wodurch sie wieder als Substrate zur Verfügung stehen.

Das Autophagosom-Lysosom-System wurde vor allem als adaptives Degradationssystem entdeckt, das der Zelle ermöglicht, mit verschiedenen Stresssituationen wie Nährstoffmangel, oxidativem Stress oder anfallenden Proteinaggregaten umzugehen, da es in der Lage ist, größere und komplexere Strukturen als das Proteasom zu degradieren. Darüber hinaus erfüllt es bei verschiedenen Zelltypen auch eine wichtige Rolle bei der Zellhomöostase. Es gibt drei Formen der Autophagie, deren gemeinsame Endstrecke die Degradation in Lysosomen durch verschiedene Verdauungsenzyme bildet: Makroautophagie,

Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (CVA). Die entsprechenden Prozesse sind schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

Als Mikroautophagie bezeichnet man die direkte lysosomale Aufnahme von zytoplasmatischen Bestandteilen durch Invagination der lysosomalen Membran.

Bei der Makroautophagie kommt es zur cytoplasmatischen Entstehung einer Phagophore, einer Lipiddoppelmembran, die durch ihr Wachstum zelluläre Bestandteile umschließt und nach dem Schluss der Membran als Autophagosom bezeichnet wird. Nach einem Reifungsprozess fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom, wodurch es zur Degradation der Inhalte kommt. Die entstehende Phagophore exprimiert PE-ligierte, Ubiquitin-ähnliche Proteine der LC3/GABARAP Familie, an die verschiedene, frachtspezifische Rezeptoren binden können, was neben der unspezifischen auch eine spezifische Degradation zellulärer Bestandteile ermöglicht (122). Inzwischen ist ein breites Spektrum an selektiven Frachtrezeptoren, zum Beispiel für Mitochondrien oder Ferritin bekannt. Manche Rezeptoren

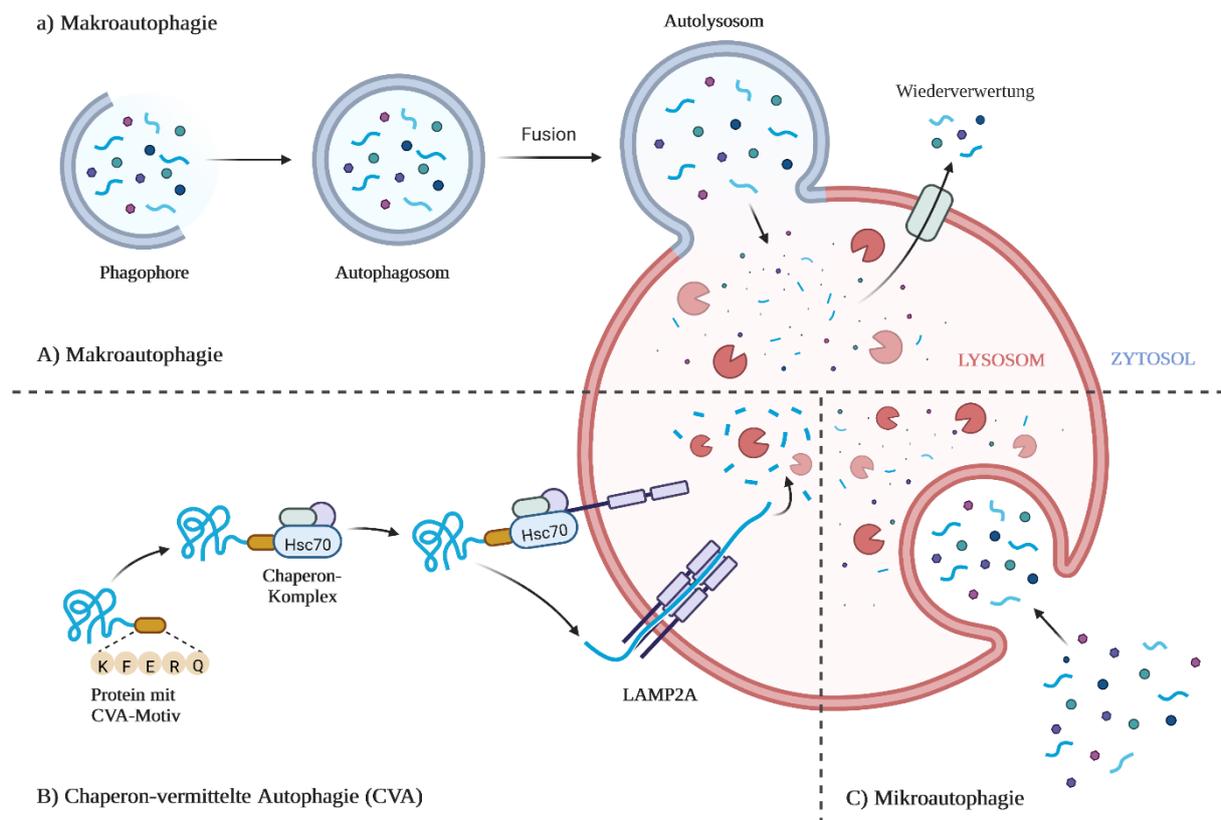


Abbildung 9: Proteindegradation über die drei Formen der Autophagie

Adaptiert nach der Vorlage "Three Main Types of Autophagy" von BioRender.com (2022). Abgerufen von <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

binden die Fracht direkt, der Großteil ist allerdings auf eine vorherige Ubiquitylierung angewiesen (122).

Bei der CVA wird eine bestimmte Aminosäure-Erkennungssequenz (KFERQ, im weiteren auch als CVA-Motiv bezeichnet) cytosolischer Proteine durch das Chaperon HSPA8/HSC70 gebunden und das Protein direkt zum Lysosom transportiert, wo es am Makromolekül LAMP2A, assistiert durch HSP90, entfaltet und anschließend ins Lysosom transferiert und dort degradiert wird (123). Es wird vermutet, dass HSP90 zusätzlich zur Stabilisierung von LAMP2A beiträgt (124). Die entsprechende Erkennungssequenz liegt bei ca. 30% der cytosolischen Proteine vor. Entscheidend für die Bindung und Degradation auf diesem Weg sind auch andere Faktoren, wie zum Beispiel weitere Co-Chaperone, die den Prozess beeinflussen, wodurch auch auf diese Weise eine selektive Proteindegradation möglich ist (125).

Die Funktion der beiden Systeme ist, wie schon an der Nutzung von Ubiquitin als Degradationsmarkierung in beiden Systemen zu sehen, auf verschiedenen Ebenen eng miteinander verbunden (121). Über die selektive Degradation von Proteinen, Lipiden und Organellen haben die genannten Degradationssysteme großen Einfluss auf verschiedene zelluläre Signalwege, darunter auch auf die Ferroptose. Kernproteine der Ferroptose, für die eine Regulation auf der Degradationsebene beschrieben ist, sind z.B. System x_c^- und die GPX4 (126).

1.7 **Zielsetzung und Hypothesen**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Ferroptose und dem IRS der Niere bei Maus und Mensch besser zu charakterisieren und das therapeutische Potential des Ferroptoseinhibitors Lip-2 zu untersuchen. Wir stellten in diesem Zusammenhang folgende Hypothesen auf:

- (A) Im Rahmen des IRS kommt es zu einem Funktionsverlust der Gpx4 im S3 Segment des proximalen Tubulus.
- (B) Dieser Funktionsverlust wird zum Teil durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt, die während der Reperfusion entstehen.
- (C) Behandlung mit dem Ferroptoseinhibitor Lip-2 wirkt sich im renalen IRS-Mausmodell protektiv aus.
- (D) Die proximalen Tubulusepithelien sind aufgrund besonderer metabolischer Eigenschaften anfällig für Ferroptose.
- (E) Beim Menschen kommt es im Zuge einer Nierentransplantation zu einem Funktionsverlust der GPX4 in der Niere.
- (F) Die Menge der GPX4 im Transplantat hat im Rahmen von humanen Nierentransplantationen einen prognostischen Effekt hinsichtlich des Auftretens einer verzögerten Transplantatfunktion.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Zellkulturschalen 15cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Trypsin / EDTA	PAN Biotech KG, Berlin, D
RPMI 1640 Medium	ThermoFisher Scientific, Waltham, U.S.A.
RPMI 1640 Medium, no glucose	ThermoFisher Scientific, Waltham, U.S.A
Fetales Bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, D
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dulbecco's PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
1% MEM Non essential amino acid solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
BD Falcon Tubes 50ml/15ml	BD Biosciences, San Jose, USA
DMSO	Merck, Darmstadt, D
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Cryovials	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Cryobox Cryo 1 °C freezing container	Nalgene™, Rochester, NY, USA
Wasserbad HI 1210	Leica Microsysteme, Solms, D
Zählkammer-Neubauer	Roth, Karlsruhe, D

2.1.2 Stimulationsexperimente

6-well-Zellkulturplatte	Costar Corning, Niederlande
96-well-Zellkulturplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Dimethylsuccinat	Sigma-Aldrich
Antimycin A from Streptomyces sp.	Sigma-Aldrich
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
Triton X-100	Sigma-Aldrich

2.1.3 Tierexperimentelle Methoden

2.1.3.1 Versuchstiere

C57BL/6 Mäuse male Charles River

2.1.3.2 Tierfutter

Mauszuchtfutter Ssniff Spezialdiäten GmbH

2.1.3.3 Tierhaltung

H-Temp Polysulfon-Käfig Eurostandard Tecniplast, Hamburg

Typ II Lon

Polysulfon (PSU) H-Temp Filterhaube Tecniplast, Hamburg

Autoklavierbare Filterhaube mit Tecniplast, Hamburg

Verschlussklammer

Innenliegender Gitterdeckel Tecniplast, Hamburg

Standard Tränkekappe aus Edelstahl Tecniplast, Hamburg

Maushaus rot Tecniplast, Hamburg

Nagestäbchen aus Espenholz (S-Bricks) Tapvei

Nestlets Ancare

Einstreu aus Espenholz Ssniff Spezialdiäten GmbH

2.1.3.4 Injektionen

BD Plastipak Spritze 2ml, 5ml Becton, Dickinson and Company Ltd.

BD Microlance Kanüle 30 G 1/2 Becton, Dickinson and Company Ltd.

2.1.3.5 Narkose und postoperative Analgesie

Fentanyl Janssen-Cilag GmbH

Midazolam Ratiopharm GmbH

Medetomidin Zoetis GmbH

Naloxon Ratiopharm GmbH

Flumazenil Hexal AG

Buprenorphin Bayer Vital GmbH

2.1.3.6 Perioperative Temperaturkontrolle

RET-3-ISO Isolated Rectal Probe for Mice	Physitemp Instruments Inc.
Kleintier-OP-Tisch	Medax GmbH
Thermes-USB Temperature Data Acquisition Seven channel unit	Physitemp Instruments Inc
Brutmaschine Brinsea Octagon 20 Advance	Hemel Brutgeräte GmbH & Co.KG
Philips INFRARED R95E 100W E27	Philips GmbH
Wärme-Strahler Health-care	

2.1.3.7 Operationen

DeBakey Gefäßklemme	Integra LifeSciences Services
Yasargil Aneurysm Clip	Medicon eG
Knapp Iris Schere	Integra LifeSciences Services
Panthenol-Augensalbe JENAPHARM®	Mibe GmbH Arzneimittel
Ethibond Excel 5-0	Ethicon Deutschland
Vicryl 5-0	Ethicon Deutschland

2.1.3.8 Blutentnahme

Isofluran CP	CP-Pharma Handelsgesellschaft GmbH
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kapillaren beidseitig offen 32 x 0,8 mm	NeoLab Migge GmbH

2.1.3.9 Entnahme der Nieren

Einbettkassetten	NeoLab Migge GmbH
Formalin 4%	Morphisto GmbH
RNAlater	Ambion, Inc

2.1.3.10 Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff

Harnstoff FS Kit	Diasys
Kreatinin FS Kit	Diasys

2.1.4 Histologie

Ethanol absolut EMSURE	Merck & Co.
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Paraffin - polyisobutylene mixture (Paraplast ®)	Merck & Co.
Aceton	Merck & Co.
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Inc
Xylol	Fisher Scientific UK Ltd
3,3'-Diaminobenzidin	Merck KGaA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories
Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories
Magermilchpulver	Merck KGaA
Methylgrün	Fluka
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH
Periodsäure	Carl Roth GmbH
Schiffsches Reagenz	Sigma
Vectastain® Elite ABC-HRP Kit	Vector Laboratories

2.1.4.1 Verwendete Antikörper

Immunogen	Konjugat	Spezie	Firma	Katalognummer
Gpx4	-	Hase	Abcam	ab125066
Hase IgG (H+L)	Biotin	Ziege	Linaris BP	ZRB1001

2.1.5 Molekularbiologische Methoden:

2.1.5.1 RNA-Isolation

PureLink™ RNA Mini Kit	Invitrogen Ltd.
RNase Away	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Ethanol 96% EMSURE	Merck
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH

2.1.5.2 Reverse Transkription

Linear Acrylamide	ThermoFisher Scientific Inc.
dNTP Set	ThermoFisher Scientific Inc.
SuperScript III Reverse Transcriptase	ThermoFisher Scientific Inc.
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega GmbH
Hexanucleotide Mix	Roche Diagnostics GmbH

2.1.5.3 Quantitative RT-qPCR

10x Taq Buffer	ThermoFisher Scientific Inc.
BSA PCR grade	ThermoFisher Scientific Inc.
dNTP-Set	ThermoFisher Scientific Inc.
MgCl ₂ , 25mM	ThermoFisher Scientific Inc.
96-well-Lightcycler-Platte	Sarstedt AG & Co. KG
Klebefolie	Sarstedt AG & Co. KG
BioStab PCR Optimizer	Biomol GmbH
SYBR Green I	Sigma-Aldrich
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH

2.1.6 **Proteinanalyse**

2.1.6.1 Proteinisolation

RIPA Buffer	Sigma-Aldrich
Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc.
Mini Tablets	

2.1.6.2 Western Blotting

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
2% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™	BioRad
Protein Gels	
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack	BioRad
Clarity™ Western ECL Blotting Substrate	BioRad
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich

Tris (Trizma-Base)	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycine	Sigma-Aldrich
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol (β -Me)	Roth Carl
Natriumchlorid	Merck

2.1.6.3 Verwendete Puffer

Ladepuffer (6x) Rezeptur:

9% SDS, 50% Glycerol, 0.03% Bromophenol Blue, 9% β -Mercaptoethanol, 375 mM Tris pH 6.8

Laufpuffer (10x) Rezeptur:

250 mM TRIS-Base, 1% SDS, 2.5 M Glycin

TBS-T-Puffer Rezeptur:

25 mM TRIS, 125 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6

2.1.6.4 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezie	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Gpx4	Hase	1:1000	Abcam	ab125066
β -Actin	Maus	1:10 000	Sigma-Aldrich	A5441

2.1.6.5 Sekundäre Antikörper, HRP-konjugiert

Antikörper	Spezie	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Anti-Maus	Ziege	1:5000	Santa Cruz	sc-2031
Anti-Hase	Ziege	1:5000	Santa Cruz	sc-2004

2.1.7 Geräte

2.1.7.1 Pipetten

Pipetten Pipetman®	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen 1-1 000 μ l Typ Gilson®	Peske, Aindling-Arnhofen, D

2.1.7.2 Mikroskope

Leica DMRBE Research Microscope	Leica Microsystems
DMIL	Leica Microsystems

2.1.7.3 Zellkultur

Steril Card Hood CII, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, Maine, USA
Zellinkubator Type B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Wasserbad 1013	GFL GmbH

2.1.7.4 Zentrifugen

Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, D
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode, D

2.1.7.5 Molekularbiologische Methoden

Nandodrop 1000 Photometer	Thermo Scientific Inc.
Thermomixer 5436	Eppendorf Ag
Mastercycler Pro	Eppendorf Ag
LightCycler 480 qPCR-System	Roche Diagnostics GmbH

2.1.7.6 Proteinanalyse

Ultra Turrax Homogenisator T25 Basic	IKA-Werke GmbH
Rocky-N Wipptisch	Labortechnik Froebel GmbH
Tube Roller SRT6	Stuart Equipment
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical	BioRad
Electrophoresis	
ChemiDocImaging system	BioRad
Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad

2.1.7.7 Histologische Methoden

Microwave 800	Severin
Paraffin Ausgießstation EC350	Microm International GmbH

zur Verfügung gestellt. Die Lichtschaltung wurde so eingestellt, dass ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Zyklus erzeugt wurde. Die Umgebungstemperatur betrug konstant 22 +/- 2 °C. Käfige, Einstreu, Futter und Häuschen wurden vor Benutzung autoklaviert. Die Maushaltung, Mauszucht sowie alle an den Mäusen vorgenommenen Eingriffe erfolgten gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2.1.2 Blutentnahme

Zur terminalen Blutentnahme wurde der retrobulbäre Venenplexus punktiert. Um den Plexus zu punktieren, wurden die Mäuse in einer Anästhesie-Kammer mit Isofluran narkotisiert. Durch einen festen Nackengriff wurden die Halsvenen gestaut. Anschließend wurde eine Glaskapillare im medialen Augenwinkel am Auge vorbei unter leichter Drehung vorgeschoben. Nach erfolgreicher Punktion des Venenplexus wurden 0,5 – 1 ml Blut in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß aufgefangen. Zur Antikoagulation wurden 20 µl 0,5 M EDTA zugegeben. Um zelluläre Bestandteile aus dem Blut zu entfernen, wurden die Proben für 5 Minuten bei 10 000 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Serum abpipettiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.3 Kreatinin Assay

Zur Bestimmung der Kreatininkonzentration im Serum wurde das Kreatinin FS Kit der Firma Diasys verwendet. Die Funktion beruht auf der Jaffé-Reaktion: Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen gelborange gefärbten Komplex. Da am Anfang der Reaktion Natronlauge und Pikrinsäure im Überfluss zugegeben werden, ist der Farbumschlag der Lösung direkt proportional zur Menge an gelöstem Kreatinin. Hierzu wurde gemäß dem Herstellerprotokoll zuerst die Gebrauchslösung durch Mischen der im Kit enthaltenen Reagenzien 1 (Natriumhydroxid 0,2 mol/l) und 2 (Pikrinsäure 177 µmol/l) im Verhältnis 1:4 hergestellt. Anschließend wurden 10 µl der Proben sowie des Kreatininstandards (1, 2, 3, 4 mg/dl) auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von je 200 µl der Gebrauchslösung gestartet. Nach 60 Sekunden erfolgte die erste Extinktionsmessung bei 492 nm, nach 120 Sekunden die zweite. Durch Subtraktion der ersten Extinktion von der zweiten wurde die Zunahme der Extinktion bestimmt, welche proportional zur gelösten Kreatininkonzentration ist. Aus den beiden Extinktionswerten konnte die Kreatininkonzentration der Proben errechnet werden.

2.2.1.4 Harnstoff Assay

Um die Harnstoffkonzentration im Serum zu bestimmen, wurde das Harnstoff FS Kit der Firma Diasys verwendet. Der Nachweis beruht auf der Urease-vermittelten Reaktion von Harnstoff zu Ammoniak und Hydrogencarbonat und der anschließenden Reaktion von Harnstoff und α -Ketoglutarat zu L-Glutamat, bei der GLDH-katalysiert NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Über das Extinktionsmaximum von NADH im UV-Spektrum bei 340 nm kann der Abfall, der proportional zur Menge an Harnstoff in der Probe ist, ermittelt werden.

Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde zuerst die Gebrauchslösung durch Mischen der beiden beigefügten Reagenzien im Verhältnis 1:4 hergestellt. Anschließend wurden die Proben sowie eine aufsteigende Harnstoffstandardreihe (50, 100, 150, 200, 250 mg/dL) auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Durch Zugabe von je 200 μ l Gebrauchslösung wurde die Reaktion gestartet. Nach 60 und 120 Sekunden erfolgte eine Extinktionsmessung bei 340 nm. Wie bei der Kreatininmessung wurde die Differenz der beiden Extinktionen ermittelt und anhand der Harnstoffstandardreihe die Harnstoffkonzentration in den Proben errechnet.

2.2.1.5 Mausmodell: Unilateraler IRS der Niere

Prinzip des unilateralen Modells ist es, dass durch 35-minütiges einseitiges Abklemmen der Nierengefäße und anschließende Wiedereröffnung ein IRS der Niere verursacht wird. Der Schaden wird funktionell durch die zweite, ungeschädigte Niere kompensiert. Die Mäuse wurden mit einer Mischung aus 0,5 mg/kg Medetomidin, 5 mg/kg Midazolam und 0,05 mg/kg Fentanyl anästhesiert. Da gezeigt wurde, dass Schwankungen der Körperkerntemperatur während der Operation zu vermehrten Komplikationen und ausgeprägteren interindividuellen Unterschieden führen, wurde auf die Temperaturkontrolle besonderen Wert gelegt (127). Zur Überwachung der intraoperativen Körperkerntemperatur wurde den Mäusen nach vollständigem Einsetzen der Narkose eine rektale Temperatursonde eingeführt, die eine Temperaturkurve der jeweiligen Maus auf einen Computerbildschirm übertrug. Dies diente zum einen als Qualitätskontrolle der Operation, aber auch um gegebenenfalls einem Temperaturabfall mittels einer Infrarot-Wärmelampe entgegenwirken zu können. Nach Einführen der Sonde wurden die Mäuse in eine belüftete Kammer gelegt, in der eine konstante Temperatur von 38 °C herrschte. Die Operation selbst wurde auf einer beheizten Platte durchgeführt. Die Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 10 anhand des bilateralen IRS

Modells dargestellt. Nach einem oberflächlichen Flankenschnitt und Auftrennung des darunter liegenden Peritoneums wurde die Niere dargestellt. Anschließend wurde sie am Nierenpedikel mit einer Yasargil Aneurysmaklemme abgeklemmt. Erfolgskontrolle für das Abklemmen war ein Abblassen der Niere. Nach 35 Minuten Ischämie wurde die Klemme geöffnet und die Niere wieder reperfundiert. Um den Flüssigkeitsverlust während der Operation auszugleichen, wurden nach Entfernen der Klemmen 200 µl isotone Natriumchloridlösung in die Peritonealhöhle gegeben. Der Wundverschluss erfolgte kutan und peritoneal mit absorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon, Belgien). Nach erfolgreichem Wundverschluss wurde die Narkose mit 2,5 mg/kg Atipamezol, 1,2 mg/kg Naloxon und 0,5 mg/kg Flumazenil antagonisiert. Zur Analgesie wurden 0,05 mg/kg Buprenorphin subkutan injiziert.

2.2.1.6 Mausmodell: Bilateraler IRS der Niere

Operativ unterscheidet sich das bilaterale Modell vom unilateralen dadurch, dass beide Nieren präpariert und abgeklemmt werden. Die Ischämiezeit betrug wie beim unilateralen Modell 35 Minuten. Die Schädigung beider Nieren hat zur Folge, dass sie nicht funktionell kompensiert werden kann, wodurch es zu einem Abfall der GFR kommt.

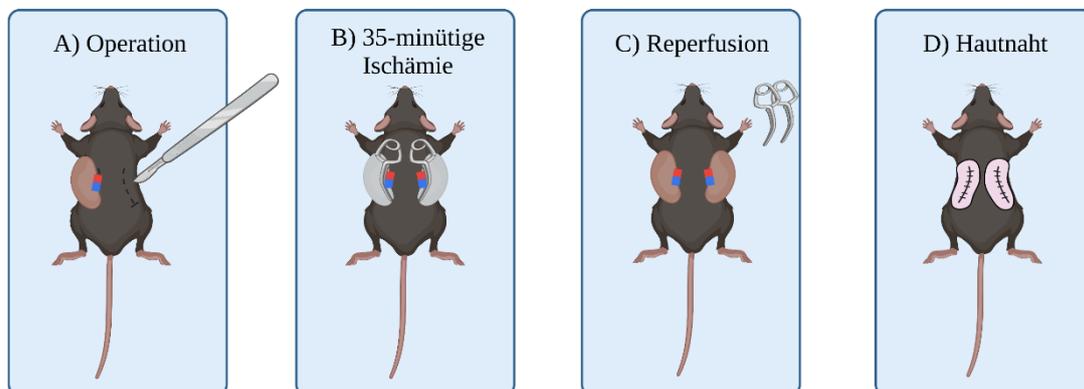


Abbildung 10: Schematische Darstellung der operativen Induktion des renalen bIRS

Unter A) dargestellt ist die operative Präparation der Nieren, die jeweils über einen Flankenschnitt erfolgte. In B) wurde durch Applikation der Yasargil-Aneurysmaklemmen über den Nierenpedikeln eine beidseitige renale Ischämie verursacht. Durch Lösen der Klemmen wurde die in C) dargestellte Reperfusion induziert. Anschließend erfolgte der in D) dargestellte Wundverschluss durch jeweils eine subkutane und eine kutane Naht. Abkürzungen: bIRS, bilateraler Ischämie-Reperfusionsschaden. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2.2.1.7 Studiendesign: Einfluss des IRS auf die renalen Gpx4-Proteinkonzentration und -Genexpression

Bei 35 Mäusen wurde operativ ein unilateraler IRS der Niere ausgelöst. Gruppen zu je 5 Mäusen wurden nach unterschiedlichen Reperfusionzeiten (0, 30min, 1h, 6h, 12h, 48h, 4d, 7d, 10d) in Inhalationsnarkose durch zervikale Dislokation getötet. Daraufhin wurde jeweils die geschädigte, sowie die Kontrollniere entnommen und nach Entfernung der Nierenkapsel in drei Teile geschnitten. Ein Drittel wurde ohne weitere Behandlung zur späteren Proteinisolation bei -80 °C gelagert, ein Drittel wurde für molekularbiologische Analysen in der Konservierungslösung RNAlater (Ambion, Deutschland) bei -80 °C aufbewahrt und das letzte Drittel wurde in 4% Formalin gelagert, um histologische Schnitte anzufertigen.

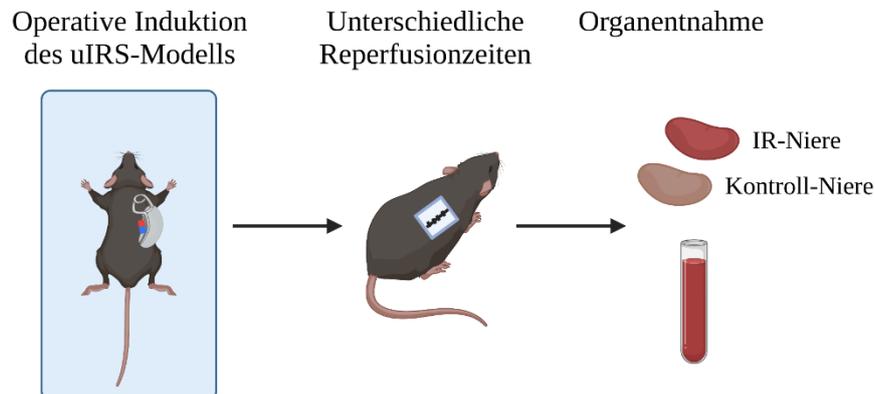


Abbildung 11: Zeitachse des Tierversuchs zum Einfluss des IRS auf die renale Gpx4

Abkürzungen: uIRS, unilateraler Ischämie-Reperfusionsschaden; IR-Nieren, die geschädigten Nieren. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2.2.1.8 Studiendesign: Effekt von Lip-2 im bIRS-Mausmodell

Um den Effekt von Lip-2 im bIRS-Mausmodell zu untersuchen, wurde bei Mäusen in Gruppen zu je 6 Tieren operativ ein bilateraler IRS der Niere ausgelöst. Die Gruppen wurden mit unterschiedlichen Dosen Lip-2 behandelt. Ein Drittel der Dosis wurde dabei jeweils unmittelbar präoperativ intravenös und zwei Drittel intraoperativ (direkt vor der Hautnaht) peritoneal appliziert. Bei der Kontrollgruppe wurde nur das verwendete Lösungsmittel, 5% Kolliphor, ohne gelösten Wirkstoff appliziert. Nach 24-stündiger Reperfusion gewannen wir Blutproben und entnahmen die Organe. Als Marker der exkretorischen Nierenfunktion wurden Serumharnstoff- und Kreatininkonzentration bestimmt.

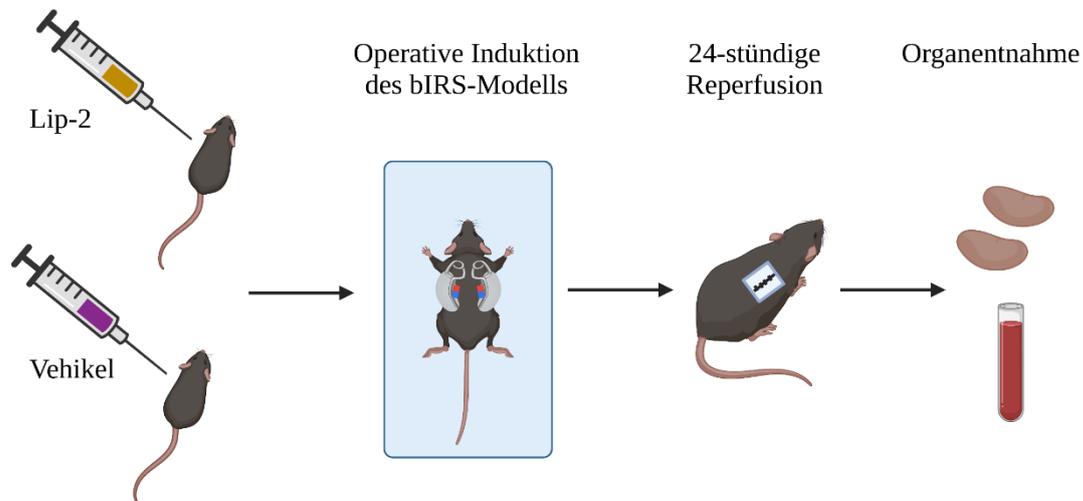


Abbildung 12: Zeitachse des Tierversuchs zum Effekt von Lip-2 im renalen bIRS-Mausmodell.

Abkürzungen: Lip-2, Liproxstatin-2; bIRS, bilateraler Ischämie-Reperfusionsschaden. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2.2.2 Molekularbiologische Analysen

2.2.2.1 RNA-Isolation

Vor Beginn der Arbeit wurde die Arbeitsbank gründlich mit RNase ZAP gereinigt, um ubiquitär in der Umwelt vorkommende RNAsen zu beseitigen und eine Degradation der RNA während der Isolation zu verhindern. Zum selben Zweck wurden während der Isolation Handschuhe und Mundschutz getragen. Um RNA aus dem Gewebe zu isolieren, wurde das PureLink RNA Mini Kit verwendet und das Herstellerprotokoll befolgt. Dessen Funktion beruht auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, unter bestimmten Bedingungen an Siliziumdioxid zu binden und erfolgt im Wesentlichen in vier Schritten: Lyse, Membranbindung, Waschen und Eluieren.

Die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in RNAlater gelagerten Nierenpole wurden für die Isolation langsam auf Eis aufgetaut. Um die Zellen zu lysieren und so die RNA freizusetzen, wurden die Nierenpole in vorbereiteten 5 ml Röhrchen mit je 2 ml 1% 2-Mercaptoethanol-Lysepuffer gemischt. Daraufhin erfolgte eine 30 Sekunden lange Behandlung mit einem Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra Turrax, IKA) zum Aufschluss des Gewebes. Die homogenisierten Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 350 μl 70% Ethanol vermengt und gründlich gevortext, bis keine Präzipitate mehr sichtbar waren. Die so entstandene Bindungslösung hat genau den richtigen Salzgehalt und pH-Wert, damit im nächsten Schritt die RNA an die Siliziumdioxidmembran binden kann.

Hierfür ist auch das im Lyse- und Waschpuffer enthaltene chaotrope Salz Guanidiniumthiocyanat von großer Wichtigkeit, das die Assoziation von Nukleinsäuren und Wasser verhindert, und so die Bindung an Siliziumdioxid erst ermöglicht.

Zur eigentlichen Isolation der RNA wurden 700 µl der Lösung auf die Zentrifugationssäulen aufgetragen und für 30 Sekunden bei 12 000 rpm zentrifugiert, sodass die Lösung von der oberen Kammer durch die Siliziumdioxidmembran in die untere Kammer gepresst wurde. Anschließend wurde das Filtrat in der unteren Kammer, in dem sich Proteine und andere Zellbestandteile befinden, verworfen. Als nächstes wurde in drei Schritten durch Hinzugabe von unterschiedlichen Waschpuffern, gefolgt von je einem Zentrifugationsschritt und dem Entleeren der unteren Kammer, die Membran, an die die Nukleinsäuren gebunden sind von Salzresten und Proteinverunreinigungen gesäubert. Daraufhin wurde die Membran durch zweiminütiges Zentrifugieren getrocknet. Um die an die Membran gebundene RNA auszuwaschen, wurden 33 µl RNase-freies Wasser auf die Membran aufgetragen. Nach einminütiger Inkubationszeit erfolgte die zweiminütige Abzentrifugation in ein Eppendorfgefäß bei 12 000 rpm. Die nun in der unteren Kammer befindliche RNA-Lösung wurde entweder bei -20 °C eingefroren oder auf Eis gestellt, um direkt weiter verarbeitet zu werden.

2.2.2.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA

Um Konzentration und Reinheit der isolierten RNA zu messen, wurde ein NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer verwendet, mit dem die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen wurde. Für die Messung wurde nach gründlichem Vortexen 1 µl der RNA-Lösung auf den Probenhalter aufgetragen. Durch das Verhältnis der beiden Extinktionen wird die OD_{260nm}/OD_{280nm} Ratio gebildet. Die Proben wurden nur bei Werten zwischen 1,6 und 2,2 verwendet, da höhere Werte auf eine DNA- und kleinere Werte auf eine Proteinkontamination hinweisen können. Nach der Messung der Konzentration wurde durch entsprechende Zugabe von RNase-freiem Wasser die Konzentration so angeglichen, dass in 15 µl der Lösung 2 µg RNA enthalten sind, da diese Konzentration für die cDNA-Synthese benötigt wird.

2.2.2.3 cDNA-Synthese

Um die RNA in komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) umzuschreiben, wurden zwei Ansätze hergestellt, ein Ansatz mit reverser Transkriptase (RT+) und einer ohne (RT-).

Der RT- Ansatz dient als Negativkontrolle zum Nachweis von DNA-Kontamination. Ist in der Messung nach der reversen Transkription auch im RT- Ansatz DNA vorhanden, ist von einer Kontamination der RNA-Proben mit DNA während oder nach der Isolation auszugehen. Es wurden pro Probe 2 µg RNA verwendet, enthalten in 15 µl der RNA-Lösung. Zuerst wurde der „*Mastermix*“ hergestellt, bestehend aus für die Transkription wichtigen Reagenzien: 4,5 µl 5xFirst-Strand-Buffer, 1 µl 0,1 M DTT, 0,45 µl 25 mM dNTP-Mischung, 0,25 µl Linear-Acrylamid (15 µg/ml), 0,25 µl Hexanukleotide und 0,5 µl RNAsin. Dem RT+ Ansatz wurde zusätzlich 0,5 µl reverse Transkriptase (Superscript II) zugefügt. Anschließend wurden 15 µl der RNA-Probe mit den 6,95 µl (bzw. 7,45 µl) „*Mastermix*“ vermischt und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Daraufhin erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei 42 °C, der idealen Arbeitstemperatur der reversen Transkriptase Superscript. Beendet wurde die Reaktion durch eine fünfminütige Inkubation bei 95 °C, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die fertige cDNA wurde daraufhin für die Lagerung bei 4 °C im Verhältnis 1:10 und für die Verwendung in der qPCR im Verhältnis 1:33 mit Wasser verdünnt.

2.2.2.4 RT-qPCR

Die quantitative *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) ist ein Verfahren, das Rückschlüsse auf die Genexpression in Zellen erlaubt. Für die Analysen wurde das Lightcycler® 480 Real-Time PCR System der Firma Roche verwendet. Das Verfahren beruht auf der Amplifikation der cDNA mittels PCR und der Fluoreszenzmessung des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I am Ende jedes PCR-Zyklus. Der Farbstoff lagert sich gleichmäßig in die DNA-Doppelstränge ein, eine Zunahme der Fluoreszenz korreliert daher eng mit einer Zunahme der Replikate der Ziel-DNA. Durch eine Formel kann zurückgerechnet werden, wie viele Kopien des Zielgens sich in der cDNA-Probe und auch entsprechend in der RNA-Probe befunden haben. Indem man diese Zahl ins Verhältnis zu so genannten „*Housekeeper*“-Genen setzt, die in jeder Zelle ungefähr gleich oft abgelesen werden, kann man Rückschlüsse auf die Genexpression ziehen.

Im ersten Schritt wurde der „*Mastermix*“ bestehend aus 1 ml 10x-Taq-Puffer, 75 µl dNTPs (25 mM), 2 ml PCR-Optimizer, 100 µl BSA-PCR (20 mg/ml), 20 µl SYBR-Green I (1:100; 20% DMSO) und 1,2 ml Magnesiumchlorid (25 mM) vorbereitet. Um einen für das Gen von Interesse spezifischen Replikationsansatz zu erstellen, wurden zu 10 µl „*Mastermix*“

0,16 µl Taq-Polymerase und je 0,6 µl (300 nmol/L) des spezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primers gemischt. Als nächstes wurden in einem *Well* einer 96-*well*-Platte 11,4 µl des Replikationsansatz mit 8,6 µl der zuvor im Verhältnis 1:33 verdünnten cDNA vermischt. Als „Housekeeper“ wurde die 18s RNA der Ribosomen verwendet. Wie für das Zielgen, wurde auch für die 18s RNA ein spezifischer Replikationsansatz erstellt und in einem *Well* mit cDNA vermischt. Neben der RT+ cDNA wurde auch RT- cDNA als Negativkontrolle mit entsprechenden Replikationsansätzen auf der Platte aufgetragen, um eine Verunreinigung der cDNA auszuschließen. Nachdem die Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen wurde, erfolgte eine einminütige Zentrifugierung bei 2000 rpm und 4 °C. Danach wurde die Platte in den Light Cycler eingesetzt und für 90 Minuten inkubiert. Dabei durchläuft sie 40 gleichartige PCR-Zyklen:

1. Denaturierung der DNA: Durch Erhitzen auf 95 °C werden die komplementären Doppelstränge voneinander getrennt.
2. Primer-Hybridisierung: Die Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge erfolgt bei einer Temperatur von 60 °C. Die Temperatur ist dabei entscheidend, ist sie zu hoch können die Primer sich nicht an die Einzelstränge anlagern, ist sie zu niedrig binden sie unspezifisch.
3. Elongation: Bei 72 °C lagern sich die Nukleotide nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an die Einzelstränge an und werden von der Taq-Polymerase zusammengefügt.

In jedem Zyklus erfolgt so eine Verdopplung der DNA. Nach den 40 Zyklen steigt die Temperatur langsam und kontinuierlich von 50 auf 95 °C an. Währenddessen wird die Fluoreszenzintensität dauerhaft gemessen. Bei einer bestimmten Temperatur trennen sich die DNA-Doppelstrangfragmente, wodurch die Fluoreszenzintensität abnimmt. Unterschiedlich lange Fragmente, oder Fragmente mit unterschiedlichem Gehalt an verschiedenen Nukleotiden, trennen sich dabei bei unterschiedlichen Temperaturen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Schmelzkurvenanalyse. Ein einzelner Fluoreszenzpeak in der Schmelzkurvenanalyse zeigt dabei an, dass nur ein spezifisches Produkt in der PCR gebildet wurde. Ursachen für mehrere Peaks können zum Beispiel unspezifische Primer sein, die an mehreren Stellen binden.

2.2.3 Proteinanalyse

2.2.3.1 Proteinisolation aus Zellen

Zur Proteinisolation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit RIPA Buffer lysiert (Sigma-Aldrich), dem zuvor Proteaseinhibitoren (Roche Diagnostics) zugefügt wurden. Dazu wurden die Zellen nach Zugabe des Lysepuffers mit einem vorgekühlten Plastischaber von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst und mit einer Pipette in ein Eppendorfgefäß übertragen. Nachdem die Proben für eine Stunde bei 4 °C in Bewegung gehalten wurden, erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 20 000 rpm, um nichtlösliche Bestandteile abzuzentrifugieren. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und das Pellet verworfen.

2.2.3.2 Proteinisolation aus Gewebe

Um Proteine aus Gewebe zu isolieren, wurde der gleiche Lysepuffer wie zuvor verwendet. Ungefähr 15 mg Gewebe wurden in einem Eppendorfgefäß mit 300 µl Lysepuffer vermengt und mittels eines Rotor-Stator-Homogenisators aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben wie die Proteinlysate aus Zellen für eine Stunde bei 4 °C in Bewegung gehalten und für 20 Minuten bei 20 000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und das Pellet verworfen.

2.2.3.3 Proteinanalyse: SDS-PAGE und Western Blotting

Aus den Proteinisolaten wurde mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit die Proteinkonzentration bestimmt. Dabei wurde die Anleitung des Herstellers befolgt. Pro Probe wurden 20 µg Protein verwendet. Diese wurden mit 3 µl des 6x Ladungspuffers vermengt und mit MilliQ Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, um Protein-Sekundärstrukturen zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben auf vorgegossene 12% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gele (Bio-Rad) in einer Mini-PROTEAN® Tetra Elektrophorese Kammer (BioRad) aufgetragen, die mit Laufpuffer gefüllt war. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100-120 Volt über einen Zeitraum von einer Stunde. Anschließend wurden die Proteine mittels Elektrotransfer (Trans-Blot® Turbo™, Biorad) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Die Membran wurde mit TBS-T gewaschen (je Waschschrift drei Mal für 5 Minuten) und für eine

Stunde bei Zimmertemperatur mit Magermilchpulverlösung (5% Milchpulver in TBS-T) blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

Nach erneutem Waschen mit TBS-T erfolgte die Übernacht-Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4 °C. Der Gpx4-Antikörper war dabei im Verhältnis 1:1000 in Magermilchlösung verdünnt. Der β -Aktin-Antikörper war im Verhältnis 1:10 000 in 5%iger Boviner-Serum-Albumin Lösung verdünnt.

Nach abgelaufener Inkubation wurden die Membranen erneut mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde bei Zimmertemperatur mit dem korrespondierenden, Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Sekundärantikörper waren dabei jeweils im Verhältnis 1:5000 in 5% Magermilchpulverlösung verdünnt. Nach einem erneuten Waschschrift mit TBS-T wurden die Proteine durch Zugabe von Clarity™ Western ECL Blotting Substraten dargestellt. Mittels des ChemiDoc™ Imaging Systems (Bio-Rad) wurden die Ergebnisse dokumentiert. Zusätzlich zur Detektion des Zielproteins wurde in jeder Probe β -Aktin als Referenzprotein detektiert. β -Aktin ist ein überlebenswichtiges Strukturprotein, das in jeder Zelle vorkommt und, unabhängig von experimentellen Bedingungen, in einem engen Rahmen reguliert wird. Die Normalisierung der Zielproteinbande zur β -Aktin-Bande ermöglicht die Bestimmung der relativen Zielproteinkonzentration pro Zelle.

2.2.4 Zellkultur-Experimente

2.2.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

HK-2 Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Die Manipulation an den Zellkulturschalen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank, die mit einem Luftfilter, sowie einer Abschirmung durch einen laminaren Luftfluss ausgestattet war. Vor Beginn der Arbeit wurden alle nötigen Materialien mit 70% Ethanol desinfiziert.

2.2.4.2 Kultur und Passagierung der HK-2 Zellen

Human Kidney 2 (HK-2) Zellen wurden in RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, im Weiteren als RPMI bezeichnet) mit 10% fetalem Rinderserum (FBS), 1% MEM *Non essential amino acid solution* (MEM-NEAA, Sigma-Aldrich), 1% Natriumpyruvat (Sigma-Aldrich) und 1% Penicillin/Streptavidin unter Standardkulturbedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ in einem

Zellkultur-Inkubator kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch 10-minütige Behandlung mit Trypsin (Sigma-Aldrich) abgelöst und dann für 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet resuspendiert und im Verhältnis 1:5 wieder auf die Platte aufgetragen.

2.2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur späteren Verwendung wurden Zellen in einer niedrigen Passage eingefroren. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst, abzentrifugiert und anschließend in vorgekühltem Einfriermedium, bestehend zu 90% aus FBS und 10% aus DMSO, resuspendiert. Der Zellgehalt der Suspension wurde wie im nächsten Abschnitt beschrieben mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und so verdünnt, dass sich in 1,5 ml Aliquots je circa 5 Millionen Zellen befanden. Diese Aliquots wurden in Kryoröhrchen gegeben, welche in einem Gummiisolator innerhalb der nächsten zwei Stunden bei -80 °C langsam abgekühlt wurden. Daraufhin erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen in den Flüssigstickstofftank, wo sie bei -196 °C aufbewahrt wurden. Zum Auftauen von gefrorenen Zellen wurde das entsprechende Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in einem Falcon-Röhrchen mit 10 ml Kulturmedium vermengt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf die Zellkulturplatten aufgetragen. Am nächsten Tag erfolgte ein erneuter Mediumwechsel, um das zellschädigende DMSO vollständig zu entfernen.

2.2.4.4 Zellzählung

Um vitale Zellen zu quantifizieren, wurden diese wie zur Passagierung mit PBS gewaschen, durch 10-minütige Behandlung mit Trypsin vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und anschließend abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 5 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl des Suspensats mit 50 µl Trypanblau vermischt. Trypanblau bindet intrazelluläre Proteine, kann aber intakte Zellmembranen nicht passieren, weshalb nur tote Zellen angefärbt werden. Vitale Zellen zeigen sich unter dem Lichtmikroskop hell-, tote Zellen dunkelblau eingefärbt. Zur Quantifizierung der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zählkammer wird aus einem modifizierten Objektträger und einem Deckglas gebildet. Der Objektträger besitzt in der Mitte drei zur Kurzkante parallel stehende Stege, die durch Vertiefungen voneinander getrennt sind.

Dabei sind die beiden äußeren Stege 0,1 mm höher als der innere Steg. Durch Aufsetzen des Deckglases bildet sich über dem mittleren Steg eine Kammer, über ein auf dem Boden des mittleren Stegs eingraviertes Zählnetz ist das Volumen der Kammer genau definiert.

Durch vorsichtiges seitliches Einpipettieren der Zellsuspension in die Vertiefung zwischen den Stegen wurde die Kammer kapillarkraftvermittelt mit Suspensat befüllt. Anschließend wurden die Zellen über den vier Großquadraten des Zählnetzes unter dem Lichtmikroskop mäandrierend ausgezählt. Um Doppelzählungen zu vermeiden, wurden Zellen, die auf den Kanten der Quadrate lagen, pro Quadrat nur an der oberen und linken Kante gezählt. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times 10^4$$

2.2.4.5 Zytotoxizitätsmessung

Zur Bestimmung der Toxizität verschiedener Substanzen auf HK-2 Zellen wurde das Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche verwendet. Die Funktion des Kits beruht auf der Freisetzung des Enzyms aus dem Zellinneren bei Verlust der Zellmembranintegrität. Dabei korreliert die Menge der freigesetzten LDH nachgewiesenermaßen eng mit der Anzahl der lysierten Zellen. Die Menge der LDH im Medium wird durch eine chemische Reaktion gemessen, bei der LDH-katalysiert Laktat zu Pyruvat oxidiert und als Kosubstrat NAD⁺ zu NADH reduziert wird. Die Substrate werden im Überfluss zugegeben, sodass die Menge der LDH die Reaktionsgeschwindigkeit limitiert. Der zuvor zugegebene, in Wasser gelbliche Redoxindikator Tetrazoliumchlorid wird durch das entstandene NADH zu Formazan reduziert. Da Formazan eine rote Färbung aufweist, kommt es in Abhängigkeit von der LDH im Medium zu einem Farbumschlag. Um diesen zu quantifizieren, wurde die Absorption mithilfe eines Photometers im roten Farbspektrum, bei 492 nm, gemessen.

Zur Ermittlung der Toxizität einer Testsubstanz wurden Zellen gleichmäßig, in einer festgelegten Anzahl, auf einer 96-well-Platte ausgesät. 10 Stunden später, nachdem die Zellen genug Zeit hatten, um adhären an der Platte anzuwachsen, wurde der Versuch gestartet. Um Wachstumseffekte zu verringern, wurden die Zellen während der 10 Stunden vor dem Versuch in serumfreiem Medium kultiviert, falls nicht anders beschrieben.

Um eine Aussage über die minimale LDH-Aktivität zu ermöglichen, wurden Zellen für die Versuchsdauer mit Medium ohne weitere Zusätze inkubiert (genauere Charakterisierung

der Experimentalmedien bei den einzelnen Versuchen). Anschließend wurden 100 µl des zellfreien Überstands entnommen und mit 100 µl der Reaktionslösung aus dem Kit vermennt. Nach 10 Minuten wurde die Absorption bei 492 nm gemessen (Min. Kontrolle). Um die maximale LDH-Aktivität zu ermitteln, wurde gleich verfahren, nur wurde dem Kulturmedium zusätzlich das Detergens TritonX 100 zugegeben, das alle Zellen in der Kammer lysiert und so die maximale LDH-Freisetzung bewirkt (Max. Kontrolle). Außerdem wurden Zellen mit der in Medium gelösten Testsubstanz inkubiert. Auch aus diesen Reaktionsgefäßen wurde in gleicher Weise Überstand entnommen und die Absorption bestimmt (Test Absorption). Anschließend wurden die Absorptionen gemäß der untenstehenden Formel zueinander in Beziehung gesetzt. Ergebnis ist die durch die Testsubstanz verursachte prozentuale Zytotoxizität.

$$\%Zytotoxizität = \frac{\text{Test Absorption} - \text{Min. Kontrolle}}{\text{Max. Kontrolle} - \text{Min. Kontrolle}}$$

Um zu sehen, ob die Testsubstanzen durch ihre Absorptionsspektren mit den Ergebnissen interferierten, wurden die Substanzen in zellfreiem Medium gelöst, die Absorption bestimmt und mit der von reinem Medium verglichen. Keine der von uns verwendeten Substanzen beeinflusste die Aktivität der LDH signifikant.

2.2.4.6 Hypoxie und Reoxygenierung

HK-2 Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume in einer Hypoxiekammer inkubiert und anschließend reoxygeniert. Für die Inkubation in der Hypoxiekammer wurden die Zellen am Vortag in 96-well-Platten für Zytotoxizitätsmessungen, beziehungsweise in 6-well-Platten für Proteinanalysen zu je 20 000, bzw. 1 Millionen Zellen pro Well ausgesät. Für das Experiment wurden die Zellen in eine Hypoxiekammer (Bilups Rothenburg) überführt. Die Hypoxie wurde nach dem Herstellerprotokoll durch Einleitung eines Stickstoff-Kohlendioxid-Gemischs (Verhältnis 95:5) erreicht. Kohlendioxid ist dem Gemisch beigefügt, da es eine wichtige Funktion im Puffersystem des Kulturmediums einnimmt und so den pH-Wert stabilisiert. Es gab zwei Ventile an der Kammer, die geöffnet werden konnten. Zur Reduktion des in der Kammer befindlichen Sauerstoffs wurde die Kammer luftdicht verschlossen, beide Ventile geöffnet und von einer Seite das Gasgemisch für 3 Minuten bei einem Gasfluss von 30 Litern pro Minute eingeleitet, sodass die Luft über das andere Ventil aus der Kammer ausströmte. Anschließend wurden beide Ventile gleichzeitig geschlossen. Nach 15 Minuten

erfolgte eine erneute einminütige Gaseinleitung nach demselben Prinzip, um auch den aus dem Medium diffundierten Restsauerstoff aus der Kammer zu entfernen. Daraufhin wurde die Kammer für den Zeitraum der Inkubation in einen Zellkulturschrank überführt. Die Sauerstoffkonzentration im Innern der Kammer wurde mithilfe eines Sensors gemessen und lag während der gesamten Inkubation unter 1%. Für die Reoxygenierung wurde die Kammer geöffnet, das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 2 Stunden bei Raumluft inkubiert.

2.2.4.7 Experimentdesign: Effekt von Lip-2 auf die Zytotoxizität im Hypoxie-Reoxygenierungs-Modell

HK-2 Zellen wurden für 48 Stunden in FBS- und Glucose-freiem Medium in der Hypoxiekammer inkubiert. Anschließend wurde die Kammer geöffnet, das Medium vorsichtig abgesaugt und durch das Reoxygenierungsmedium ersetzt. Dieses bestand aus frischem FBS- und Glucose-haltigem RPMI-Medium, dem zuvor unterschiedliche Dosen Liproxstatin (10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 µmol/L) zugefügt wurden. Das Liproxstatin wurde in DMSO gelöst. Als Kontrolle wurde dieselbe Menge DMSO ohne Wirkstoff zugegeben. Nach zwei Stunden wurde die Zytotoxizität mittels LDH-Release Assay bestimmt. Als Minimalkontrolle wurde Überstand von Zellen verwendet, die für zwei Stunden in Glucose- und FBS-haltigem Medium bei Normoxie inkubiert wurden. Für die Maximalkontrolle wurden Zellen nach der 48-stündigen Hypoxiephase mit Triton X lysiert.

2.2.4.8 Experimentdesign: GPX4-Proteinkonzentration in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kulturbedingungen

Um den Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung, sowie unterschiedlicher Nährstoffsupplementation auf die GPX4-Proteinkonzentration zu untersuchen, wurden HK-2 Zellen für 48 Stunden in unterschiedlich supplementiertem RPMI-Medium (+/- Glucose, +/- FBS) in der Hypoxiekammer oder unter Normoxie inkubiert. Eine Gruppe wurde wie im Vorexperiment für 48h in FBS- und Glucose-freiem Medium in der Hypoxiekammer inkubiert und anschließend für zwei Stunden in FBS- und Glucose-haltigem Medium reoxygeniert. Anschließend wurden von allen Gruppen die Proteine isoliert und die GPX4 mittels Western Blot nachgewiesen.

2.2.5 Messung des intramitochondrialen Superoxids mittels Durchflusszytometrie

Als intramitochondrialer Superoxidsensor wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoSox Red verwendet, der sich selektiv in die Mitochondrien einlagert (128). Das Produkt der MitoSox Red Oxidation mit Superoxid ist stark fluoreszierend und hat ein Emissionsmaximum bei 580 nm. Das Exzitationsmaximum liegt bei 510 nm. Durch andere ROS und RNS (reaktive Stickstoffspezies) als Superoxid lässt sich MitoSox Red nicht, beziehungsweise nur sehr langsam oxidieren (128). Für die Analyse wurden die Zellen in 3,5 cm Schalen zu je 200 000 Zellen in 1 ml serumfreiem Medium ausgesät und für 10 Stunden ruhen gelassen. Anschließend wurde das Medium gegen neues getauscht, das mit 50 μ M Antimycin A und 50 mM Dimethylsuccinat versetzt war. Dem Medium der Kontrollgruppe wurde nur DMSO zugegeben. Eine halbe Stunde vor Ende des Experiments wurde MitoSox Red hinzugefügt, sodass die Konzentration im Medium 3 μ M betrug. Nach zwei Stunden wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, mittels Trypsins von der Platte abgelöst und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Das Falcon-Röhrchen wurde für 5 Minuten bei 250 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung durch einen 35 μ m Filter in ein FACS-Röhrchen pipettiert, um Zellagglomerate zu entfernen oder aufzulösen. Daraufhin wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurde ein BD FACS Canto II (BD Bioscience) benutzt. Zur Anregung wurde der 488 nm Laser verwendet. Die Daten wurden mittels der Software FlowJo analysiert und dargestellt.

2.2.6 Histologie

2.2.6.1 Fixierung, Paraffineinbettung und Schneiden

Zur Herstellung histologischer Schnitte wurde nach der Organentnahme das Mittelstück der Niere in einer Einbett-Kassette für 24 Stunden bei Raumtemperatur in 4% Formalinlösung fixiert. Da das Gewebe in diesem Zustand nicht fest genug ist, um die für Lichtmikroskopie benötigten, durchstrahlbaren Schnitte herzustellen, wurde im nächsten Schritt das Wasser im Gewebe durch Paraffin ersetzt. Hierzu erfolgte zuerst eine Dehydrierung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%), daraufhin die Behandlung mit dem in Alkohol wie in Paraffin löslichen Xylol und anschließend die Einbettung in erwärmtes, flüssiges Paraffin. Nach dem Abkühlen und Aushärten der Blöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom (HM 340 E, Microm International GmbH) 2 μ m dicke Transversalschnitte angefertigt. Diese

wurden auf Objektträger übertragen und für 12 Stunden bei 60 °C in einem Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden die Präparate auf ihren Objektträgern erneut mit Xylol behandelt und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

2.2.6.2 Periodic Acid-Schiff (PAS) Färbung

Um die im Vorschrift hergestellten Präparate zu Färben, wurden diese für 5 Minuten mit 0,5% Periodsäure inkubiert, danach mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit Schiffischem Reagenz bedeckt. Daraufhin wurden die Präparate drei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Grundlage dieser Färbung bildet die zweischrittige PAS-Reaktion, die langkettige Polysaccharide und Moleküle, die solche enthalten, nachweist. Glykogengruppen werden durch Periodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert, welche anschließend mit der im Schiffischen Reagenz enthaltenen fuchsinschwefeligen Säure reagieren, wodurch die typische magentarote Färbung entsteht.

2.2.6.3 Semiquantitative Beurteilung der histopathologischen Tubulusschädigung

Zur Beurteilung der histomorphologischen Nierenschädigung wurden PAS-gefärbte Nierenschnitte verwendet. Diese wurden unter Verwendung des in unserem Labor etablierten Tubulären Schädigungs Scores analysiert (127). Hierzu wurden die histologischen Hauptmarker tubulärer Schädigung, Dilatation des Tubuluslumens (Ballonierung), Tubuluszellnekrose und intraluminale Zylinderformationen zunächst einzeln beurteilt. Pro Maus wurden je 20 Blickfelder aus dem kortikomedullären Übergang in 200-facher Vergrößerung beurteilt. Pro Schadensmarker wurden 1-10 Punkte vergeben, wobei 1 Punkt keiner bzw. einer sehr geringen, und 10 Punkte einer maximalen Markerausprägung entspricht. Die genaue Punktzuteilung lautet wie folgt: War der entsprechende Schadensmarker bei 0-10% der Tubulusepithelzellen vorhanden wurde 1 Punkt vergeben; bei 11-20% 2 Punkte; bei 21-30% 3 Punkte; bei 31-40% 4 Punkte; bei 41-50% 5 Punkte; bei 51-60% 6 Punkte; bei 61-70% 7 Punkte; bei 71-80% 8 Punkte; bei 81-90% 9 Punkte; bei 91-100% 10 Punkte. Anschließend wurde aus den 20 bewerteten Blickfeldern der Mittelwert gebildet. Die so bestimmten Einzelscores wurden graphisch dargestellt. Zusätzlich wurde für jede Niere durch Bildung des Mittelwerts der drei Marker der Tubuläre Schädigungsscore gebildet.

2.2.6.4 Immunhistochemische Färbung auf Gpx4

Die verwendete immunhistochemische Färbungsmethodik beruht auf dem Prinzip der antigenspezifischen Markierung durch einen Primärantikörper, sowie der anschließenden Bindung dieses primären Antikörpers durch einen sekundären, biotinylierten Antikörper. Basierend auf der Streptavidin/Biotin-Bindung wird dieser Sekundärantikörper in einem nächsten Schritt mit einer Streptavidin-gebundenen Meerrettichperoxidase markiert. Diese katalysiert anschließend die lokale Oxidation von zugegebenem 3,3'-Diaminobenzidin durch Wasserstoffperoxid, das dadurch ausfällt und ein lichtmikroskopisch darstellbares, bräunliches Präzipitat bildet.

Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Präparate für 20 Minuten mit 30% Wasserstoffperoxid inkubiert. Anschließend erfolgten zwei jeweils 5-minütige Waschschrte mit PBS, im Folgenden nur noch als Waschschrte bezeichnet. Zur Antigendemaskierung wurde einprozentig verdünnte *Unmasking Solution* (H-3300, Vector Laboratories) in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt. Anschließend wurden die Präparate bei 1 bar für 20 Minuten in der Lösung autoklaviert. Es folgte ein erneuter Waschschrte. Daraufhin wurden die Präparate für 15 Minuten mit jeweils einem Tropfen Avidin inkubiert, um natürlich vorkommendes Biotin zu blockieren. Durch Zugabe eines Tropfen Biotins wurden freie Biotin-Bindungsstellen des Avidins gesättigt. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit PBS.

Im nächsten Schritt wurden die Präparate über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper gegen Gpx4 inkubiert, der dazu im Verhältnis 1:250 in 10% Magermilchpulverlösung verdünnt wurde. Nach zwei Waschschrten wurde das Präparat für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, Ziege-anti-Hase-IgG, inkubiert, der dazu im Verhältnis 1:300 in 10% Magermilchpulverlösung verdünnt war. Unter Verwendung des VECTASTAIN R[®] Elite R[®] ABC-HRP Kit (PK-6100, Vector Laboratories) wurde, den Herstellerangaben folgend, Meerrettichperoxidase an den biotinylierten Sekundärantikörper konjugiert. Es folgten zwei Waschschrte. Als Nächstes erfolgte die Zugabe von Wasserstoffperoxid und DAB. Hierzu wurden 200 ml TRIS mit 4 ml DAB-Arbeitslösung und 1 ml achtprozentiger Nickelchloridlösung gemischt, das in diesem Kontext die Färbungsintensität verstärkt. Zuletzt wurden 500 µl dreiprozentiges Wasserstoffperoxid zugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Präparate mit der Lösung. Im Anschluss erfolgte durch zweiminütige Inkubation mit Methylengrün eine Gegenfärbung der Präparate.

2.2.7 Serielle Nierenbiopsien im Verlauf einer humanen Nierentransplantation

Von unserer Kooperationspartnerin Dr. Mariana Wohlfahrtová am Institut für Klinische und Experimentelle Medizin Prag (IKEM) erhielten wir zu 19 Patienten, die sich zwischen 2009 und 2010 einer Nierentransplantation nach Kadaverspende unterzogen hatten, jeweils drei serielle Nierenbiopsien. In Abbildung 13 sind anhand eines Zeitstrahls die Biopsiezeitpunkte dargestellt.

Die erste Biopsie (T_0) wurde während der Explantation des Spenderorgans als subkapsuläre Keilbiopsie gewonnen, kurz nachdem das Organ mit kalter Präservationslösung durchspült wurde. Die zweite Biopsie (T_1) wurde während der Transplantation mit einer sterilen 14-Gauge Biopsienadel entnommen, bevor das Organ reperfundiert wurde. Die Dauer der kalten Ischämiezeit betrug im Schnitt 15 Stunden. Die dritte Biopsie (T_2) wurde mittels einer sterilen 14-Gauge Biopsienadel ca. 30 Minuten nach Reperfusion entnommen.

Die 19 Patienten waren Teil einer insgesamt 35 Patienten umfassenden Studie. Bei 12 dieser Patienten war es nach Transplantation zu einer verzögerten Transplantatfunktion (VTF) gekommen, definiert durch den Bedarf an Dialyse innerhalb der ersten Woche nach Transplantation. Ausgenommen davon wurde die Dialyse aufgrund von Hyperkaliämie oder Volumenüberladung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Transplantation.

Bei 3 dieser 12 Patienten trat die VTF vermutlich in Folge von perioperativen Komplikationen auf, weshalb diese Patienten ausgeschlossen wurden. Wir erhielten die Biopsien der restlichen 9 Patienten mit VTF, sowie als Kontrollen die Biopsien von 10 Patienten mit primärer Transplantatfunktion (PTF), welche aus derselben Kohorte, zufällig, durch unsere Kooperationspartnerin ausgewählt wurden. Die genauen Patientencharakteristika können der ursprünglichen, von Frau Dr. Wohlfahrtová veröffentlichten Studie entnommen werden (129).

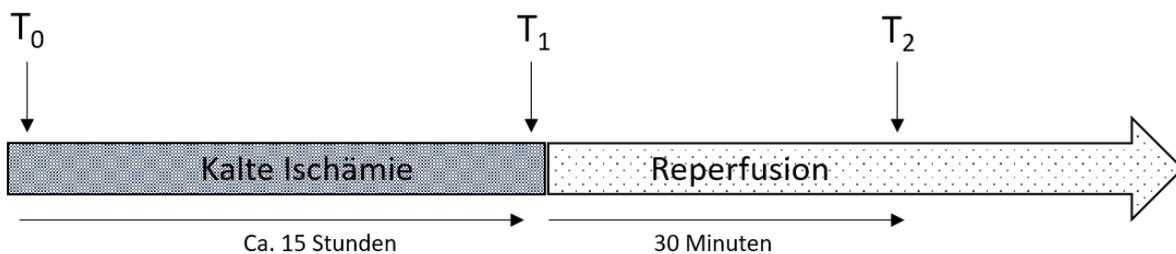


Abbildung 13: Zeitpunkte der Biopsieentnahme im Verlauf einer Nierentransplantation

Die Biopsien wurden in Paraffin fixiert, geschnitten und anschließend immunhistochemisch auf GPX4 gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in 200-facher Vergrößerung abfotografiert. Durch manuelle Selektion wurden möglichst große Bildbereiche ausgewählt, die nur Tubuli und keine Glomeruli enthielten. Von diesen Bereichen wurde, in Anlehnung an ein publiziertes Protokoll zur Analyse immunhistochemischer Schnitte, die prozentual auf GPX4 gefärbte Fläche bestimmt (130). Hierzu wurden die Bilder durch ein ImageJ Makro in Graustufen konvertiert und die bei einem zuvor und für alle Präparate gleich gewählten Graustufengrenzwert prozentual gefärbte Fläche gemessen. Der Prozess ist in Abbildung 14 dargestellt. Da die Intensität immunhistochemischer Färbungen mit der Proteinkonzentration korreliert, stellt dies eine nährungsweise Quantifizierung der tubulären GPX4 dar. (130).

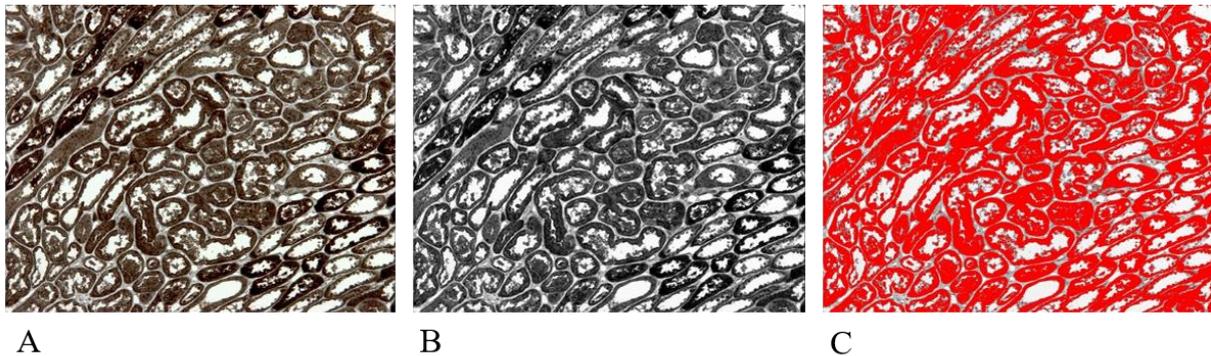


Abbildung 14: Ablauf der Quantifizierung der tubulären GPX4-Proteinkonzentration

A: Originalbild; B: Graustufenkonversion; C: Rot dargestellt ist die bei dem gewählten Graustufengrenzwert gefärbte Fläche. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der roten Fläche an der Gesamtfläche gemessen.

2.2.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurde die Software Graphpad Prism 9 verwendet. Dargestellt wurden jeweils die Mittelwerte \pm *Standard Error of the Mean* (SEM, Standardfehler). Vor einer weiteren statistischen Analyse wurde zur Überprüfung der Normalverteilung der Shapiro-Wilk-Test, sowie der Ausreißertest nach Grubb auf die Datensätze angewandt. Zum Vergleich zweier Stichproben wurde ein Zweistichproben-t-Test verwendet. Bei drei oder mehr vorliegenden Stichproben wurde eine einfaktorielle Analyse der Varianz (ANOVA) durchgeführt. Als post-hoc-Test wurde je nach Fragestellung Dunnett's Test gegen eine Kontrolle oder eine Bonferronikorrektur verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ definiert. Statistische Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

3. Ergebnisse

3.1 Liproxstatin-2 hat im IRS-Mausmodell einen protektiven Effekt

Um das therapeutische Potential von Lip-2 *in vivo* zu untersuchen, testeten wir das *Compound* in einem bilateralen IRS-Mausmodell. Zur Induktion des Modells analogosedierten wir die Mäuse, präparierten operativ die Nieren und klemmten diese mittels eines Aneurysmaclips für 35 Minuten von der Blutversorgung ab. Anschließend öffneten wir die Clips und die Nieren wurden reperfundiert. Gruppen zu je 6 Tieren behandelten wir mit unterschiedlichen Dosen Lip-2. Ein Drittel der Dosis wurde jeweils präoperativ intravenös und zwei Drittel postoperativ intraperitoneal appliziert. Der Kontrollgruppe verabreichten wir das verwendete Lösungsmittel, 5% Kolliphor, ohne gelösten Wirkstoff. Nach 24-stündiger Reperfusion gewannen wir Blutproben, und entnahmen die Nieren. Als Marker der exkretorischen renalen Funktion bestimmten wir aus dem Serum die Harnstoff- und Kreatininkonzentration.

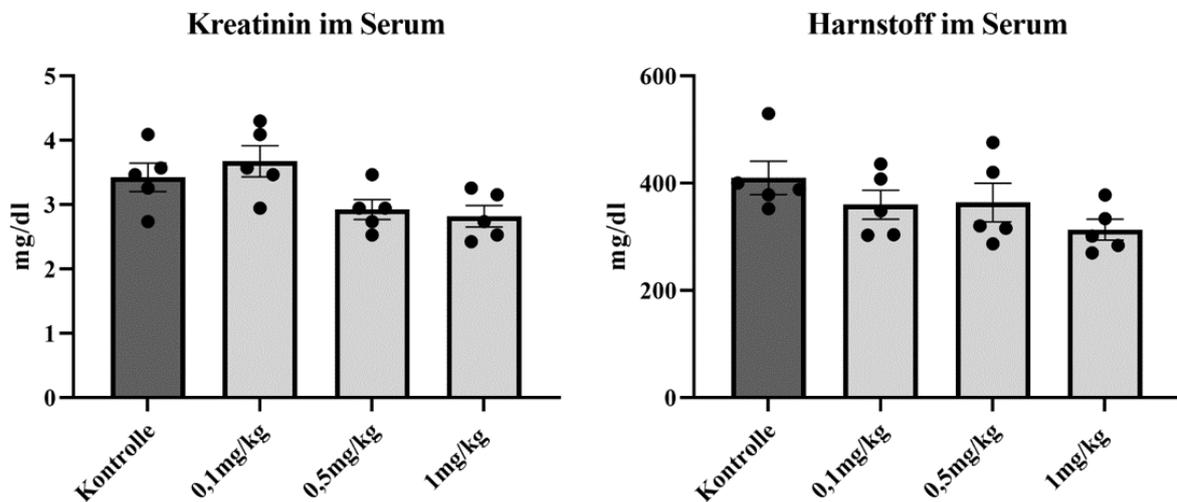


Abbildung 15: Effekt unterschiedlicher Dosen Lip-2 auf die renalen Funktionsparameter nach bIRS

Mäuse in Gruppen zu je 5 Tieren wurden mit 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg oder 1 mg Lip-2 pro Kilogramm Körpergewicht, gelöst in 120 µl Kolliphor behandelt. 40 µl wurden vor der bIRS-Induktion intravenös und die restlichen 80 µl danach intraperitoneal verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde nur der Emulgator Kolliphor ohne gelösten Wirkstoff injiziert. Anschließend wurden die Tiere einem operativen bIRS-Modell unterzogen. 24 Stunden nach Reperfusion wurde Blut entnommen, aus dem die Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen bestimmt wurden. Jede Säule stellt den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar.

Bei den Tieren, die mit der höchsten Dosis Liproxstatin (1mg/kg) behandelt wurden, waren im Schnitt die niedrigsten Kreatinin- und Harnstoffspiegel nachweisbar, wobei sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen und der Kontrollgruppe zeigen ließ. Es fiel zudem auf, dass im Vergleich zu Vorexperimenten aus unserer Arbeitsgruppe die gemessenen Kreatinin- und Harnstoffspiegel, insbesondere auch der Kontrollgruppe, außergewöhnlich hoch waren, entsprechend einer sehr ausgeprägten Schädigung. Wir wiederholten das Experiment mit nur zwei Gruppen à 6 Mäusen unter Optimierung der Operationsbedingungen. Als Interventionsdosis wurde die höchste zuvor genutzte Dosis (1mg/kg Körpergewicht) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

Die renale Schädigung der Kontrollgruppe entspricht in diesem zweiten Experiment der zu erwartenden Schädigung. Die Behandlung mit Liproxstatin hat einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion nach IRS. Bei den behandelten Tieren wurde im Schnitt 27 % weniger Kreatinin und 28 % weniger Harnstoff im Serum detektiert.

Zusätzlich zur Messung der renalen Funktionsparameter erfolgte eine semiquantitative Beurteilung der strukturellen Tubulusschädigung. Dazu fertigten wir von den entnommenen Nieren je einen PAS-gefärbten Histologieschnitt an und beurteilten den kortikomedullären Übergang im Hinblick auf die wichtigsten Marker tubulärer Schädigung: Dilatation des

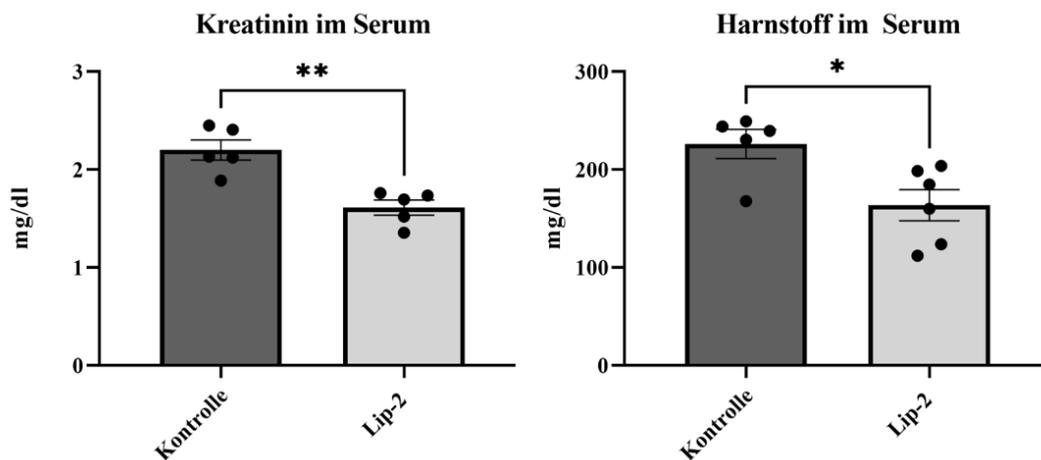


Abbildung 16: Effekt der Behandlung mit Lip-2 auf die renalen Funktionsparameter nach bIRS

Mäuse in Gruppen zu je 6 Tieren wurden mit 1 mg/kg Körpergewicht Lip-2, gelöst in 120 µl Kolliphor behandelt. 40 µl wurden vor der bIRS-Induktion intravenös und die restlichen 80 µl danach intraperitoneal verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde nur der Emulgator Kolliphor ohne gelösten Wirkstoff injiziert. Anschließend wurden die Tiere einem operativen bIRS-Modell unterzogen. 24 Stunden nach Reperfusion wurde Blut entnommen und jeweils die Kreatinin- und Harnstoffkonzentration bestimmt. Jede Säule stellt den Mittelwert von 5 bis 6 Mäusen ± SEM dar. *p<0,05, **p<0,01.

Tubuluslumens (Ballonierung), Tubuluszellnekrose und intraluminale Zylinderformation. Anschließend fassten wir diese Beurteilung für jede Niere im Tubulären Schädigungsscore zusammen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Bereits auf dem Niveau der Einzelmarker zeigt sich bei den mit Lip-2 behandelten Tieren signifikant weniger Tubuluszellnekrose und tubuläre Dilatation. Zusammengefasst liegt bei den Kontrolltieren eine mittelschwere bis schwere Tubulusschädigung vor (Tubulärer Schädigungsscore 5,8) während diese bei den mit Liproxstatin behandelten Tieren weniger stark ausgeprägt ist (Tubulärer Schädigungsscore 4). Lip-2 hat also auch hinsichtlich der nachweisbaren strukturellen Tubulusschädigung einen protektiven Effekt.

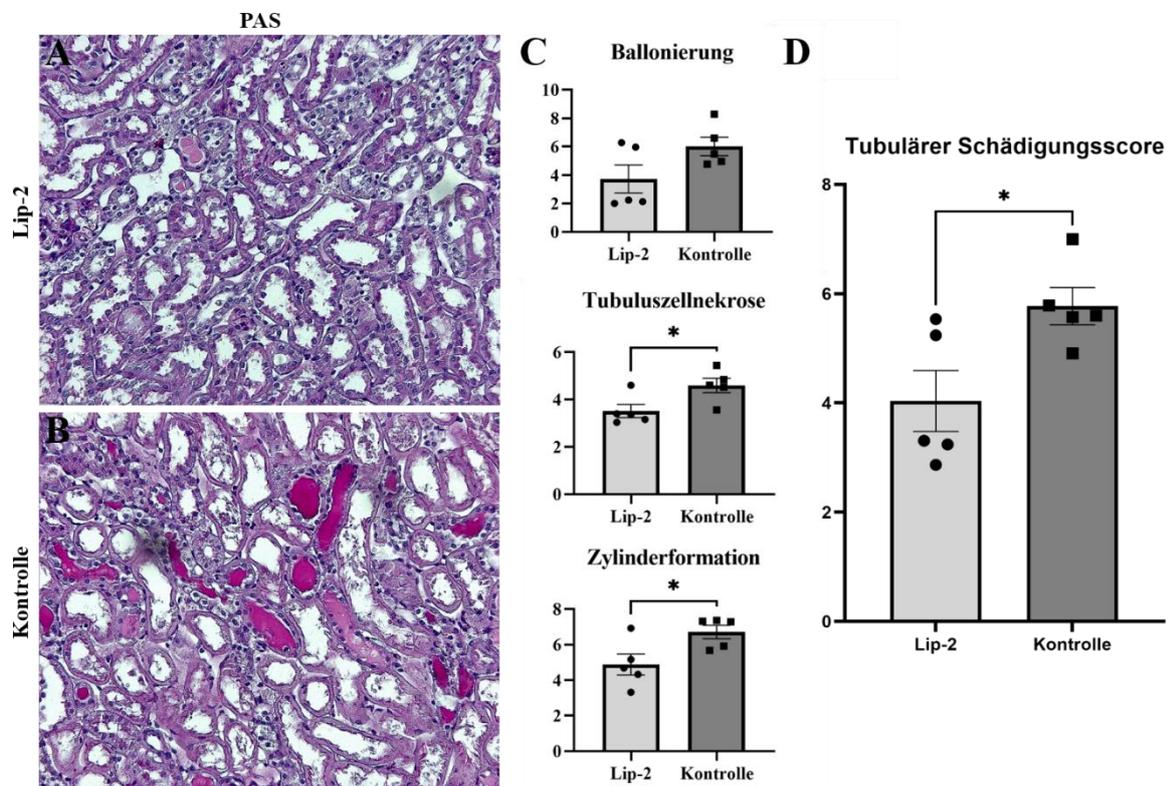


Abbildung 17: Effekt der Intervention mit Lip-2 auf die strukturelle Tubulusschädigung nach bIRS

A, B: Repräsentativer Ausschnitt aus dem kortikomedullären Übergang in 200-facher Vergrößerung, 24 Stunden nach bIRS; A der mit Lip-2 behandelten Gruppe; B der Kontrollgruppe.

C, D: Semiquantitative Analyse der tubulären Schädigung. Die Nierenschnitte wurden hinsichtlich der Marker tubulärer Schädigung jeweils mit Punkten von 0 – 10 beurteilt. Ein Score von 1 entspricht einem physiologischen Befund, ein Score von 10 einer maximalen Ausprägung des entsprechenden Merkmals. Pro Niere wurden 20 Blickfelder aus dem kortikomedullären Übergang beurteilt. Das detaillierte Vorgehen ist im Methodenteil beschrieben. Unter **D** wurden die Marker zum Tubulären Schädigungsscore zusammengefasst, indem für jede Niere aus den 3 Markern der Mittelwert gebildet wurde. Jede Säule stellt den Mittelwert der Beurteilung von 5 Mauseieren \pm SEM dar. * $p < 0,05$.

3.2 Nach IRS kommt es zu einer Gpx4 Depletion in der Niere

Unter physiologischen Bedingungen exprimieren die Tubulusepithelien Gpx4 außerordentlich stark. Um zu überprüfen, ob es im Zuge des IRS zu einer Veränderung der

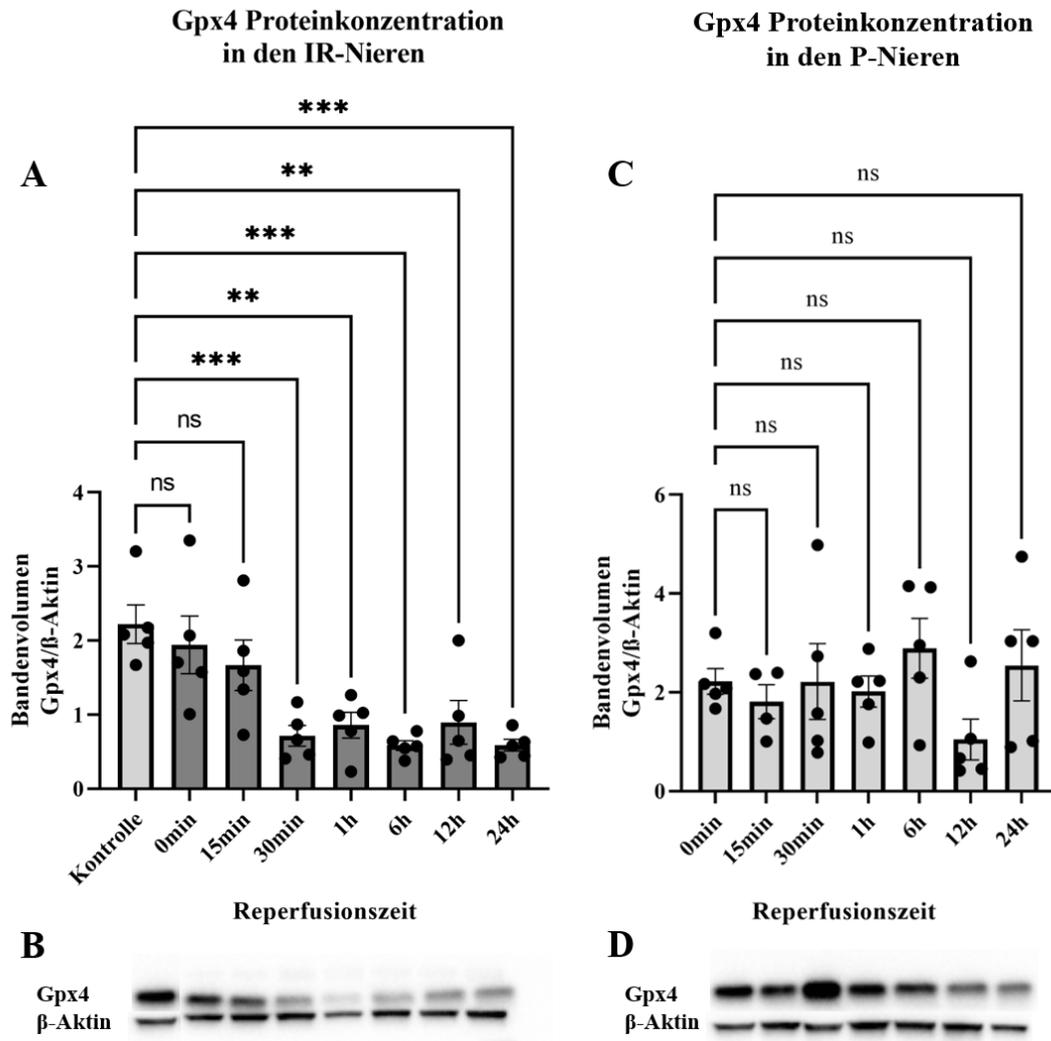


Abbildung 18: Renale Gpx4-Proteinkonzentration im Verlauf eines unilateralen IRS

Bei Mäusen in Gruppen zu je 5 Tieren wurde operativ ein unilaterales IRS Modell induziert. Nach unterschiedlichen Reperfuzeiten wurde die geschädigte Niere (IR-Niere), sowie die kontralaterale, nicht geschädigte Niere (P-Niere) entnommen und die Gpx4 Proteinkonzentration mittels Western Blot bestimmt. **A und C:** Quantitative Auswertung der Western Blots der IR-Nieren (**A**) und der P-Nieren (**C**). Hierzu wurde das Gpx4-Bandenvolumen normalisiert zum jeweiligen β-Aktin-Bandenvolumen. Jede Säule stellt den Mittelwert der Gpx4-Proteinkonzentration von 4 bis 5 Mäusen \pm SEM dar. Als Kontrolle in **A** wurden die P-Nieren der Gruppe ohne Nierenreperfuzeit (0min) verwendet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **B:** Exemplarischer Western Blot der IR-Nieren. Von links nach rechts: Kontrolle (ausgeschnitten und kopiert aus **D**), 0 min Reperfuzeit, 15min, 30min, 1h, 6h, 12h, 24h. Oben sind die Gpx4-Banden und darunter die korrespondierenden β-Aktin-Banden zu sehen. Jedes Bandenpaar entspricht einer Niere. **D:** Exemplarischer Western Blot der Kontrollnieren. Von links nach rechts: 0min, 15min, 30min, 1h, 6h, 12h, 24h. Abkürzungen: ns, nicht signifikant.

Gpx4-Proteinkonzentration in der Niere kommt, unterzogen wir Mäuse in Gruppen zu je 5 Tieren einem unilateralen IRS-Modell. Das Vorgehen gleicht dem des bIRS-Modells, es wird jedoch lediglich eine der beiden Nieren operativ präpariert und für 35 Minuten von der Blutversorgung abgeklemmt (IR-Niere). Die andere Niere wird währenddessen normal perfundiert (P-Niere). Nach unterschiedlichen Reperfusionzeiten entnahmen wir die Nieren. Anschließend isolierten wir aus den Proben die Proteine und wiesen die Gpx4 mittels SDS-PAGE Western Blot nach. Als Kontrolle verwendeten wir die P-Nieren der Gruppe ohne Reperfusion, die einer gesunden Niere entsprechen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Innerhalb der ersten halben Stunde der Reperfusion kommt es zu einem ausgeprägten Abfall der Gpx4-Proteinkonzentration in der IR-Niere auf ca. ein Drittel des ursprünglichen Wertes. Im weiteren Verlauf der ersten 24 Stunden bleibt die Proteinkonzentration auf diesem niedrig-nachweisbaren Niveau und wird nicht regeneriert. Bei den P-Nieren kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Gpx4-Proteinkonzentration.

3.3 Das S3 Segment ist von der Gpx4-Depletion besonders stark betroffen

Die verschiedenen Tubulussegmente weisen unter physiologischen Bedingungen unterschiedlich viel Gpx4-Protein auf. Um zu sehen, wo in der Niere die Gpx4 nach IRS verloren geht, fertigten wir histologische Schnitte der IR- und P-Nieren an und färbten diese immunhistochemisch auf Gpx4. In Abbildung 19 sieht man anhand eines repräsentativen Schnitts, dass unter physiologischen Bedingungen am meisten Gpx4 im OSOM vorliegt. Auch im Kortex ist die Proteinmenge der Gpx4 hoch. Im ISOM ist sie hingegen deutlich geringer, während in der inneren Medulla kaum Gpx4 vorliegt.

In Abbildung 20 sind zwei Übersichtsaufnahmen von Mausnieren dargestellt, eine von einer gesunden Niere und eine 24 Stunden nach IRS, die jeweils immunhistochemisch auf Gpx4 gefärbt wurden. Die Bilder wurden repräsentativ für je 5 Mausnieren ausgewählt. Schon in den Übersichtsaufnahmen kann man erkennen, dass es vor allem im OSOM der Niere zu einem Verlust der Gpx4 kommt. In der vergrößerten Aufnahme des OSOM der gesunden Niere sieht man, dass durch die hohe Proteinmenge der Gpx4 im OSOM und die geringere im ISOM eine deutlich sichtbare Grenze zwischen den beiden Regionen entsteht. 24 Stunden nach IRS ist diese Grenze aufgrund eines Verlusts der Gpx4 im OSOM nicht mehr deutlich abgrenzbar, der Übergang ist fließend.

Bei genauerer Betrachtung erkennt man im OSOM der gesunden Niere zwei Populationen von Tubulusepithelien, die sich anhand der Gpx4-Proteinmenge voneinander unterscheiden lassen. Die eine Population weist von allen Tubulussegmenten der Niere am meisten Gpx4 auf (exemplarisch gelb umrandet), während bei der anderen eher unterdurchschnittlich viel Gpx4 vorliegt (exemplarisch rot umrandet). 24 Stunden nach Reperfusion lassen sich diese beiden Tubuluspopulationen im OSOM anhand unserer Färbung nicht mehr eindeutig voneinander unterscheiden. Die Gpx4 geht also vor allem bei der Tubuluspopulation verloren, die normalerweise am meisten Gpx4 aufweist.

Im OSOM sind die Tubulussegmente der mTAL und des S3 Segments des proximalen Tubulus lokalisiert. Anhand von Proteomics-Daten zur physiologischen Verteilung von Gpx4-Protein in den unterschiedlichen Tubulussegmenten (dargestellt in Kapitel 3.7), handelt es sich bei der Tubuluspopulation, bei der am meisten Gpx4 vorliegt, um das S3 Segment des proximalen Tubulus. Bei der zweiten Tubuluspopulation mit der schwächeren Gpx4-Färbung handelt es sich daher vermutlich um die mTAL. Das S3 Segment ist somit besonders stark von der Gpx4-Depletion nach IRS betroffen. Auch die Tubuli in Kortex und ISOM sind 24 Stunden nach IRS schwächer gefärbt als bei der gesunden Niere, der Unterschied ist allerdings weniger stark ausgeprägt. In ISOM und Medulla beobachtet man hingegen keine Veränderung. Es fällt darüber hinaus auf, dass nach IRS die tubulären Lumina auch bei Vorliegen von obstruierenden Zylindern nicht auf Gpx4 anfärbbar sind.

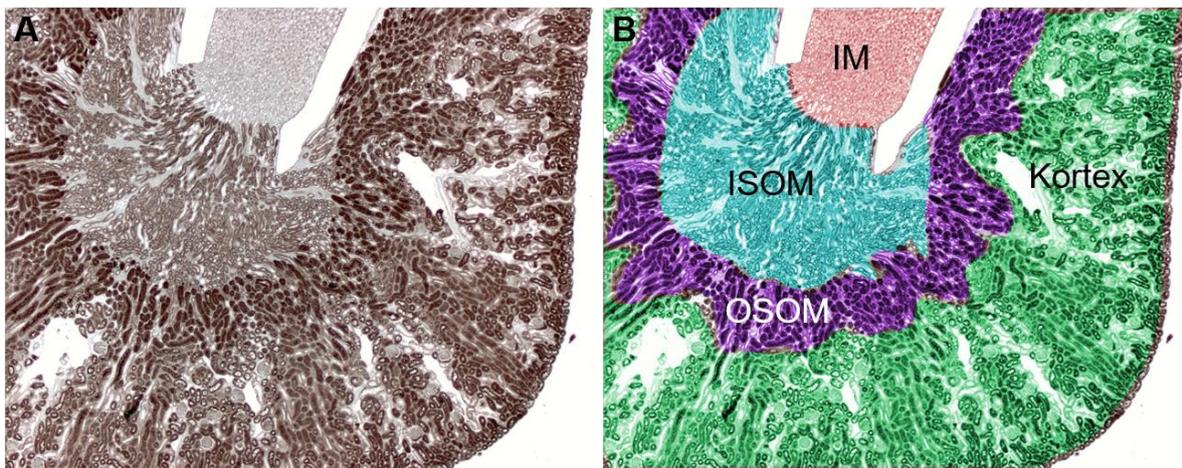


Abbildung 19: Physiologische Gpx4-Verteilung in der Mausnieren

A: Transversalschnitt durch eine gesunde Mausnieren (repräsentative P-Niere der Gruppe ohne Reperfusion) die immunhistochemisch auf Gpx4 gefärbt wurde. **B:** Selber Schnitt mit Einfärbung der Nierenkompartimente. Kortex, Äußerer Streifen der äußeren Medulla (OSOM), Innerer Streifen der äußeren Medulla (ISOM), Innere Medulla (IM).

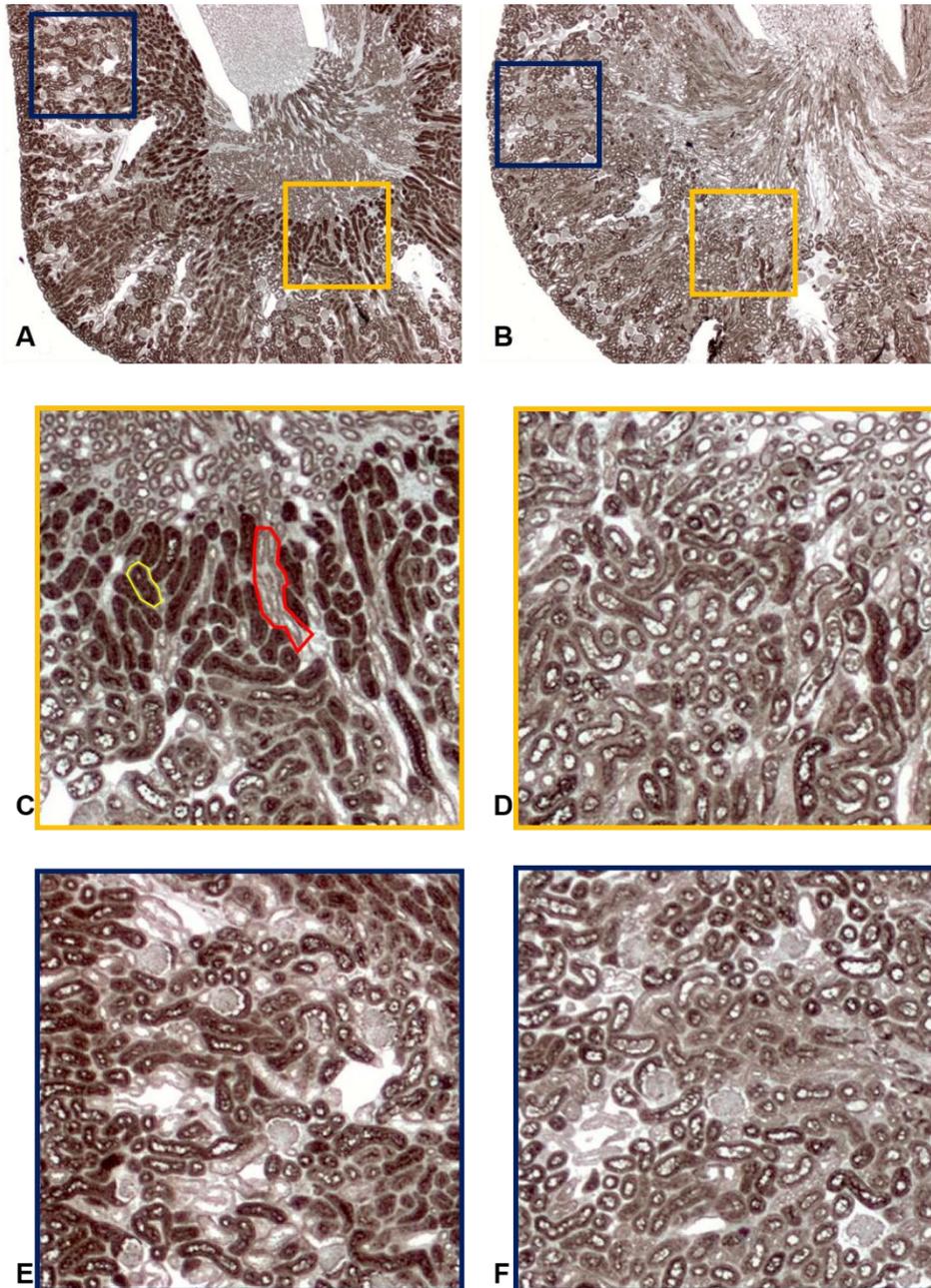


Abbildung 20: Vergleich der physiologischen Gpx4-Verteilung mit der 24 h nach IRS-Induktion

A: Immunhistochemisch auf Gpx4 gefärbter Transversalschnitt durch eine repräsentative, nicht geschädigte Niere (P-Niere, 0min Reperfusion). **B:** Entsprechender repräsentativer Schnitt durch eine Niere 24 Stunden nach IRS-Induktion. **C und E:** Vergrößerung der in A markierten Bereiche: OSOM (C) und Kortex (E) der gesunden Niere. **D und F:** Vergrößerung der in B markierten Bereiche: OSOM (D) und Kortex (F) 24 h nach IRS. In C markiert: Rot umrandet exemplarisch mehrere Tubuli im OSOM mit schwacher Gpx4-Färbung, gelb umrandet exemplarisch ein Tubulus mit starker Gpx4-Färbung.

3.4 Nach Reperfusion kommt es zu einer verminderten Gpx4-Genexpression

Um zu sehen, ob eine veränderte Gpx4-Genexpression zum Verlust der Gpx4 beiträgt, isolierten wir aus den gewonnenen Nierenproben die RNA, schrieben diese zu cDNA um und ermittelten die Genexpression mittels RT-qPCR. Als Kontrolle wurden wiederum die P-Nieren der nicht reperfundierte Gruppe verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Innerhalb der ersten 30 Minuten nach Reperfusion fällt die Gpx4-Genexpression ab. 30 Minuten nach Reperfusion ist sie auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes reduziert. Zwischen einer und sechs Stunden nach Reperfusion normalisiert sie sich wieder und ist nach 12 und 24 Stunden im Mittel sogar erhöht, wobei dieser Effekt keine statistische Signifikanz erreicht. Es kommt also nach Reperfusion, in etwa zum selben Zeitpunkt wie die Gpx4 auf

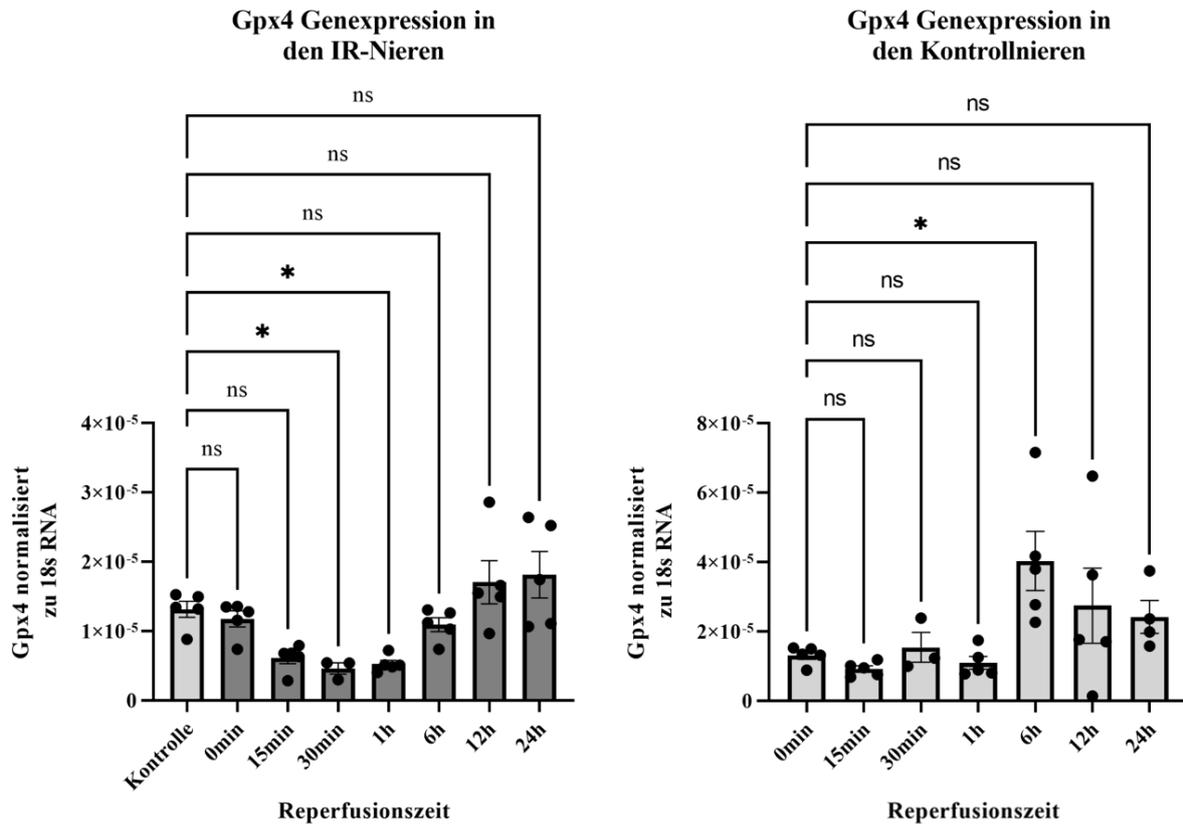


Abbildung 21: Renale Gpx4-Genexpression im Verlauf eines unilateralen IRS

Bei Mäusen in Gruppen zu je 5 Tieren wurde operativ ein unilaterales IRS-Modell induziert. Nach unterschiedlichen Reperfusionzeiten wurde die geschädigte Niere (IR-Niere), sowie die kontralaterale, nicht geschädigte Niere (P-Niere) entnommen und die Gpx4 Proteinkonzentration mittels Western Blot bestimmt. **A:** Auf 18s RNA normalisierte Gpx4-Genexpression in den IR-Nieren. Als Kontrolle wurden die P-Nieren der Gruppe ohne Reperfusion der gegenseitigen Niere (0min) ausgewertet. **B:** Auf 18s RNA normalisierte Gpx4-Genexpression in den P-Nieren. Jede Säule stellt den Mittelwert von 3 bis 5 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0,05$. Abkürzungen: ns, nicht signifikant.

Proteinebenen verloren geht, zu einem passageren Abfall der Gpx4-Genexpression. Interessanterweise beobachtet man bei den P-Nieren sechs Stunden nach Reperfusion einen vorübergehenden Anstieg der Gpx4-Genexpression.

3.5 Intramitochondriales Superoxid verursacht *in vitro* keine Gpx4-Degradation

Um zu überprüfen, ob es durch IRS-typische Superoxidproduktion zu einer Gpx4-Degradation kommt, versuchten wir, ein entsprechendes *in vitro* Modell zu etablieren. Hierzu inkubierten wir HK-2 Zellen für zwei Stunden mit unterschiedlichen Dosen Antimycin A, Dimethylsuccinat oder einer Kombination aus beiden Substanzen. Anschließend bestimmten wir die Zytotoxizität mittels LDH-Release Assay. Um zu überprüfen, ob Antimycin A und Dimethylsuccinat in der Konzentration Antimycin A [50 μ M] und Dimethylsuccinat [50mM] synergistisch wirken, wurde die Zytotoxizität der Einzelbehandlungen (Mittelwerte und Varianzen) addiert und mit der Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung verglichen. Die Kombinationsbehandlung verursachte im Mittel 46% Zytotoxizität, die addierte Toxizität der Einzelbehandlungen betrug hingegen 16 %. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war

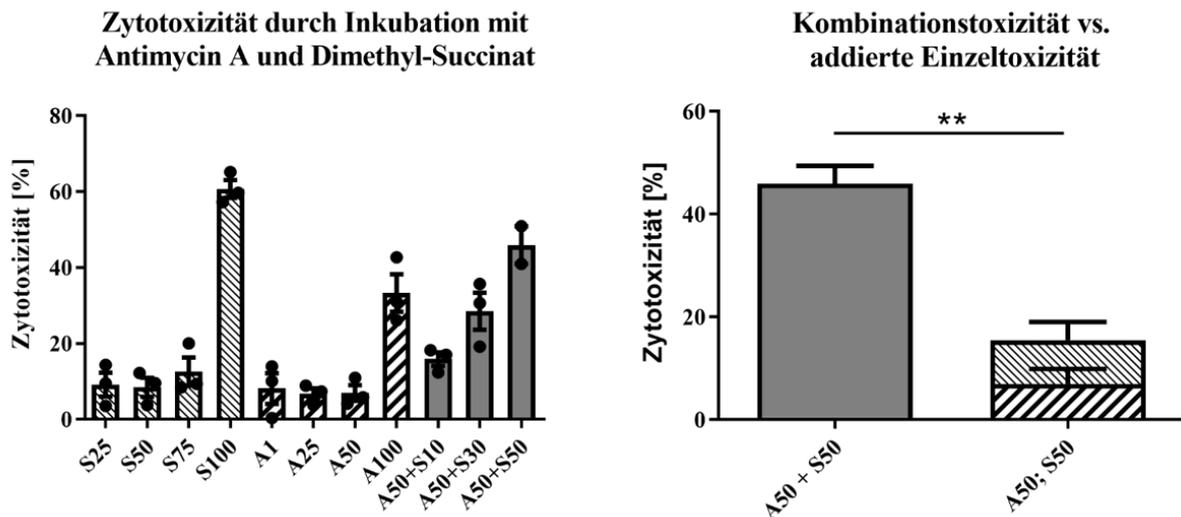


Abbildung 22: Antimycin A und Dimethylsuccinat verursachen synergistisch Zelltod

HK-2 Zellen wurden mit Medium inkubiert, das mit Antimycin A (A [μ M]), Dimethylsuccinat (S [mM]), oder einer Kombination aus den beiden Substanzen (A [μ M] + S [mM]) versetzt war. Nach zwei Stunden wurde die Zytotoxizität mittels LDH-Release Assay bestimmt. Rechts abgebildet ist die Toxizität der kombinierten Behandlung (A50 + S50), aufgetragen gegen die addierte Einzeltoxizität der beiden Substanzen (A50; S50). Jede Säule stellt den Mittelwert von 3 biologischen Replikaten \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

hochsignifikant. In der entsprechenden Konzentration verursachen Antimycin A und Dimethylsuccinat also synergistisch Zelltod.

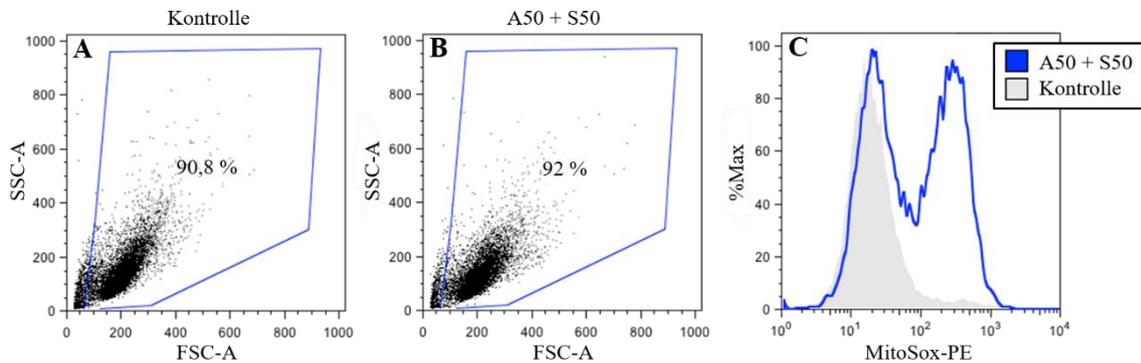


Abbildung 23: MitoSox-Oxidation nach Behandlung mit Antimycin A und Dimethylsuccinat

HK-2 Zellen wurden für 2 Stunden mit 50 μ M Antimycin A und 50 mM Dimethylsuccinat inkubiert. Dem Medium der Kontrollgruppe wurde nur DMSO ohne Wirkstoff zugegeben. Nach 90-minütiger Inkubation wurde jeweils 3 μ M MitoSox Red zugefügt. Nach weiteren 30 Minuten wurden die Zellen für die FACS Analyse vorbereitet und mittels Durchflusszytometrie untersucht. **A, B:** Dotplot, in dem jeder Punkt einer untersuchten Zelle entspricht. FSC-A und SSC-A stehen für *Forward-* und *Sidewards*scatter. Mit dem blauen Auswahlfenster wurden die vitalen Zellen selektiert, von denen in Abbildung C die Fluoreszenz dargestellt wurde. **C:** Histogramm. Die logarithmierte Fluoreszenzintensität wurde gegen die Häufigkeit dieser Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Häufigkeit wurde dabei als prozentualer Anteil der maximal für eine Fluoreszenzintensität erreichten, absoluten Zellzahl dargestellt. Die Kurve mit blauem Rahmen stellt die mit Antimycin A und Dimethylsuccinat behandelte Gruppe dar, die mit grauer Füllung die Kontrollgruppe.

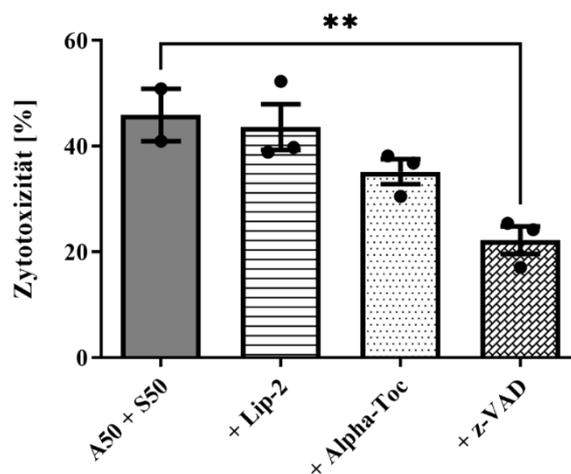


Abbildung 24: Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Zytotoxizität im Modell

HK-2 Zellen wurden für zwei Stunden mit einer Kombination aus Antimycin A [50 μ M] und Dimethylsuccinat [50 mM] inkubiert. Zusätzlich wurden wahlweise die Inhibitoren Lip-2 [1 μ M], α -Tocopherol [50 μ M] oder zVAD-FMK [40 μ M] zugegeben. Nach zwei Stunden wurde die Zytotoxizität mittels LDH-Release Assay bestimmt. Jede Säule stellt den Mittelwert von 3 biologischen Replikaten \pm SEM dar. ** $p < 0,01$.

Um zu überprüfen, ob die Inkubation mit Antimycin A und Dimethylsuccinat bei HK-2 Zellen tatsächlich die vermehrte Entstehung von intramitochondrialem Superoxid auslöst, verwendeten wir den Superoxidsensor MitoSox Red. Wie zuvor inkubierten wir HK-2 Zellen für 2 Stunden mit Antimycin A und Dimethylsuccinat. Eine halbe Stunde vor Ende der Inkubation wurde zusätzlich MitoSox Red zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie in Abbildung 23 zu sehen, beobachtet man bei der Kontrollgruppe (C, graue Fläche) eine gleichmäßig fluoreszierende Zellpopulation, während man in der mit Antimycin A und Dimethylsuccinat behandelten Gruppe (C, blaue Kurve) zusätzlich eine zweite, deutlich stärker fluoreszierende Zellpopulation beobachtet. Die Inkubation mit Antimycin A und Dimethylsuccinat löst also vermehrte MitoSox Red Oxidation aus, entsprechend einem vermehrten Vorkommen von intramitochondrialem Superoxid.

Um zu überprüfen, ob es in dem Modell zu Ferroptose kommt, inkubierten wir die Zellen neben Antimycin A und Dimethylsuccinat mit dem Ferroptoseinhibitor Lip-2, dem lipophilen Radikalfänger α -Tocopherol oder dem Apoptoseinhibitor zVAD-FMK. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. Einzig die Behandlung mit zVAD-FMK hatte in dem Modell einen protektiven Effekt.

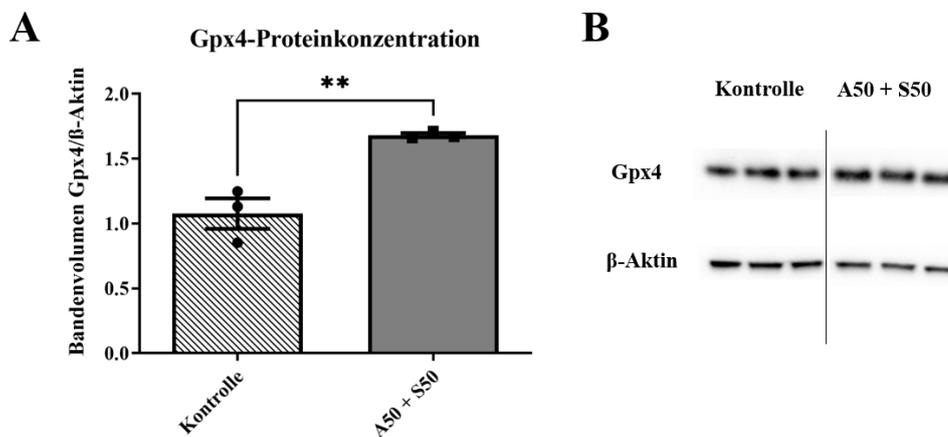


Abbildung 25: Gpx4-Proteinkonzentration nach Inkubation mit Antimycin A und Dimethylsuccinat

HK-2 Zellen wurden zu je 1 Millionen Zellen pro *Well* in serumfreiem Medium auf eine 6-*well*-Platte gesät und für 10 Stunden ruhen gelassen. Zur Modellinduktion wurden die Zellen mit Medium inkubiert, welches mit einer Kombination aus Antimycin A [50 μ M] und Dimethylsuccinat [50 mM] versetzt war. Nach 2 Stunden wurden die Proteine der Zellen isoliert und Gpx4 mittels Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle wurden HK-2 Zellen im selben Setting für zwei Stunden mit DMSO inkubiert und anschließend die Proteine isoliert. **A**: Quantitative Auswertung des unter **B** dargestellten Western Blots: Gpx4-Bandenvolumen normalisiert zum β -Aktin-Bandenvolumen. Jede Säule stellt den Mittelwert von 3 biologischen Replikaten \pm SEM dar. * $p < 0,05$.

Um zu untersuchen, ob es zu einer Degradation der Gpx4 kommt, inkubierten wir HK-2 Zellen für zwei Stunden mit Antimycin A und Dimethylsuccinat, isolierten die Proteine aus den Zellen und wiesen die Gpx4 mittels Western Blot nach. Wie in Abbildung 25 zu sehen, kommt es in dem Modell nicht zu einem Abfall, sondern zu einem Anstieg der Gpx4-Proteinkonzentration.

3.6 In einem Hypoxie-Reoxygenierungs-Modell kommt es *in vitro* zu Ferroptose

Um den Mechanismus des Gpx4-Verlusts während IRS genauer zu untersuchen, versuchten wir, ein geeignetes *in vitro* Modell zu etablieren. Als Zellmodell wählten wir erneut HK-2 Zellen. Um die Ischämie zu simulieren, inkubierten wir die Zellen für unterschiedliche Zeitspannen in einer Hypoxiekammer. Das Kulturmedium enthielt dabei keine Zusätze von Glucose oder FBS, um die Nährstoffdepletion nachzuahmen. Anschließend wurde das Medium gegen frisches, Glucose- und FBS-haltiges, ausgetauscht und die Zellen durch zweistündige normoxische Inkubation reoxygeniert. Um zu untersuchen, ob es während der Reoxygenierung

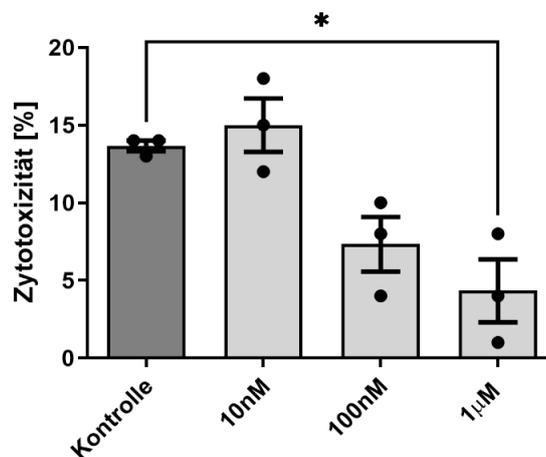


Abbildung 26: Effekt von Lip-2 auf den durch Hypoxie und Reoxygenierung verursachten Zelltod

HK-2 Zellen wurden für 72 Stunden in Glucose- und FBS-freiem Medium in der Hypoxiekammer inkubiert. Anschließend wurde die Kammer geöffnet und das Medium gegen frisches, mit Glucose und FBS versetztes Medium ausgetauscht. Zusätzlich wurden dem Reoxygenierungsmedium unterschiedliche Dosen Lip-2 gelöst in DMSO zugefügt. Als Kontrolle wurde DMSO ohne gelösten Wirkstoff zugefügt. Nach zweistündiger Inkubation unter Normoxie wurde die Zytotoxizität mittels LDH-Release Assay bestimmt. Als Minimalkontrolle wurde Überstand von Zellen verwendet, die für zwei Stunden in FBS- und glucosehaltigem Medium bei Normoxie inkubiert wurden. Als Maximalkontrolle wurde Überstand von Zellen verwendet, die für 72 Stunden in Glucose- und FBS-freiem Medium unter Hypoxie inkubiert und anschließend mit Triton X lysiert wurden. Jede Säule stellt den Mittelwert von 3 biologischen Replikaten \pm SEM dar. Zum Vergleich der Gruppen wurde eine ANOVA mit Bonferronikorrektur gegen die Kontrolle gerechnet. * $p < 0,05$.

zu ferroptotischem Zelltod kommt, fügten wir dem Reoxygenierungsmedium unterschiedliche Dosen Liproxstatin hinzu. Der während der Reoxygenierung auftretende Zelltod wurde mittels LDH-Release Assay bestimmt.

Nach mehreren Vorversuchen mit kürzeren Hypoxiezeiträumen, bei denen sich jeweils nur eine geringe Zytotoxizität zeigte, wählten wir eine hypoxische Inkubation von 72 Stunden. Wie in Abbildung 26 dargestellt, kommt es während der anschließenden Reoxygenierung zu Zelltod (im Mittel 14% Zytotoxizität), der sich durch Behandlung mit Lip-2 in dosisabhängiger Art und Weise reduzieren lässt.

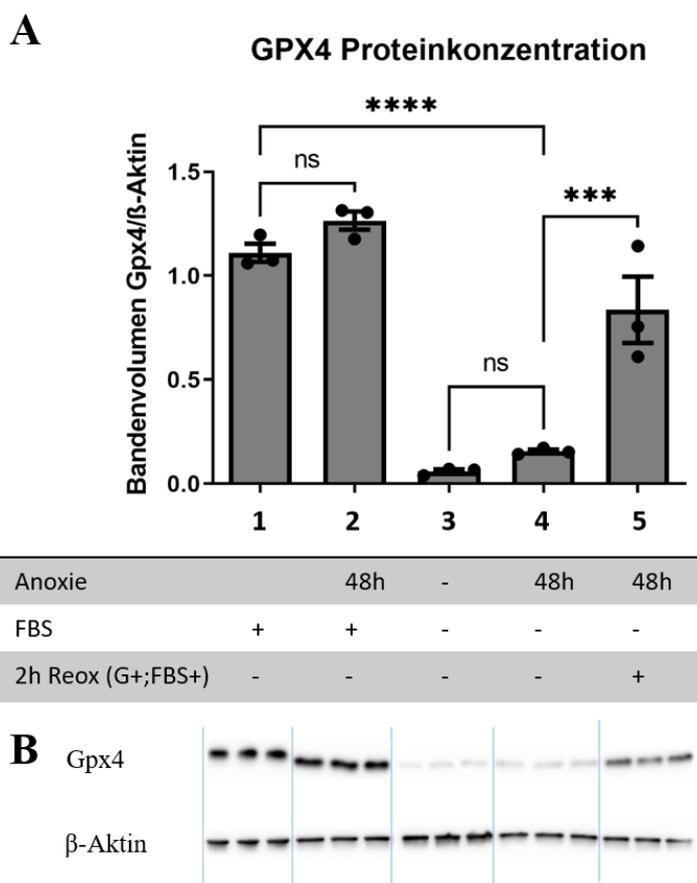


Abbildung 27: GPX4-Proteinkonzentration in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen

HK-2 Zellen wurden für 48h in unterschiedlich supplementiertem RPMI-Medium (+/- Glucose, +/- FBS) in der Hypoxiekammer oder unter Normoxie inkubiert. Eine Gruppe wurde wie im Vorexperiment für 48h in FBS- und Glucose-freiem Medium in der Hypoxiekammer inkubiert und anschließend für zwei Stunden in FBS- und Glucose-haltigem Medium reoxygeniert. Anschließend wurden von allen Gruppen die Proteine isoliert und die GPX4 mittels Western Blot nachgewiesen. **A:** Quantitative Auswertung des unter **B** abgebildeten Western Blots: GPX4-Bandenvolumen normalisiert zum β -Aktin-Bandenvolumen der jeweiligen Gruppe. Jede Säule stellt den Mittelwert von 3 biologischen Replikaten \pm SEM dar. Zur statistischen Analyse wurde eine einfaktorielle ANOVA gerechnet und die entsprechend markierten Säulen mittels Bonferronitesting miteinander verglichen. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Abkürzungen: ns, nicht signifikant.

Um zu überprüfen, ob es in dem Modell zu einer Degradation der GPX4 kommt, isolierten wir nach 48-stündiger Hypoxie, beziehungsweise nach anschließender zweistündiger Reoxygenierung, jeweils die Proteine der Zellen und bestimmten die GPX4-Proteinkonzentration mittels Western Blot. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Wir konnten zeigen, dass die GPX4-Proteinkonzentration nach der hypoxischen Inkubation stark reduziert ist. Nach der Reoxygenierung lässt sich hingegen wieder mehr GPX4 nachweisen, was im Gegensatz zu unseren Beobachtungen im Tiermodell steht.

Wir stellten uns die Frage, ob die lange serumfreie Inkubation einen Einfluss auf das GPX4-Proteinkonzentration im Modell hat. Um dies zu untersuchen, inkubierten wir HK-2-Zellen für 48 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen, wahlweise mit oder ohne FBS, und bestimmten anschließend die GPX4-Proteinkonzentration.

Dabei zeigte sich, dass 48-stündige serumfreie Inkubation, unabhängig von hypoxischer oder normoxischer Inkubation, einen Verlust der GPX4 zur Folge hat, während man einen solchen Verlust bei Inkubation mit Serum nicht beobachtet. Der Verlust der GPX4 ist also eine Folge der serumfreien Inkubation und nicht der Hypoxie. Zusammenfassend kommt es in dem Modell durch die lange serumfreie Inkubation zu einer zellulären GPX4-Depletion. In diesem Kontext tritt während der Reoxygenierung, charakterisiert durch den protektiven Effekt von Lip-2, ferroptotischer Zelltod auf.

3.7 Vergleich der Häufigkeit ferroptoserelevanter Proteine entlang des Tubulussystems

Um zu untersuchen, warum die proximalen Tubulusepithelien so anfällig für Ferroptose sind, verglichen wir, wie häufig verschiedene ferroptoserelevante Proteine in den 14 Tubulussegmenten der Niere vorliegen. Hierzu bedienten wir uns der Tubulussegment-spezifischen Proteomics-Datenbank des *Kidney Tubules Expression Atlas* (KTEA). Um diesen zu etablieren, hatten Limbutara et al. an der Rattenniere 14 verschiedene Tubulussegmente manuell präpariert und jeweils mittels Massenspektrometrie untersucht. Die Anzahl der Proteinkopien pro Zelle wurde mittels der Proteomic Ruler Technik geschätzt. Gemittelt aus 3-4 biologischen Replikaten ist in der Datenbank für jedes detektierte Protein die Anzahl der entsprechenden Kopien pro Zelle (KpZ) je Tubulussegment angegeben (131). In Abbildung 28 wurde von ausgewählten, für diese Arbeit relevanten Proteinen die mittlere Anzahl der KpZ

je Tubulussegment mittels einer *Heatmap* visualisiert. Die Anzahl der KpZ wurde hierzu für jede Zeile standardisiert (z-transformiert). Zusätzlich wurde jeweils die absolute Anzahl der KpZ bei dem Tubulussegment angegeben, in dem das entsprechende Protein am häufigsten detektiert wurde. Die Ergebnisse des statistischen Vergleichs, wie häufig die verschiedenen Proteine in den 14 Tubulussegmenten vorliegen, sind in Tabelle 1 dargestellt.

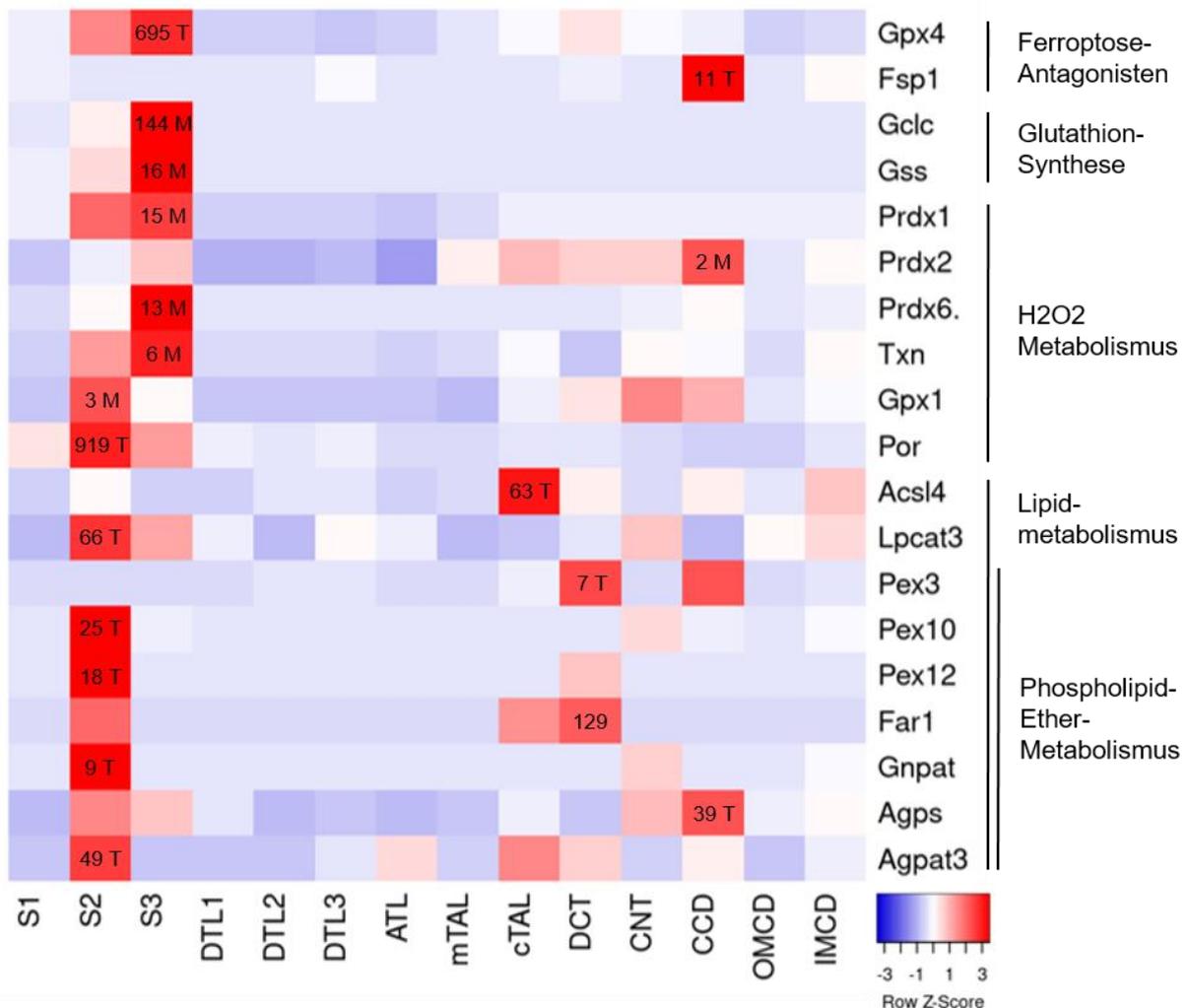


Abbildung 28: Vergleich der Häufigkeit ausgewählter Proteine in den Tubulussegmenten der Niere

Auf der X-Achse sind die 14 Tubulussegmente der Niere aufgetragen, auf der Y-Achse die analysierten Proteine. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Proteinkopien pro Zelle (KpZ), die für jede Zeile standardisiert (z-transformiert) und farblich visualisiert wurde. Die Farbe Rot entspricht einer hohen Anzahl an KpZ, die Farbe Blau einer geringen. Bei dem Tubulussegment in dem das entsprechende Protein am häufigsten vorlag, wurde in schwarz zudem die absolute Anzahl der KpZ angegeben. Die Akürzung M steht dabei für Million Kopien, die Abkürzung T für Tausend Kopien. Hinsichtlich der Abkürzung der Tubulussegmente verweisen wir auf Abbildung 1 der Einleitung. Die Abkürzungen der Proteine sind dem Verzeichnis erwähnter Gene und Proteine zu entnehmen. Diese Abbildung wurde mit der Onlineapplikation Heatmapper.ca erstellt.

Ergebnisse

Tabelle 1: Statistischer Vergleich der Häufigkeit ausgewählter Proteine in den 14 Tubulussegmenten

Gpx4	p-Wert	Sig.	Gclc	p-Wert	Sig.	Gss	p-Wert	Sig.	Gpx1	p-Wert	Sig.
S3 vs. S1	<0.0019	**	S3 vs. S1	<0.0019	**	S3 vs. S1	<0.0019	**	S3 vs. S1	5.5632	ns
S3 vs. S2	13.2981	ns	S3 vs. S2	<0.0019	**	S3 vs. S2	<0.0019	**	S3 vs. S2	0.0171	*
S3 vs. DTL1	<0.0019	**	S3 vs. DTL1	<0.0019	**	S3 vs. DTL1	<0.0019	**	S3 vs. DTL1	4.75	ns
S3 vs. DTL2	<0.0019	**	S3 vs. DTL2	<0.0019	**	S3 vs. DTL2	<0.0019	**	S3 vs. DTL2	5.0426	ns
S3 vs. DTL3	<0.0019	**	S3 vs. DTL3	<0.0019	**	S3 vs. DTL3	<0.0019	**	S3 vs. DTL3	7.5981	ns
S3 vs. ATL	<0.0019	**	S3 vs. ATL	<0.0019	**	S3 vs. ATL	<0.0019	**	S3 vs. ATL	4.9875	ns
S3 vs. mTAL	<0.0019	**	S3 vs. mTAL	<0.0019	**	S3 vs. mTAL	<0.0019	**	S3 vs. mTAL	4.2826	ns
S3 vs. cTAL	<0.0019	**	S3 vs. cTAL	<0.0019	**	S3 vs. cTAL	<0.0019	**	S3 vs. cTAL	18.9886	ns
S3 vs. DCT	0.0152	*	S3 vs. DCT	<0.0019	**	S3 vs. DCT	<0.0019	**	S3 vs. DCT	16.9537	ns
S3 vs. CNT	<0.0019	**	S3 vs. CNT	<0.0019	**	S3 vs. CNT	<0.0019	**	S3 vs. CNT	1.0488	ns
S3 vs. CCD	<0.0019	**	S3 vs. CCD	<0.0019	**	S3 vs. CCD	<0.0019	**	S3 vs. CCD	15.5591	ns
S3 vs. OMCD	<0.0019	**	S3 vs. OMCD	<0.0019	**	S3 vs. OMCD	<0.0019	**	S3 vs. OMCD	18.981	ns
S3 vs. IMCD	<0.0019	**	S3 vs. IMCD	<0.0019	**	S3 vs. IMCD	<0.0019	**	S3 vs. IMCD	18.9924	ns
Prdx1			Prdx2			Prdx6			Txn		
S3 vs. S1	<0.0019	**	S3 vs. S1	1.786	ns	S3 vs. S1	<0.0019	**	S3 vs. S1	<0.0019	**
S3 vs. S2	18.2096	ns	S3 vs. S2	8.7438	ns	S3 vs. S2	<0.0019	**	S3 vs. S2	0.0646	ns
S3 vs. DTL1	<0.0019	**	S3 vs. DTL1	0.5187	ns	S3 vs. DTL1	<0.0019	**	S3 vs. DTL1	<0.0019	**
S3 vs. DTL2	<0.0019	**	S3 vs. DTL2	0.6137	ns	S3 vs. DTL2	<0.0019	**	S3 vs. DTL2	<0.0019	**
S3 vs. DTL3	<0.0019	**	S3 vs. DTL3	1.1476	ns	S3 vs. DTL3	<0.0019	**	S3 vs. DTL3	<0.0019	**
S3 vs. ATL	<0.0019	**	S3 vs. ATL	0.2109	ns	S3 vs. ATL	<0.0019	**	S3 vs. ATL	<0.0019	**
S3 vs. mTAL	<0.0019	**	S3 vs. mTAL	18.9924	ns	S3 vs. mTAL	<0.0019	**	S3 vs. mTAL	<0.0019	**
S3 vs. cTAL	<0.0019	**	S3 vs. cTAL	18.9943	ns	S3 vs. cTAL	<0.0019	**	S3 vs. cTAL	<0.0019	**
S3 vs. DCT	<0.0019	**	S3 vs. DCT	18.9962	ns	S3 vs. DCT	<0.0019	**	S3 vs. DCT	<0.0019	**
S3 vs. CNT	<0.0019	**	S3 vs. CNT	18.9867	ns	S3 vs. CNT	<0.0019	**	S3 vs. CNT	<0.0019	**
S3 vs. CCD	<0.0019	**	S3 vs. CCD	1.3186	ns	S3 vs. CCD	<0.0019	**	S3 vs. CCD	<0.0019	**
S3 vs. OMCD	<0.0019	**	S3 vs. OMCD	6.783	ns	S3 vs. OMCD	<0.0019	**	S3 vs. OMCD	<0.0019	**
S3 vs. IMCD	<0.0019	**	S3 vs. IMCD	15.3387	ns	S3 vs. IMCD	<0.0019	**	S3 vs. IMCD	<0.0019	**
Por			Acsf4			Lpcat3			Agpat3		
S3 vs. S1	0.0817	ns	S2 vs. S1	18.7967	ns	S2 vs. S1	0.0247	*	S2 vs. S1	<0.0019	**
S3 vs. S2	<0.0019	**	S2 vs. S3	18.7967	ns	S2 vs. S3	8.303	ns	S2 vs. S3	<0.0019	**
S3 vs. DTL1	<0.0019	**	S2 vs. DTL1	18.5364	ns	S2 vs. DTL1	0.2071	ns	S2 vs. DTL1	<0.0019	**
S3 vs. DTL2	<0.0019	**	S2 vs. DTL2	18.9848	ns	S2 vs. DTL2	0.0646	ns	S2 vs. DTL2	<0.0019	**
S3 vs. DTL3	<0.0019	**	S2 vs. DTL3	18.9221	ns	S2 vs. DTL3	0.4389	ns	S2 vs. DTL3	<0.0019	**
S3 vs. ATL	<0.0019	**	S2 vs. ATL	18.5364	ns	S2 vs. ATL	0.1729	ns	S2 vs. ATL	0.1805	ns
S3 vs. mTAL	<0.0019	**	S2 vs. mTAL	18.9905	ns	S2 vs. mTAL	0.6726	ns	S2 vs. mTAL	0.0038	**
S3 vs. cTAL	0.0076	**	S2 vs. cTAL	0.0076	**	S2 vs. cTAL	13.3513	ns	S2 vs. cTAL	6.8419	ns
S3 vs. DCT	<0.0019	**	S2 vs. DCT	18.9829	ns	S2 vs. DCT	0.532	ns	S2 vs. DCT	0.1273	ns
S3 vs. CNT	<0.0019	**	S2 vs. CNT	18.9848	ns	S2 vs. CNT	3.5986	ns	S2 vs. CNT	<0.0019	**
S3 vs. CCD	<0.0019	**	S2 vs. CCD	18.9886	ns	S2 vs. CCD	0.0247	*	S2 vs. CCD	0.0551	ns
S3 vs. OMCD	<0.0019	**	S2 vs. OMCD	18.9829	ns	S2 vs. OMCD	0.5757	ns	S2 vs. OMCD	<0.0019	**
S3 vs. IMCD	<0.0019	**	S2 vs. IMCD	18.9924	ns	S2 vs. IMCD	1.3243	ns	S2 vs. IMCD	0.0057	**
Pex10			Pex3			Pex12			Far1		
S2 vs. S1	0.0931	ns	S2 vs. S1	19	ns	S2 vs. S1	0.0019	**	S2 vs. S1	1.1096	ns
S2 vs. S3	18.9886	ns	S2 vs. S3	19	ns	S2 vs. S3	0.0019	**	S2 vs. S3	1.1096	ns
S2 vs. DTL1	0.0931	ns	S2 vs. DTL1	19	ns	S2 vs. DTL1	0.0019	**	S2 vs. DTL1	1.1096	ns
S2 vs. DTL2	0.0931	ns	S2 vs. DTL2	13.2943	ns	S2 vs. DTL2	0.0019	**	S2 vs. DTL2	1.1096	ns
S2 vs. DTL3	0.0931	ns	S2 vs. DTL3	18.9202	ns	S2 vs. DTL3	0.0019	**	S2 vs. DTL3	1.1096	ns
S2 vs. ATL	0.0931	ns	S2 vs. ATL	19	ns	S2 vs. ATL	0.0019	**	S2 vs. ATL	1.1096	ns
S2 vs. mTAL	0.0931	ns	S2 vs. mTAL	19	ns	S2 vs. mTAL	0.0019	**	S2 vs. mTAL	1.1096	ns
S2 vs. cTAL	0.2622	ns	S2 vs. cTAL	0.8056	ns	S2 vs. cTAL	0.0019	**	S2 vs. cTAL	16.2393	ns
S2 vs. DCT	0.2014	ns	S2 vs. DCT	0.3382	ns	S2 vs. DCT	0.0475	*	S2 vs. DCT	18.9924	ns
S2 vs. CNT	0.5738	ns	S2 vs. CNT	19	ns	S2 vs. CNT	0.0019	**	S2 vs. CNT	1.1096	ns
S2 vs. CCD	0.2109	ns	S2 vs. CCD	5.4169	ns	S2 vs. CCD	0.0019	**	S2 vs. CCD	1.1096	ns
S2 vs. OMCD	0.0931	ns	S2 vs. OMCD	19	ns	S2 vs. OMCD	0.0019	**	S2 vs. OMCD	1.1096	ns
S2 vs. IMCD	0.1862	ns	S2 vs. IMCD	18.848	ns	S2 vs. IMCD	0.0019	**	S2 vs. IMCD	1.1096	ns
Gnpat			Agps								
S2 vs. S1	<0.0019	**	S2 vs. S1	0.0114	*						
S2 vs. S3	<0.0019	**	S2 vs. S3	14.5597	ns						
S2 vs. DTL1	<0.0019	**	S2 vs. DTL1	0.1159	ns						
S2 vs. DTL2	<0.0019	**	S2 vs. DTL2	0.0114	*						
S2 vs. DTL3	<0.0019	**	S2 vs. DTL3	0.0228	*						
S2 vs. ATL	<0.0019	**	S2 vs. ATL	0.0114	*						
S2 vs. mTAL	<0.0019	**	S2 vs. mTAL	0.0418	*						
S2 vs. cTAL	<0.0019	**	S2 vs. cTAL	2.2496	ns						
S2 vs. DCT	<0.0019	**	S2 vs. DCT	2.1356	ns						
S2 vs. CNT	<0.0019	**	S2 vs. CNT	17.8809	ns						
S2 vs. CCD	<0.0019	**	S2 vs. CCD	17.9949	ns						
S2 vs. OMCD	<0.0019	**	S2 vs. OMCD	0.2527	ns						
S2 vs. IMCD	<0.0019	**	S2 vs. IMCD	1.2445	ns						

Tabellenlegende: Um zu vergleichen, wie häufig verschiedene ferroptoserelevante Proteine in den 14 Tubulussegmenten der Niere vorliegen, wurde für jedes Protein eine einfaktorische ANOVA durchgeführt. Als Post-hoc Test wurde Dunnett's Test gegen das S3 Segment als Kontrolle verwendet. Für die am Lipidmetabolismus beteiligten Proteine wurde als Kontrolle gegen das S2 Segment getestet. Anschließend wurden die so generierten p-Werte mittels Bonferroni-Korrektur für das Testen von 19 Proteinen korrigiert (Durch Multiplikation der p-Werte mit 19). Für p-Werte $<0,0001$ wurde mit dem p-Wert $0,0001$ gerechnet und das korrigierte Resultat mit einem Kleinerzeichen ($<$) versehen. Angegeben sind die korrigierten p-Werte, sowie das erreichte Signifikanzniveau. * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Die Abkürzungen der Proteine sind dem Verzeichnis erwähnter Gene und Proteine zu entnehmen.

3.7.1 Starke Gpx4/GSH-Achse im S3 Segment

Die Gpx4 stellt den wichtigsten Gegenregulator der Ferroptose dar. Unsere Analyse der Datenbank des KTEA zeigt, dass die Gpx4 am häufigsten im S3 Segment vorliegt (Unterschied S3 vs. S2 nicht signifikant, S3 vs. DCT signifikant, S3 vs. restliche Tubulussegmente hochsignifikant). Glutathion, der essentielle Kofaktor der Gpx4, wurde als Tripeptid im Rahmen der massenspektrometrischen Untersuchung nicht erfasst. Die Glutathion-synthetisierenden Enzyme Glutamat-Cystein-Ligase und Glutathionsynthase liegen jedoch ebenfalls mit weitem Abstand am häufigsten im S3 Segment vor (jeweils hochsignifikanter Unterschied vom S3 Segment im Vergleich zu allen anderen Tubulussegmenten). Fsp1 und Gch1, die Zellen unabhängig von der Gpx4 vor Ferroptose schützen können, wurden in der Niere hingegen nicht in relevantem Umfang nachgewiesen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das S3 Segment im Vergleich zur restlichen Niere eine aussergewöhnlich hohe antiferroptotische Kapazität aufweist.

3.7.2 Schlüsselenzyme des cytosolischen Wasserstoffperoxidstoffwechsels liegen am häufigsten im S3 Segment vor

Cytosolisches Wasserstoffperoxid stellt in verschiedenen zellulären Kontexten eine Voraussetzung für den Ablauf von ferroptotischem Zelltod dar, indem es über die Entstehung von Hydroxylradikalen Lipidperoxidation initiiert (90). Um Rückschlüsse auf den cytosolischen Wasserstoffperoxidumsatz zu ziehen, analysierten wir das Vorliegen der entsprechenden Wasserstoffperoxid-verstoffwechelnden Enzyme entlang des Tubulussystems. Cytosolische Enzyme, die Wasserstoffperoxid verstoffwechseln, sind Prdx1, 2 und 6, sowie die Gpx1.

Prdx1 und Prdx6 liegen am häufigsten im S3 vor (hochsignifikanter Unterschied S3 vs. alle anderen Segmente bis auf S2), während das insgesamt in geringerem Umfang exprimierte

Prdx2 am häufigsten im CCD detektiert wurde. Gemeinsam betrachtet wurden am meisten Kopien der cytosolischen Prdx im S3 Segment (zusammen 30 Mio. KpZ) und am zweitmeisten im S2 Segment (zusammen 15 Millionen KpZ) nachgewiesen. Auch der für die Funktion der Peroxiredoxine essenzielle Kofaktor Thioredoxin wurde im S3 Segment am häufigsten nachgewiesen (Signifikanter Unterschied S3 vs S2, hochsignifikanter Unterschied S3 vs. alle anderen Segmente). Die Anzahl der nachgewiesenen Kopien der Gpx1 war mit 2,7 Millionen im S2 und 860 000 im S3 Segment deutlich geringer. Verschiedene Schlüsselenzyme des cytosolischen Wasserstoffperoxidstoffwechsels liegen somit am häufigsten im S3 Segment vor.

3.7.3 Vorkommen Wasserstoffperoxid-produzierender Enzyme mit proferroptotischem Effekt im Tubulussystem

Por und Cyb5r1 sensibilisieren Zellen über die Produktion von Wasserstoffperoxid für Ferroptose. Por lag am häufigsten im S2 Segment (920 000 KpZ) und am zweithäufigsten im S3 Segment vor (510 000 KpZ, jeweils hochsignifikanter Unterschied S2 und S3 im Vergleich zu den restlichen Tubulussegmenten). In den anderen Tubulussegmenten wurde Por nur in geringem Umfang nachgewiesen. Cyb5r1 wurde im Tubulussystem nicht detektiert. Auch die für Ferroptose relevanten, Wasserstoffperoxid- und Superoxid-produzierenden NADPH-Oxidasen (Nox1, Nox4) wurden nicht detektiert. Die Familie der Lipoxygenasen (Alox3, Alox5, Alox12, Alox15 und Alox15b) wurde ebenfalls nicht nachgewiesen.

3.7.4 Vermehrte Aktivität des proferroptotischen Phospholipidether-Synthese-Stoffwechselwegs im S2 Segment

Zou et al. identifizierten durch genomweite CrisprCas-Supressor-Screenings mehrere Gene, die einen proferroptotischen Effekt aufweisen, indem sie über die Synthese von Phospholipidethern zur Anreicherung der Membranen mit PUFA beitragen. Der Effekt der Gene Pex3, Pex10, Pex12, Far1, Gnpat, Agps und Agpat3 wurde in dem Paper durch individuelle CrisprCas9-vermittelte Depletion bestätigt (87). 4 der 7 durch diese Gene kodierten Proteine wurden im Mittel am häufigsten im S2 Segment detektiert (Pex10, Pex12, Gnpat, Agpat3). Bei zwei davon (Pex12, Gnpat) wurden im S2 Segment signifikant mehr Kopien pro Zelle nachgewiesen, als in allen anderen Tubulussegmenten. Zwei weitere beteiligte Proteine wurden im S2 Segment am zweithäufigsten nachgewiesen. Lediglich Pex3 wurde im S2 Segment nur in vergleichsweise geringem Umfang detektiert. Diese Ergebnisse deuten in

Zusammenschau auf eine vermehrte Aktivität des proferroptotischen Phospholipidethersynthese-Stoffwechselwegs im S2 Segment hin.

Acsl4 und Lpcat3 sensibilisieren Zellen ebenfalls für Ferroptose, indem sie durch ihre sequentielle Aktion den Einbau von PUFA in Phospholipide vermitteln. Acsl4 wurde am häufigsten im cTAL nachgewiesen. Lpcat3 am häufigsten im S2 Segment.

3.8 **Beim Menschen kommt es im Verlauf einer NTx zu einer tubulären GPX4 Depletion**

Wir vermuteten, dass es beim Menschen im Rahmen einer NTx zur GPX4-Depletion in der Transplantatniere kommt. Um dies zu überprüfen, fertigten wir von im Verlauf von Nierentransplantationen entnommenen Biopsien histologische Schnitte an und färbten diese immunhistochemisch auf GPX4. Um Rückschlüsse auf die Proteinmenge zu ziehen, bestimmten wir die Färbungsintensität der immunhistochemischen Färbungen, die mit der Proteinmenge korreliert.

Andere Zelltypen in der Niere ausser den Tubuli exprimieren die GPX4 anhand der uns vorliegenden Färbungen nur schwach. Um die tubuläre GPX4-Proteinmenge zu quantifizieren, selektierten wir deshalb möglichst große Bildbereiche mit angeschnittenen Tubuli. Von diesen

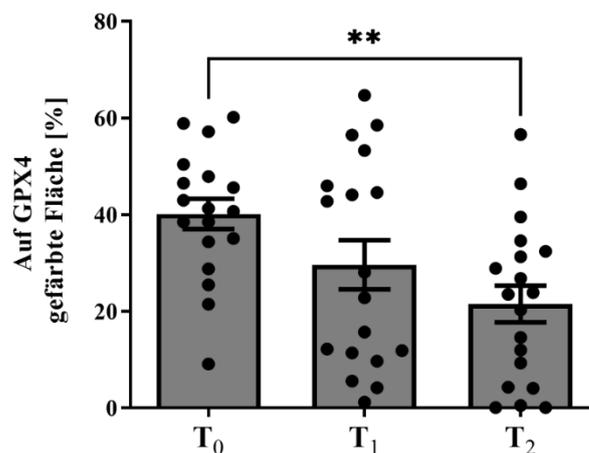


Abbildung 29: Tubuläre GPX4-Proteinmenge im Verlauf einer Nierentransplantation

T₀: vor Ischämie, T₁: nach im Durchschnitt 15-stündiger kalter Ischämie, T₂: nach 30 minütiger Reperfusion. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten während NTx entnommenen Transplantatbiopsien wurden immunhistochemisch auf GPX4 gefärbt und abfotografiert. Anschließend wurden möglichst große Bildbereiche mit angeschnittenen Tubuli selektiert. Zur Bestimmung der Färbungsintensität, die mit der Proteinmenge korreliert, wurde die bei einem zuvor festgelegten Grenzwert auf GPX4 gefärbte Fläche ermittelt. Jede Säule stellt die mittlere GPX4-Färbungsintensität von 19 Transplantatbiopsien \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Bildbereichen bestimmten wir die prozentual oberhalb eines zuvor festgelegten Grenzwertes gefärbte Fläche. Eine genaue Beschreibung des Vorgehens findet sich im Methodenteil. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

Wir konnten zeigen, dass es beim Menschen im Verlauf einer Transplantation zu einer tubulären GPX4-Depletion in der Transplantatniere kommt. Im Mittel ist die Proteinmenge dabei bereits nach der 15-stündigen Ischämiephase reduziert. Ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert besteht jedoch erst nach der Reperfusion.

3.9 Kein Nachweis einer signifikante Assoziation zwischen der Menge der tubulären GPX4 und dem Auftreten einer VTF

Wir stellten die Vermutung auf, dass die tubuläre GPX4-Proteinmenge im Transplantatorgan einen prognostischen Effekt hinsichtlich des Auftretens einer verzögerten Transplantatfunktion (VTF) hat. Um dies zu untersuchen, verglichen wir die Proteinmenge im Transplantat von Patienten, bei denen es postoperativ zu einer VTF kam, mit der von Patienten

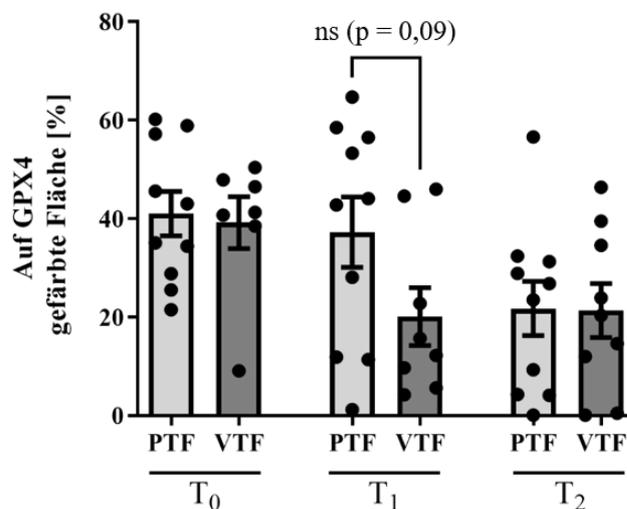


Abbildung 30: Tubuläre GPX4-Proteinmenge im Verlauf einer NTx bei Patienten mit PTF und VTF

T₀: vor Ischämie, T₁: nach im Durchschnitt 15-stündiger kalter Ischämie, T₂: nach 30 minütiger Reperfusion. Die zu den entsprechenden Zeitpunkten während NTx entnommenen Transplantatbiopsien wurden immunhistochemisch auf GPX4 gefärbt und ab fotografiert. Anschließend wurden möglichst große Bildbereiche mit angeschnittenen Tubuli selektiert. Zur Bestimmung der Färbungsintensität, die mit der Proteinmenge korreliert, wurde die bei einem zuvor festgelegten Grenzwert auf GPX4 gefärbte Fläche ermittelt. Die Gruppe der Patienten mit primärer Transplantatfunktion umfasste 10 Patienten, die mit verzögerter Transplantatfunktion 9 Patienten. Jede Säule stellt die mittlere GPX4-Färbungsintensität der Transplantatbiopsien der jeweiligen Gruppe ± SEM dar. NTx, Nierentransplantation; PTF, Primäre Transplantatfunktion; VTF, Verzögerte Transplantatfunktion; ns, nicht signifikant.

mit primärer Transplantatfunktion (PTF). Wie zuvor quantifizierten wir die tubuläre GPX4-Proteinmenge anhand der Intensität der immunhistochemischen GPX4-Färbung der während der Explantation (T_0), nach der kalten Ischämie (T_1), sowie nach der Reperfusion (T_2) entnommen Biopsien. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

Es besteht keine signifikante Assoziation zwischen der tubulären Proteinmenge der GPX4 im Transplantat im Verlauf der Transplantation und dem Auftreten einer VTF. Tendenziell ($p = 0,09$) weist das Transplantat von Patienten mit VTF nach der Phase der kalten Ischämie weniger tubuläre GPX4 auf als das von Patienten mit PTF.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Ferroptose und dem IRS der Niere bei Maus und Mensch besser zu charakterisieren und das therapeutische Potential des Ferroptoseinhibitors Lip-2 zu untersuchen. Wir stellten in diesem Zusammenhang folgende Hypothesen auf:

- (A) Im Rahmen des IRS kommt es zu einem Funktionsverlust der Gpx4 im S3 Segment des proximalen Tubulus.
- (B) Dieser Funktionsverlust wird zum Teil durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt, die während der Reperfusion entstehen.
- (C) Behandlung mit dem Ferroptoseinhibitor Lip-2 wirkt sich im renalen IRS-Mausmodell protektiv aus.
- (D) Die proximalen Tubulusepithelien sind aufgrund besonderer metabolischer Eigenschaften anfällig für Ferroptose.
- (E) Beim Menschen kommt es im Verlauf einer Nierentransplantation zu einem Funktionsverlust der GPX4 in der Niere.
- (F) Die Menge der GPX4 im Transplantat hat im Rahmen von humanen Nierentransplantationen einen prognostischen Effekt hinsichtlich des Auftretens einer verzögerten Transplantatfunktion.

Wir konnten zeigen, dass es im Mausmodell, in der Frühphase der Reperfusion, zu einer Gpx4-Depletion in der Niere kommt, die im S3 Segment des proximalen Tubulus am ausgeprägtesten ist (A). Auch die Gpx4-Genexpression ist nach IRS reduziert. Behandlung mit Lip-2 hat im Mausmodell des renalen IRS einen protektiven Effekt (C).

Intramitochondriales Superoxid verursacht *in vitro* keine Degradation der Gpx4 (B).

Durch die Analyse einer tubulussegmentspezifischen Proteomicsdatenbank konnten wir mehrere Stoffwechselwege identifizieren, die möglicherweise zur besonderen Ferroptosesensibilität der proximalen Tubulusepithelien beitragen (D).

Im Verlauf einer Nierentransplantation kommt es beim Menschen zu einem Abfall der tubulären GPX4-Proteinmenge (E). Wir konnten keine signifikante Assoziation zwischen der Menge der tubulären GPX4 und dem Auftreten einer VTF nach NTx nachweisen (F).

4.1 Lip-2 wirkt im IRS-Mausmodell protektiv

Wir konnten zeigen, dass die Behandlung mit dem Ferroptoseinhibitor Lip-2 im renalen IRS-Mausmodell einen protektiven Effekt aufweist. Der von uns beobachtete protektive Effekt fällt geringer aus, als man anhand des von Linkermann et al. publizierten Effekts des auf Fer-1 basierenden Ferroptoseinhibitors SRS 16-68 erwarten würde. Die Daten sind zwar aufgrund unterschiedlicher Operationsbedingungen (Flankenschnitt vs. Bauchschnitt) und aufgrund unterschiedlicher gewählter Zeitfenster (24 vs. 48 Stunden) nur eingeschränkt vergleichbar, dennoch sind die Unterschiede auffällig stark ausgeprägt. Bei der mit Lip-2 behandelten Gruppe wurde im Vergleich zur Kontrolle 27% weniger Serumkreatinin, 28% weniger Serumharnstoff und ein 31% geringerer Tubulärer Schädigungsscore detektiert. Im Vergleich dazu wurde von Linkermann et al. bei der mit SRS 16-86 behandelten Gruppe 60% weniger Serumkreatinin, 40% weniger Serumharnstoff und ein 70% geringerer Tubulärer Schädigungsscore als bei der entsprechenden Kontrollgruppe beschrieben (69).

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liefert die Ernährung unserer Versuchstiere. Conrad et al. wiesen im Rahmen eines Übersichtsartikels darauf hin, dass kommerziell erhältliches Mausefutter häufig sehr große Mengen Vitamin E enthält, teilweise mehr als das 100-fache der menschlichen Diät (132). Auch das von uns verwendete Mausezuchtfutter der Firma Ssniff enthält große Mengen Vitamin E (110 mg/kg) (133). Die aktive Form von Vitamin E, alpha-Tocopherol, ist ein lipophiler Radikalfänger und hemmt Ferroptose *in vivo* und *in vitro* (132). Wortmann et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass ein konditioneller *Knockout* der Gpx4 in Endothelzellen bei Vitamin E-armer Ernährung einen letalen Phänotyp aufweist, der durch Vitamin E Supplementation verhindert werden kann (92). Aufgrund der ungewollten Vitamin E Supplementation in unserem Modell ist davon auszugehen, dass auch die Kontrollgruppe von einem alpha-Tocopherol vermittelten antiferroptotischen Effekt profitierte. Es wäre also gut denkbar, dass der Effekt von Lip-2, das ebenfalls als lipophiler Radikalfänger agiert, ohne die hohe Supplementation von Vitamin E stärker ausgefallen wäre. Linkermann et al. erwähnen in ihrer Studie nicht, welches Mausefutter verwendet wurde, sollte dies jedoch eines mit geringerer Vitamin E Supplementation sein, so wäre die unterschiedliche Effektstärke erklärt.

Daneben wäre es auch denkbar, dass SRS 16-86 zusätzlich zu dem demonstrierten antiferroptotischen Effekt andere Zelltodprogramme beeinflusst. Linkermann et al.

kommentierten nicht, inwiefern nach der Entwicklung des Wirkstoffs überprüft wurde, ob dieser andere Zelltodprogramme beeinflusst (69). Der Fall des Nekroptoseinhibitors Nec-1 hat verdeutlicht, dass dies im Kontext der Zelltodforschung dringend notwendig ist, um Fehlinterpretationen zu verhindern. Für Nec-1 wurde gezeigt, dass es neben dem ursprünglich demonstrierten anti-nekroptotischen Effekt zusätzlich einen anti-ferroptotischen Effekt aufweist, weshalb viele Studien neu bewertet werden mussten (62). Ein zusätzlicher anti-nekroptotischer Effekt von SRS 16-86 wäre geeignet, den stärkeren protektiven Effekt im IRS Mausmodell zu erklären, da gezeigt wurde, dass auch Nekroptoseinhibitoren sich beim IRS der Niere protektiv auswirken (134). Eine Untersuchung des Effekts von SRS 16-86 auf andere Zelltodwege erscheint daher in jedem Fall sinnvoll. Daneben wäre auch ein direkter Vergleich von Lip-2 und SRS 16-86 im IRS-Mausmodell wünschenswert. Unabhängig von der Effektstärke belegt der protektive Effekt von Lip-2 beim IRS der Niere das therapeutische Potential des speziell für die Anwendung beim Menschen optimierten Wirkstoffs.

4.2 **Ein neuer Pathomechanismus des renalen IRS**

Während des IRS kommt es über zwei Mechanismen zu einem Funktionsverlust der Gpx4 in der Niere. Wie Slusser et al. bereits 1990 zeigen konnten, wird Glutathion während der Ischämie in der Niere degradiert. Nach der Reperfusion regenerieren sich die Spiegel aufgrund eines Cysteinmangels nur langsam (105). Wie wir in dieser Arbeit demonstrieren konnten, kommt es im Anschluss daran, in der Frühphase der Reperfusion, zu einer Gpx4-Depletion in der Niere. Diese betrifft vermutlich die gesamte Niere, ist jedoch am ausgeprägtesten im S3 Segment, wo unter physiologischen Bedingungen am meisten Gpx4 vorliegt. Der Verlust der Gpx4 geht dabei der Tubulusnekrose, die man ab ca. 2 Stunden nach Reperfusion im S3 Segment beobachtet, direkt voraus. Mehrere Beobachtungen legen einen kausalen Zusammenhang zwischen den beiden Ereignissen nahe.

Die proximalen Tubulusepithelien sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf eine funktionale Gpx4 angewiesen, um Ferroptose zu verhindern. *In vivo* beobachtet man im Mausmodell nach genetischer Gpx4-Deletion ein akutes Nierenversagen mit letalem Verlauf (62). *In vitro* kommt es bei primär isolierten, proximalen Tubulusepithelien nach Inhibition der Gpx4 durch RSL-3 zu Ferroptose (62). Auch Behandlung mit Erastin und die damit verbundene Glutathion-Depletion lösen in diesem Kontext Ferroptose aus (110). Es liegt daher nahe, dass die kombinierte Gpx4- und Glutathion-Depletion im Rahmen des IRS Ferroptose induziert.

Belegt wird dies durch den protektiven Effekt spezifischer Ferroptoseinhibitoren im renalen IRS-Mausmodell. Linkermann et al. konnten einen protektiven Effekt für Fer-1 und SRS 16-86 beim IRS der Niere demonstrieren (69). Wir konnten diese Beobachtungen anhand des auf Lip-1 basierenden, spezifischen Ferroptoseinhibitors Lip-2 bestätigen. Die Gpx4-Depletion im S3 Segment stellt somit einen bisher unbekanntem Pathomechanismus dar, der die Ausprägung des IRS der Niere vermittelt.

4.3 Wie kommt es zum Verlust der Gpx4?

Wie viele Kopien eines Proteins oder Peptids in einer Zelle vorliegen, wird bestimmt durch Produktion und Degradation, sowie durch Aufnahme und Abgabe an das umliegende Gewebe. Um zu untersuchen, ob es zu einer veränderten Proteinproduktion kommt, bestimmten wir die Gpx4-Genexpression in der Mausniere im Verlauf des IRS mittels RT-qPCR. Wir konnten demonstrieren, dass es im Rahmen des IRS zu einem Abfall der Gpx4-Genexpression in der Niere kommt. Dieser tritt zwischen 15 und 30 min nach Reperfusion auf, in etwa zum selben Zeitpunkt wie der Verlust der Gpx4 auf Proteinebene.

Sollte die veränderte Genexpression allerdings allein den Verlust der Gpx4 erklären, so müsste die Gpx4 in der Niere eine sehr kurze Halbwertszeit aufweisen. Mathieson und Kollegen konnten mittels einer dynamischen, SILAC-basierten Proteomics-Studie die Halbwertszeiten der Proteine verschiedener primärer humaner Zellen bestimmen. Ihre Daten zeigen, dass die Halbwertszeit der Gpx4 bei primären, isolierten Hepatozyten, die wie Tubulusepithelien Gpx4 stark exprimieren und auf eine funktionale Gpx4 angewiesen sind, unter physiologischen Bedingungen ca. 500 Stunden beträgt (135). Es scheint unwahrscheinlich, dass die Halbwertszeit in der Niere stark genug davon abweicht, um den Verlust der Gpx4 hinreichend zu erklären.

Eine weitere Möglichkeit, den Verlust zu erklären, stellt die Ausscheidung über den Urin dar. Im Rahmen eines IRS kommt es zum Verlust der apikalen Mikrovilli der proximalen Tubulusepithelien, die teilweise als kleine Membranvesikel, sogenannte ‚Blebs‘ ins tubuläre Lumen abgeschilfert werden. Dort werden sie zum Teil über den Urin ausgeschieden, zum Teil bilden sie mit abgeschilfertem Tubulusepithelzellen und verschiedenen Proteinen sogenannte ‚Casts‘, die die Tubuli verstopfen können. Um zu überprüfen, ob es im Rahmen dieses Prozesses zu einer Ausscheidung der Gpx4 über den Urin kommt, analysierten wir anhand der immunhistochemisch auf Gpx4 gefärbten Nierenschnitten nach IRS die in den tubulären

Lumina vorliegenden ‚Casts‘. Diese zeigten sich zu keinem Zeitpunkt nach Reperfusion auf Gpx4 anfärbbar, was eine relevante Ausscheidung mit den abgeschilferten ‚Blebs‘ unwahrscheinlich erscheinen lässt. Ferner ließen sich in Studien zum Urinproteom bei Mäusen weder bei gesunden Tieren eine Gpx4-Ausscheidung über den Urin nachweisen (136), noch zeigte sich nach IRS der Niere (zu den Zeitpunkten 4, 11 und 16 Stunden nach Reperfusion) eine vermehrte Ausscheidung über den Urin (137). In Zusammenschau der Befunde und insbesondere in Anbetracht des sehr schnellen Verlusts der Gpx4, erscheint eine Degradation des Proteins wahrscheinlich.

4.4 **Gpx4-Degradation durch direkte Interaktion mit ROS?**

Im Rahmen eines IRS beobachtet man über verschiedene Gewebe hinweg, dass es kurz nach der Reperfusion zu einer explosionsartigen Entstehung von ROS kommt, die die Ausprägung des IRS vermitteln. Unsere Beobachtung, dass es erst nach der Reperfusion zu einem Verlust der Gpx4 kommt, dann allerdings die Proteinkonzentration innerhalb der ersten halben Stunde stark abfällt, wäre gut mit einer Degradation durch ROS vereinbar. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie ROS eine Degradation der Gpx4 verursachen könnten. Denkbar wäre zum Beispiel eine direkte oxidative Modifikation des Enzyms. Die mögliche Bandbreite an oxidativen Modifikationen von Proteinen durch ROS ist groß und reicht von reversiblen Veränderungen wie z.B. Disulfidbrückenbindung, über irreversible oxidative Modifikation der Aminosäure-Seitenketten, bis hin zur Spaltung von Peptidbindungen. Auf diese Weise irreversibel beschädigte Proteine werden in der Zelle üblicherweise durch eins der verschiedenen Protein-Qualitätskontroll-Systeme markiert und anschließend abgebaut (121).

Die Gpx4 ist unter physiologischen Bedingungen stark im mitochondrialen Intermembranraum angereichert. Es wird vermutet, dass die Außenseite der mitochondrialen Innenmembran ihre wichtigste Zielstruktur darstellt (103). Dort ist auch die Atmungskette lokalisiert, die den Ursprung des während der Reperfusion entstehenden Superoxids darstellt. Aufgrund der Nähe der beteiligten Strukturen erscheint eine direkte Modifikation der Gpx4 durch ROS möglich. Superoxid selbst ist vergleichsweise reaktionsträge und reagiert nur mit einzelnen Proteinen, darunter vor allem solche mit Eisen-Schwefel-Clustern (39). Es induziert jedoch die Entstehung einer Reihe weiterer ROS, darunter z.B. Hydroxylradikale, die ein breites Spektrum an Proteinen modifizieren können (40).

Ein klassisches Modell für oxidativen Stress durch ROS stellt die Inkubation von Zellen mit Wasserstoffperoxid dar. Conrad et al. konnten zeigen, dass es *in vitro* bei Maus-Embryonischen-Fibroblasten, einer klassischen ferroptosesensiblen Zelllinie, nach Inkubation mit hohen Konzentrationen Wasserstoffperoxid zu nekrotischem Zelltod kommt, der sich nicht durch Zelltodinhibitoren beeinflussen lässt, also zu akzidentieller Nekrose (138). Im Hinblick auf den Ort der ROS-Entstehung und die entstehenden ROS unterscheidet sich dieses Modell jedoch entscheidend von der ROS Entstehung beim IRS *in vivo*.

Chouchani et al. konnten demonstrieren, dass ROS im Rahmen der Reperfusion vor allem über einen spezifischen Mechanismus gebildet werden. Während der Ischämie akkumuliert über verschiedene Gewebe hinweg der Citratzyklusmetabolit Succinat. Nach Reperfusion wird dieses Succinat an der mitochondrialen Atmungskette durch den Komplex II rasch verstoffwechselt, woraus eine vermehrte Reduktion des Coenzym Q-Pools resultiert. Es kommt zu einem Phänomen, das als reverser Elektronentransfer (RET) bezeichnet wird. Neben der physiologisch stattfindenden Übertragung von Elektronen von Coenzym Q auf den Komplex III werden Elektronen, entgegen der üblichen Arbeitsrichtung der Atmungskette, von Komplex II auf den Komplex I übertragen, wobei am Komplex I große Mengen Superoxid entstehen (35).

Um zu überprüfen, ob IRS-typische ROS-Produktion im proximalen Tubulus eine Degradation der Gpx4 vermittelt, entschieden wir uns, basierend auf diesem Mechanismus ein *in vitro* Modell zu etablieren. Als Zellmodell für den proximalen Tubulus verwendeten wir immortalisierte humane proximale Tubulusepithelien (HK-2), die anhand von Transkriptomdaten zu unterschiedlichen proximalen Tubuluszelllinien Gpx4 besonders stark exprimieren (139). Zudem sind HK-2 Zellen wie primär isolierte proximale Tubulusepithelien auf eine funktionale Gpx4 angewiesen, um Ferroptose zu verhindern (140).

Um die Succinatakkumulation während der Ischämie zu simulieren, inkubierten wir die Zellen in Anlehnung an ein in der Literatur verwendetes Modell mit hyperphysiologischen Konzentrationen Dimethylsuccinat (35). Zusätzlich inkubierten wir die Zellen mit dem Komplex III Inhibitor Antimycin A. Sowohl die Behandlung mit Dimethylsuccinat als auch die Behandlung mit Antimycin A resultieren in einer Überreduktion des Coenzym Q-Pools (47). Aus der gemeinsamen Behandlung versprochen wir uns, diesen Effekt noch weiter zu verstärken und so Superoxidentstehung über RET zu induzieren. Gleichzeitig bedingt Antimycin A selbst die Entstehung von Superoxid am Komplex III.

Wir konnten zeigen, dass die kombinierte Inkubation mit Antimycin A (50 μ M) und Dimethylsuccinat (50 mM) zusammen signifikant mehr Zelltod verursacht als die Addition der Einzeltoxizitäten der beiden Substanzen erwarten lassen würde. Die beiden Substanzen beeinflussen sich in dieser Konzentration also synergistisch, was einen gemeinsamen Wirkmechanismus impliziert. Wir konnten zudem zeigen, dass es während der Inkubation mit Antimycin A und Dimethylsuccinat zu vermehrter MitoSox Red Oxidation kommt, was ein vermehrtes Vorliegen von intramitochondrialem Superoxid belegt. Da die beiden Substanzen primär auf Ebene der Mitochondrien wirken, scheint es wahrscheinlich, dass die Ursache hierfür eine vermehrte intramitochondriale Entstehung ist. Ob es in dem Modell jedoch tatsächlich zu Superoxidentstehung über reversen Elektronentransfer kommt, konnten wir nicht eindeutig belegen. Möglich wäre es zum Beispiel auch, dass es lediglich zu einer vermehrten Entstehung von Superoxid an Komplex III kommt.

Wir konnten demonstrieren, dass es bei HK-2 Zellen nach Inkubation mit Antimycin A und Dimethylsuccinat nicht zu einem Verlust der Gpx4 auf Proteinebene kommt. Das in dem Modell entstehende Superoxid verursacht also keine Degradation der Gpx4. Superoxid, das an der Atmungskette entsteht, kann je nach Entstehungsort auf beide Seiten der mitochondrialen Innenmembran abgegeben werden. Da Superoxid aufgrund seiner negativen Ladung nicht in der Lage ist, Biomembranen frei zu passieren, resultiert eine Kompartimentalisierung innerhalb der Mitochondrien. Im Zuge von RET entsteht Superoxid an Komplex I vermutlich exklusiv auf der Seite der mitochondrialen Matrix (141). Nach Inkubation mit Antimycin A entsteht Superoxid am Komplex III hingegen in relevantem Umfang auf beiden Seiten der Innenmembran, also auch im Intermembranraum (46). Komplex I und III sind innerhalb der mitochondrialen Innenmembran in Superkomplexen organisiert und liegen nah beieinander (142). Da die Gpx4 vorrangig im Intermembranraum angereichert ist, erscheint es unwahrscheinlich, dass über RET an Komplex I entstehendes Superoxid eine Gpx4-Degradation verursacht, während dies bei Antimycin A induzierter Superoxidentstehung nicht der Fall ist. Unabhängig davon, ob unser Modell die Superoxidentstehung während des IRS also korrekt abbildet, können wir belegen, dass an der Atmungskette entstehendes Superoxid keine Degradation der Gpx4 verursacht.

Von verschiedenen Inhibitoren hatte in unseren Versuchen lediglich der Pancaspaseinhibitor ZVAD-FMK einen protektiven Effekt auf den durch Antimycin A und Dimethylsuccinat verursachten Zelltod. Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich bei dem

Zelltod im Modell tatsächlich um Apoptose handelt. Im Einklang damit ist in der Literatur eine Apoptoseinduktion durch Antimycin A beschrieben (143).

4.5 **Verlust der Gpx4 durch Bildung eines oxidativ vernetzten Makromoleküls?**

Eine weitere Möglichkeit einer indirekten oxidativen Modifikation der Gpx4 durch ROS ergibt sich bei Betrachtung ihrer Rolle in einem anderen Kontext. Im Rahmen der Spermatogenese wechselt die Gpx4 ihre Funktion von löslichem, katalytisch aktivem Enzym, hin zu einem unlöslichen, oxidativ vernetzten Makromolekül, das als Strukturprotein der Spermatozoenkapsel dient (99).

Mauri et al. konnten zeigen, dass für diesen Funktionswechsel die niedrige Kosubstratspezifität der Gpx4 eine Rolle spielt. Falls Glutathion nicht als Kosubstrat zur Verfügung steht, wird das oxidierte katalytische Zentrum der Gpx4 auch durch andere niedermolekulare Thiole und bestimmte Thiolgruppen in Proteinen reduziert. So entstehen über Selendisulfidbrücken verbundene Proteinkomplexe. Auch für eine Thiolgruppe der Gpx4 selbst (Cys148) ist eine solche Reaktion mit dem katalytischen Zentrum beschrieben, die zur reversiblen Inaktivierung des Enzyms führt. Wird die Gpx4 in Abwesenheit von Glutathion mit Wasserstoffperoxid inkubiert, kommt es über diese Reaktion zur Entstehung von linear verknüpften Gpx4-Polymeren. Diese weisen allerdings nicht die außergewöhnliche Stabilität und Resistenz gegenüber Inkubation mit Reduktionsmitteln auf, wie man sie bei der Spermatozoenkapsel beobachtet (144).

Maiorani et al. konnten zeigen, dass bei der Entstehung dieses robusten Proteinkomplexes der Interaktion der Gpx4 mit dem cysteinreichen Protein SMCP eine entscheidende Rolle zukommt. Wie Glutathion kann SMCP als Kosubstrat für die Gpx4 fungieren. Dabei werden über Cysteine, die in regelmäßigen Abständen liegen, Disulfidbrücken gebildet und das Protein verändert seine Konfiguration (100).

Im Rahmen der Spermatogenese kommt es durch GGT1 vermittelte Degradation zu einem ausgeprägten Abfall der Glutathionkonzentration und anschließend zu einem synchronisierten oxidativen Stressreiz bislang unklaren Ursprungs (145, 146). Katalysiert durch die Gpx4 entstehen daraufhin über Disulfidbrücken 3D-vernetzte Makromoleküle aus SMCP, verschiedenen Keratinen und mehreren Gpx4-Molekülen (100).

Tatsächlich ähneln die Bedingungen während des IRS der Niere denen während der Spermatogenese. Im Rahmen der Ischämie kommt es, vermutlich ebenfalls GGT1 vermittelt,

zu einer Glutathion-Degradation (105). Dabei beobachtet man während der Ischämie selbst keine vermehrte Glutathion-Oxidation im Sinne eines gesteigerten GSSG/GSH Quotienten. Erst im Rahmen der Reperfusion kommt es zu vermehrter Glutathion-Oxidation, die der sich anschließenden Gpx4-Degradation unmittelbar vorausgeht (147).

Käme es während des IRS der Niere zu einer Homoaggregation der Gpx4, wie von Mauri et al. *in vitro* demonstriert, so sollte dies den Nachweis der Gpx4 mittels SDS-PAGE Western Blots nicht behindern, da dem Laufpuffer regelhaft das starke Reduktionsmittel beta-Mercaptoethanol zugegeben wird, um solche Proteinaggregationen über einzelne Disulfidbrücken durch Reduktion aufzuspalten. Anders wäre dies bei einem Prozess, der dem der Entstehung der Spermatozoonkapsel ähnelt. In der Spermatozoonkapsel liegt die Gpx4 so stark vernetzt vor, dass sie sich mittels eines konventionellen SDS-PAGE Western Blots nicht nachweisen lässt. Aus diesem Grund wurde die Gpx4 erst 1999 als Hauptbestandteil der Spermatozoonkapsel identifiziert. Ursini et al. gelang es, durch Behandlung von isoliertem Kapselprotein mit hohen Thiolkonzentrationen in Gegenwart des chaotropen Salzes Guanidin, die in SDS unlösliche Proteinfraction in Lösung zu bringen und Gpx4 mittels PAGE nachzuweisen (99). Bedauerlicherweise gelang es uns nicht, ein geeignetes Protokoll in unserem Labor zu etablieren, auch da die Proteinisolate der Mausexperimente bereits durch die regulären Western Blots auf Gpx4 weitgehend aufgebraucht waren. Es wäre interessant, zu sehen, ob sich durch einen so modifizierten Western Blot nach IRS mehr Gpx4 nachweisen ließe als durch einen herkömmlichen SDS-PAGE Western Blot.

SMCP wurde anhand der Datenbank des KTEA in der Niere nicht nachgewiesen (131). Maiorani et al. konnten mittels einer BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Suche gegen SMCP jedoch zeigen, dass die Basensequenz des Proteins starke Ähnlichkeit mit verschiedenen Keratin-assoziierten-Proteinen aufweist, die wie SMCP Cysteine in regelmäßigen Abständen besitzen. Diese Proteine tragen ebenfalls zur Bildung vernetzter Makromoleküle bei und sind bisher vor allem durch ihren Beitrag zur Organisation des Keratins im Haarfollikel bekannt. Aufgrund der ubiquitären Expression der Gpx4 äußerten die Autoren bereits vor 15 Jahren die Vermutung, dass eine ähnliche Aggregatbildung wie die in den Spermatozyten auch in anderen Geweben stattfinden könnte. Eine Analyse der Datenbank des KTEA zeigt jedoch, dass auch diese Proteine in der Niere unter physiologischen Bedingungen nicht nachgewiesen wurden (131). Sollte ein Nachweis eines Gpx4-Makromoleküls in der Zukunft gelingen, so stellt sich also die Frage, welche Proteine in der Niere die Rolle von SMCP übernehmen könnten.

4.6 **Intrazelluläre Gpx4-Degradation über Proteasom und Autophagie**

Proteine werden bei Säugetieren intrazellulär vor allem über das Proteasom oder durch Autophagie abgebaut. Beide Systeme können zur Degradation der Gpx4 beitragen. Yang et al. konnten zeigen, dass es unter physiologischen Bedingungen zu einer fortlaufenden proteasomalen Degradation der Gpx4 kommt (148). Daneben lösen verschiedene Moleküle, die als experimentelle Ferroptoseinduktoren verwendet werden, darunter Erastin und RSL3, eine Gpx4-Degradation durch Chaperon-vermittelte-Autophagie (CVA) aus (124).

Um zu klären, ob eines der Systeme die Gpx4-Degradation im Rahmen des IRS der Niere vermittelt, entschieden wir uns, ein *in vitro* Modell zu etablieren. In einem geeigneten Modell, das den Mechanismus der Degradation während IRS abbildet, sollte es während der simulierten Reperfusion zu einem Abfall der Gpx4-Proteinkonzentration kommen und anschließend ferroptotischer Zelltod auftreten.

In Anlehnung an ein publiziertes *in vitro* Hypoxie-Reoxygenierungsmodell, inkubierten wir HK-2 Zellen in einer Hypoxiekammer bei <1% Umgebungssauerstoff (149). Um die Energiedeprivation während der Ischämie nachzustellen, inkubierten wir die Zellen während der Hypoxie in nährstoffarmem Medium, ohne Glucose und FBS. Zur Simulation der Reperfusion wurde das Medium gegen frisches, nährstoffreiches Medium ausgetauscht und die Zellen für zwei Stunden bei Normoxie inkubiert.

Wir konnten zeigen, dass es in dem Modell zu einer Degradation der Gpx4 kommt und dass im Rahmen der Reoxygenierung, charakterisiert durch den protektiven Effekt von Lip-2, ferroptotischer Zelltod auftritt. Die genauere Analyse der Einflussfaktoren der Degradation zeigte jedoch, dass diese kein Effekt von Hypoxie und Reoxygenierung, sondern einer der prolongierten, serumfreien Inkubation ist.

Eine weitere Beobachtung spricht dagegen, dass das Modell den Mechanismus der Gpx4-Degradation nach Reperfusion abbildet. Im Zuge der Reoxygenierung kommt es im Modell zu einem scheinbaren Anstieg der mittels Western Blots nachgewiesenen Gpx4-Proteinkonzentration. Dies entspricht dem Gegenteil von dem, was man anhand der Beobachtungen im Tiermodell erwarten würde. Es wäre möglich, dass ein Selektionsprozess zu diesem Phänomen beiträgt. Zellen, die nicht adhären sind, werden während des Waschschritts der Proteinisolation entfernt. Da möglicherweise gerade die Zellen, bei denen

die Gpx4 am stärksten supprimiert ist, während der Reoxygenierung sterben oder ihre Adhärenz verlieren, würde dies einen Anstieg der detektierten Gpx4-Proteinkonzentration erklären.

Auch die lange hypoxische Inkubation von 72 Stunden, die notwendig war, um während der Reoxygenierung Zelltod hervorzurufen, spricht gegen die Validität des Modells. Eine Möglichkeit, diese besondere Hypoxietoleranz zu erklären, bietet eine Veränderung der Membranzusammensetzung langfristig kultivierter Zellen. Symons et al. konnten mittels Lipidomics Untersuchungen verschiedener primär isolierter Zellen und immortalisierter Zelllinien zeigen, dass immortalisierte Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs sich in ihrem Lipidom untereinander deutlich stärker ähneln, als primär isolierten Zellen des Ursprungsgewebes. Dabei sind die Membranen kultivierter Zellen im Schnitt nur halb so stark mit PUFA angereichert wie die Membranen primär isolierter Zellen, was mit einer verminderten Ferroptosesensibilität einhergeht (150). Tatsächlich wurden in der Vergangenheit Hypoxie-Reoxygenierungsmodelle anhand von primär isolierten proximalen Tubulusepithelien beschrieben, die auch bei einer deutlich kürzeren hypoxischen Inkubation von nur einer Stunde im Rahmen der Reoxygenierung relevanten Zelltod hervorriefen (149). Im Rückblick wäre es unter diesem Gesichtspunkt sinnvoller gewesen, für die *in vitro* durchgeführten Experimente primär isolierte Zellen zu verwenden.

In Zusammenschau kommt es in dem Modell zwar zu einer Degradation der Gpx4. Diese unterscheidet sich jedoch hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs und der auslösenden Faktoren deutlich von der schnellen Gpx4-Degradation nach Reperfusion, wie wir sie *in vivo* beobachten. Auch da in der Literatur bereits verschiedene Mechanismen der Gpx4-Degradation in unterschiedlichen Kontexten beschrieben sind, eignet sich das Modell nicht, um Rückschlüsse auf die Gpx4-Degradation im Rahmen des IRS zu ziehen.

Eine mögliche Erklärung für den Verlust der Gpx4 in dem Modell bietet eine Degradation über Autophagie. Es ist bekannt, dass Serumdeprivation Autophagie induzieren kann (151). Passend dazu zeigen Proteomicsdaten, dass nach 48-stündiger serumfreier Inkubation von HK-2 Zellen die beiden CVA Mediatoren HSC70 und HSP90 im Vergleich zur Kontrolle stark hochreguliert werden (152). Aufgrund fehlender Relevanz entschieden wir uns jedoch, den Degradationsmechanismus im Modell nicht weiter zu verfolgen.

In Übereinkunft mit unseren Daten konnten Chen et al. kürzlich zeigen, dass die Gpx4-Proteinkonzentration in der Niere der Maus 24 Stunden nach IRS reduziert ist (153). Sie postulieren, dass es nach IRS über CVA zur Degradation der Gpx4 kommt und dass die

Endopeptidase Legumain dabei beim Transport der Gpx4 in die Lysosomen assistiert. Die Studie wirft jedoch einige Fragen auf.

Die Autoren konnten zeigen, dass es *in vitro* bei primär isolierten murinen Tubulusepithelien (mRTEC) nach 12- und 24-stündiger Hypoxie (durch Inkubation in einer Hypoxiekammer) zu einer Degradation der Gpx4 und zum Zelltod kommt, der sich durch Behandlung mit Ferrostatin reduzieren lässt. Dabei kommt es zu einer vermehrten intralysosomalen Lokalisation der Gpx4 und zu einer vermehrten Assoziation von Gpx4 mit Lamp-2a, Hsc-70, Hsp90 und Legumain, was für eine Degradation durch CVA spricht. Der Verlust der Gpx4 in dem Hypoxiemodell wird allerdings nur anhand eines einzelnen Western Blots demonstriert und fällt im Vergleich zu dem von uns *in vivo* nach IRS, oder auch *in vitro* nach 48-stündiger Inkubation von HK-2 Zellen ohne Serum, beobachteten Verlusts gering aus. Da zudem die Zusammensetzung des Mediums nicht kommentiert wurde, wäre es denkbar, dass die Autoren sich aus ähnlichen Überlegungen wie wir für eine serumfreie hypoxische Inkubation entschieden haben.

Die Studie belegt, dass CVA vermutlich zur Degradation der Gpx4 innerhalb der ersten 24 Stunden nach IRS beiträgt. Dies steht im Einklang damit, dass es bekannterweise nach IRS zu vermehrter Autophagie kommt und dass die Gpx4 ein CVA Substrat ist (154). Der autophagische Flux in der Niere, der grob mit der Degradationsgeschwindigkeit korreliert, steigt nach IRS an, wird jedoch erst etwa 24 Stunden nach Reperfusion maximal (155). Es scheint daher unwahrscheinlich, dass CVA für die von uns beobachtete schnelle Degradation der Gpx4 innerhalb der ersten halben Stunde nach Reperfusion verantwortlich ist. Dagegen spricht auch, dass Autophagie in den proximalen Tubulusepithelien beim IRS der Niere primär einen protektiven Effekt hat (155, 156).

4.7 **Warum sind die proximalen Tubulusepithelien so anfällig für Ferroptose?**

Ein induzierbarer *Knockout* der Gpx4 (außerhalb des Gehirns) hat im Mausmodell ein akutes Nierenversagen mit letalem Verlauf zur Folge, wobei man initial vor allem im Bereich der proximalen Tubulusepithelien Ferroptose beobachtet. Wir stellten uns die Frage, welche Eigenschaften der Niere und im speziellen der proximalen Tubulusepithelien diese außergewöhnliche Ferroptosesensibilität vermitteln.

Unsere Analyse der Datenbank des KTEA zeigt, dass die Gpx4 im Vergleich zu den restlichen Tubulussegmenten am häufigsten im S3 Segment des proximalen Tubulus vorliegt.

Am zweithäufigsten wurde sie im S2 Segment des proximalen Tubulus detektiert. Glutathion wurde zwar nicht direkt nachgewiesen, die hohe Anzahl der Kopien der GSH synthetisierenden Enzyme im S3 Segment lässt jedoch ebenfalls hier die höchste Konzentration vermuten. Wahrscheinlich ist es kein Zufall, dass die für Ferroptose besonders anfälligen proximalen Tubulusepithelien auffallend reich an Gpx4 und Glutathion sind. Vielmehr lässt diese Beobachtung vermuten, dass weitere Prozesse die proximalen Tubulusepithelien für Ferroptose sensibilisieren, die durch die hohe Gpx4-Aktivität in Schach gehalten werden müssen.

Ein Faktor der Zellen für Ferroptose sensibilisiert, ist die Menge des cytosolischen Wasserstoffperoxids. Dieses generiert in bestimmten Kontexten über Fentonreaktionen Hydroxylradikale, die wiederum Lipidperoxidation initiieren können. Yan et al. konnten zeigen, dass die ektopische Expression des Wasserstoffperoxid-verstoffwechslenden Enzyms Katalase im Cytosol HeLa Zellen vor Ferroptoseinduktion schützt. Durch externe Zugabe von Wasserstoffperoxid kann dabei die Ferroptosesensibilität wiederhergestellt werden (90).

Wasserstoffperoxid diffundiert aufgrund seines hohen Dipolmoments nicht frei durch Membranen, sondern ist auf Transporterproteine angewiesen, um diese zu passieren. Aus dieser Restriktion, sowie aus unterschiedlichen Entstehungs- und Abbauraten, resultieren Gradienten zwischen den verschiedenen subzellulären Kompartimenten (157). Es bietet sich daher eine kompartimentspezifische Betrachtung der Wasserstoffperoxidspiegel an.

Wir konnten anhand der Proteomics-Datenbank des KTEA demonstrieren, dass in den proximalen Tubulusepithelien des S2 und S3 Segments verschiedene Enzyme besonders häufig vorliegen, die eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der cytosolischen Wasserstoffperoxidspiegel einnehmen. Enzyme, die Wasserstoffperoxid im Cytosol verstoffwechseln sind die Peroxiredoxine 1, 2 und 6, sowie die Gpx1. Die Reaktionsgeschwindigkeiten 2. Ordnung der Enzyme betragen in purifizierter Form bei der Gpx1 $4,1 \times 10^7 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, bei Prdx1 und Prdx2 ca. $1 \times 10^8 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und bei Prdx6 $3,4 \times 10^7 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und liegen damit in einem ähnlichen Bereich (158–161).

Unsere Analysen der Datenbank des KTEA zeigen, dass Prdx 1 und 6 am häufigsten im S3 Segment vorliegen, während das insgesamt schwächer exprimierte Prdx2 am häufigsten im CCD detektiert wurde. Gemeinsam betrachtet wurden am meisten Kopien der cytosolischen Prdx im S3 Segment nachgewiesen. Auch der für die Funktion der Peroxiredoxine essenzielle Kofaktor Thioredoxin liegt am häufigsten im S3 Segment vor. Die Anzahl der nachgewiesenen Kopien der Gpx1 war hingegen deutlich geringer. Vermutlich weisen die proximalen

Tubulusepithelien und insbesondere das S3 Segment also eine besonders hohe Kapazität zur Verstoffwechslung von Wasserstoffperoxid im Cytosol auf, was wiederum auf einen hohen Umsatz hindeutet. Tatsächlich wurde kürzlich unter Verwendung des genetisch kodierten Wasserstoffperoxid-Sensors HyPer experimentell bestätigt, dass die proximalen Tubulusepithelien im Vergleich zur restlichen Niere besonders hohe Wasserstoffperoxidspiegel aufweisen (162). Vermutlich trägt dies zu ihrer außergewöhnlichen Ferroptosesensibilität bei.

Um den Beitrag bekannter, proferroptotischer, Wasserstoffperoxid-produzierenden Enzyme zum Wasserstoffperoxidumsatz der proximalen Tubulusepithelien zu beurteilen, untersuchten wir deren Vorkommen im Tubulussystem der Niere. Unsere Analyse der Datenbank des KTEA zeigt, dass die Oxidoreduktase POR am häufigsten im S2 Segment vorliegt, das S3 Segment folgt an zweiter Stelle. Cyb5r1 und die Familie der Nox Enzyme wurden in der Niere hingegen nicht detektiert. Vermutlich sind also noch weitere Enzyme für den hohen Wasserstoffperoxidumsatz im S3 verantwortlich, die bisher nicht als proferroptotisch identifiziert wurden. Möglicherweise trägt hierzu auch die hohe Redundanz Wasserstoffperoxid-produzierender Enzyme bei.

Ein weiterer Faktor, der bestimmt, wie sensibel Zellen und Gewebe für Ferroptoseinduktion sind, ist die Anreicherung der Membranen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Insbesondere zwei höhergradig ungesättigte Fettsäuren werden in Zusammenhang mit Ferroptose häufig impliziert, Adrensäure und Arachidonsäure. Letztere ist die bei der Ratte (und bei anderen Säugetieren) am häufigsten vorkommende höhergradig ungesättigte Fettsäure (definiert durch drei oder mehr Doppelbindungen) (163). Salem et al. untersuchten in einer vergleichenden Studie die Fettsäurezusammensetzung verschiedener Gewebe der Ratte mittels Gaschromatographie. Die Daten sind in Abbildung 31 visualisiert. Sie zeigen, dass die Niere ausgesprochen stark mit Arachidonsäure angereichert ist. Während der Anteil der Arachidonsäure an der Gesamtheit der Fettsäuren im Körper nur 1,4% beträgt, macht sie in der Niere fast ein Viertel aller Fettsäuren (23,5%) aus. Adrensäure, die im Hinblick auf den gesamten Körper 0,7% der Fettsäuren stellt, hat in der Niere mit 0,5% hingegen einen unterdurchschnittlichen Anteil. Diese außergewöhnlich starke Anreicherung mit Arachidonsäure macht die Niere vermutlich bereits als ganzes Organ betrachtet anfällig für Lipidperoxidation.

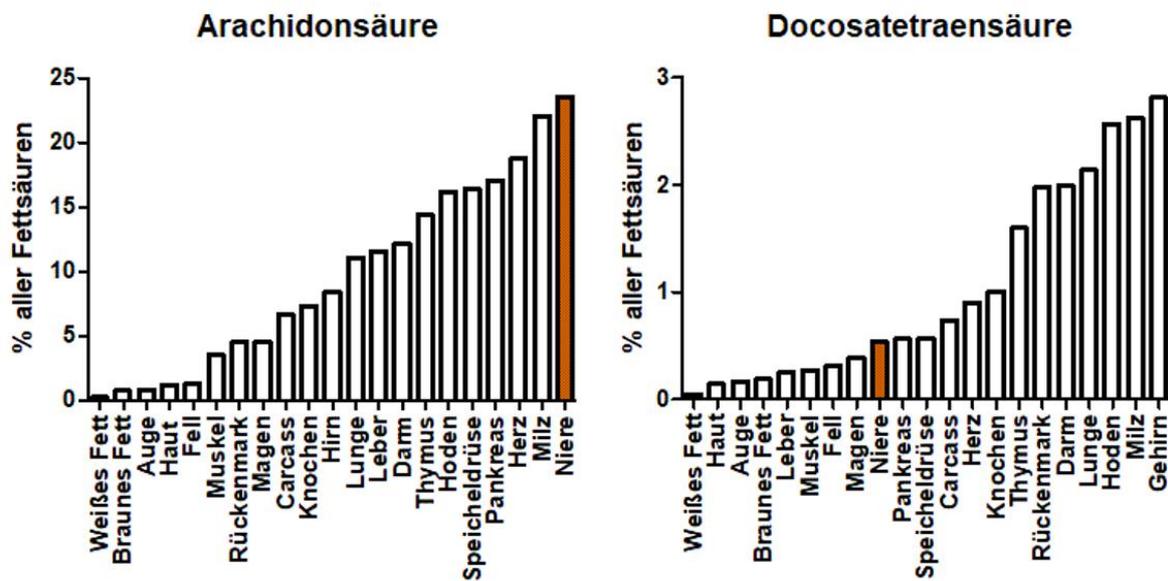


Abbildung 31: Anteil von Arachidonsäure und Docosatetraensäure in verschiedenen Geweben

Grafik anhand der Daten von Salem et al. 2015 (163), die in einer vergleichenden Studie die Fettsäurezusammensetzung verschiedener Gewebe der Ratte mittels Gaschromatographie untersuchten. Angegeben ist der prozentuale Anteil der entsprechenden Fettsäure an der Gesamtheit der Fettsäuren. Die vier Gewebe mit dem insgesamt niedrigsten Fettsäureanteil wurden nicht dargestellt (Harnblase, Plasma, Erythrozyten und Nebenniere).

Bisher liegen keine Studien vor, die vergleichend die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Tubulussegmente durch experimentelle Messung untersuchen. Das Vorkommen verschiedener Lipid-metabolisierender Enzyme lässt jedoch Rückschlüsse auf die Lipidkomposition der Segmente zu. Unseres Wissens nach existieren zwei Stoffwechselwege, die Zellen über die Anreicherung der Membranen mit PUFA für Ferroptose sensibilisieren. Den einen bildet die sequentielle Aktion der beiden Enzyme ACSL4 und LPCAT3, die den Einbau von PUFA in Phosphocholine und Phosphoethanolamine katalysieren. Den anderen stellt die Synthese der stark mit PUFA angereicherten Phospholipidether dar. Während wir kein signifikant unterschiedliches Vorliegen von ACSL4 und LPCAT3 in den Tubulussegmenten nachweisen konnten, deutet unsere Analyse auf eine vermehrte Aktivität des Phospholipidether-Synthese-Stoffwechselwegs im S2 Segment des proximalen Tubulus hin. In Einklang damit steht, dass das S2 Segment besonders reich an Peroxisomen ist, in denen der erste Teil der Phospholipidether-Biosynthese stattfindet (164). Primär isolierte proximale Tubulusepithelien des Hasen sind zudem stark mit Etherphospholipiden angereichert und diese tragen dort entscheidend zum hohen Arachidonsäuregehalt der Membranen bei (165). Vermutlich trägt also eine aussergewöhnlich starke Anreicherung der Membranen des S2

Segments mit Phospholipidethern, und darüber mit PUFA, zur besonderen Ferroptosesensibilität dieses Tubulussegments bei.

Weitere Untersuchungen sind notwendig um zu untersuchen, welcher Anteil des proximalen Tubulus (S1, S2 und S3) besonders anfällig für Ferroptose ist. Unsere Analysen implizieren hinsichtlich des Expressionsniveaus der Gpx4/GSH-Achse, sowie im Hinblick auf für Ferroptose sensibilisierende Eigenschaften insbesondere das S3 und nachrangig das S2-Segment.

4.8 **Tubuläre GPX4-Depletion im Verlauf einer Nierentransplantation**

Während einer Transplantation kommt es unter kontrollierten Bedingungen zu einem IRS der Transplantatniere. Um zu untersuchen, ob sich unsere Beobachtungen im Mausmodell auf den Menschen übertragen lassen, analysierten wir die tubuläre GPX4-Proteinmenge in der Transplantatniere im Verlauf einer NTx. Wir konnten zeigen, dass es dabei zu einem Verlust der GPX4 kommt. Die GPX4 war im Mittel bereits nach der Phase der kalten Ischämie reduziert, einen signifikanten Unterschied zum Ausgangswert konnten wir jedoch nur nach 30-minütiger Reperfusion nachweisen. Der zeitliche Verlauf des Verlustes der GPX4 nach NTx ähnelt damit dem nach IRS im Mausmodell.

Nach der Reperfusion im Empfängerorganismus wirken neben dem ablaufenden IRS auch alloimmune Einflussfaktoren auf die Transplantatniere. Dass diese jedoch bereits 30 Minuten nach Reperfusion einen relevanten Einfluss auf die Proteinmenge der GPX4 haben, erscheint wenig wahrscheinlich. Vermutlich kommt es beim Menschen wie im Mausmodell durch den IRS zu einem Verlust der GPX4 in der Niere.

Es ist bekannt, dass immortalisierte humane proximale Tubulusepithelien auf eine funktionale GPX4 angewiesen sind, um Ferroptose zu verhindern (62). Unter diesem Gesichtspunkt erscheint es wahrscheinlich, dass der Verlust der GPX4 auch beim Menschen zur Ausprägung des IRS beiträgt. Diese Beobachtung bietet eine Rationale für den therapeutischen Einsatz von Ferroptoseinhibitoren, wie zum Beispiel Lip-2, beim renalen IRS des Menschen. Dabei bietet sich insbesondere der Gebrauch als Supplement in Organpräservationslösungen bei der Nierentransplantation als mögliches Einsatzgebiet an. Da die Nieren während der Transplantation explantiert sind, wäre eine medikamentöse Intervention einfach umsetzbar und es könnte sogar auf eine systemische Applikation verzichtet werden.

Zudem sind gute Scoringsysteme etabliert, um das Risiko einer postoperativen VTF abzuschätzen, was die Möglichkeit eröffnet, Interventionsgruppen gezielt einzuschränken (22).

Zwischen der tubulären GPX4-Proteinmenge im Verlauf der Nierentransplantation und der Häufigkeit des Auftretens einer VTF nach Transplantation konnten wir keine signifikante Assoziation nachweisen. Tendenziell ($p = 0,09$) ist die tubuläre GPX4-Proteinmenge nach der Phase der kalten Ischämie in der Gruppe der Patienten, bei denen es später zu einer VTF kommt, geringer. Pathophysiologisch wäre es denkbar, dass Patienten, die nach der kalten Ischämie weniger tubuläre GPX4 aufweisen, im Zuge der Reperfusion eine verstärkte Schädigung erleiden, da sie der ROS-vermittelten Lipidperoxidation nicht entgegensteuern können. Um valide Aussagen treffen zu können, muss unsere Beobachtung jedoch anhand von Studien mit größeren Fallzahlen verifiziert werden.

Ein Faktor, der die Erhebung robuster Daten in diesem Kontext erschwert, steht in Zusammenhang mit der Probengewinnung. Diese erfolgte im Rahmen der Studie vor Explantation des Spenderorgans (T_0) durch subkapsuläre (= streng kortikale) Keilbiopsie. Nach kalter Ischämie (T_1) und nach 30-minütiger Reperfusion (T_2) wurden die Biopsien jeweils mittels einer sterilen 14-Gauge Biopsienadel entnommen, wobei ebenfalls vorrangig kortikale Proben gewonnen wurden. Entsprechend sind auf den meisten entnommenen Biopsien auch Glomeruli zu sehen. Wie wir anhand des IRS-Mausmodells zeigen konnten, ist der Verlust der Gpx4 jedoch am ausgeprägtesten im S3 Segment, das im OSOM lokalisiert ist. Die Region des OSOMs wird allerdings durch die Biopsieverfahren nur eingeschränkt erreicht, weshalb mögliche Effekte vermutlich nur unvollständig erfasst werden.

Zudem erhielten wir die Biopsien als paraffinierte Blöcke, sodass ein quantitativer Nachweis der GPX4 nur auf immunhistochemische Weise möglich war. Eine direkte Messung der GPX4, z.B. mittels Western Blot, wäre vermutlich genauer und würde eine bessere Trennschärfe zwischen den Gruppen ermöglichen.

4.9 **Limitationen dieser Arbeit**

Der Großteil der Erkenntnisse dieser Arbeit wurde in Modellsystemen gewonnen, darunter *in vitro* in Zellkulturmodellen, sowie *in vivo* im Mausmodell. Um Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen, ist es notwendig, kritisch zu hinterfragen, inwieweit verwendete Modelle die humane Physio- und Pathophysiologie abbilden.

Aufgrund ihrer geringen Größe und des kurzen Reproduktionszyklus stellt die Maus das am häufigsten verwendete Tiermodell dar, um menschliche Erkrankungen zu erforschen. Obwohl der Erkenntnisgewinn durch Forschung an Mausmodellen immens ist, scheitert die Translation auf den Menschen häufig. So erzielten 2003 bis 2011 nur ca. 10% der im Rahmen von klinischen Studien untersuchten Substanzen, die zuvor intensiv erforscht und deren Wirksamkeit im Mausmodell belegt wurde, letztlich eine Medikamentenzulassung (166).

Diese Statistik ist nicht weiter verwunderlich, wenn man die großen phänotypischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch betrachtet. Auf genetischer Ebene existieren für ca. 80% der Protein-kodierenden Gene des Menschen ein orthologes Gen der Maus, was bedeutet, dass diese beiden Gene jeweils durch ein Artbildungsereignis (nicht durch Duplikation) aus einem Gen des letzten gemeinsamen Vorfahren entstanden sind (167). Zwischen diesen Orthologen besteht oft eine hohe Konservierung. Doch sogar Mutationen in orthologen Genen rufen bei Maus und Mensch nicht selten unterschiedliche Phänotypen hervor (168).

Nichtsdestotrotz stellt die Maus für viele Regelkreisläufe und Pathologien ein geeignetes Modell dar. Es muss jedoch jeweils im Einzelfall entschieden werden, ob die entsprechenden Prozesse beim Menschen im Organismus der Maus abgebildet werden. Betrachtet man den Kontext der Ferroptose, so sind viele Kreisläufe zwischen Maus und Mensch konserviert. Vergleicht man die Aminosäuresequenz der Gpx4 der Maus (*Mus Musculus*) und die des Menschen mit dem *Uniprot Align Tool*, so ergibt sich eine 93,4% Übereinstimmung, was einer sehr hohen Konservierung entspricht. Die Relevanz verschiedener Schlüsselemente ferroptotischen Zelltods, wie z.B. GPX4, Glutathion, ACSL4, SBP2, PUFAs, Lipoxygenasen, labiles Eisen und Lipidperoxidation wurde zudem jeweils in murinen als auch in humanen Zelllinien belegt (96).

Ein weiteres Problem der Forschung an Mausmodellen betrifft die Generalisierbarkeit der erhobenen Daten. Labortiere, darunter auch die von uns verwendete C57BL/6N Mauslinie, entstammen zum Großteil Inzuchtlinien. Dies bietet den Vorteil, dass Forschungsergebnisse nicht durch genetische Unterschiede verfälscht werden. Gleichzeitig können dadurch Punktmutationen allerdings auch fixiert werden, wodurch es zu Veränderungen des Phänotyps kommen kann, die unter dem geringen Selektionsdruck der Tierzuchtbedingungen möglicherweise nicht auffallen (169).

Für Mausexperimente werden meistens Mäuse eines bestimmten Geschlechtes und Alters verwendet, wodurch die Generalisierbarkeit der Ergebnisse weiter reduziert wird. Die

Tiere sind dabei meist 8-12 Wochen alt, was in etwa einem 20 Jahre alten Menschen entspricht (170). Wie in der Einleitung ausgeführt, sind z.B. Patienten, die sich einer Nierentransplantation unterziehen, zumeist deutlich älter. Ein hohes Alter stellt zudem einen wichtigen Risikofaktor für das Auftreten einer verzögerten Transplantatfunktion dar.

Das von uns verwendete renale IRS-Mausmodell stellt den Standard zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens dar und wurde von unserer Arbeitsgruppe optimiert (127). Die Entstehung des IRS bildet dabei die Prozesse während einer Transplantation in vielen Aspekten gut ab. Es wird allerdings vermutet, dass Schädigung durch IRS auch entscheidend zu verschiedenen anderen Formen der akuten Nierenschädigung beiträgt. Inwieweit sich Erkenntnisse aus dem Modell auch auf die Entstehung einer akuten Nierenschädigung z.B. im Rahmen einer Sepsis anwenden lässt, ist jedoch fraglich.

Noch eingeschränkter als von der Maus auf den Menschen ist die Übertragbarkeit aus einem *in vitro* Experiment auf den lebenden Organismus. Oft scheitert allein die Reproduktion von Ergebnissen, wobei hierfür eine Vielzahl an Fehlerquellen ursächlich sein kann. Ein häufiges Problem ist die Fehlidentifikation oder Kontamination von Zelllinien. Bis heute sind keine flächendeckenden Authentifizierungsprogramme etabliert und Zellen werden häufig von einem Wissenschaftler an den nächsten weitergereicht. Daneben stellen auch Mutationen unter prolongierter Passagierung und Infektionen, so z.B. mit Mykoplasmen, mögliche Fehlerquellen dar.

Im Kontext der Ferroptose ist insbesondere wichtig, dass sich längerfristig kultivierte Zellen in ihrem Lipidom untereinander deutlich stärker ähneln, als gegenüber Zellen des Ursprungsgewebes. Dabei sind die Membranen dieser Zellen im Schnitt nur halb so stark mit PUFA angereichert wie die Membranen frisch isolierter, primärer Zellen (150). Wenn man Rückschlüsse auf ein Gewebe erlauben möchte, so scheint die Verwendung von immortalisierten Zelllinien im Kontext der Ferroptose nicht sinnvoll. Mögliche Effekte werden durch den niedrigen PUFA-Gehalt der Membranen unterschätzt und lassen nur sehr eingeschränkt Rückschlüsse auf das Gewebe zu. Die vorliegende Arbeit ist von den beschriebenen Problematiken, falls nicht anders diskutiert, vollständig betroffen.

4.10 **Ausblick**

Wie eine PubMed-Suche zeigt, steigt die Anzahl der Publikationen, die sich mit Ferroptose beschäftigen, exponentiell an, seitdem der Begriff 2012 durch Dixon et al. geprägt

wurde (61). Die besondere Relevanz der Ferroptose für die Niere wird verdeutlicht, wenn man die Anzahl der Publikationen betrachtet, die sich mit beiden Begriffen beschäftigen. Seitdem die Niere 2014 zum ersten Mal in Zusammenhang mit Ferroptose gebracht wurde, beobachtet man auch hier einen nahezu exponentiellen Anstieg der Publikationen. Die Suchergebnisse über die Zeit sind in Abbildung 32 dargestellt.

Trotz dieses hohen Forschungsinteresses und obwohl protektive Effekte von Ferroptoseinhibitoren bei einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsmodelle demonstriert wurden, finden diese beim Menschen bisher keine Anwendung. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die Behandlung mit dem speziell für den Einsatz beim Menschen optimierten Wirkstoff Lip-2 beim IRS der Niere im Mausmodell einen protektiven Effekt aufweist. Zudem konnten wir mit der Nierentransplantation ein vielversprechendes Einsatzgebiet beim Menschen identifizieren. Dies bildet eine hinreichende Grundlage, um in einem nächsten Schritt im Rahmen von klinischen Studien das therapeutische Potential von Lip-2 beim Menschen weiter zu untersuchen.

Daneben wirft diese Arbeit weitere interessante Forschungsansätze auf. Wir konnten demonstrieren, dass der schnelle Verlust der Gpx4 nach der Reperfusion einen bisher unbekanntem Pathomechanismus darstellt, der die Ausprägung des IRS der Niere vermittelt. Da bereits protektive Effekte von Ferroptoseinhibitoren auch beim IRS von Leber, Gehirn und Dünndarm nachgewiesen wurden, erscheint es möglich, dass es auch bei diesen Organen im Zuge des IRS zu einem Verlust der Gpx4 kommt. Weitere Arbeiten sind notwendig, um zu

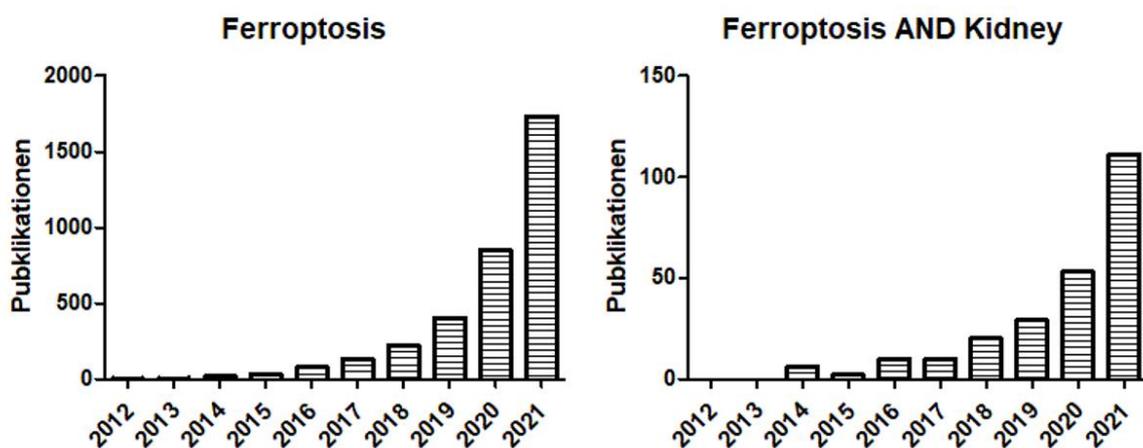


Abbildung 32: Publikationsanalyse zu Ferroptose und der Niere

Anzahl der auf PubMed gelisteten Publikationen mit dem entsprechenden Suchterminus, seitdem der Begriff Ferroptose geprägt wurde.

zeigen, ob der Verlust der Gpx4 möglicherweise einen über verschiedene Organe hinweg konservierten Mechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens darstellt.

Auch die Frage, wie es nach Reperfusion zum schnellen Verlust der Gpx4 kommt, ist bislang nicht zufriedenstellend geklärt. Besonders interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung, ob es im Zuge des IRS in der Niere zu der Entstehung eines oxidativ vernetzten Gpx4-Makromoleküls kommt, wie man es während der Spermatogenese beobachtet. Daneben stellt auch die Untersuchung des Beitrags der CVA zur schnellen Gpx4-Degradation nach IRS einen vielversprechenden Forschungsansatz dar. Denkbar wäre in diesem Kontext z.B. die Induktion eines renalen IRS in einem Autophagie-defizienten Mausmodell (z.B. das von Jiang et al. beschriebene proximal-Tubulus-spezifische *Atg7-Knockout*-Mausmodell) und die anschließende Bestimmung der Gpx4-Proteinkonzentration nach Reperfusion (156).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zwei Ansätze identifizieren, die vermutlich zur besonderen Ferroptosesensibilität der proximalen Tubulusepithelien beitragen. Unsere Analysen deuten auf eine vermehrte Aktivität des Phospholipidether-Synthesestoffwechselwegs im S2 Segment hin, was wiederum eine besonders starke Anreicherung der proximalen Tubulusepithelien mit PUFA (wahrscheinlich insbesondere mit Arachidonsäure) vermuten lässt. Es wäre interessant zu sehen, ob sich diese Beobachtungen experimentell verifizieren lassen, z.B. durch eine lipidomische Analyse von primär isolierten Zellen aus S2 und S3 Segmenten und anschließendem Vergleich mit bekannten primär isolierten Zellpopulationen.

Daneben lassen unsere Analysen vermuten, dass die proximalen Tubulusepithelien und insbesondere das S3 Segment einen außergewöhnlich hohen Wasserstoffperoxidumsatz aufweisen. Kürzlich wurde dies von einer anderen Arbeitsgruppe experimentell bestätigt, wobei bisher kein Bezug zur Ferroptose hergestellt wurde. Es wäre interessant zu untersuchen, welche Stoffwechselwege für den hohen Wasserstoffperoxid Umsatz verantwortlich sind und ob ein gezieltes Ausschalten bestimmter Stoffwechselwege die Ferroptosesensibilität beeinflusst. Ein tieferes Verständnis dieser Prozesse erscheint nicht nur hinsichtlich des IRS der Niere, sondern auch mit Blick auf die anderen Formen der Nierenschädigung, bei denen ein Beitrag der Ferroptose vermutet wird, sinnvoll.

Zusammenfassung

Eine terminale Niereninsuffizienz geht mit einer erheblichen Einschränkung der Lebenserwartung und -qualität einher. Für die meisten Patienten stellt eine Nierentransplantation (NTx) die beste Therapieoption dar. Während der Transplantation kommt es infolge der vorübergehend unterbrochenen Blutversorgung zu einem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) des Spenderorgans. Die Ausprägung dieses Schadens hat einen entscheidenden Einfluss auf das Langzeitergebnis nach Transplantation.

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Ferroptoseinhibitoren sich beim renalen IRS protektiv auswirkt. Es wird daher vermutet, dass diese Form von regulierter Nekrose zur Ausbildung des IRS beiträgt (69). Das S3 Segment des proximalen Tubulus ist besonders anfällig für Schädigung durch Ischämie und Reperfusion (49). Gleichzeitig wird der zentrale Gegenregulator der Ferroptose, die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4), hier sehr stark exprimiert (62). Die proximalen Tubulusepithelien sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf die Funktion der Gpx4 angewiesen, um Ferroptose zu verhindern (62, 110).

Von der Arbeitsgruppe um unseren Kooperationspartner Dr. Marcus Conrad wurde der Ferroptoseinhibitor Liproxstatin-1 (Lip-1) identifiziert (62). Basierend auf Lip-1 entwickelten Conrad, Ingold et al. das *Compound* Lip-2, das Ferroptose spezifisch, im niedrig nanomolaren Konzentrationsbereich hemmt und eine verbesserte *in vivo* Stabilität beim Menschen besitzt. Wir konnten zeigen, dass Lip-2 im Mausmodell beim IRS der Niere einen protektiven Effekt aufweist. Damit können wir das therapeutische Potential dieses speziell für die Anwendung beim Menschen optimierten Wirkstoffs bestätigen.

Um den Mechanismus zu untersuchen, über den Ferroptose zum IRS der Niere beiträgt, analysierten wir die Proteinkonzentration der Gpx4 in einem IRS-Mausmodell. Wir konnten zeigen, dass es in den ersten 30 Minuten nach Reperfusion zu einem Verlust von Gpx4 in der Niere kommt, der während der nächsten 24 Stunden nicht kompensiert wird. Dabei ist insbesondere das S3 Segment des proximalen Tubulus betroffen, wo ab zwei Stunden nach Reperfusion Zelltod mit nekrotischem Phänotyp auftritt. Da die proximalen Tubulusepithelien auf die Funktion der Gpx4 angewiesen sind, um Ferroptose zu verhindern, schlussfolgern wir, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Ereignissen besteht. Belegt wird dies durch den protektiven Effekt von Ferroptoseinhibitoren beim IRS der Niere. Der schnelle

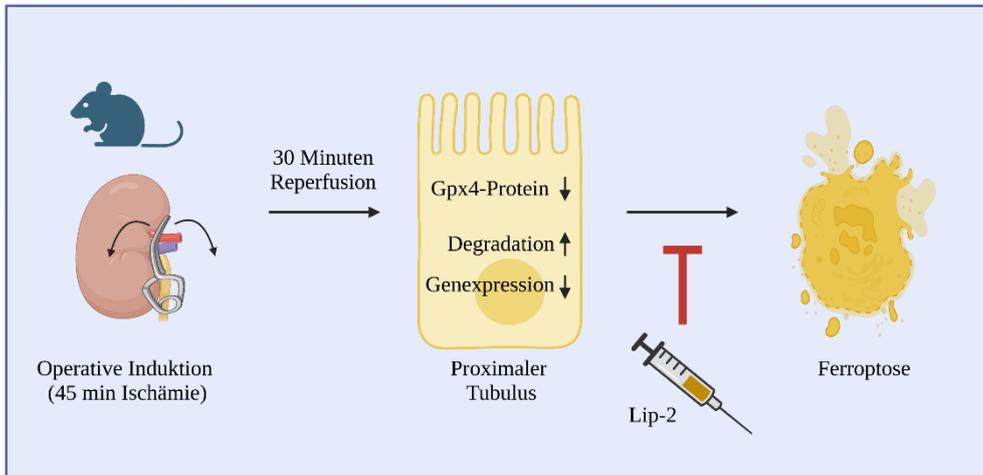
Verlust der Gpx4 nach Reperfusion stellt somit einen bisher unbekanntem Pathomechanismus dar, der zur Ausprägung des IRS der Niere beiträgt.

Mittels RT-qPCR konnten wir zeigen, dass es im Mausmodell nach Reperfusion temporär zu einer verminderten Gpx4-Genexpression in der Niere kommt. Aufgrund von Überlegungen zur zellulären Halbwertszeit der Gpx4 tritt vermutlich zusätzlich eine vermehrte Degradation auf. Im Zellkulturmodell konnten wir demonstrieren, dass intramitochondriales Superoxid, ein wichtiger Mediator des IRS, *in vitro* keine Degradation der Gpx4 vermittelt.

Durch eine Analyse der tubulussegmentspezifischen Proteomics-Datenbank des *Kidney Tubules Expression Atlas* konnten wir zwei Eigenschaften identifizieren, die möglicherweise zur besonderen Ferroptosesensibilität der proximalen Tubulusepithelien beitragen. Unsere Ergebnisse deuten auf eine hohe Aktivität des proferroptotischen Phospholipidether-Synthesewegs im S2 Segment des proximalen Tubulus hin. Darüber hinaus implizieren sie einen hohen Wasserstoffperoxid-Umsatz im S3 Segment.

Um zu untersuchen, ob es auch beim Menschen im Rahmen eines IRS zu einem Verlust der GPX4 in der Niere kommt, analysierten wir serielle Nierenbiopsien im Verlauf einer NTx. Anhand von immunhistochemisch auf GPX4 gefärbten Schnitten konnten wir zeigen, dass die Menge der tubulären GPX4 in der Transplantatniere 30 Minuten nach Reperfusion reduziert ist. Zwischen der tubulären GPX4-Proteinmenge im Verlauf der Transplantation und der Häufigkeit des Auftretens einer verzögerten Transplantatfunktion konnten wir keine signifikante Assoziation nachweisen. Unsere Beobachtungen bieten eine Rationale für den therapeutischen Einsatz von Ferroptoseinhibitoren wie Lip-2 beim renalen IRS des Menschen. Insbesondere die Verwendung als Supplement in Organpräservationslösungen sollte im Rahmen von klinischen Studien weiter untersucht werden.

Ein neuer Pathomechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens der Niere



...mit humaner Relevanz

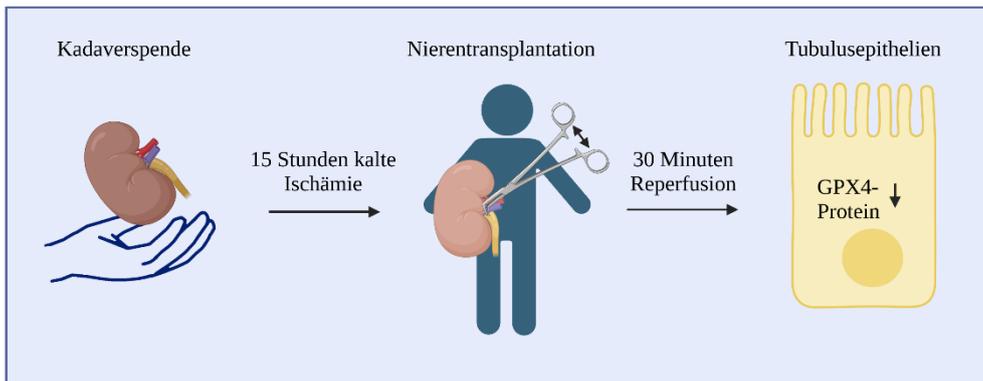


Abbildung 33: Zentrale Erkenntnisse dieser Arbeit

Literatur

1. Ellen F. Carney. The impact of chronic kidney disease on global health. *Nature Reviews Nephrology* 2020; 2020(16):251.
2. Chen L, Clark JZ, Nelson JW, Kaissling B, Ellison DH, Knepper MA. Renal-Tubule Epithelial Cell Nomenclature for Single-Cell RNA-Sequencing Studies. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30(8):1358–64 [Stand: 27.10.2022]. Verfügbar unter: <https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/30/8/1358.full.pdf?with-ds=yes>.
3. KDIGO. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements* 2012; 2(1):1. doi: 10.1038/kisup.2012.1.
4. Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders H-J. Acute kidney injury. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7(1):52. doi: 10.1038/s41572-021-00284-z.
5. Siew ED, Ware LB, Ikizler TA. Biological markers of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(5):810–20. doi: 10.1681/ASN.2010080796.
6. Han WK, Waikar SS, Johnson A, Betensky RA, Dent CL, Devarajan P et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* 2008; 73(7):863–9. doi: 10.1038/sj.ki.5002715.
7. Paola Romagnani, Giuseppe Remuzzi, Richard Glassock, Adeera Levin, Kitty J Jager, Hans-Joachim Anders et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3:17088. doi: 10.1038/nrdp.2017.88.
8. Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, Rosenberg M, Jha V, Zoccali C. A single number for advocacy and communication-worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Kidney Int* 2019; 96(5):1048–50. doi: 10.1016/j.kint.2019.07.012.
9. WHO. Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/ [Abrufsdatum: 01.04.2019].
10. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351(13):1296–305. doi: 10.1056/NEJMoa041031.
11. Jan de Boer. Eurotransplant Manual - Kidney (ETKAS and ESP): Abgerufen unter https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=et_manual am 11.04.2019.
12. Chen Y, Shi J, Xia TC, Xu R, He X, Xia Y. Preservation Solutions for Kidney Transplantation: History, Advances and Mechanisms. *Cell Transplant* 2019; 28(12):1472–89. doi: 10.1177/0963689719872699.
13. Alan J. Wein, Louis R. Kavoussi, Alan W. Partin, Craig A. Peter. *Campbell-Walsh Urology*, 11th Edition.
14. Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int* 2015; 87(2):343–9. doi: 10.1038/ki.2014.304.

15. Kramer A, Pippias M, Stel VS, Bonthuis M, Abad Diez JM, Afentakis N et al. Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2013 ERA-EDTA Registry Annual Report with a focus on diabetes mellitus. *Clin Kidney J* 2016; 9(3):457–69. doi: 10.1093/ckj/sfv151.
16. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant* 2011; 11(10):2093–109. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03686.x.
17. Gemeinsamer Bundesausschuss, MNC - Medical Netcare GmbH Technologiehof Münster. Jahresbericht Datenanalyse Dialyse für den Gemeinsamen Bundesausschuss [Stand: 11.04.2019]. Verfügbar unter: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=13876739&nummer=878&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=11417753.
18. Eurotransplant Statistics Report Library: Titel: 2053P_2018_kidney [Stand: 31.07.2020]. Verfügbar unter: https://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=&search_organ=kidney&search_region=by+country&search_period=2018&search_characteristic=&search_text=&search_collection=.
19. Eurotransplant Statistics Report Library: Titel: 4503P_2018 [Stand: 31.07.2020]. Verfügbar unter: https://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=&search_organ=kidney&search_region=by+country&search_period=2018&search_characteristic=&search_text=&search_collection=.
20. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *The Lancet* 2004; 364(9447):1814–27. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17406-0.
21. Schröppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: From mechanism to translation. *Kidney Int* 2014; 86(2):251–8. doi: 10.1038/ki.2014.18.
22. Irish WD, Ilsley JN, Schnitzler MA, Feng S, Brennan DC. A risk prediction model for delayed graft function in the current era of deceased donor renal transplantation. *Am J Transplant* 2010; 10(10):2279–86. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03179.x.
23. Kers J, Peters-Sengers H, Heemskerk MBA, Berger SP, Betjes MGH, van Zuilen AD et al. Prediction models for delayed graft function: External validation on The Dutch Prospective Renal Transplantation Registry. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 33(7):1259–68. doi: 10.1093/ndt/gfy019.
24. Wu WK, Famure O, Li Y, Kim SJ. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation. *Kidney Int* 2015; 88(4):851–8. doi: 10.1038/ki.2015.190.
25. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: A systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(3):1039–47. doi: 10.1093/ndt/gfn667.
26. Peter Mitchell. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 1961; (191):144–8.

27. Chatauret N, Badet L, Barrou B, Hauet T. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Progrès en Urologie* 2014; 24:S4-S12. doi: 10.1016/S1166-7087(14)70057-0.
28. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10):813–24. doi: 10.1038/nrm2256.
29. Hou T, Wang X, Ma Q, Cheng H. Mitochondrial flashes: new insights into mitochondrial ROS signalling and beyond. *J Physiol* 2014; 592(17):3703–13. doi: 10.1113/jphysiol.2014.275735.
30. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. Oxford United Kingdom: Oxford University Press; 2015 [Stand: 26.08.2021].
31. Jay L, Zweier, John T, Flaherty and Myron L. Weisfeldt. Direct measurement of free radical regeneration following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1987 [Stand: 11.12.2020]. Verfügbar unter: <https://www.pnas.org/content/pnas/84/5/1404.full.pdf>.
32. Carmen M. Arroyo, Jay H. Kramer, Benjamin F. Dickens and William B. Weglicki. Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Letters*; 1987.
33. Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab* 2016; 23(2):254–63. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.009.
34. Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med* 2013; 19(6):753–9. doi: 10.1038/nm.3212.
35. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014; 515(7527):431–5. doi: 10.1038/nature13909.
36. Loor G, Kondapalli J, Iwase H, Chandel NS, Waypa GB, Guzy RD et al. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1813(7):1382–94. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.008.
37. Robb EL, Hall AR, Prime TA, Eaton S, Szibor M, Viscomi C et al. Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I. *J Biol Chem* 2018; 293(25):9869–79. doi: 10.1074/jbc.RA118.003647.
38. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417(1):1–13. doi: 10.1042/BJ20081386.
39. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995; 270(22):13399–405. doi: 10.1074/jbc.270.22.13399.
40. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research* 2012; 46(4):382–419. doi: 10.3109/10715762.2011.653969.
41. J. Aikens TD. Perohydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *Biol Chem*.

42. Mishina NM, Bogdanova YA, Ermakova YG, Panova AS, Kotova DA, Bilan DS et al. Which Antioxidant System Shapes Intracellular H₂O₂ Gradients? *Antioxid Redox Signal* 2019; 31(9):664–70. doi: 10.1089/ars.2018.7697.
43. Bienert GP, Møller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 2007; 282(2):1183–92. doi: 10.1074/jbc.M603761200.
44. Joachim Rassow, Karin Hauser, Roland Netzker, Rainer Deutzmann. *Duale Reihe Biochemie*. 3. Auflage: Thieme.
45. Bernard L. Trumpower. The protonmotive Q Cycle. *Biol Chem* 1990; (Vol 265, No. 20):11409–12.
46. Quinlan CL, Gerencser AA, Treberg JR, Brand MD. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle. *J Biol Chem* 2011; 286(36):31361–72. doi: 10.1074/jbc.M111.267898.
47. M Takada, S Ikenoya, T Yuzuriha and Kouichi Katayama. Studies on reduced and oxidized coenzyme Q (ubiquinones). II. The determination of oxidation-reduction levels of coenzyme Q in mitochondria, microsomes and plasma by high performance liquid chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1982.
48. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002; 80(5):780–7. doi: 10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x.
49. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int* 1978; 14(1):31–49. doi: 10.1038/ki.1978.87.
50. P. F. SHANLEY, M. D. ROSEN, M. BREZIS, P. SILVA, F. H. EPSTEIN, and S. ROSEN. Topography of Focal Proximal Tubular Necrosis After Ischemia With Reflow in the Rat Kidney. *Am J Pathol* 1986; (122):462–8.
51. Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 66(2):871–83. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00818.x.
52. Ashworth SL, Southgate EL, Sandoval RM, Meberg PJ, Bamburg JR, Molitoris BA. ADF/cofilin mediates actin cytoskeletal alterations in LLC-PK cells during ATP depletion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(4):F852–62. doi: 10.1152/ajprenal.00210.2002.
53. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7(4):189–200. doi: 10.1038/nrneph.2011.16.
54. Molitoris BA, Geerdes A, McIntosh JR. Dissociation and redistribution of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase from its surface membrane actin cytoskeletal complex during cellular ATP depletion. *J Clin Invest* 1991; 88(2):462–9. doi: 10.1172/JCI115326.
55. Anna Zuk, Joseph V. Bonventre, Dennis Brown, and Karl S. Matlin. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney.
56. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011; 121(11):4210–21. doi: 10.1172/JCI45161.

57. Scholz H, Boivin FJ, Schmidt-Ott KM, Bachmann S, Eckardt K-U, Scholl UI et al. Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection. *Nat Rev Nephrol* 2021; 17(5):335–49. doi: 10.1038/s41581-021-00394-7.
58. S. Bagnasco, D. Good, R. Balaban, and M. Burg. Lactate production in isolated segments of the rat nephron.
59. Linkermann A, Bräsen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller J-O et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(29):12024–9. doi: 10.1073/pnas.1305538110.
60. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019; 43(6):582–92. doi: 10.1002/cbin.11137.
61. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012; 149(5):1060–72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
62. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol* 2014; 16(12):1180–91. doi: 10.1038/ncb3064.
63. F. Ursini, M. Maiorino. M. Valente *. L. Ferri and C. Gregolin. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1982(710):197-21.
64. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 2014; 156(1-2):317–31. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
65. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016; 26(3):165–76. doi: 10.1016/j.tcb.2015.10.014.
66. Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, da Silva MC, Ingold I et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* 2019; 575(7784):693–8. doi: 10.1038/s41586-019-1707-0.
67. Zilka O, Shah R, Li B, Friedmann Angeli JP, Griesser M, Conrad M et al. On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent Sci* 2017; 3(3):232–43. doi: 10.1021/acscentsci.7b00028.
68. Kraft VAN, Bezzian CT, Pfeiffer S, Ringelstetter L, Müller C, Zandkarimi F et al. GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling. *ACS Cent Sci* 2020; 6(1):41–53 [Stand: 20.03.2022]. Verfügbar unter: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acscentsci.9b01063>.
69. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, Zen F de et al. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(47):16836–41. doi: 10.1073/pnas.1415518111.
70. Tuo Q-Z, Lei P, Jackman KA, Li X-L, Xiong H, Liuyang Z-Y et al. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. *Mol Psychiatry* 2017; 22(11):1520–30. doi: 10.1038/mp.2017.171.

71. Gao M, Monian P, Quadri N, Ramasamy R, Jiang X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. *Mol Cell* 2015; 59(2):298–308. doi: 10.1016/j.molcel.2015.06.011.
72. Do Van B, Gouel F, Jonneaux A, Timmerman K, Gelé P, Pétrault M et al. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiol Dis* 2016; 94:169–78. doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.011.
73. Alvarez SW, Sviderskiy VO, Terzi EM, Papagiannakopoulos T, Moreira AL, Adams S et al. NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis. *Nature* 2017; 551(7682):639–43. doi: 10.1038/nature24637.
74. Shen Z, Song J, Yung BC, Zhou Z, Wu A, Chen X. Emerging Strategies of Cancer Therapy Based on Ferroptosis. *Adv Mater Weinheim* 2018; 30(12):e1704007. doi: 10.1002/adma.201704007.
75. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem Rev* 2011; 111(10):5944–72. doi: 10.1021/cr200084z.
76. Maillard B, Ingold KU, Scaiano JC. Rate constants for the reactions of free radicals with oxygen in solution. *J. Am. Chem. Soc.* 1983; 105(15):5095–9. doi: 10.1021/ja00353a039.
77. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(34):E4966–75. doi: 10.1073/pnas.1603244113.
78. Conrad M, Pratt DA. The chemical basis of ferroptosis. *Nat Chem Biol* 2019; 15(12):1137–47. doi: 10.1038/s41589-019-0408-1.
79. Haeggström JZ, Funk CD. Lipoxygenase and leukotriene pathways: Biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev* 2011; 111(10):5866–98. doi: 10.1021/cr200246d.
80. Wenzel SE, Tyurina YY, Zhao J, St Croix CM, Dar HH, Mao G et al. PEBP1 Wardens Ferroptosis by Enabling Lipoxygenase Generation of Lipid Death Signals. *Cell* 2017; 171(3):628–641.e26. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.044.
81. Shah R, Shchepinov MS, Pratt DA. Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. *ACS Cent Sci* 2018; 4(3):387–96. doi: 10.1021/acscentsci.7b00589.
82. Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22(4):266–82. doi: 10.1038/s41580-020-00324-8.
83. Agmon E, Solon J, Bassereau P, Stockwell BR. Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. *Sci Rep* 2018; 8(1):5155. doi: 10.1038/s41598-018-23408-0.
84. Dixon SJ, Winter GE, Musavi LS, Lee ED, Snijder B, Rebsamen M et al. Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chem Biol* 2015; 10(7):1604–9. doi: 10.1021/acscchembio.5b00245.
85. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol* 2017; 13(1):91–8. doi: 10.1038/nchembio.2239.
86. Doll S, Conrad M. Iron and ferroptosis: A still ill-defined liaison. *IUBMB Life* 2017; 69(6):423–34. doi: 10.1002/iub.1616.

87. Yilong Zou, Whitney S. Henry, Emily L. Ricq, Emily T. Graham, Vaishnavi V. Phadnis, Pema Maretich et al. Plasticity of ether lipids promotes ferroptosis susceptibility and evasion.
88. Riddick DS, Ding X, Wolf CR, Porter TD, Pandey AV, Zhang Q-Y et al. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: roles in physiology, pharmacology, and toxicology. *Drug Metab Dispos* 2013; 41(1):12–23. doi: 10.1124/dmd.112.048991.
89. Zou Y, Li H, Graham ET, Deik AA, Eaton JK, Wang W et al. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. *Nat Chem Biol* 2020; 16(3):302–9. doi: 10.1038/s41589-020-0472-6.
90. Yan B, Ai Y, Sun Q, Ma Y, Cao Y, Wang J et al. Membrane Damage during Ferroptosis Is Caused by Oxidation of Phospholipids Catalyzed by the Oxidoreductases POR and CYB5R1. *Mol Cell* 2021; 81(2):355-369.e10. doi: 10.1016/j.molcel.2020.11.024.
91. Carlson BA, Tobe R, Yefremova E, Tsuji PA, Hoffmann VJ, Schweizer U et al. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox Biol* 2016; 9:22–31. doi: 10.1016/j.redox.2016.05.003.
92. Wortmann M, Schneider M, Pircher J, Hellfritsch J, Aichler M, Vegi N et al. Combined deficiency in glutathione peroxidase 4 and vitamin E causes multiorgan thrombus formation and early death in mice. *Circ Res* 2013; 113(4):408–17. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.279984.
93. Wirth EK, Bharathi BS, Hatfield D, Conrad M, Brielmeier M, Schweizer U. Cerebellar hypoplasia in mice lacking selenoprotein biosynthesis in neurons. *Biol Trace Elem Res* 2014; 158(2):203–10. doi: 10.1007/s12011-014-9920-z.
94. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab* 2008; 8(3):237–48. doi: 10.1016/j.cmet.2008.07.005.
95. Chen L, Hambright WS, Na R, Ran Q. Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. *J Biol Chem* 2015; 290(47):28097–106. doi: 10.1074/jbc.M115.680090.
96. Conrad M, Kagan VE, Bayir H, Pagnussat GC, Head B, Traber MG et al. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes Dev* 2018; 32(9-10):602–19. doi: 10.1101/gad.314674.118.
97. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kölle S, Roveri A et al. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 2005; 25(17):7637–44. doi: 10.1128/MCB.25.17.7637-7644.2005.
98. Hatfield DL, Schweizer U, Tsuji P, Gladyshev VN, Hrsg. *Selenium: - Its Molecular Biology and Role in Human Health*. 4th edition: Springer; 2016.
99. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J et al. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1999; 285(5432):1393–6. doi: 10.1126/science.285.5432.1393.
100. Maiorino M, Roveri A, Benazzi L, Bosello V, Mauri P, Toppo S et al. Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a

- new substrate of the selenoperoxidase. *J Biol Chem* 2005; 280(46):38395–402. doi: 10.1074/jbc.M505983200.
101. Schneider M, Förster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F et al. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J* 2009; 23(9):3233–42. doi: 10.1096/fj.09-132795.
 102. Liang H, Yoo S-E, Na R, Walter CA, Richardson A, Ran Q. Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *J Biol Chem* 2009; 284(45):30836–44. doi: 10.1074/jbc.M109.032839.
 103. Maiorino M, Conrad M, Ursini F. GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues. *Antioxid Redox Signal* 2018; 29(1):61–74. doi: 10.1089/ars.2017.7115.
 104. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1830(5):3143–53. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
 105. Stephen O. Slusser, Lee W. Grotyohann, Louis F. Martin, and Russell C. Scaduto, JR. Glutathione catabolism by the ischemic rat kidney.
 106. E. Herrera CB. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2001; (57):43–56.
 107. Gatto VJ, Elnagar HY, Moehle WE, Schneller ER. Redesigning alkylated diphenylamine antioxidants for modern lubricants. *Lubrication Science* 2007; 19(1):25–40. doi: 10.1002/lis.28.
 108. Chung KT. Occurrence, uses, and carcinogenicity of arylamines. *Front Biosci (Elite Ed)*; 2015 Jan 1(7):322–45.
 109. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol* 2012; 2(2):1303–53 [Stand: 22.05.2022]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3919808/pdf/nihms545925.pdf>.
 110. Adedoyin O, Boddu R, Traylor A, Lever JM, Bolisetty S, George JF et al. Heme oxygenase-1 mitigates ferroptosis in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018; 314(5):F702-F714. doi: 10.1152/ajprenal.00044.2017.
 111. Li Y, Feng D, Wang Z, Zhao Y, Sun R, Tian D et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. *Cell Death Differ* 2019; 26(11):2284–99 [Stand: 04.05.2022]. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41418-019-0299-4.pdf>.
 112. Tuo Q-Z, Lei P, Jackman KA, Li X-L, Xiong H, Liuyang Z-Y et al. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. *Mol Psychiatry* 2017; 22(11):1520–30 [Stand: 22.05.2022]. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/mp2017171.pdf>.
 113. Panizo N, Rubio-Navarro A, Amaro-Villalobos JM, Egado J, Moreno JA. Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches to Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press Res* 2015; 40(5):520–32. doi: 10.1159/000368528.
 114. Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Palomino-Antolín A, Rubio-Navarro A, Vázquez-Carballo C, Herencia C et al. Curcumin reduces renal damage associated with rhabdomyolysis by decreasing ferroptosis-mediated cell death. *FASEB J* 2019;

- 33(8):8961–75 [Stand: 04.05.2022]. Verfügbar unter: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1096/fj.201900077R?download=true>.
115. Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, Carrasco S, Cannata-Ortiz P, Sanchez-Niño MD et al. Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(1):218–29 [Stand: 04.05.2022]. Verfügbar unter: <https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/28/1/218.full.pdf?with-ds=yes>.
116. van Raaij S, van Swelm R, Bouman K, Cliteur M, van den Heuvel MC, Pertijs J et al. Tubular iron deposition and iron handling proteins in human healthy kidney and chronic kidney disease. *Sci Rep* 2018; 8(1):9353 [Stand: 04.05.2022]. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27107-8.pdf>.
117. Tsugawa H, Ikeda K, Takahashi M, Satoh A, Mori Y, Uchino H et al. A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nat Biotechnol* 2020; 38(10):1159–63. doi: 10.1038/s41587-020-0531-2.
118. Ikeda Y, Enomoto H, Tajima S, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K et al. Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 304(7):F1028–36. doi: 10.1152/ajprenal.00473.2012.
119. Ikeda Y, Ozono I, Tajima S, Imao M, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y et al. Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *PLoS One* 2014; 9(2):e89355 [Stand: 22.05.2022]. Verfügbar unter: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0089355&type=printable>.
120. Zhang X, Li X. Abnormal Iron and Lipid Metabolism Mediated Ferroptosis in Kidney Diseases and Its Therapeutic Potential. *Metabolites* 2022; 12(1) [Stand: 04.05.2022]. Verfügbar unter: https://mdpi-res.com/d_attachment/metabolites/metabolites-12-00058/article_deploy/metabolites-12-00058-v3.pdf?version=1642479787.
121. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem* 2017; 86:193–224. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908.
122. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol* 2016; 26(1):6–16. doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.010.
123. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(6):365–81. doi: 10.1038/s41580-018-0001-6.
124. Wu Z, Geng Y, Lu X, Shi Y, Wu G, Zhang M et al. Chaperone-mediated autophagy is involved in the execution of ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116(8):2996–3005. doi: 10.1073/pnas.1819728116.
125. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* 2012; 22(8):407–17. doi: 10.1016/j.tcb.2012.05.006.
126. Chen X, Yu C, Kang R, Kroemer G, Tang D. Cellular degradation systems in ferroptosis. *Cell Death Differ* 2021. doi: 10.1038/s41418-020-00728-1.
127. Marschner JA, Schäfer H, Holderied A, Anders H-J. Optimizing Mouse Surgery with Online Rectal Temperature Monitoring and Preoperative Heat Supply. Effects on Post-Ischemic Acute Kidney Injury. *PLoS One* 2016; 11(2):e0149489. doi: 10.1371/journal.pone.0149489.

128. Invitrogen. Produktinformation: MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator for live-cell imaging (M36008); 2005. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp36008.pdf>.
129. Wohlfahrtova M, Brabcova I, Zelezny F, Balaz P, Janousek L, Honsova E et al. Tubular atrophy and low netrin-1 gene expression are associated with delayed kidney allograft function. *Transplantation* 2014; 97(2):176–83. doi: 10.1097/TP.0b013e3182a95d04.
130. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio Protoc* 2019; 9(24) [Stand: 03.05.2022]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6924920/pdf/BioProtoc-9-24-3465.pdf>.
131. Limbutara K, Chou C-L, Knepper MA. Quantitative Proteomics of All 14 Renal Tubule Segments in Rat. *J Am Soc Nephrol* 2020; 31(6):1255–66. doi: 10.1681/ASN.2020010071.
132. Angeli JPF, Shah R, Pratt DA, Conrad M. Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci* 2017; 38(5):489–98. doi: 10.1016/j.tips.2017.02.005.
133. ssniff. Composition Diet [Stand: 12.02.2022]. Verfügbar unter: <https://www.ssniff.de/documents/01-1%20%20DE%20RM%20&%20low%20phyt.pdf>.
134. Linkermann A, Bräsen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller J-O et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(29):12024–9 [Stand: 19.01.2022]. Verfügbar unter: <https://www.pnas.org/content/pnas/110/29/12024.full.pdf>.
135. Mathieson T, Franken H, Kosinski J, Kurzawa N, Zinn N, Sweetman G et al. Systematic analysis of protein turnover in primary cells. *Nat Commun* 2018; 9(1):689. doi: 10.1038/s41467-018-03106-1.
136. Wei P, Hao L, Ma F, Yu Q, Buchberger AR, Lee S et al. Urinary metabolomic and proteomic analyses in a mouse model of prostatic inflammation. *URINE* 2019; 1:17–23. doi: 10.1016/j.urine.2020.05.002.
137. Malagrino PA, Venturini G, Yogi PS, Dariolli R, Padilha K, Kiers B et al. Proteome analysis of acute kidney injury - Discovery of new predominantly renal candidates for biomarker of kidney disease. *J Proteomics* 2017; 151:66–73. doi: 10.1016/j.jprot.2016.07.019.
138. Ingold I, Berndt C, Schmitt S, Doll S, Poschmann G, Buday K et al. Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell* 2018; 172(3):409–422.e21. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.048.
139. Khundmiri SJ, Chen L, Lederer ED, Yang C-R, Knepper MA. Transcriptomes of Major Proximal Tubule Cell Culture Models. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32(1):86–97. doi: 10.1681/ASN.2020010009.
140. Wang Y, Quan F, Cao Q, Lin Y, Yue C, Bi R et al. Quercetin alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis. *J Adv Res* 2021; 28:231–43. doi: 10.1016/j.jare.2020.07.007.

141. Stefan Dröse and Ulrich Brandt, Hrsg. *Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain*. New York, NY: Springer New York; 2012. (Advances in Experimental Medicine and Biology; Bd. 748) [Stand: 24.07.2022].
142. Dudkina NV, Kouril R, Peters K, Braun H-P, Boekema EJ. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1797(6-7):664–70. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.12.013.
143. Park WH, Han YW, Kim SH, Kim SZ. An ROS generator, antimycin A, inhibits the growth of HeLa cells via apoptosis. *J Cell Biochem* 2007; 102(1):98–109. doi: 10.1002/jcb.21280.
144. Mauri P, Benazzi L, Flohé L, Maiorino M, Pietta PG, Pilawa S et al. Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS. *Biol Chem* 2003; 384(4):575–88. doi: 10.1515/BC.2003.065.
145. Seligman J, Newton GL, Fahey RC, Shalgi R, Kosower NS. Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. *J Androl* 2005; 26(5):629–37; discussion 638–40 [Stand: 17.03.2021]. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.2164/jandrol.05040?download=true>.
146. Flohé L. Selenium in mammalian spermiogenesis. *Biol Chem* 2007; 388(10):987–95. doi: 10.1515/BC.2007.112.
147. McCoy RN, Hill KE, Ayon MA, Stein JH, Burk RF. Oxidant stress following renal ischemia: changes in the glutathione redox ratio. *Kidney Int* 1988; 33(4):812–7. doi: 10.1038/ki.1988.72.
148. Yang L, Chen X, Yang Q, Chen J, Huang Q, Yao L et al. Broad Spectrum Deubiquitinase Inhibition Induces Both Apoptosis and Ferroptosis in Cancer Cells. *Front Oncol* 2020; 10:949. doi: 10.3389/fonc.2020.00949.
149. Paller MS, Neumann TV. Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kidney Int* 1991; 40(6):1041–9. doi: 10.1038/ki.1991.312.
150. Symons JL, Cho K-J, Chang JT, Du G, Waxham MN, Hancock JF et al. Lipidomic atlas of mammalian cell membranes reveals hierarchical variation induced by culture conditions, subcellular membranes, and cell lineages. *Soft Matter* 2021; 17(2):288–97. doi: 10.1039/d0sm00404a.
151. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; 23(16):2891–906. doi: 10.1038/sj.onc.1207521.
152. Jennings P, Aydin S, Bennett J, McBride R, Weiland C, Tuite N et al. Inter-laboratory comparison of human renal proximal tubule (HK-2) transcriptome alterations due to Cyclosporine A exposure and medium exhaustion. *Toxicol In Vitro* 2009; 23(3):486–99. doi: 10.1016/j.tiv.2008.12.023.
153. Chen C, Wang D, Yu Y, Zhao T, Min N, Wu Y et al. Legumain promotes tubular ferroptosis by facilitating chaperone-mediated autophagy of GPX4 in AKI. *Cell Death Dis* 2021; 12(1):65. doi: 10.1038/s41419-020-03362-4.
154. Decuypere J-P, Ceulemans LJ, Agostinis P, Monbaliu D, Naesens M, Pirenne J et al. Autophagy and the Kidney: Implications for Ischemia-Reperfusion Injury and Therapy. *Am J Kidney Dis* 2015; 66(4):699–709. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.05.021.

155. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Kaimori J-Y, Matsui I, Namba T et al. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(5):902–13. doi: 10.1681/ASN.2010070705.
156. Jiang M, Wei Q, Dong G, Komatsu M, Su Y, Dong Z. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. *Kidney Int* 2012; 82(12):1271–83. doi: 10.1038/ki.2012.261.
157. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 2017; 11:613–9. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
158. Peskin AV, Low FM, Paton LN, Maghzal GJ, Hampton MB, Winterbourn CC. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J Biol Chem* 2007; 282(16):11885–92. doi: 10.1074/jbc.M700339200.
159. Dalla Rizza J, Randall LM, Santos J, Ferrer-Sueta G, Denicola A. Differential parameters between cytosolic 2-Cys peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2. *Protein Sci* 2019; 28(1):191–201. doi: 10.1002/pro.3520.
160. Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1790(11):1486–500. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.04.007.
161. Zeida A, Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Denicola A, Estrin DA, Radi R. Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols. *Chem Rev* 2019; 119(19):10829–55. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00371.
162. Tang-Dong Liao, Pabo A. Ortiz, Mariela Mendez. Monitoring Hydrogen Peroxide (H₂O₂) in live kidneys by Multiphoton Microscopy and genetically encoded probes. *FASEB J*; 2019. Verfügbar unter: https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.748.3
163. Salem NM, Lin YH, Moriguchi T, Lim SY, Salem N, Hibbeln JR. Distribution of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids in the whole rat body and 25 compartments. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2015; 100:13–20. doi: 10.1016/j.plefa.2015.06.002.
164. Guder WG, Ross BD. Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int* 1984; 26(2):101–11. doi: 10.1038/ki.1984.143.
165. Portilla D, Creer MH. Plasmalogen phospholipid hydrolysis during hypoxic injury of rabbit proximal tubules. *Kidney Int* 1995; 47(4):1087–94. doi: 10.1038/ki.1995.155.
166. Breschi A, Gingeras TR, Guigó R. Comparative transcriptomics in human and mouse. *Nat Rev Genet* 2017; 18(7):425–40. doi: 10.1038/nrg.2017.19.
167. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* 2014; 515(7527):355–64. doi: 10.1038/nature13992.
168. Ben-Yang Liao and Jianzhi Zhang. Null mutations in human and mouse orthologs frequently result in different phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; (105).

169. Zeldovich L. Genetic drift: the ghost in the genome. *Lab Anim (NY)* 2017; 46(6):255–7 [Stand: 24.05.2021]. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/labam.1275.pdf>.
170. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* 2016; 152:244–8. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.025.

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Hans-Joachim Anders danken, ohne dessen Führung und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Seine Leidenschaft für die Wissenschaft hat mich stets inspiriert.

Mein großer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Marc Weidenbusch, der mich in die Methodik wissenschaftlicher Arbeit eingeführt hat und entscheidend am Konzept dieser Arbeit beteiligt war.

Dr. Marcus Conrad möchte ich meinen besonderen Dank dafür aussprechen, dass ich einen Teil meiner Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Helmholtz Zentrum München durchführen durfte. Als Koryphäe auf dem Gebiet der Zelltodforschung hat der Austausch mit ihm den Verlauf dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Bettina Proneth, Dr. Irina Ingold, Dr. Sebastian Doll und Dr. Katalin Buday für die umfangreiche Unterstützung und Anleitung vor Ort, sowie die angenehme Zusammenarbeit.

Dr. Julian Marschner möchte ich meinen herzlichen Dank dafür aussprechen, dass er mir mit großer Geduld und Fachkenntnis eine Vielzahl an Methoden vermittelt hat, wobei insbesondere sein Beitrag zu den operativen Mausmodellen hervorzuheben ist.

Daneben möchte ich mich auch bei Janina Mandelbaum und Dan Draganovici für die technische Unterstützung bei der Anfertigung histologischer Schnitte und Färbungen bedanken. Mein Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden Moritz Hernandez, Lukas Rath, Jakob Molnar und Alexandra Lindenthal, die stets für eine gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und denen ich freundschaftlich verbunden bleibe.

Dr. Mariana Wohlfahrtová möchte ich für die Bereitstellung der Patientenbiopsien meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Für die Förderung im Rahmen des „FöFoLe“-Programms möchte ich mich stellvertretend bei Herrn Prof. Dr. Gudermann bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung bedanken. Insbesondere möchte ich Leonie Hörmann und meinem Bruder Franz Bauernschmitt für das Lektorat der Arbeit danken. Klara Eglseer danke ich für ihre große Geduld während der Fertigstellung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Ute und Rüdiger, die mich mein Leben lang mit Rat und Tat unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle der Glutathionperoxidase 4 bei der Ausbildung des renalen Ischämie-Reperfusions-Schadens“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schriftmaterial ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Johannes Bauernschmitt

München, den 10.05.2023

Übereinstimmungserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle der Glutathionperoxidase 4 bei der Ausbildung des renalen Ischämie-Reperfusions-Schadens“

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Johannes Bauernschmitt

München, den 10.05.2023